

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-527850

(P2023-527850A)

(43)公表日 令和5年6月30日(2023.6.30)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 M	1/00 (2006.01)	C 1 2 M	1/00	A Z N A	2 G 0 5 8
C 1 2 Q	1/6851(2018.01)	C 1 2 Q	1/6851	Z	4 B 0 2 9
C 1 2 Q	1/34 (2006.01)	C 1 2 Q	1/34		4 B 0 6 3
G 0 1 N	37/00 (2006.01)	G 0 1 N	37/00	1 0 2	
G 0 1 N	35/08 (2006.01)	G 0 1 N	35/08	A	
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全194頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2022-573175(P2022-573175)	(71)出願人	521475598
(86)(22)出願日	令和3年5月28日(2021.5.28)		マンモス バイオサイエンス インコーポレイテッド
(85)翻訳文提出日	令和5年1月27日(2023.1.27)		アメリカ合衆国 9 4 0 0 5 カリフォルニア州 プリスベン マリーナ ブールバード 1 0 0 0 スイート 6 0 0
(86)国際出願番号	PCT/US2021/035031	(74)代理人	100102978
(87)国際公開番号	WO2021/243308		弁理士 清水 初志
(87)国際公開日	令和3年12月2日(2021.12.2)	(74)代理人	100102118
(31)優先権主張番号	63/032,455		弁理士 春名 雅夫
(32)優先日	令和2年5月29日(2020.5.29)	(74)代理人	100160923
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 山口 裕孝
(31)優先権主張番号	63/113,798	(74)代理人	100119507
(32)優先日	令和2年11月13日(2020.11.13)		弁理士 刑部 俊
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100142929
(31)優先権主張番号	63/151,592		
最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 プログラム可能ヌクレアーゼ診断デバイス

(57)【要約】

本開示は、様々な診断デバイスを提供する。本デバイスは、少なくとも1つの目的の配列を含み得るサンプルを受け取るように構成されたサンプル境界面と；サンプル境界面及び検出チャンバと流体連通するチャンネルであって、当該チャンネルは、サンプルを複数の液滴に分離するための1つまたは複数の可動機構を含み、当該検出チャンバは、複数の液滴を受け取り、当該検出チャンバの表面上に配置された少なくとも1つのプログラム可能ヌクレアーゼプローブと接触するように構成され、当該少なくとも1つのプログラム可能ヌクレアーゼプローブは、プログラム可能ヌクレアーゼと複合化されたガイド核酸を含み得る、チャンネルと；当該少なくとも1つのプログラム可能ヌクレアーゼプローブによる当該少なくとも1つの目的の配列の標的核酸領域の切断時に生成されるシグナルを検出することによって、当該少なくとも1つの目的の配列の存在を決定する複数のセンサーとを含み得る。

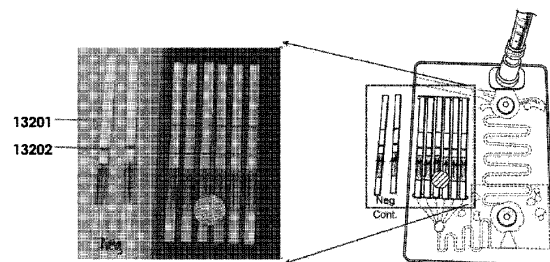


FIG. 132

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a. 標的核酸を含むサンプルを受け取るように構成された、サンプル境界面、
b. 前記サンプル境界面と流体連通し、前記サンプル境界面を介して受け取った前記サンプルを増幅するように構成された、加熱領域、
c. 前記加熱領域と流体連通する検出領域、ならびに
d. 前記サンプル境界面内、前記加熱領域内、及び／または前記検出領域内に配置された、プログラム可能ヌクレアーゼプローブを含む、標的核酸を検出するためのデバイスであって；

シグナルが、前記加熱領域内、前記サンプル境界面内、及び／または前記検出領域内の前記プログラム可能ヌクレアーゼプローブと前記標的核酸との間の選択的結合を介して生成され；

前記検出領域が、前記標的核酸の存在に対応する前記シグナルを検出するように構成され；かつ

前記標的核酸の存在または非存在が、前記サンプルが前記サンプル境界面で受け取られた後、30分未満の時間内に決定される、前記デバイス。

【請求項 2】

増幅試薬を含む試薬ミックスをさらに含む、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 3】

前記試薬ミックスが凍結乾燥されている、請求項 2 に記載のデバイス。

【請求項 4】

前記試薬ミックスが、前記サンプル境界面と前記加熱領域の両方と流体連通する前記デバイスの領域に位置する、請求項 2 または 3 に記載のデバイス。

【請求項 5】

前記試薬ミックスが、前記サンプル境界面内、前記加熱領域内、前記検出領域内、及び／または前記サンプル境界面と前記加熱領域の間の領域内に位置する、請求項 2 から 4 のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項 6】

前記加熱領域が増幅試薬を含む、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 7】

前記サンプルが、ループ媒介等温増幅（LAMP）を介して増幅される、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 8】

前記加熱領域が、等温または非サイクル温度プロファイルを維持するように構成されている、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 9】

前記等温または非サイクル温度プロファイルが約 30℃ から約 60℃ の間である、請求項 8 に記載のデバイス。

【請求項 10】

前記等温または非サイクル温度プロファイルが約 55℃ から約 60℃ の間である、請求項 8 に記載のデバイス。

【請求項 11】

前記サンプル境界面が、前記サンプルを含むスワブを受け取るように構成された区画を含む、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 12】

前記区画が、前記サンプルを前記スワブから前記デバイスに移すように構成されたスクレーパを含む、請求項 11 に記載のデバイス。

【請求項 13】

前記区画が、前記スワブから前記サンプルを抽出するように構成された境界面溶液を含

10

20

30

40

50

む、請求項 1 1 に記載のデバイス。

【請求項 1 4】

前記境界面溶液が緩衝液または溶解緩衝液を含む、請求項 1 3 に記載のデバイス。

【請求項 1 5】

前記サンプル境界面が、ピペッティングを介してスワブから前記サンプルを受け取るように構成されている、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 1 6】

前記サンプル境界面が、前記サンプルを含む容器から前記サンプルを受け取るように構成された区画を含む、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 1 7】

前記容器がシリンジを含む、請求項 1 6 に記載のデバイス。

【請求項 1 8】

前記シリンジ境界面が、そこを通して前記サンプルを受け取るための開口部を含む、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 1 9】

前記シリンジ境界面開口部が、

i) 前記加熱領域、及び／または

i i) 前記加熱領域と流体連通する別の区画

と流体連通している、請求項 1 8 に記載のデバイス。

【請求項 2 0】

前記サンプル境界面が、前記サンプルを流体として受け取るように構成されている、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 2 1】

前記加熱領域及び検出領域が、前記デバイス上の同じ位置に配置される、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 2 2】

前記加熱領域及び前記検出領域が、前記デバイスの同じ区画内に配置される、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 2 3】

前記加熱領域が、そこを通る流体移動のためのチャンネルを含む、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 2 4】

前記チャンネルが、前記サンプル境界面及び前記検出領域と直接的または間接的のいずれかで流体連通し、それによって、前記サンプルが前記サンプル境界面から前記検出領域に移動できるようにする、請求項 2 3 に記載のデバイス。

【請求項 2 5】

前記チャンネルが、螺旋構成または蛇行構成を含む、請求項 2 3 に記載のデバイス。

【請求項 2 6】

そこを通る流体移動のための 2 つ以上のチャンネルをさらに含み、前記 2 つ以上のチャンネルのうちの少なくとも 1 つのチャンネルが、前記サンプルを前記サンプル境界面から前記検出領域に移動させるように構成されている、請求項 2 3 に記載のデバイス。

【請求項 2 7】

前記加熱領域の各チャンネルが、1 つまたは複数の可動機構を含む、請求項 2 3 から 2 6 のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項 2 8】

前記 1 つまたは複数の可動機構が、i) 前記サンプル境界面と前記加熱領域との間の前記サンプルの移送を制御するための、前記サンプル境界面と前記加熱領域との間の第 1 の可動機構、及び／または i i) 前記加熱領域と前記検出領域との間の前記サンプルの移送を制御するための、前記加熱領域と前記検出領域との間の第 2 の可動機構を含む、請求項 2 7 に記載のデバイス。

10

20

30

40

50

【請求項 29】

前記加熱領域の少なくとも1つのチャンネルが、前記サンプルを2つ以上のサブサンプルに分離するように構成された2つ以上の加熱区画を含み、前記2つ以上の区画が、前記1つ以上の可動機構の可動機構を介して互いに分離されている、請求項27に記載のデバイス。

【請求項 30】

各加熱区画が、少なくとも1つの加熱要素の対応する加熱要素によって加熱されるように構成されている、請求項29に記載のデバイス。

【請求項 31】

前記デバイスの少なくとも1つの加熱要素が化学的加熱要素を含む、請求項30に記載のデバイス。

【請求項 32】

少なくとも1つの化学的加熱要素が酢酸ナトリウムである、請求項31に記載のデバイス。

【請求項 33】

前記加熱領域が、前記サンプル境界面及び前記検出領域と流体連通するチャンバを含む、請求項1に記載のデバイス。

【請求項 34】

前記加熱領域が、その中に固定化されたレポーターを含み、前記レポートが、活性化されたプログラム可能ヌクレアーゼと前記標的核酸との間の選択的結合を介して検出部分を放出するように構成され、それによって、前記シグナルの生成を可能にする、請求項1から33のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項 35】

前記レポーターが、前記加熱領域の表面に固定された支持体を介して前記加熱領域に固定される、請求項34に記載のデバイス。

【請求項 36】

前記支持体が、ビーズ、コーティング、及び散在ポリマーを含む、請求項35に記載のデバイス。

【請求項 37】

前記支持体が固体支持体を含む、請求項35に記載のデバイス。

【請求項 38】

前記加熱領域の表面が、前記表面の凹部であるウェルを含み、前記支持体が前記ウェル内に配置される、請求項35に記載のデバイス。

【請求項 39】

前記サンプルを前記サンプル境界面から前記検出領域に移動させるための1つまたは複数のチャンネルをさらに含む、請求項1に記載のデバイス。

【請求項 40】

前記1つまたは複数のチャンネルが、前記サンプル境界面内、前記サンプル境界面と前記加熱領域との間、前記加熱領域内、前記加熱領域と前記検出領域との間、及び／または前記検出領域内に位置する、請求項39に記載のデバイス。

【請求項 41】

前記1つまたは複数のチャンネルが複数のチャンネルを含み、前記複数のチャンネルが、直列に配置された少なくとも1組のチャンネルを含む、請求項40に記載のデバイス。

【請求項 42】

前記1つまたは複数のチャンネルが複数のチャンネルを含み、前記複数のチャンネルが、平行に配置された少なくとも1組のチャンネル（平行なチャンネル）を含み、それによって、前記サンプルが、前記少なくとも1組の平行なチャンネルの各チャンネル内でサブサンプルに分割されることを可能にする、請求項40に記載のデバイス。

【請求項 43】

前記1つまたは複数のチャンネルが複数のチャンネルを含み、前記複数のチャンネルが、前記

10

20

30

40

50

デバイス内の第 1 の位置から前記デバイス内の第 2 の位置に前記サンプルを移動させるように構成された少なくとも 1 組のチャンネルを含み、それによって、前記サンプルが、前記少なくとも 1 組のチャンネルの各チャンネル内のサブサンプルに分割されることを可能にする、請求項 40 に記載のデバイス。

【請求項 44】

前記少なくとも 1 組のチャンネルが、異なる長さ及び／または異なる構成を有する 2 つ以上のチャンネルを含み、それによって、2 つ以上の対応するサブサンプルに対して特定の条件を指定することが可能になる、請求項 43 に記載のデバイス。

【請求項 45】

前記特定の条件が、特定の加熱温度範囲、特定の加熱持続時間、前記デバイス上の任意の領域内または位置内の特定の滞留時間、特定のインキュベーション時間、特定の試薬との接触、またはそれらの任意の組み合わせを含む、請求項 44 に記載のデバイス。

【請求項 46】

前記少なくとも 1 組のチャンネルが、同じ長さ及び／または構成を有する 2 つ以上のチャンネルを含み、それによって、2 つ以上の対応するサブサンプルに対して特定の条件を指定することが可能になる、請求項 43 に記載のデバイス。

【請求項 47】

前記 1 つまたは複数のチャンネルのチャンネルが、放射状構成、螺旋構成、蛇行構成、線形構成、またはそれらの任意の組み合わせを含む、請求項 39 から 46 のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項 48】

少なくとも 1 つのアクチュエータをさらに含む、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 49】

前記少なくとも 1 つのアクチュエータが、プランジャ、ばね作動式プランジャ、またはばね機構を含む、請求項 48 に記載のデバイス。

【請求項 50】

前記少なくとも 1 つのアクチュエータが手動で作動される、請求項 48 に記載のデバイス。

【請求項 51】

前記少なくとも 1 つのアクチュエータの第 1 のアクチュエータが、前記第 1 のアクチュエータの手動作動によって前記サンプルを前記サンプル境界面から前記加熱領域に移動させるように構成されている、請求項 48 に記載のデバイス。

【請求項 52】

前記少なくとも 1 つのアクチュエータの第 2 のアクチュエータが、前記第 2 のアクチュエータの手動作動を介して前記検出部分を前記加熱領域から前記検出領域に移動させるように構成されている、請求項 48 に記載のデバイス。

【請求項 53】

電力なしで手動で操作されるように構成されている、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 54】

電源をさらに含む、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 55】

前記電源が 1 つまたは複数のバッテリーを含む、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 56】

前記加熱領域が、加熱要素を介して前記サンプルを加熱するように構成されている、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 57】

前記加熱要素が化学的加熱要素を含む、請求項 56 に記載のデバイス。

【請求項 58】

前記化学的加熱要素が酢酸ナトリウムである、請求項 57 に記載のデバイス。

【請求項 59】

10

20

30

40

50

前記シグナルが視覚的に検出可能である、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 6 0】

前記プログラム可能ヌクレアーゼがガイド核酸を含む、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 6 1】

前記ガイド核酸が修飾されている、請求項 6 0 に記載のデバイス。

【請求項 6 2】

前記ガイド核酸が、少なくとも 1 つのメチル基で修飾されている、請求項 6 1 に記載のデバイス。

【請求項 6 3】

前記プログラム可能ヌクレアーゼが Cas 酵素をさらに含む、請求項 6 0 に記載のデバイス。 10

【請求項 6 4】

前記 Cas 酵素が、Cas 1 2、Cas 1 3、Cas 1 4、Cas 1 4 a、Cas 1 4 a 1、及び Cas Phi からなる群から選択される、請求項 6 3 に記載のデバイス。

【請求項 6 5】

前記標的核酸が、呼吸器障害または呼吸器病原体を示す、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 6 6】

前記呼吸器障害または呼吸器病原体が、SARS-CoV-2 及び対応する変異体、29E)、NL63、OC43、HKU1、MERS-CoV、(MERS)、SARS-CoV (SARS、Flu A、Flu B、RSV、ライノウイルス、ストレプト A (Strept A)、及び TB からなる群から選択される、請求項 6 5 に記載のデバイス。 20

【請求項 6 7】

ウイルス感染と細菌感染とを区別するように構成されている、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 6 8】

前記標的核酸が、性感染症 (STI) または女性の健康に関連する感染症を示す、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 6 9】

前記 STI または女性の健康に関連する感染症が、CT、NG、MG、TV、HPV、カンジダ、B. 腔疾患 梅毒、及び UTI からなる群から選択される、請求項 6 8 に記載のデバイス。 30

【請求項 7 0】

前記標的核酸が一塩基多型 (SNP) を含む、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 7 1】

前記 SNP が NA SH 障害またはアルファ-1 障害を示す、請求項 7 0 に記載のデバイス。

【請求項 7 2】

前記標的核酸が、HIV、HBV、HCV、及びジカからなる群から選択される血液媒介性病原体である、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 7 3】

前記標的核酸が、ピロリ菌 (H. Pylori)、C. ディフィシル (C. Difficile)、ノロウイルス、HSV、及び髄膜炎 (Meningitis) を示す、請求項 1 に記載のデバイス。 40

【請求項 7 4】

前記標的核酸を含まない前記サンプルから 1 つまたは複数の粒子を濾過するように構成された物理的フィルタをさらに含む、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 7 5】

前記物理的フィルタが、前記サンプル境界面と加熱領域との間に位置し、それらと流体連通している、請求項 7 4 に記載のデバイス。

【請求項 7 6】

前記プログラム可能ヌクレアーゼ、ガイド核酸、または前記レポーターが、結合によってデバイス表面に固定化される、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 77】

前記結合が、共有結合、非共有結合、静電結合、ストレプトアビジンとビオチンとの間の結合、アミド結合、またはそれらの任意の組み合わせを含む、請求項 76 に記載のデバイス。

【請求項 78】

前記結合が非特異的吸収を含む、請求項 76 に記載のデバイス。

【請求項 79】

前記プログラム可能ヌクレアーゼが、前記結合によって前記デバイス表面に固定化され、前記結合が、前記プログラム可能ヌクレアーゼと前記表面の間にある、請求項 76、77 または 78 に記載のデバイス。

【請求項 80】

前記レポーターが、前記結合によって前記デバイス表面に固定化され、前記結合が、前記レポーターと前記表面の間にある、請求項 76 に記載のデバイス。

【請求項 81】

前記ガイド核酸が、前記結合によって前記表面に固定化され、前記結合が、前記ガイド核酸の 5' 末端と前記表面の間にある、請求項 76 に記載のデバイス。

【請求項 82】

前記ガイド核酸が、前記結合によって前記表面に固定化され、前記結合が、前記ガイド核酸の 3' 末端と前記表面の間にある、請求項 76 に記載のデバイス。

【請求項 83】

複数のガイド核酸をさらに含む、デバイスであって、前記複数のガイド核酸の各ガイド核酸が、前記標的核酸の異なるセグメントに相補的であるか、または部分的に相補的である、請求項 1 から 82 のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項 84】

前記サンプルが、前記標的核酸を含むサンプル、前記増幅試薬を含むサンプル、増幅されたサンプル、及び／または前記検出部分を含むサンプルを含む、請求項 1 から 83 のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項 85】

サンプル中の標的核酸を検出するためのデバイスであって；

a. サンプルを受け取るためのサンプル境界面；

b. 前記サンプル境界面と流体連通する加熱領域であって、前記加熱領域が、

i. ガイド核酸を含むプログラム可能ヌクレアーゼ、及び

ii. レポーター

を含み、前記プログラム可能ヌクレアーゼが、前記ガイド核酸と標的核酸との間の選択的結合によって活性化され、前記レポーターが、活性化されたプログラム可能ヌクレアーゼによる切断時に検出部分を放出するように構成された、前記加熱領域；

c. 前記加熱領域を加熱するように構成された化学的加熱要素；

d. 前記加熱領域と流体連通している検出領域であって、放出された検出部分によって生成されたシグナルを検出するように構成された、前記検出領域；

e. 前記サンプルを前記加熱領域から前記検出領域に移送するように構成された、第 1 の手動アクチュエータ；ならびに

f. 増幅試薬を含む試薬ミックスであって、前記サンプル境界面内、前記加熱領域内、前記検出領域内、及び／または前記サンプル境界面と前記加熱領域の間に配置される、前記試薬ミックス

を含み；

前記生成されたシグナルを介して 30 分未満の時間内に前記標的核酸の存在または非存在を決定するように構成されている、前記デバイス。

【請求項 86】

前記試薬ミックスが凍結乾燥されている、請求項 85 に記載のデバイス。

【請求項 87】

前記加熱領域が前記標的核酸を増幅するように構成されている、請求項 85 に記載のデバイス。

【請求項 88】

前記加熱領域が前記増幅試薬を含む、請求項 85 に記載のデバイス。

【請求項 89】

前記標的核酸が、ループ媒介等温増幅 (LAMP) を介して増幅される、請求項 85 に記載のデバイス。

10

【請求項 90】

前記加熱領域が、等温または非サイクル温度プロファイルを維持するように構成されている、請求項 85 に記載のデバイス。

【請求項 91】

前記等温または非サイクル温度プロファイルが約 30℃ から約 60℃ の間である、請求項 85 に記載のデバイス。

【請求項 92】

前記等温または非サイクル温度プロファイルが約 55℃ から約 60℃ の間である、請求項 85 に記載のデバイス。

【請求項 93】

前記サンプル境界面が、前記サンプルを含むスワブを受け取るように構成された区画を含む、請求項 85 に記載のデバイス。

20

【請求項 94】

前記区画が、前記サンプルを前記スワブから前記デバイスに移すように構成されたスクレーパを含む、請求項 86 に記載のデバイス。

【請求項 95】

前記区画が、前記スワブから前記サンプルを抽出するように構成された境界面溶液を含む、請求項 86 に記載のデバイス。

【請求項 96】

前記境界面溶液が緩衝液または溶解緩衝液を含む、請求項 95 に記載のデバイス。

30

【請求項 97】

前記サンプル境界面が、ピペッティングを介してスワブから前記サンプルを受け取るように構成されている、請求項 85 に記載のデバイス。

【請求項 98】

前記サンプル境界面が、前記サンプルを含む容器から前記サンプルを受け取るように構成された区画を含む、請求項 85 に記載のデバイス。

【請求項 99】

前記容器がシリンジを含む、請求項 98 に記載のデバイス。

【請求項 100】

前記シリンジ境界面が、そこを通して前記サンプルを受け取るための開口部を含む、請求項 85 に記載のデバイス。

40

【請求項 101】

前記シリンジ境界面開口部が、
前記加熱領域、または
前記加熱領域と流体連通する別の区画
と流体連通している、請求項 100 に記載のデバイス。

【請求項 102】

前記サンプル境界面が、前記サンプルを流体として受け取るように構成されている、請求項 85 に記載のデバイス。

【請求項 103】

50

前記加熱領域及び検出領域が、前記デバイス上の同じ位置に配置される、請求項 85 に記載のデバイス。

【請求項 104】

前記加熱領域及び前記検出領域が、前記デバイスの同じ区画内に配置される、請求項 85 に記載のデバイス。

【請求項 105】

前記加熱領域が、そこを通る流体移動のためのチャンネルを含む、請求項 85 に記載のデバイス。

【請求項 106】

前記チャンネルが、前記サンプル境界面及び前記検出領域と直接的または間接的のいずれかで流体連通し、それによって、前記サンプルが前記サンプル境界面から前記検出領域に移動できるようにする、請求項 105 に記載のデバイス。

【請求項 107】

前記チャンネルが、螺旋構成または蛇行構成を含む、請求項 105 に記載のデバイス。

【請求項 108】

そこを通る流体移動のための 2 つ以上のチャンネルをさらに含み、前記 2 つ以上のチャンネルのうちの少なくとも 1 つのチャンネルが、前記サンプルを前記サンプル境界面から前記検出領域に移動させるように構成されている、請求項 105 に記載のデバイス。

【請求項 109】

前記加熱領域の各チャンネルが、1 つまたは複数の可動機構を含む、請求項 105 から 108 のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項 110】

前記 1 つまたは複数の可動機構が、i) 前記サンプル境界面と前記加熱領域との間の前記サンプルの移送を制御するための、前記サンプル境界面と前記加熱領域との間の第 1 の可動機構、及び／または ii) 前記加熱領域と前記検出領域との間の前記サンプルの移送を制御するための、前記加熱領域と前記検出領域との間の第 2 の可動機構を含む、請求項 109 に記載のデバイス。

【請求項 111】

前記加熱領域の少なくとも 1 つのチャンネルが、前記サンプルを 2 つ以上のサブサンプルに分離するように構成された 2 つ以上の加熱区画を含み、前記 2 つ以上の区画が、前記 1 つ以上の可動機構の可動機構を介して互いに分離されている、請求項 109 に記載のデバイス。

【請求項 112】

各加熱区画が、対応する加熱要素によって加熱されるように構成されている、請求項 111 に記載のデバイス。

【請求項 113】

前記デバイスの前記少なくとも 1 つの加熱要素が化学的加熱要素を含む、請求項 112 に記載のデバイス。

【請求項 114】

前記少なくとも 1 つの化学的加熱要素が酢酸ナトリウムである、請求項 113 に記載のデバイス。

【請求項 115】

前記加熱領域がチャンバを含む、請求項 85 に記載のデバイス。

【請求項 116】

前記加熱領域が、その中に固定化されたレポーターを含む、請求項 85 から 115 のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項 117】

前記レポーターが、前記加熱領域の表面に固定された支持体を介して前記加熱領域に固定される、請求項 116 に記載のデバイス。

【請求項 118】

10

20

30

40

50

前記支持体が、ビーズ、コーティング、及び散在ポリマーを含む、請求項 1 1 7 に記載のデバイス。

【請求項 1 1 9】

前記支持体が固体支持体を含む、請求項 1 1 7 に記載のデバイス。

【請求項 1 2 0】

前記加熱領域の表面が、前記表面の凹部であるウェルを含み、前記支持体が前記ウェル内に配置される、請求項 1 1 7 に記載のデバイス。

【請求項 1 2 1】

前記サンプルを前記サンプル境界面から前記検出領域に移動させるための 1 つまたは複数のチャンネルをさらに含む、請求項 8 5 に記載のデバイス。

【請求項 1 2 2】

前記 1 つまたは複数のチャンネルが、前記サンプル境界面内、前記サンプル境界面と前記加熱領域との間、前記加熱領域内、前記加熱領域と前記検出領域との間、及び／または前記検出領域内に位置する、請求項 1 2 1 に記載のデバイス。

【請求項 1 2 3】

前記 1 つまたは複数のチャンネルが複数のチャンネルを含み、前記複数のチャンネルが、直列に配置された少なくとも 1 組のチャンネルを含む、請求項 1 2 1 に記載のデバイス。

【請求項 1 2 4】

前記 1 つまたは複数のチャンネルが複数のチャンネルを含み、前記複数のチャンネルが、平行に配置された少なくとも 1 組の平行なチャンネル（平行なチャンネル）を含み、それによって、前記サンプルが、前記少なくとも 1 組の平行なチャンネルの各チャンネル内でサブサンプルに分割されることを可能にする、請求項 1 2 1 に記載のデバイス。

【請求項 1 2 5】

前記 1 つまたは複数のチャンネルが複数のチャンネルを含み、前記複数のチャンネルが、前記デバイス内の第 1 の位置から前記デバイス内の第 2 の位置に前記サンプルを移動させるように構成された少なくとも 1 組のチャンネルを含み、それによって、前記サンプルが、前記少なくとも 1 組のチャンネルの各チャンネル内のサブサンプルに分割されることを可能にする、請求項 1 2 1 に記載のデバイス。

【請求項 1 2 6】

前記少なくとも 1 組のチャンネルが、異なる長さ及び／または異なる構成を有する 2 つ以上のチャンネルを含み、それによって、2 つ以上の対応するサブサンプルに対して特定の条件を指定することが可能になる、請求項 1 2 5 に記載のデバイス。

【請求項 1 2 7】

特定の条件が、特定の加熱温度範囲、特定の加熱持続時間、前記デバイス上の任意の領域内または位置内の特定の滞留時間、特定のインキュベーション時間、特定の試薬との接触、またはそれらの任意の組み合わせを含む、請求項 1 2 6 に記載のデバイス。

【請求項 1 2 8】

前記少なくとも 1 組のチャンネルが、同じ長さ及び／または構成を有する 2 つ以上のチャンネルを含み、それによって、2 つ以上の対応するサブサンプルに対して特定の条件を指定することが可能になる、請求項 1 2 6 に記載のデバイス。

【請求項 1 2 9】

前記 1 つまたは複数のチャンネルのチャンネルが、放射状構成、螺旋構成、蛇行構成、線形構成、またはそれらの任意の組み合わせを含む、請求項 1 2 1 から 1 2 8 のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項 1 3 0】

前記少なくとも 1 つのアクチュエータが、プランジャ、ばね作動式プランジャ、またはばね機構を含む、請求項 8 5 に記載のデバイス。

【請求項 1 3 1】

電力なしで手動で操作されるように構成されている、請求項 8 5 に記載のデバイス。

【請求項 1 3 2】

10

20

30

40

50

電源をさらに含む、請求項 8 5 に記載のデバイス。

【請求項 1 3 3】

前記電源が 1 つまたは複数のバッテリーを含む、請求項 8 5 に記載のデバイス。

【請求項 1 3 4】

前記加熱領域が、加熱要素を介して前記サンプルを加熱するように構成されている、請求項 8 5 に記載のデバイス。

【請求項 1 3 5】

前記加熱要素が化学的加熱要素を含む、請求項 1 3 4 に記載のデバイス。

【請求項 1 3 6】

前記化学的加熱要素が酢酸ナトリウムである、請求項 1 3 5 に記載のデバイス。

10

【請求項 1 3 7】

前記シグナルが視覚的に検出可能である、請求項 8 5 に記載のデバイス。

【請求項 1 3 8】

前記ガイド核酸が修飾されている、請求項 8 5 に記載のデバイス。

【請求項 1 3 9】

前記ガイド核酸が、少なくとも 1 つのメチル基で修飾されている、請求項 8 5 に記載のデバイス。

【請求項 1 4 0】

前記プログラム可能ヌクレアーゼが Cas 酵素をさらに含む、請求項 8 5 に記載のデバイス。

20

【請求項 1 4 1】

前記 Cas 酵素が、Cas 1 2、Cas 1 3、Cas 1 4、Cas 1 4 a、Cas 1 4 a 1、及び Cas Phi からなる群から選択される、請求項 1 4 0 に記載のデバイス。

【請求項 1 4 2】

前記標的核酸が、呼吸器障害または呼吸器病原体を示す、請求項 8 5 に記載のデバイス。

【請求項 1 4 3】

前記呼吸器障害または呼吸器病原体が、SARS-CoV-2 及び対応する変異体、29E、NL63、OC43、HKU1、MERS-CoV、(MERS)、SARS-CoV (SARS、Flu A、Flu B、RSV、ライノウイルス、ストレプト A、及び TB からなる群から選択される、請求項 1 4 2 に記載のデバイス。

30

【請求項 1 4 4】

ウイルス感染と細菌感染とを区別するように構成されている、請求項 8 5 に記載のデバイス。

【請求項 1 4 5】

前記標的核酸が、性感染症 (STI) または女性の健康に関連する感染症を示す、請求項 8 5 に記載のデバイス。

【請求項 1 4 6】

前記 STI または女性の健康に関連する感染症が、CT、NG、MG、TV、HPV、カンジダ、B. 性疾患 梅毒、及び UTI からなる群から選択される、請求項 1 4 5 に記載のデバイス。

40

【請求項 1 4 7】

前記標的核酸が一塩基多型 (SNP) を含む、請求項 8 5 に記載のデバイス。

【請求項 1 4 8】

前記 SNP が NA SH 障害またはアルファ-1 障害を示す、請求項 1 4 7 に記載のデバイス。

【請求項 1 4 9】

前記標的核酸が、HIV、HBV、HCV、及びジカからなる群から選択される血液媒介性病原体である、請求項 8 5 に記載のデバイス。

【請求項 1 5 0】

50

前記標的核酸が、ピロリ菌、C．ディフィシル、ノロウイルス、HSV、及び髄膜炎を示す、請求項85に記載のデバイス。

【請求項151】

前記標的核酸を含まない前記サンプルから1つまたは複数の粒子を濾過するように構成された物理的フィルタをさらに含む、請求項85に記載のデバイス。

【請求項152】

前記物理的フィルタが、前記サンプル境界面と加熱領域との間に位置し、それらと流体連通している、請求項151に記載のデバイス。

【請求項153】

前記プログラム可能ヌクレアーゼ、前記ガイド核酸、または前記レポーターが、結合によってデバイス表面に固定化される、請求項85に記載のデバイス。

【請求項154】

前記結合が、共有結合、非共有結合、静電結合、ストレプトアビジンとビオチンとの間の結合、アミド結合、またはそれらの任意の組み合わせを含む、請求項153に記載のデバイス。

【請求項155】

前記結合が非特異的吸収を含む、請求項153に記載のデバイス。

【請求項156】

前記プログラム可能ヌクレアーゼが、前記結合によって前記デバイス表面に固定化され、前記結合が、前記プログラム可能ヌクレアーゼと前記表面の間にある、請求項153、154または155に記載のデバイス。

【請求項157】

前記レポーターが、前記結合によって前記デバイス表面に固定化され、前記結合が、前記レポーターと前記表面の間にある、請求項153に記載のデバイス。

【請求項158】

前記ガイド核酸が、前記結合によって前記表面に固定化され、前記結合が、前記ガイド核酸の5'末端と前記表面の間にある、請求項153に記載のデバイス。

【請求項159】

前記ガイド核酸が、前記結合によって前記表面に固定化され、前記結合が、前記ガイド核酸の3'末端と前記表面の間にある、請求項153に記載のデバイス。

【請求項160】

複数のガイド核酸をさらに含む、デバイスであって、前記複数のガイド核酸の各ガイド核酸が、前記標的核酸の異なるセグメントに相補的であるか、または部分的に相補的である、請求項85から159のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項161】

前記サンプルが、前記標的核酸を含むサンプル、前記増幅試薬を含むサンプル、増幅されたサンプル、及び／または前記検出部分を含むサンプルを含む、請求項85から160のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項162】

サンプル中の複数の標的核酸を多重化検出するためのマイクロアレイデバイスであって；

- a．サンプルを受け取るためのサンプル境界面、
- b．増幅試薬を含む試薬ミックス、
- c．前記サンプル境界面と流体連通する加熱領域、及び

d．マイクロアレイ形式の複数の検出スポットを含む表面を含む、検出領域であって、前記複数の検出スポットのそれぞれがレポータープローブを含み、各レポータープローブが、活性化されたプログラム可能ヌクレアーゼによる切断を介して検出部分を放出するように構成され、前記複数の検出スポットのそれぞれが、異なるプログラム可能ヌクレアーゼプローブを含む、前記検出領域を含み；かつ

10

20

30

40

50

前記複数の検出スポットのそれぞれにおける各レポーターの各検出部分の放出を介して、30分未満の時間内に前記複数の標的核酸のそれぞれの存在または非存在を決定するように構成されている、

前記マイクロアレイデバイス。

【請求項163】

少なくとも1つのプログラム可能ヌクレアーゼプローブがCas酵素を含む、請求項162に記載のデバイス。

【請求項164】

前記少なくとも1つのプログラム可能ヌクレアーゼの各Cas酵素が、Cas12、Cas13、Cas14、Cas14a、及びCas14a1を含む群から選択される、請求項163に記載のデバイス。

【請求項165】

請求項85から161のいずれか一項に記載のデバイスを含む、請求項162から164のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項166】

- a. スワブ、
- b. 溶出試薬、
- c. 溶解試薬、
- d. デバイス

を含む、サンプル中の標的核酸を検出するためのキットであって；

前記デバイスが、

i. 前記サンプルを受け取るためのサンプル境界面、

ii. 前記サンプル境界面と流体連通し、前記サンプルを受け取るように構成された、加熱領域であって、前記加熱領域が、ガイド核酸を含むプログラム可能ヌクレアーゼと前記加熱領域内に配置されたレポーターとを含み、前記プログラム可能ヌクレアーゼが、前記ガイド核酸及び前記標的核酸間の選択的結合によって活性化され、前記レポーターが、活性化されたプログラム可能ヌクレアーゼを介して検出部分を放出するように構成された、前記加熱領域、

iii. 前記加熱領域への加熱をもたらすように構成された化学的加熱要素、

iv. 前記加熱領域と前記サンプル境界面に流体連通している検出領域であって、放出された検出部分によって生成されたシグナルを検出するように構成され、それによって、前記標的核酸の存在を検出する、前記検出領域、ならびに

v. 増幅試薬を含む試薬ミックスであって、前記サンプル境界面内、前記加熱領域内、前記検出領域内、及び／または前記サンプル境界面と前記加熱領域との間に配置されている、前記試薬ミックス

を含み、かつ

前記デバイスが、前記放出された検出部分を介して30分未満の時間内に前記標的核酸の存在または非存在を決定するように構成されている、

前記キット。

【請求項167】

前記サンプル境界面が、前記スワブから前記サンプルを受け取るように構成されている、請求項166に記載のキット。

【請求項168】

収集管をさらに含む、キットであって、前記収集管が、前記スワブを受け入れるように構成され、前記スワブに含まれる前記サンプルが、前記収集管に移され、前記収集管が、前記デバイスから分離されている、請求項166に記載のキット。

【請求項169】

前記収集管が、前記サンプル境界面に挿入されて、前記サンプルを前記デバイスに移送するように構成されている、請求項168に記載のキット。

【請求項170】

10

20

30

40

50

前記収集管がシリンジである、請求項 1 6 8 に記載のキット。

【請求項 1 7 1】

前記溶出試薬及び／または前記溶解試薬を含む第 1 の容器をさらに含む、請求項 1 6 6 に記載のキット。

【請求項 1 7 2】

希釈試薬をさらに含む、請求項 1 6 6 に記載のキット。

【請求項 1 7 3】

前記希釈試薬を含む第 2 の容器をさらに含む、請求項 1 7 2 に記載のキット。

【請求項 1 7 4】

前記プログラム可能ヌクレアーゼが Cas 酵素を含む、請求項 1 6 6 から 1 7 3 のいずれか一項に記載のキット。 10

【請求項 1 7 5】

前記 Cas 酵素が、Cas 1 2、Cas 1 3、Cas 1 4、Cas 1 4 a、及び Cas 1 4 a 1 を含む群から選択される、請求項 1 7 4 に記載のキット。

【請求項 1 7 6】

前記デバイスが、請求項 8 5 から 1 6 1 のいずれか一項に記載のデバイスを含む、請求項 1 6 6 から 1 7 5 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 1 7 7】

サンプル中の標的核酸を検出するための方法であって、

a. サンプルがデバイスに導入された後、30 分未満で標的核酸の存在または非存在を決定するように構成されたデバイスを提供する段階であって、前記デバイスが、サンプル境界面、前記サンプル境界面と流体連通する加熱領域、及び前記加熱領域と流体連通する検出領域を含む、前記段階； 20

b. 前記デバイスの前記サンプル境界面に前記サンプルを導入する段階；

c. 前記サンプルを、増幅試薬を含む試薬ミックスと混合して、混合サンプル溶液を生成する段階；

d. 前記混合サンプル溶液を前記サンプル境界面から前記加熱領域に移す段階；

e. 前記加熱領域で前記混合サンプル溶液を加熱することにより、前記サンプルを増幅する段階；

f. プログラム可能ヌクレアーゼベースのアッセイを実行する段階であって、ガイド核酸と前記標的核酸との間の選択的結合が、レポータープローブを切断するように構成されたプログラム可能ヌクレアーゼプローブを活性化し、それによって、前記標的核酸が存在する場合に検出部分を前記サンプル溶液中に放出する、前記段階； 30

g. 前記加熱領域から前記検出領域に、前記増幅されたサンプルを有する前記混合サンプル溶液を移送する段階；ならびに

h. 前記検出領域の放出された検出部分の捕捉を介して、前記サンプル中の前記標的核酸の存在または非存在を決定する段階を含む、前記方法。

【請求項 1 7 8】

前記標的核酸を増幅する段階及び前記プログラム可能ヌクレアーゼアッセイを実行する段階が、前記加熱領域においてワンポット反応として実行される、請求項 1 7 7 に記載の方法。 40

【請求項 1 7 9】

前記ワンポット反応が約 30℃から 60℃の間で行われる、請求項 1 7 8 に記載の方法。

【請求項 1 8 0】

前記ワンポット反応が約 55℃で行われる、請求項 1 7 8 に記載の方法。

【請求項 1 8 1】

前記ワンポット反応の前記プログラム可能ヌクレアーゼが Cas 酵素を含み、前記 Cas 酵素が、Cas 1 2、Cas 1 3、Cas 1 4、Cas 1 4 a、及び Cas 1 4 a 1 を 50

含む群から選択される、請求項 178 に記載の方法。

【請求項 182】

前記加熱領域に入る前に、前記試薬ミックスを有する前記サンプルを濾過する段階をさらに含む、請求項 177 に記載の方法。

【請求項 183】

前記サンプルを前記濾過する段階が、前記標的核酸を含まない前記サンプルから 1 つ以上の粒子を濾過することを含む、請求項 182 に記載の方法。

【請求項 184】

前記フィルタが、前記サンプル境界面と加熱領域との間に位置し、それらと流体連通している、請求項 182 に記載の方法。

【請求項 185】

複数のガイド核酸をさらに含む、方法であって、前記複数のガイド核酸の各ガイド核酸が、前記標的核酸の異なるセグメントに相補的であるか、または部分的に相補的である、請求項 177 に記載の方法。

【請求項 186】

段階 (a) の前に、

i . 前記標的核酸を含むサンプル溶液を含む収集管を提供する段階、及び

i i . 前記収集管を前記デバイスのサンプル境界面に挿入することにより、前記サンプル溶液を前記デバイスに移すことであって、前記サンプル溶液が溶解し、増幅試薬を含む凍結乾燥反応ミックスと混合する、前記段階をさらに含む、請求項 177 に記載の方法。

【請求項 187】

前記デバイスが、請求項 85 から 161 のいずれか一項に記載のデバイスを含む、請求項 177 から 186 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

相互参照

この出願は、2020 年 5 月 29 日に提出された米国仮出願第 63 / 032, 455 号、2020 年 11 月 13 日に提出された米国仮出願第 63 / 113, 798 号、2021 年 2 月 19 日に提出された米国仮出願第 63 / 151, 592 号、2021 年 3 月 26 日に提出された米国仮出願第 63 / 166, 538 号、及び 2021 年 4 月 28 日に提出された米国仮出願第 63 / 181, 130 号の利益を主張するものであり、それぞれが参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

連邦政府支援の研究に関する声明文

本発明は、国防総省、国防高等研究計画局 (DARPA) によって授与された契約番号 N66001-21-C-4048 の下で政府の支援を受けて行われた。米国政府は、本発明において特定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

背景

特に病気または感染の初期段階での病気の検出は、その病の進行または伝染を減らすための治療または介入に関するガイダンスを提供できる。このような病は、診断アッセイを実行できるデバイスによって、必要な時点で検出できる。これらのデバイスによって、生物、疾患状態、表現型、または遺伝子型に関連する様々な生物種を検出できる。このようなデバイスを展開する際の課題には、アッセイの能力を損なうことなく表面に診断アッセイ構成要素を固定化する方法の開発、及び重要な追加の機器を使用せずにサンプルの増幅を実行することが含まれる。

【発明の概要】

【0004】

概要

一態様では、本開示は、プログラム可能ヌクレアーゼ診断デバイスを提供し、それは、少なくとも1つの目的の配列を含み得るサンプルを受け取るように構成されたサンプル境界面と；サンプル境界面及び検出チャンバと流体連通するチャンネルであって、当該チャンネルは、サンプルを複数の液滴に分離するための1つまたは複数の可動機構を含み、当該検出チャンバは、複数の液滴を受け取り、当該検出チャンバの表面上に配置された少なくとも1つのプログラム可能ヌクレアーゼプローブと接触するように構成され、当該少なくとも1つのプログラム可能ヌクレアーゼプローブは、プログラム可能ヌクレアーゼと複合化されたガイド核酸を含み得る、チャンネルと；当該少なくとも1つのプログラム可能ヌクレアーゼプローブによる当該の少なくとも1つの目的の配列の標的核酸領域の切断時に生成されるシグナルを検出することによって、当該少なくとも1つの目的の配列の存在を決定する複数のセンサーとを含み得る。いくつかの実施形態では、当該標的核酸領域の切断は、当該少なくとも1つのプログラム可能ヌクレアーゼプローブの当該ガイド核酸への当該標的核酸領域の相補的結合の後に起こる。いくつかの実施形態では、プログラム可能ヌクレアーゼプローブは、CRISPR/Cas酵素を含み得る。いくつかの実施形態では、ガイド核酸はガイドRNAを含み得る。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の可動機構は、チャンネルの1つまたは複数のセクションを通る流れを制限するように構成された1つまたは複数の弁を含む。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の可動機構は、チャンネルの1つまたは複数のセクションを通る流れを制限するように構成されたプランジャまたはピストルを含む。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の可動機構は、装置と一体化されるかまたは装置に挿入可能な電源に動作可能に結合される。いくつかの実施形態では、電源は、バッテリーを含み得る。いくつかの実施形態では、デバイスは、目的の配列を含まないサンプルから1つまたは複数の粒子を濾過するための物理的フィルタを含んでもよい。いくつかの実施形態では、デバイスは、サンプル調製チャンバを含み得る。いくつかの実施形態では、サンプル調製チャンバは、溶解剤を含み得る。いくつかの実施形態では、サンプル調製チャンバは、熱不活性化のために構成された加熱ユニットを含んでもよい。いくつかの実施形態では、サンプル調製チャンバは、核酸精製のための1つまたは複数の試薬を含み得る。いくつかの実施形態では、チャンネルは、少なくとも1つの目的の配列またはその一部を増幅するために、複数の加熱要素及び複数のヒートシンクを含んでもよい。いくつかの実施形態では、複数の加熱要素及び複数のヒートシンクは、複数の液滴に対して1つまたは複数のサーモサイクリング操作を実行するように構成される。いくつかの実施形態では、デバイスは、異なるガイドRNAを含む複数のプログラム可能ヌクレアーゼプローブを含み得る。いくつかの実施形態では、シグナルは、物理的、化学的、または電気化学的変化または反応に関連する。いくつかの実施形態では、シグナルは光シグナルを含むことができる。いくつかの実施形態では、シグナルは、蛍光シグナルまたは比色シグナルを含み得る。いくつかの実施形態では、シグナルは、電位差測定シグナルまたは電流測定シグナルを含み得る。いくつかの実施形態では、シグナルは圧電シグナルを含むことができる。いくつかの実施形態では、シグナルは、少なくとも1つのプログラム可能ヌクレアーゼプローブが配置される固体またはゲル体積の屈折率の変化に関連する。

【0005】

別の態様において、本開示は、1つまたは複数の目的の標的配列を含み得るサンプルを受け取るように構成されたサンプル境界面；サンプルを分割されたサンプルに分離するための1つ以上の可動機構を含む1つ以上のチャンネルであって、サンプル境界面、及び分割されたサンプルを受け取り、当該1つまたは複数の目的の標的配列の核酸を切断するように構成された酵素、試薬、またはプログラム可能検出因子と接触するように構成された反応チャンバと流体連通する、1つ以上のチャンネル；及び当該核酸の当該切断の際に放出される1つまたは複数のレポーターを検出することによって、1つまたは複数の目的の標的配列の存在を決定するための複数のセンサーを含み得る、デバイスを提供する。いくつか

の実施形態では、プログラム可能検出因子は、C R I S P R / C a s 酵素を含み得る。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の目的の標的配列は、当該核酸を含む核酸の配列を含む。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の可動機構は、1つまたは複数のチャンネルを通してサンプル境界面に向かう第1の方向の流れを制限するように構成された複数の弁を含む。いくつかの実施形態では、複数の弁は、1つまたは複数のチャンネルを通して反応チャンバに向かう第2の方向の流れを選択的に可能にするように構成される。いくつかの実施形態では、複数の弁のうちの第1の弁及び第2の弁は、第1の弁及び第2の弁が閉状態にあるときに、サンプルの第2の部分からサンプルの第1の部分を物理的、流体的、または熱的に分離するように構成される。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のチャンネルは、複数の加熱要素及び複数のヒートシンクを含み、分割されたサンプルに対してサーモサイクリングを実行する。いくつかの実施形態では、複数の加熱要素の第1の加熱要素及び複数のヒートシンクの第1のヒートシンクは、1つまたは複数の可動機構の第1の可動機構と第2の可動機構との間に配置される。いくつかの実施形態では、レポーターは、核酸及び検出部分を含み得る。いくつかの実施形態では、レポーターは、少なくとも1つのリボヌクレオチドまたは少なくとも1つのデオキシリボヌクレオチドを含み得る。いくつかの実施形態では、レポーターは、DNA核酸またはRNA核酸を含み得る。いくつかの実施形態では、デバイスは、デバイスから離れたコンピューティングユニットに1つまたは複数の検出結果を伝えるように構成された遠隔医療ユニットを含んでもよく、1つまたは複数の検出結果は、サンプルの目的の標的核酸の存在または非存在を示す。

10

20

【0006】

別の態様では、本開示は、標的検出のための方法を提供し、本明細書に記載のデバイスのいずれかとサンプルを接触させる段階と；当該サンプルの1つまたは複数の目的の遺伝子の存在または非存在を検出する段階を含む。いくつかの実施形態では、方法は、サンプル中の1つまたは複数の目的の遺伝子の存在または非存在を示す1つまたは複数の検出結果を生成する段階を含み得る。いくつかの実施形態では、方法は、1つまたは複数の検出結果をリモートコンピューティングユニットに送信する段階を含むことができる。いくつかの実施形態では、リモートコンピューティングユニットはモバイルデバイスを含むことができる。別の態様において、本開示は、標的検出のための方法を提供し、少なくとも1つの目的の遺伝子を含むサンプルを提供する段階；1つまたは複数の可動機構を使用して、サンプルを複数のサブサンプルに分離する段階；検出チャンバ内に複数のサブサンプルを受け取り、複数のサブサンプルを、当該検出チャンバの表面上に配置された少なくとも1つのプログラム可能ヌクレアーゼプローブと接触させる段階であって、当該少なくとも1つのプログラム可能ヌクレアーゼプローブは、プログラム可能ヌクレアーゼと複合化されたガイド核酸を含み得る、段階；及び複数のセンサーを使用して、当該少なくとも1つのプログラム可能ヌクレアーゼプローブによる当該少なくとも1つの目的の遺伝子における標的核酸領域の切断時に生成されるシグナルを検出することにより、当該少なくとも1つの目的の遺伝子の存在または非存在を決定する段階を含む。いくつかの実施形態では、方法は、サンプルを複数のサブサンプルに分離した後に、少なくとも1つの目的の遺伝子を増幅する段階を含み得る。いくつかの実施形態では、方法は、複数のサブサンプルが検出チャンバに受け取られる前に、少なくとも1つの目的の遺伝子を増幅する段階を含み得る。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの目的の遺伝子を増幅する段階は、複数の加熱要素及び複数のヒートシンクを使用して、複数のサブサンプルに対してサーモサイクリングを実行する段階を含み得る。いくつかの実施形態では、プログラム可能ヌクレアーゼプローブは、C R I S P R / C a s 酵素を含み得る。いくつかの実施形態では、ガイド核酸はガイドRNAを含み得る。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の可動機構は、チャンネルの1つまたは複数のセクションを通る流れを制限するように構成された1つまたは複数の弁を含む。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の可動機構は、チャンネルの1つまたは複数のセクションを通る流れを制限するように構成されたプランジャまたはピストルを含む。いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも1つの目的の遺伝子を含まないサンプルから1つまたは複数の粒子を濾過するための物理的フィルタを使用する

30

40

50

段階を含み得る。いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも1つの目的の遺伝子を検出する前にサンプルを溶解する段階を含み得る。いくつかの実施形態では、方法は、サンプルに対して熱不活性化を行う段階を含み得る。いくつかの実施形態では、方法は、サンプルに対して核酸精製を行う段階を含み得る。いくつかの実施形態では、方法は、複数のサブサンプルを、異なるガイドRNAを含む複数のプログラム可能ヌクレアーゼプローブと接触させる段階を含み得る。いくつかの実施形態では、シグナルは、物理的、化学的、または電気化学的变化または反応に関連する。いくつかの実施形態では、シグナルは、光シグナル、蛍光シグナル、比色シグナル、電位差シグナル、電流測定シグナル、及び圧電シグナルからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、シグナルは、当該少なくとも1つのプログラム可能ヌクレアーゼプローブが配置される固体またはゲル体積の屈折率の変化に関連する。いくつかの実施形態では、方法は、シグナルを使用して、病原性ウイルス、病原性細菌、病原性線虫、病原性真菌、またはがん細胞を検出する段階を含み得る。いくつかの実施形態では、病原性ウイルスは、呼吸器ウイルス、アデノウイルス、パラインフルエンザウイルス、重症急性呼吸器症候群（SARS）、コロナウイルス、SARS-CoV、SARS-CoV-2、MERS、胃腸ウイルス、ノロウイルス、ロタウイルス、アストロウイルス、発疹性ウイルス、肝臓ウイルス性疾患、皮膚ウイルス性疾患、ヘルペス、出血性ウイルス性疾患、エボラ、ラッサ熱、デング熱、黄熱病、マールブルグ出血熱、クリミア・コンゴ出血熱、神経性ウイルス、ポリオ、ウイルス性髄膜炎、ウイルス性脳炎、狂犬病、性感染症ウイルス、HIV、HPV、免疫不全ウイルス、インフルエンザウイルス、デングウイルス、西ナイルウイルス、ヘルペスウイルス、黄熱病ウイルス、C型肝炎ウイルス、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、パピローマウイルスからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、この方法は、切断の際に放出されるレポーターと、検出チャンバ内の別の物質、実体、または分子種との間の物理的または化学的相互作用を使用して、シグナルを増幅または改変する段階を含み得る。いくつかの実施形態では、本開示のデバイスは、シグナルに基づいて、病原性ウイルス、病原性細菌、病原性虫、病原性真菌、またはがん細胞を検出するように構成される。いくつかの実施形態では、病原性ウイルスは、呼吸器ウイルス、アデノウイルス、パラインフルエンザウイルス、重症急性呼吸器症候群（SARS）、コロナウイルス、SARS-CoV、SARS-CoV-2、MERS、胃腸ウイルス、ノロウイルス、ロタウイルス、アストロウイルス、発疹性ウイルス、肝臓ウイルス性疾患、皮膚ウイルス性疾患、ヘルペス、出血性ウイルス性疾患、エボラ、ラッサ熱、デング熱、黄熱病、マールブルグ出血熱、クリミア・コンゴ出血熱、神経性ウイルス、ポリオ、ウイルス性髄膜炎、ウイルス性脳炎、狂犬病、性感染症ウイルス、HIV、HPV、免疫不全ウイルス、インフルエンザウイルス、デングウイルス、西ナイルウイルス、ヘルペスウイルス、黄熱病ウイルス、C型肝炎ウイルス、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、パピローマウイルスからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、デバイスの検出チャンバまたは反応チャンバは、シグナルを増幅または改変するために切断時に放出されるレポーターと物理的または化学的に相互作用または反応するように構成された別の材料、実体、または分子種を含み得る。いくつかの実施形態では、目的の配列は、生物学的配列を含み得る。生物学的配列は、核酸配列またはアミノ酸配列を含むことができる。いくつかの実施形態では、目的の配列は、目的の生物、目的の疾患、目的の疾患状態、目的の表現型、目的の遺伝子型、または目的の遺伝子と関連している。

10

20

30

40

50

【0007】

別の態様では、反応チャンバは表面を含み得、それにおいてプローブは、当該酵素、当該試薬、当該プログラム可能検出試薬、プログラム可能ヌクレアーゼ、ガイド核酸、レポーターまたはそれらの組み合わせのうちの少なくとも1つを含み、当該プローブは、結合によって当該表面に固定される。いくつかの実施形態では、結合は、表面官能基及びプローブ官能基を含み得る。いくつかの実施形態では、表面官能基が当該表面上に配置される。いくつかの実施形態では、表面官能基はストレプトアビジンである。いくつかの実施形態では、当該プログラム可能ヌクレアーゼのアミノ酸残基は、当該結合によって当該表面

に結合される。いくつかの実施形態では、アミノ酸残基は、当該プローブ官能基で修飾される。いくつかの実施形態では、プローブ官能基はビオチンである。いくつかの実施形態では、ガイド核酸は、当該結合によって表面に結合される。いくつかの実施形態では、ガイド核酸は、3'末端または5'末端が当該プローブ官能基で修飾される。いくつかの実施形態では、レポーターは、当該結合によって当該表面に結合される。いくつかの実施形態では、レポーターは、当該核酸、当該プローブ官能基、検出部分、クエンチャーまたはそれらの組み合わせのうちの少なくとも1つを含み得る。いくつかの実施形態では、レポーターは、当該検出部分が当該表面に固定されたままであり、当該クエンチャーが当該レポーターの切断時に溶液中に放出されるように構成される。いくつかの実施形態では、レポーターは、当該クエンチャーが当該表面に固定されたままであり、当該検出部分が当該レポーターの切断時に溶液中に放出されるように構成される。

10

【0008】

本明細書に記載される様々な態様において、レポーターは、結合によって当該表面に結合される。いくつかの実施形態では、結合は、表面官能基及びプローブ官能基を含み得る。いくつかの実施形態では、表面官能基が当該表面上に配置され、当該レポーターは当該プローブ官能基を含み得る。

【0009】

特定の態様では、標的検出のための方法の実施形態が本明細書に記載され、少なくとも1つの目的の配列を含むサンプルを提供する段階；1つまたは複数の可動機構を使用して、サンプルを複数のサブサンプルに分離する段階；検出チャンバ内に複数のサブサンプルを受け取り、複数のサブサンプルを少なくとも1つのプローブと接触させる段階であって、当該少なくとも1つのプローブが、結合によって当該検出チャンバの表面に接続され、当該少なくとも1つのプローブが、プログラム可能ヌクレアーゼ、ガイド核酸、レポーターまたはそれらの組み合わせを含み得る、段階；複数のセンサーを使用して、当該プログラム可能ヌクレアーゼによる当該レポーターの切断時に生成されるシグナルを検出することにより、少なくとも1つの目的の配列の存在を決定する段階を含む。

20

【0010】

本明細書には、1つまたは複数の目的の標的配列を含み得るサンプルを受け取るように構成されたサンプル境界面；当該サンプルを分割されたサンプルに分離するための1つまたは複数の可動機構を含む1つ以上のチャンネルであって、当該1つ以上のチャンネルは、当該サンプル境界面及び表面を含む反応チャンバと流体連通しており、少なくとも1つのプローブはプログラム可能ヌクレアーゼを、ガイド核酸、レポーターまたはそれらの組み合わせを含み得、当該少なくとも1つのプローブが、結合によって当該表面に結合される、1つ以上のチャンネル；及び当該プログラム可能ヌクレアーゼによる当該レポーターの切断時に放出されるシグナルを検出することによって、当該1つまたは複数の目的の標的配列の存在を決定するための複数のセンサーを含む、デバイスの様々な実施形態が記載される。

30

【0011】

本明細書には、標的核酸を含むサンプルを受け取るように構成された、サンプル境界面；サンプル境界面と流体連通し、サンプル境界面を介して受け取ったサンプルを増幅するように構成された、反応チャンバ（例えば、加熱領域）；加熱領域と流体連通する検出領域；及びサンプル境界面内、加熱領域内、及び／または検出領域内に配置されるプログラム可能ヌクレアーゼプローブを含み；シグナルは、プログラム可能ヌクレアーゼプローブと、加熱領域内、サンプル境界面内、及び／または検出領域内の標的核酸との間の選択的結合を介して生成され；検出領域は、標的核酸の存在に対応するシグナルを検出するように構成され；かつ標的核酸の存在または非存在が、サンプルがサンプル境界面で受け取られた後、30分未満の時間に決定される、標的核酸を検出するための様々なデバイスが記載される。いくつかの実施形態では、増幅試薬を含む試薬ミックスがある。いくつかの実施形態では、試薬ミックスは凍結乾燥される。いくつかの実施形態では、試薬ミックスは、サンプル境界面と加熱領域の両方と流体連通するデバイスの領域に配置される。いくつ

40

50

かの実施形態では、試薬ミックスが、サンプル境界面内、加熱領域内、検出領域内、及び／またはサンプル境界面と加熱領域の間の領域内に配置される。いくつかの実施形態では、加熱領域は増幅試薬を含む。いくつかの実施形態では、サンプルは、ループ媒介等温増幅（LAMP）を介して増幅される。いくつかの実施形態では、加熱領域は、等温または循環しない温度プロファイルを維持するように構成される。いくつかの実施形態では、等温または非サイクル温度プロファイルは、約30℃から約60℃の間である。いくつかの実施形態では、等温または非サイクル温度プロファイルは、約55℃から約60℃である。いくつかの実施形態では、サンプル境界面は、サンプルを含むスワブを受け取るように構成された区画を含む。いくつかの実施形態では、区画は、サンプルをスワブからデバイスに移すように構成されたスクレーパを含む。いくつかの実施形態では、区画は、スワブからサンプルを抽出するように構成された境界面溶液を含む。いくつかの実施形態では、境界面溶液は、緩衝液または溶解緩衝液を含む。いくつかの実施形態では、サンプル境界面は、ピペッティングによってスワブからサンプルを受け取るように構成される。いくつかの実施形態では、サンプル境界面は、サンプルを含む容器からサンプルを受け取るように構成された区画を含む。いくつかの実施形態では、容器は、シリンジを含む。いくつかの実施形態では、シリンジ境界面は、そこを通してサンプルを受け取るための開口部を含む。いくつかの実施形態では、シリンジ境界面開口部は、i) 加熱領域、及び／または ii) 加熱領域と流体連通する別の区画と流体連通している。いくつかの実施形態では、サンプル境界面は、サンプルを流体として受け取るように構成される。いくつかの実施形態では、加熱領域及び検出領域は、デバイス上の同じ位置に配置される。いくつかの実施形態では、加熱領域及び検出領域は、デバイスの同じ区画内に配置される。いくつかの実施形態では、加熱領域は、そこを通る流体移動のためのチャネルを含む。いくつかの実施形態では、チャネルが、サンプル境界面及び検出領域と直接的または間接的に流体連通し、それによって、サンプルがサンプル境界面から検出領域に移動できるようにする。いくつかの実施形態では、チャネルは、螺旋構成または蛇行構成を含む。いくつかの実施形態では、そこを通る流体移動のための2つ以上のチャネルがあり、2つ以上のチャネルのうちの少なくとも1つのチャネルは、サンプルをサンプル境界面から検出領域に移動させるように構成される。いくつかの実施形態では、加熱領域の各チャネルは、1つまたは複数の可動機構を含む。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の可動機構は、i) サンプル境界面と加熱領域との間のサンプルの移動を制御するための第1の可動機構、及び／または ii) 加熱領域と検出領域との間のサンプルの移送を制御するための、加熱領域と検出領域との間の第2の可動機構を含む。いくつかの実施形態では、加熱領域の少なくとも1つのチャネルは、サンプルを2つ以上のサブサンプルに分離するように構成された2つ以上の加熱区画を含み、2つ以上の区画は、1つまたは複数の可動機構の可動機構を介して互いに分離されている。いくつかの実施形態では、各加熱区画は、対応する加熱要素によって加熱されるように構成される。いくつかの実施形態では、デバイスの少なくとも1つの加熱要素は、化学的加熱要素を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの化学的加熱要素は酢酸ナトリウムである。いくつかの実施形態では、加熱領域は、サンプル境界面及び検出領域と流体連通するチャンバを含む。いくつかの実施形態では、加熱領域は、その中に固定化されたレポーターを含み、レポーターは、活性化されたプログラム可能ヌクレアーゼと標的核酸との間の選択的結合を介して検出部分を放出するように構成され、それによって、シグナルの生成を可能にする。いくつかの実施形態では、レポーターは、加熱領域の表面に固定された支持体を介して加熱領域に固定される。いくつかの実施形態では、支持体は、ビーズ、コーティング、及び散在ポリマーを含む。いくつかの実施形態では、支持体は、固体支持体を含む。いくつかの実施形態では、加熱領域の表面は、表面の窪んだ部分であるウェルを含み、支持体はウェル内に配置される。いくつかの実施形態では、サンプルをサンプル境界面から検出領域に移動させるための1つまたは複数のチャネルがある。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のチャネルは、サンプル境界面内、サンプル境界面と加熱領域の間、加熱領域内、加熱領域と検出領域の間、及び／または検出領域内に位置する。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のチャネルは複数のチ

10

20

30

40

50

チャンネルを含み、複数のチャンネルは、直列に配置された少なくとも1組のチャンネルを含む。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のチャンネルが複数のチャンネルを含み、複数のチャンネルは、平行に配置された少なくとも1組のチャンネル（平行なチャンネル）を含み、それによって、サンプルが少なくとも1組の平行なチャンネルの各チャンネル内でサブサンプルに分割されることを可能にする。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のチャンネルは複数のチャンネルを含み、複数のチャンネルは、デバイス内の第1の位置からデバイス内の第2の位置にサンプルを移動させるように構成された少なくとも1組のチャンネルを含み、それによって、サンプルを少なくとも1組のチャンネルの各チャンネル内のサブサンプルに分割することを可能にする。いくつかの実施形態では、少なくとも1組のチャンネルは、長さが異なる及び／または構成が異なる2つ以上のチャンネルを含み、これにより、2つ以上の対応するサブサンプルに対して特定の条件を指定できる。いくつかの実施形態では、特定の条件は、特定の加熱温度範囲、特定の加熱持続時間、デバイス上の任意の領域内または位置内の特定の滞留時間、特定のインキュベーション時間、特定の試薬との接触、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1組のチャンネルは、同じ長さ及び／または構成を有する2つ以上のチャンネルを含み、それによって、2つ以上の対応するサブサンプルに対して特定の条件を指定することが可能になる。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のチャンネルのチャンネルは、放射状構成、螺旋構成、蛇行構成、線形構成、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのアクチュエータである。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのアクチュエータは、プランジャ、ばね作動プランジャ、またはばね機構を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのアクチュエータは手動で作動される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのアクチュエータの第1のアクチュエータは、第1のアクチュエータの手動作動によってサンプルをサンプル境界面から加熱領域に移動させるように構成される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのアクチュエータの第2のアクチュエータは、第2のアクチュエータの手動作動を介して検出部分を加熱領域から検出領域に移動させるように構成される。いくつかの実施形態では、デバイスは、電力なしで手動で操作されるように構成されている。いくつかの実施形態では、電源がある。いくつかの実施形態では、電源は、1つまたは複数の電池を含む。いくつかの実施形態では、加熱領域は、加熱要素を介してサンプルを加熱するように構成される。いくつかの実施形態では、加熱要素は、化学的加熱要素を含む。いくつかの実施形態では、化学的加熱要素は酢酸ナトリウムである。いくつかの実施形態では、シグナルは視覚的に検出可能である。いくつかの実施形態では、プログラム可能ヌクレアーゼはガイド核酸を含む。いくつかの実施形態において、ガイド核酸は修飾される。いくつかの実施形態では、ガイド核酸は、少なくとも1つのメチル基で修飾される。いくつかの実施形態では、プログラム可能ヌクレアーゼは、C a s 酵素をさらに含む。いくつかの実施形態では、C a s 酵素は、C a s 1 2、C a s 1 3、C a s 1 4、C a s 1 4 a、C a s 1 4 a 1、及びC a s P h i からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、標的核酸は、呼吸器障害または呼吸器病原体を示す。いくつかの実施形態では、呼吸器障害または呼吸器病原体が、S A R S - C o V - 2 及び対応する変異体、2 9 E）、N L 6 3、O C 4 3、H K U 1、M E R S - C o V、（M E R S）、S A R S - C o V（S A R S、F l u A、F l u B、R S V、ライノウイルス、ストレプトA（S t r e p A）、及びT B からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、デバイスは、ウイルス感染と細菌感染とを区別するように構成されている。いくつかの実施形態では、標的核酸は、性感染症（S T I）または女性の健康に関連する感染症を示している。いくつかの実施形態では、S T I または女性の健康に関連する感染症は、C T、N G、M G、T V、H P V、カンジダ、B . 腔疾患 梅毒、及びU T I からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、標的核酸は一塩基多型（S N P）を含む。いくつかの実施形態では、S N P は、N A S H 障害またはアルファ-1 障害を示す。いくつかの実施形態では、標的核酸は、H I V、H B V、H C V、及びジカからなる群から選択される血液媒介性病原体である。いくつかの実施形態では、標的核酸は、ピロリ菌（H . P y l o r i）、C . ディフィシル（C . D i f f i c i l e）、ノロウイルス、

10

20

30

40

50

H S V、及び髄膜炎 (M e n i n g i t i s) を示す。いくつかの実施形態では、標的核酸を含まないサンプルから1つまたは複数の粒子を濾過するように構成された物理的フィルタがある。いくつかの実施形態では、物理的フィルタは、サンプル境界面と加熱領域との間に位置し、これらと流体連通している。いくつかの実施形態では、プログラム可能ヌクレアーゼ、ガイド核酸、またはレポーターは、結合によってデバイス表面に固定化される。いくつかの実施形態では、結合は、共有結合、非共有結合、静電結合、ストレプトアビジンとビオチンとの間の結合、アミド結合、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、結合は非特異的吸収を含む。いくつかの実施形態では、プログラム可能ヌクレアーゼは、結合によってデバイス表面に固定化され、結合は、プログラム可能ヌクレアーゼと表面の間にある。いくつかの実施形態では、レポーターは、結合によってデバイス表面に固定化され、結合はレポーターと表面の間にある。いくつかの実施形態では、ガイド核酸は、結合によって表面に固定化され、結合はガイド核酸の5'末端と表面の間にある。いくつかの実施形態では、ガイド核酸は、結合によって表面に固定化され、結合はガイド核酸の3'末端と表面の間にある。いくつかの実施形態では、複数のガイド核酸であり、複数のガイド核酸の各ガイド核酸は、標的核酸の異なるセグメントに対して相補的であるか、または部分的に相補的である。いくつかの実施形態では、サンプルは、標的核酸（複数可）を含むサンプル、増幅試薬を含むサンプル、増幅されたサンプル、及び／または検出部分を含むサンプルを含む。

10

【0012】

本明細書には、サンプルを受け取るためのサンプル境界面；サンプル境界面と流体連通する反応チャンバ（例えば、加熱領域）であって、加熱領域は、ガイド核酸及びレポーターを含むプログラム可能ヌクレアーゼを含み、プログラム可能ヌクレアーゼは、ガイド核酸と標的核酸との間の選択的結合によって活性化され、レポーターは、活性化されたプログラム可能ヌクレアーゼによる切断の際に検出部分を放出するように構成されている、加熱領域；加熱領域を加熱するように構成された化学的加熱要素；加熱領域と流体連通している検出領域であって、放出された検出部分によって生成されたシグナルを検出するように構成された、検出領域；サンプルを加熱領域から検出領域に移送するように構成された、第1の手動アクチュエータ；及び増幅試薬を含む試薬ミックスであって、サンプル境界面内、加熱領域内、検出領域内、及び／またはサンプル境界面と加熱領域との間に配置されている、試薬ミックスを含み、かつ生成されたシグナルを介して30分未満の時間内に標的核酸の存在または非存在を決定するように構成されている、サンプル中の標的核酸を検出するための様々なデバイスが記載される。いくつかの実施形態では、試薬ミックスは凍結乾燥される。いくつかの実施形態では、加熱領域は、標的核酸を増幅するように構成される。いくつかの実施形態では、加熱領域は増幅試薬を含む。いくつかの実施形態では、標的核酸は、ループ媒介等温増幅 (L A M P) を介して増幅される。いくつかの実施形態では、加熱領域は、等温または循環しない温度プロファイルを維持するように構成される。いくつかの実施形態では、等温または非サイクル温度プロファイルは、約30℃から約60℃の間である。いくつかの実施形態では、等温または非サイクル温度プロファイルは、約55℃から約60℃である。いくつかの実施形態では、サンプル境界面は、サンプルを含むスワブを受け取るように構成された区画を含む。いくつかの実施形態では、区画は、サンプルをスワブからデバイスに移すように構成されたスクレーパを含む。いくつかの実施形態では、区画はスワブからサンプルを抽出するように構成された境界面溶液を含む。いくつかの実施形態では、境界面溶液は、緩衝液または溶解緩衝液を含む。いくつかの実施形態では、サンプル境界面は、ピペッティングによってスワブからサンプルを受け取るように構成される。いくつかの実施形態では、サンプル境界面は、サンプルを含む容器からサンプルを受け取るように構成された区画を含む。いくつかの実施形態では、容器は、シリンジを含む。いくつかの実施形態では、シリンジ境界面は、そこを通してサンプルを受け取るための開口部を含む。いくつかの実施形態では、シリンジ境界面開口部は、加熱領域、または加熱領域と流体連通する別の区画と流体連通している。いくつかの実施形態では、サンプル境界面は、サンプルを流体として受け取るように構成される。いくつ

20

30

40

50

かの実施形態では、加熱領域及び検出領域は、デバイス上の同じ位置に配置される。いくつかの実施形態では、加熱領域及び検出領域は、デバイスの同じ区画内に配置される。いくつかの実施形態では、加熱領域は、そこを通る流体移動のためのチャンネルを含む。いくつかの実施形態では、チャンネルが、サンプル境界面及び検出領域と直接的または間接的に流体連通し、それによって、サンプルがサンプル境界面から検出領域に移動できるようにする。いくつかの実施形態では、チャンネルは、螺旋構成または蛇行構成を含む。いくつかの実施形態では、そこを通る流体移動のための2つ以上のチャンネルがあり、2つ以上のチャンネルのうちの少なくとも1つのチャンネルは、サンプルをサンプル境界面から検出領域に移動させるように構成される。いくつかの実施形態では、加熱領域の各チャンネルは、1つまたは複数の可動機構を含む。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の可動機構は、
i) サンプル境界面と加熱領域との間のサンプルの移動を制御するための第1の可動機構、及び／または ii) 加熱領域と検出領域との間のサンプルの移送を制御するための、加熱領域と検出領域との間の第2の可動機構を含む。いくつかの実施形態では、加熱領域の少なくとも1つのチャンネルは、サンプルを2つ以上のサブサンプルに分離するように構成された2つ以上の加熱区画を含み、2つ以上の区画は、1つまたは複数の可動機構の可動機構を介して互いに分離されている。いくつかの実施形態では、各加熱区画は、少なくとも1つの加熱要素の対応する加熱要素によって加熱されるように構成される。いくつかの実施形態では、デバイスの少なくとも1つの加熱要素は、化学的加熱要素を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの化学的加熱要素は酢酸ナトリウムである。いくつかの実施形態では、加熱領域はチャンバを含む。いくつかの実施形態では、加熱領域は、その中に固定化されたレポーターを含む。いくつかの実施形態では、レポーターは、加熱領域の表面に固定された支持体を介して加熱領域に固定される。いくつかの実施形態では、支持体は、ビーズ、コーティング、及び散在ポリマーを含む。いくつかの実施形態では、支持体は、固体支持体を含む。いくつかの実施形態では、加熱領域の表面は、表面の窪んだ部分であるウェルを含み、支持体はウェル内に配置される。いくつかの実施形態では、サンプルをサンプル境界面から検出領域に移動させるための1つまたは複数のチャンネルがある。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のチャンネルは、サンプル境界面内、サンプル境界面と加熱領域の間、加熱領域内、加熱領域と検出領域の間、及び／または検出領域内に位置する。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のチャンネルは複数のチャンネルを含み、複数のチャンネルは、直列に配置された少なくとも1組のチャンネルを含む。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のチャンネルが複数のチャンネルを含み、複数のチャンネルは、平行に配置された少なくとも1組の平行なチャンネル（平行なチャンネル）を含み、それによって、サンプルが少なくとも1組の平行なチャンネルの各チャンネル内でサブサンプルに分割されることを可能にする。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のチャンネルは複数のチャンネルを含み、複数のチャンネルは、デバイス内の第1の位置からデバイス内の第2の位置にサンプルを移動させるように構成された少なくとも1組のチャンネルを含み、それによって、少なくとも1組のチャンネルの各チャンネル内のサブサンプルに分割することを可能にする。いくつかの実施形態では、少なくとも1組のチャンネルは、異なる長さ及び／または異なる構成を有する2つ以上のチャンネルを含み、それによって、2つ以上の対応するサブサンプルに対して特定の条件を指定することが可能になる。いくつかの実施形態では、特定の条件は、特定の加熱温度範囲、特定の加熱持続時間、デバイス上の任意の領域内または位置内の特定の滞留時間、特定のインキュベーション時間、特定の試薬との接触、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1組のチャンネルは、同じ長さ及び／または構成を有する2つ以上のチャンネルを含み、それによって、2つ以上の対応するサブサンプルに対して特定の条件を指定することが可能になる。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のチャンネルのチャンネルは、放射状構成、螺旋構成、蛇行構成、線形構成、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのアクチュエータは、プランジャ、ばね作動プランジャ、またはばね機構を含む。いくつかの実施形態では、デバイスは、電力なしで手動で操作されるように構成されている。いくつかの実施形態では、デバイスは、電源を含み得る。いくつかの実

10

20

30

40

50

施形態では、電源は、1つまたは複数の電池を含む。いくつかの実施形態では、加熱領域は、加熱要素を介してサンプルを加熱するように構成される。いくつかの実施形態では、加熱要素は、化学的加熱要素を含む。いくつかの実施形態では、化学的加熱要素は酢酸ナトリウムである。いくつかの実施形態では、シグナルは視覚的に検出可能である。いくつかの実施形態において、ガイド核酸は修飾される。いくつかの実施形態では、ガイド核酸は、少なくとも1つのメチル基で修飾される。いくつかの実施形態では、プログラム可能ヌクレアーゼは、Cas酵素をさらに含む。いくつかの実施形態では、Cas酵素は、Cas12、Cas13、Cas14、Cas14a、Cas14a1、及びCasPhiからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、標的核酸は、呼吸器障害または呼吸器病原体を示す。いくつかの実施形態では、呼吸器障害または呼吸器病原体が、SARS-CoV-2及び対応する変異体、29E)、NL63、OC43、HKU1、MERS-CoV、(MERS)、SARS-CoV(SARS、Flu A、Flu B、RSV、ライノウイルス、ストレプトA、及びTBからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、デバイスは、ウイルス感染と細菌感染とを区別するように構成されている。いくつかの実施形態では、標的核酸は、性感染症(STI)または女性の健康に関連する感染症を示している。いくつかの実施形態では、STIまたは女性の健康に関連する感染症は、CT、NG、MG、TV、HPV、カンジダ、B. 腔疾患 梅毒、及びUTIからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、標的核酸は一塩基多型(SNP)を含む。いくつかの実施形態では、SNPは、NASH障害またはアルファ-1障害を示す。いくつかの実施形態では、標的核酸は、HIV、HBV、HCV、及びジカからなる群から選択される血液媒介性病原体である。いくつかの実施形態では、標的核酸は、ピロリ菌、C. ディフィシル、ノロウイルス、HSV、及び髄膜炎を示す。いくつかの実施形態では、標的核酸を含まないサンプルから1つまたは複数の粒子を濾過するように構成された物理的フィルタがある。いくつかの実施形態では、物理的フィルタは、サンプル境界面と加熱領域との間に位置し、これらと流体連通している。いくつかの実施形態では、プログラム可能ヌクレアーゼ、ガイド核酸、またはレポーターは、結合によってデバイス表面に固定化される。いくつかの実施形態では、結合は、共有結合、非共有結合、静電結合、ストレプトアビジンとビオチンとの間の結合、アミド結合、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、結合は非特異的吸収を含む。いくつかの実施形態では、プログラム可能ヌクレアーゼは、結合によってデバイス表面に固定化され、結合は、プログラム可能ヌクレアーゼと表面の間にある。いくつかの実施形態では、レポーターは結合によってデバイス表面に固定化され、結合はレポーターと表面の間にある。いくつかの実施形態では、ガイド核酸は結合によって表面に固定化され、結合はガイド核酸の5'末端と表面の間にある。いくつかの実施形態では、ガイド核酸は結合によって表面に固定化され、結合はガイド核酸の3'末端と表面の間にある。いくつかの実施形態では、複数のガイド核酸であり、複数のガイド核酸の各ガイド核酸は、標的核酸の異なるセグメントに対して相補的であるか、または部分的に相補的である。いくつかの実施形態では、サンプルは、標的核酸(複数可)を含むサンプル、増幅試薬を含むサンプル、増幅されたサンプル、及び／または検出部分を含むサンプルを含む。

10

20

30

40

50

【0013】

本明細書には、サンプルを受け取るためのサンプル境界面、増幅試薬を含む試薬ミックス、サンプル境界面と流体連通する反応チャンバ(例えば、加熱領域)、及びマイクロアレイ形式の複数の検出スポットを含む表面を含む検出領域であって、複数の検出スポットのそれぞれがレポータープローブを含み、各レポータープローブが、活性化されたプログラム可能ヌクレアーゼによる切断を介して検出部分を放出するように構成されている、検出領域を含み、複数の検出スポットのそれぞれが、異なるプログラム可能ヌクレアーゼプローブを含み、デバイスは、複数の検出スポットのそれぞれにおける各レポーターの各検出部分の放出を介して、30分未満の時間内に複数の標的核酸のそれぞれの存在または非存在を決定するように構成されている、サンプル中の複数の標的核酸を多重検出するためのマイクロアレイ装置の様々な実施形態が記載される。いくつかの実施形態では、少なく

とも1つのプログラム可能ヌクレアーゼプローブはCas酵素を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのプログラム可能ヌクレアーゼの各Cas酵素は、Cas12、Cas13、Cas14、Cas14a、及びCas14a1からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、マイクロアレイデバイスは、本明細書に記載されるデバイスの様々な実施形態のすべてを含み得る。

【0014】

サンプル中の標的核酸を検出するためのキットの様々な実施形態が本明細書に記載されており、キットは、スワブ；溶出試薬；溶解試薬；デバイスを含み、デバイスは、サンプルを受け取るためのサンプル境界面；サンプル境界面と流体連通し、サンプルを受け取るように構成された、反応チャンバ（例えば、加熱領域）であって、加熱領域は、ガイド核酸を含むプログラム可能ヌクレアーゼと加熱領域内に配置されたレポーターとを含み、プログラム可能ヌクレアーゼは、ガイド核酸及び標的核酸間の選択的結合によって活性化され、レポーターは、活性化されたプログラム可能ヌクレアーゼを介して検出部分を放出するように構成される、加熱領域；加熱領域への加熱をもたらすように構成された化学的加熱要素；加熱領域とサンプル境界面に流体連通している検出領域であって、放出された検出部分によって生成されたシグナルを検出するように構成され、それによって、標的核酸の存在を検出する、検出領域；及び増幅試薬を含む試薬ミックスであって、サンプル境界面内、加熱領域内、検出領域内、及び／またはサンプル境界面と加熱領域との間に配置される、試薬ミックスを含み、かつデバイスは、放出された検出部分を介して30分未満の時間内に標的核酸の存在または非存在を決定するように構成されている。いくつかの実施形態では、サンプル境界面は、スワブからサンプルを受け取るように構成される。いくつかの実施形態では、収集管であって、収集管がスワブを受け入れるように構成され、スワブに含まれるサンプルが収集管に移され、収集管がデバイスから分離されている。いくつかの実施形態では、収集管は、サンプル境界面に挿入されて、サンプルをデバイスに移送するように構成される。いくつかの実施形態では、収集管は、シリンジである。いくつかの実施形態では、キットは、溶出試薬及び／または溶解試薬を含む第1の容器を含む。いくつかの実施形態では、キットは希釈試薬を含む。いくつかの実施形態では、キットは、希釈試薬を含む第2の容器を含む。いくつかの実施形態では、プログラム可能ヌクレアーゼは、Cas酵素を含む。いくつかの実施形態では、Cas酵素は、Cas12、Cas13、Cas14、Cas14a、及びCas14a1を含む群から選択される。いくつかの実施形態では、キットは、本明細書に記載されるデバイスの様々な実施形態のすべてを含み得る。

【0015】

サンプル中の標的核酸を検出するための方法の様々な実施形態が本明細書に記載されており、この方法は、サンプルがデバイスに導入された後、30分未満で標的核酸の存在または非存在を決定するように構成されたデバイスを提供する段階であって、デバイスは、サンプル境界面、サンプル境界面と流体連通する加熱領域、及び加熱領域と流体連通する検出領域を含む、段階；デバイスのサンプル境界面にサンプルを導入する段階；サンプルを、増幅試薬を含む試薬ミックスと混合して、混合サンプル溶液を生成する段階；混合サンプル溶液をサンプル境界面から加熱領域に移す段階；加熱領域で混合サンプル溶液を加熱することにより、サンプルを増幅する段階；プログラム可能ヌクレアーゼベースのアッセイを実行する段階であって、ガイド核酸と標的核酸との間の選択的結合が、レポータープローブを切断するように構成されたプログラム可能ヌクレアーゼプローブを活性化し、それによって、標的核酸が存在する場合に検出部分をサンプル溶液中に放出する、段階；加熱領域から検出領域に、増幅されたサンプルを有する混合サンプル溶液を移送する段階；及び検出領域の放出された検出部分の捕捉を介して、サンプル中の標的核酸の存在または非存在を決定する段階を含む。いくつかの実施形態では、標的核酸を増幅する段階及びプログラム可能ヌクレアーゼアッセイを実施する段階は、加熱領域においてワンポット反応として実施される。いくつかの実施形態では、ワンポット反応は約30℃から60℃の間で行われる。いくつかの実施形態では、ワンポット反応は約55℃で行われる。いくつ

かの実施形態では、ワンポットのプログラム可能ヌクレアーゼ反応は、Cas酵素を含み、Cas酵素は、Cas12、Cas13、Cas14、Cas14a、及びCas14a1を含む群から選択される。いくつかの実施形態では、この方法は、加熱領域に入る前に、試薬ミックスを有するサンプルを濾過する段階をさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、標的核酸を含まないサンプルから1つまたは複数の粒子を濾過することを含む、サンプルを濾過する段階をさらに含む。いくつかの実施形態では、フィルタは、サンプル境界面と加熱領域との間に位置し、これらと流体連通している。いくつかの実施形態では、この方法は、複数のガイド核酸をさらに含み、複数のガイド核酸の各ガイド核酸は、標的核酸の異なるセグメントに対して相補的であるか、または部分的に相補的である。いくつかの実施形態では、この方法は、段階(a)の前に、標的核酸を含むサンプル溶液を含む収集管を提供する段階、及び収集管をデバイスのサンプル境界面に挿入することにより、サンプル溶液をデバイスに移す段階であって、サンプル溶液が溶解し、増幅試薬を含む凍結乾燥反応ミックスと混合する、段階をさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、本明細書に記載されるデバイスの様々な実施形態のすべてを含み得る。

10

【0016】

参照による援用

本明細書で言及される全ての刊行物、特許、及び特許出願は、各個の刊行物、特許、または特許出願が参照により援用されることが具体的かつ個別に示されているのと同程度に、参照により本明細書に援用される。

【0017】

20

本発明の新規の特徴は、添付の特許請求の範囲で詳細に記述されている。本発明の特徴及び利点のさらなる理解は、本発明の原理が利用される説明的実施形態を記述する以下の詳細な説明と、添付の図面とを参照することによって得られるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】1つ以上の標的配列が検出される前に、1つ以上の標的配列を含むサンプルが収集及び調製される、プログラム可能ヌクレアーゼベースの検出デバイスのプロセスフローチャートを示す。サンプル調製には、区画化されたサーモサイクリングが含まれる。

【図2】AからBは、本明細書に記載のプログラム可能ヌクレアーゼベースの検出デバイスの上面図及び断面図を示す。

30

【図3】AからBは、本明細書に記載の、可動機構を有する複数のサーモサイクリング区画を含むプログラム可能ヌクレアーゼベースの検出デバイスの断面図を示す。

【図4】AからBは、本明細書に記載の、プログラム可能ヌクレアーゼと、相補的結合事象の前後にプログラム可能ヌクレアーゼと複合化されたガイド核酸とを含むプログラム可能ヌクレアーゼプローブを示す。

【図5】AからBは、本明細書に記載の、相補的結合事象及び標的配列または標的核酸の存在を示すシグナルの生成の前後のプログラム可能ヌクレアーゼプローブを示す。

【図6】本明細書に記載されるように、センサーによって検出可能な増幅されたシグナルを生成する反応を経ることができると大分子量レポーターを示す。

【図7】AからCは、本明細書に記載の、プログラム可能ヌクレアーゼベースの検出デバイスの様々な多重化の実施形態を示す。

40

【図8】ポイントオブニード(PON)5重呼吸パネルのアッセイ設計を示す。

【図9】本明細書に記載の実施形態による、PON使い捨てデバイスを示す。

【図10】AからCは、本明細書に記載の消耗品及び構成要素の実施形態を示す。

【図11】AからDは、本明細書に記載の消耗品の構成要素の様々な実施形態をさらに示している。

【図12】本明細書に記載の消耗デバイスの弁の位置決めを示す。

【図13】本明細書に記載の、電気化学レポーターとのHERC2遺伝子DETECTR反応の酸化曲線を示す。

【図14】本明細書に記載の、電気化学レポーターとのHERC2 DETECTR反応

50

の還元曲線を示す。

【図 1 5】本明細書に記載されるように、HERC2 DETECTOR 反応の前後に取られたサイクリックボルタモグラムの提示する。

【図 1 6】本明細書に記載の、電気化学レポーターとの SARS-CoV-2 DETECTOR 反応の酸化曲線を示す。

【図 1 7】本明細書に記載の、電気化学レポーター及び対照との SARS-CoV-2 DETECTOR 反応の矩形波ボルタンメトリー測定のための完全なデータセットを提示する。

【図 1 8】本明細書に記載の、R1763 (N 遺伝子) との複合化マスターミックスを提示する。

【図 1 9】本明細書に記載される矩形波ボルタンメトリー測定の実験条件を提示する。

【図 2 0】本明細書に記載の CRISPR-Cas 診断アッセイ成分の固定戦略を示す。

【図 2 1】本明細書に記載されるように、CRISPR 診断読み出しを可能にするために固定戦略が組み合わされる実施形態を示す。

【図 2 2】本明細書に記載の、gRNA に対する様々な化学修飾の適合性の評価についての結果を提示する。

【図 2 3】本明細書に記載の、ストレプトアビジン被覆表面への gRNA の固定化の結果を示す。

【図 2 4】本明細書に記載の Cas タンパク質-RNA 複合体の固定化の結果を示す。

【図 2 5】A から B は、本明細書に記載のレポーターの固定化の結果を示す。

【図 2 6】本明細書に記載の固定化リボ核タンパク質 (RNP) とレポーター系の組み合わせの機能試験の結果を示す。

【図 2 7】A から E は、本明細書に記載されるように、Cas 複合体固定化と組み合わせた固定化についての異なるレポーターの評価の結果を提示する。

【図 2 8】A から C は、Cy5 レポーターが本明細書に記載のように DETECTOR に対して機能的であるという結果を提示する。

【図 2 9】A から F は、本明細書に記載の複合体形成ステップを含む固定化最適化の結果を提示する。

【図 3 0】A から B は、gRNA / レポーター結合時間とレポーター濃度を含む、固定化最適化の結果を提示する。

【図 3 1】A から C は、修飾された gRNA の l y の標的識別を示す結果を提示する。

【図 3 2】A から E は、ビオチン修飾 Cas13a gRNA が機能的であることを示す結果を提示する。

【図 3 3】ビオチン化レポーターを含むストレプトアビジン被覆顕微鏡スライドの結果を示す。

【図 3 4】A から B は、ガラスのスライド上での DETECTOR 反応の結果を提示する。

【図 3 5】本明細書に記載されるように、実験条件を示す。

【図 3 6】本明細書に記載されるように、実験条件を示す。

【図 3 7】A から B は、本明細書に記載されるように、実験条件を示す。

【図 3 8】A から B は、本明細書に記載されるように、実験条件を示す。

【図 3 9】A から B は、本明細書に記載されるように、実験条件を示す。

【図 4 0】A から B は、本明細書に記載されるように、実験条件を示す。

【図 4 1】A から B は、本明細書に記載されるように、実験条件を示す。

【図 4 2】本明細書に記載されるように、実験条件を示す。

【図 4 3】DETECTOR アッセイデバイスのレイアウトを示す。

【図 4 4】スライディング弁デバイスの概略図を示す。

【図 4 5】図 4 4 に示されるスライディング弁デバイスを通るサンプル移動の図を示す。

【図 4 6-1】最初の溶解及び濃縮緩衝液スクリーニングのためのサンプル調製最適化の結果を提示する。

【図 4 6-2】図 4 6-1 の続きの図である。

10

20

30

40

50

【図 47-1】 Cas 14 a . 1 を使用した Hot pot を含むサンプル調製最適化の結果を示している。

【図 47-2】 図 47-1 の続きの図である。

【図 48-1】 L A N C R (C a s 1 2 M O 8 D E T E C T R) 対照実験を含むサンプル調製最適化の結果を提示する。

【図 48-2】 図 48-1 の続きの図である。

【図 49 A】 グループ 1 による凍結乾燥最適化の結果を示している。左が R T - L A M P 、右が D E T E C T R を使用したトレハロースである。

【図 49 B】 グループ 1 による凍結乾燥最適化の結果を示している。左が R T - L A M P 、右が D E T E C T R を使用したトレハロースである。

【図 50 A】 グループ 2 の凍結乾燥最適化結果を示している。PVP 40、ソルビトール、マンニトール、マンノッセのものである。図 50 A に示されているように、R T - L A M P M M を 3 から 8 % の候補賦形剤で用いている。また、図 50 B に示すように、D E T E C T R の結果を示している。

【図 50 B】 グループ 2 の凍結乾燥最適化結果を示している。PVP 40、ソルビトール、マンニトール、マンノッセのものである。図 50 A に示されているように、R T - L A M P M M を 3 から 8 % の候補賦形剤で用いている。また、図 50 B に示すように、D E T E C T R の結果を示している。

【図 51 A】 グループ 2 の凍結乾燥最適化の結果、すなわち PVP 40、ソルビトール、マンニトール、マンノースについて、3 から 5 % の候補賦形剤と共に D E T E C T R M M を使用した凍結乾燥最適化結果を示す。

【図 51 B】 グループ 2 の凍結乾燥最適化の結果、すなわち PVP 40、ソルビトール、マンニトール、マンノースについて、3 から 5 % の候補賦形剤と共に D E T E C T R M M を使用した凍結乾燥最適化結果を示す。

【図 52】 トレハロース機能スクリーニングにおける R T - L A M P マスターミックスの凍結乾燥最適化結果を提示する。

【図 53 A】 本明細書に記載の、トレハロース中の D E T E C T R マスターミックスの凍結乾燥最適化結果を提示する。

【図 53 B】 本明細書に記載の、トレハロース中の D E T E C T R マスターミックスの凍結乾燥最適化結果を提示する。

【図 54】 A から B は、単一反応体積（ワンポット）での C a s 1 4 a D E T E C T R による L A M P 増幅を伴う Hot Pot の結果を示す。

【図 55】 単一反応体積（ワンポット）での C a s 1 4 a D E T E C T R による R T - L A M P 増幅の結果を示す。

【図 56 A】 C a s 1 4 a 及び低温 R T - L A M P (L o w L A M P) と適合する緩衝液を同定するための結果を提示する。

【図 56 B】 C a s 1 4 a 及び低温 R T - L A M P (L o w L A M P) と適合する緩衝液を同定するための結果を提示する。

【図 57】 低温 R T - L A M P 条件での C a s 1 4 の能力に対する個々の成分の影響を含む結果を提示する。

【図 58】 単一反応体積（ワンポット）での C a s 1 4 a D E T E C T R による L A M P 増幅の結果を示す。

【図 59 A】 50℃で L o w L A M P を用いたワンポット C a s 1 4 の結果を提示する。

【図 59 B】 50℃で L o w L A M P を用いたワンポット C a s 1 4 の結果を提示する。

【図 60】 55℃での B s m DNA ポリメラーゼによるワンポット C a s 1 4 の結果を示す。

【図 61】 ワンポット D E T E C T R (H o t P o t) を含む検出限界研究の結果を提示する。

【図 62】 55℃で 2 つの異なる DNA ポリメラーゼが試験された、ワンポット D E T E C T R (H o t P o t) を含む検出限界研究の結果を提示する。

10

20

30

40

50

【図 6 3】 N E A R アッセイで B s t ポリメラーゼを置換することを含む研究の結果を示しており、低温での S A R S - C o V - 2 検出が可能であることを示している。

【図 6 4】 C a s 1 4 a 最適緩衝液における N E A R アッセイ増幅機能の結果を提示する。

【図 6 5】 K O A c 塩濃度範囲における C a s 1 4 a 機能の結果を提示する。

【図 6 6】 C a s 1 4 a 最適緩衝液における N E A R 能力を改善するために K O A c の濃度を増加させることを含む研究の結果を提示する。

【図 6 7】 C a s 1 4 a 最適緩衝液における N E A R 能力を改善するために K O A c の濃度を増加させることを含む研究の結果を提示する。

【図 6 8】 A から B は、それぞれ S A R S - C o V - 2 E 遺伝子アンプリコンに対する C a s 1 4 a . 1 c r R N A の配列と能力の結果を示している。

【図 6 9】 減少する塩濃度での I B 1 3 緩衝液中の K l e n o w (e x o -) N E A R アッセイの能力の評価についての結果を提示する。

【図 7 0】 s R C A の概要を示している。

【図 7 1】 s R C A についてのダンベル DNA テンプレートのスクリーニングからの結果を提示する。

【図 7 2】 上昇する温度にわたって R C A 反応の生成物を検出する C a s 1 4 a の能力を含む研究からの結果を提示する。

【図 7 3】 トリガーオリゴの効果に関する研究の結果を示している。

【図 7 4】 C a s 1 4 ワンポット s R C A に対するトリガーオリゴの滴定を含む研究からの結果を提示する。

【図 7 5】 ワンポット s R C A における C a s 1 2 M 0 8 の評価からの結果を提示する。

【図 7 6】 C a s 1 3 の R C A 正のフィードバックの概要を示している。

【図 7 7】 R C A の C a s 1 3 互換 DNA テンプレートを評価した結果を示している。

【図 7 8】 C a s 1 3 適合 DNA テンプレートが R C A において機能的であるかどうかを評価する研究からの結果を提示する。

【図 7 9】 上昇する温度でのワンポット s R C A 反応における C a s 1 3 機能を含む研究の結果を示している。

【図 8 0】 C a s P i n の概要を示す。

【図 8 1】 C a s P i n の潜在的なヘアピン構造を示している。

【図 8 2 - 1】 2 つのヘアピンを使用した初期設計の結果を示している。

【図 8 2 - 2】 図 8 2 - 1 の続きの図である。

【図 8 3】 g R N A とレポーターの固定化を組み合わせた概略図を左側に示し、 N H S - アミン化学を使用した D E T E C T R 成分の固定化の結果を右側に示す。

【図 8 4】 非特異的結合を減少させるためにコンジュゲーション緩衝液を最適化した結果を提示する。

【図 8 5】 レポーター + ガイド + C a s 1 2 M 0 8 の様々な組み合わせを固定化することを含む研究からの結果を提示する。

【図 8 6】 g R N A と標的濃度を最適化して固定化 D E T E C T R のシグナル対ノイズ比を改善する研究の結果を示している。

【図 8 7】 A から B は、 D E T E C T R 固定化のための修飾及び様々なアミノ修飾の評価からの結果をそれぞれ提示する。

【図 8 8】 迅速なサーモサイクリング + C R I S P R D x による S A R S - C o V - 2 の検出を含む F A S T R アッセイの結果を示している。

【図 8 9】 F A S T R アッセイで最高の能力を発揮するポリメラーゼと緩衝液を決定するための研究の結果を示している。

【図 9 0】 F A S T R を使用した S A R S - C o V - 2 の単一コピー検出の結果を示している。

【図 9 1】 F A S T R での変性及びアニーリング／拡張のための迅速なサイクリング時間の変化の結果を提示する。

10

20

30

40

50

- 【図 9 2】 F A S T R の R T 時間を最小化するための結果を示している。
- 【図 9 3】 F A S T R 能力を向上させる高 p H 緩衝液の結果を示している。
- 【図 9 4】 粗溶解緩衝液との F A S T R の適合性に関する結果を示している。
- 【図 9 5】 最適化されていない F A S T R の多重化の結果を提示する。
- 【図 9 6】 多重 F A S T R の結果を示している。
- 【図 9 7】 多重 F A S T R の検出限界についての結果を提示する。
- 【図 9 8】 重要なプライマーと g R N A を示している。
- 【図 9 9 A】 一緒にプールされた R T - L A M P 及び D E T E C T R アッセイ試薬の両方のワンポットマスターミックスの結果を示している。C a s 1 2 M 0 8 タンパク質を含む同じ反応ミックスのアリコート、各アッセイで別々に実行した。R T - L A M P アッセイの結果を示す。 10
- 【図 9 9 B】 一緒にプールされた R T - L A M P 及び D E T E C T R アッセイ試薬の両方のワンポットマスターミックスの結果を示している。C a s 1 2 M 0 8 タンパク質を含む同じ反応ミックスのアリコート、各アッセイで別々に実行した。D E T E C T R アッセイの結果を示す。
- 【図 1 0 0】 凍結乾燥後に再構成された C a s 1 2 M 0 8 ベースの D E T E C T R マスターミックスの結果を示している。
- 【図 1 0 1】 C a s 1 4 a 1 ベースの D E T E C T R アッセイの結果を提示する。
- 【図 1 0 2 A】 R T - L A M P 及び C a s 1 2 M 0 8 ベースの D E T E C T R アッセイの結果を示しており、試薬マスターミックスを含有する 1 つのサンプルを凍結乾燥前に 2 週間保存した。 20
- 【図 1 0 2 B】 R T - L A M P 及び C a s 1 2 M 0 8 ベースの D E T E C T R アッセイの結果を示しており、試薬マスターミックスを含有する 1 つのサンプルを凍結乾燥前に 2 週間保存した。
- 【図 1 0 3】 少量の凍結乾燥反応マスターミックスの結果を示している。
- 【図 1 0 4】 D E T E C T R 及び R T - L A M P 試薬のプールされ、凍結乾燥されたマスターミックスについての動的走査熱量測定の結果を提示する。
- 【図 1 0 5】 賦形剤のリストを示している。
- 【図 1 0 6】 ハンドヘルドマイクロ流体デバイスで実行されたワンポット D E T E C T R アッセイの結果を示している。 30
- 【図 1 0 7】 本明細書に記載の多重ラテラルフローストリップの実施形態を示す。
- 【図 1 0 8】 本明細書に記載の多重「H o t P o t」を伴うワークフローの実施形態を示す。
- 【図 1 0 9】 本明細書に記載の H R P 紙ベースの検出の実施形態を示す。
- 【図 1 1 0】 本明細書に記載の H R P ベースの多重ラテラルフローアッセイの実施形態を示す。
- 【図 1 1 1】 本明細書に記載の、H R P ベースの多重ラテラルフローアッセイへの多重化 C a s 1 3 固定化アプローチの実施形態を示す。
- 【図 1 1 2】 1 週間離れた 2 回の反復実験についての D N A s e 及び D E T E C T R ベースのアッセイの両方の結果を示す。 40
- 【図 1 1 3】 本明細書に記載のように、複数の C a s 複合体プローブのガイドプーリングの使用が、ラテラルフローアッセイに対するシグナル検出を増強させたことを示す。
- 【図 1 1 4】 個々の g R N A フォーマットを使用する D E T E C T R C a s 1 2 a ベースのアッセイと比較して、プールされたガイド（プール g R N A）フォーマットを使用する G F 1 8 4 標的の増強された C a s 1 2 a ベースの検出を示す D E T E C T R アッセイの結果を示す。
- 【図 1 1 5】 個々のガイドフォーマットを使用する C a s 1 3 a ベースのアッセイと比較して、プールガイドフォーマットを使用する S C 2 標的の C a s 1 3 a ベースの検出の感度の向上を示す D E T E C T R アッセイの結果を示す。
- 【図 1 1 6】 各チャンバに対応する画像を示し、陽性液滴の数をカウントするために使用 50

され、プールされたガイドRNAを含有するCas13a-DETECTRアッセイサンプルが、標的RNAの開始コピー当たりの増幅産物を含有する結晶を、個々のフォーマットのガイドRNAを含むCas13a-DETECTRアッセイのサンプルより多く生成したことを示している。

【図117】増幅後のシグナル強度の測定が、プールされたガイドRNAを含有するCas13a-DETECTRアッセイサンプルが、個々のフォーマットでガイドRNAを含有するCas13a-DETECTRアッセイサンプルよりも、標的テンプレートRNAの開始コピー当たりにより多くのシグナル強度を生成したことを示したことを示す。

【図118】増幅後のシグナル強度の測定が、プールされたガイドRNAを含有するCas13a-DETECTRアッセイサンプルが、個々のフォーマットでガイドRNAを含有するCas13a-DETECTRアッセイサンプルよりも、標的テンプレートRNAの開始コピー当たりにより多くのシグナル強度を生成したことを示したことを示す。図118はまた、陽性液滴の数をカウントすることによって実行された相対定量化により、プールされたガイドRNAを含むCas13a-DETECTRアッセイのサンプルが、ガイドRNAが個別の形式で含まれているCas13a-DETECTRアッセイのサンプルよりも、標的テンプレートRNAの開始コピーあたりの増幅産物を含む結晶を、多く生成したことを示す。

【図119】プールされたガイド(R4637、R4638、R4667、R4676、R4684、R4689、R4691)を含むCas13a-DETECTRアッセイのサンプルが、個別の形式の単一のガイドR4684、R4667、またはR4785(RNAsePガイド)を含むCas13a-DETECTRサンプルよりも高い標的の開始コピーあたりの標的検出感度を呈さなかったことを示す。

【図120】本明細書に記載のラテラルフローアッセイを含むハンドヘルドデバイスの実施形態を示す。

【図121】AからBは、本明細書に記載のラテラルフローアッセイを含むポイントオブケアデバイスの実施形態を図示する。

【図122】本明細書に記載のラテラルフローアッセイを含むポイントオブケアデバイスの実施形態を図示する。

【図123】本明細書に記載のラテラルフローアッセイ及び螺旋式反応チャンバを含むポイントオブケアデバイスの実施形態を図示する。

【図124】本明細書に記載のデバイスアクチュエータをトリガーするためのスイッチトリガーを含むポイントオブケアデバイスの実施形態を示している。

【図125】本明細書に記載の、投入ポートに結合され、実質的に螺旋形状である反応チャンバの実施形態を示す。

【図126】本明細書に記載の各アッセイで実質的に同じ輪郭の長さのチャンネル構造を含むラテラルフローアッセイのためのハウジング構造の実施形態を示す。

【図127】AからBは、本明細書に記載のデバイスアクチュエータの作動前及び部分的作動後のポイントオブケアデバイスの実施形態を示す。

【図128】AからBは、本明細書に記載の化学的加熱要素及びその時間依存温度プロファイルの実施形態を示す。

【図129】AからBは、本明細書に記載のラテラルフローストリップ構成の実施形態を示している。

【図130】化学的加熱要素及び電気加熱要素を含むポイントオブケアデバイスの実施形態を示す。

【図131】AからBは、本明細書に記載のポイントオブケアデバイスの実施形態のうちの1つを利用して、成功した核酸増幅を示す、DETECTRアッセイの結果を図示する。

【図132】本明細書に記載のフローストリップアッセイの実施形態の1つを利用した核酸の検出の成功を示すDETECTRアッセイの結果を示す。

【図133】診断用途のためにタンパク質を評価、特徴付け、及び最適化するために使用

10

20

30

40

50

されるプロセスの流れ図を示す。

【図134】Labcyte Echoを使用するプロセスのワークフローを示す概略図を図示する。

【図135-1】3つのCas酵素候補の蛍光に関する実験結果を示す。

【図135-2】図135-1の続きの図である。

【図136】異なる温度及び緩衝液での3つのCas酵素候補の能力を示す。

【図137】CasM.1740を使用して35℃で3つの追加緩衝液を使用して実施したテストの結果を示している。

【図138】35℃での一本鎖オリゴまたは合成dsDNA標的の検出限界を調べた実験の結果を示している。

【図139】CasM.1740についてタンパク質が機能することが証明された35℃及び最高温度の両方での検出限界を評価する実験の結果を示す。

【図140】タンパク質の能力に対する添加剤及びアッセイ製剤の効果を調べる実験の結果を示す。

【図141】CasM.124070を用いた一塩基変異感受性実験の結果を示す。

【図142】CasM.08を用いた一塩基変異感受性実験の結果を示す。

【図143】同じ標的部点を有するCasM.124070及びCasM.08を用いた一塩基変異感受性実験の結果を示す。

【図144】AからBは、感度、特異度、または熱安定性に関して最高の能力を有するタンパク質のトランス切断の動力学を調べる実験の結果を示す。

【図145】様々なCas酵素の能力結果をまとめたものである。

【発明を実施するための形態】

【0019】

詳細な説明

本開示は、核酸標的検出のためのシステム及び方法を提供する。本開示のシステム及び方法は、プログラム可能ヌクレアーゼベースの検出用に構成されたデバイスを使用して実施することができる。いくつかの実施形態では、デバイスは、単一反応検出用に構成することができる。いくつかの実施形態では、デバイスは使い捨てデバイスであり得る。本明細書に開示されるデバイスは、サンプル中に標的が存在するかどうかを検出するための非常に効率的で迅速かつ正確な反応を実行するのに特によく適している可能性がある。標的は、標的配列または標的核酸を含むことができる。本明細書で使用されるように、標的は、標的核酸と交換可能に呼ばれ得る。さらに、標的が増幅を受ける場合（例えば、本明細書の他の箇所に記載のサーモサイクリングプロセスを介して）、そのような標的は、標的アンプリコンまたは標的核酸アンプリコンと呼ぶことができる。標的核酸は、目的の核酸の一部、例えば、目的の任意の植物、動物、ウイルス、または微生物由来の標的核酸であり得る。本明細書で提供されるデバイスは、単一の統合システムで迅速なテストを実行するために使用できる。

【0020】

標的核酸は、病原体、ウイルス、細菌、菌類、原生動物、蠕虫、または生物（例えば、ヒト、動物、植物、作物など）の疾患または状態の原因である、及び／またはそれらに関連するその他の因子（複数可）または生物（複数可）に由来する、核酸または核酸の一部であり得る。標的核酸は、核酸またはその一部であり得る。標的核酸は、サンプル中のがんまたは遺伝性障害で発現する遺伝子由来の核酸の一部であり得る。標的核酸は、サンプル中の任意の生物由来のRNAまたはDNAの一部であり得る。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される1つまたは複数のプログラム可能ヌクレアーゼを活性化して、レポーター（本明細書ではレポーター分子とも呼ばれる）のトランス切断活性を開始することができる。本明細書に開示されるプログラム可能ヌクレアーゼは、ある場合には、標的配列または標的核酸に結合して、レポーターのトランス切断を開始することができる。プログラム可能ヌクレアーゼは、RNA活性化プログラム可能RNAヌクレアーゼと呼ぶことができる。ある場合には、本明細書に開示されるプログラム可能ヌクレアーゼは、標的

10

20

30

40

50

DNAに結合して、RNAレポーターのトランス切断を開始することができる。そのようなプログラム可能ヌクレアーゼは、本明細書において、DNA活性化プログラム可能RNAヌクレアーゼと呼ぶことができる。ある場合には、本明細書に記載のプログラム可能ヌクレアーゼは、標的RNAまたは標的DNAによって活性化することができる。例えば、プログラム可能ヌクレアーゼ、例えばCas酵素は、標的RNA核酸または標的DNA核酸によって活性化されて、RNAレポーターを切断することができる。いくつかの実施形態では、Cas酵素は、RNAレポーターのトランス切断を開始する標的ssDNAに結合することができる。ある場合には、本明細書に開示されるプログラム可能ヌクレアーゼは、標的DNAに結合してDNAレポーターのトランス切断を開始することができ、このプログラム可能ヌクレアーゼは、DNA活性化プログラム可能DNAヌクレアーゼと呼ぶことができる。

10

【0021】

本明細書に記載及び言及される核酸は、複数の塩基対を含むことができる。塩基対は、水素結合によって互いに結合した2つの核酸塩基を含む生物学的単位であり得る。核酸塩基は、アデニン、グアニン、シトシン、チミン、及び／またはウラシルを含み得る。ある場合には、本明細書に記載及び言及される核酸は、異なる塩基対を含むことができる。ある場合には、本明細書に記載及び言及される核酸は、1つまたは複数の修飾された塩基対を含むことができる。1つまたは複数の塩基対が化学修飾を受けて新しい塩基が生じるとき、1つまたは複数の修飾された塩基対を生成することができる。1つ以上の修飾された塩基対は、例えば、ヒポキサンチン、イノシン、キサンチン、キサントシン、7-メチルグアニン、7-メチルグアノシン、5,6-ジヒドロウラシル、ジヒドロウリジン、5-メチルシトシン、5-メチルシチジン、5-ヒドロキシメチルシトシン(5hmC)、5-ホルミルシトシン(5fC)、または5-カルボキシルシトシン(5caC)であり得る。

20

【0022】

プログラム可能ヌクレアーゼは、プログラム可能ヌクレアーゼと複合化されたガイド核酸が、標的核酸と結合した後に、活性化され得て、活性化されたプログラム可能ヌクレアーゼは、標的核酸を切断することができ、それはトランス切断活性をもたらすことができる。トランス切断活性は、検出部分によるディテクタ核酸のトランス切断など、活性化されたプログラム可能ヌクレアーゼによる近く的一本鎖核酸の非特異的切断であり得る。活性化されたプログラム可能ヌクレアーゼによって標的核酸が切断されると、検出部分がレポーターから放出または分離され得て、検出可能なシグナルを直接的または間接的に生成することができる。レポーター及び／または検出部分は、支持媒体上に固定化することができる。多くの場合、検出部分は、フルオロフォア、染料、ポリペプチド、または核酸のうちの少なくとも1つである。検出部分は、固定される支持媒体上の捕捉分子に結合することがある。検出可能なシグナルを支持媒体上で視覚化して、疾患、がん、または遺伝性障害などの病気に関連する1つまたは複数の標的核酸の存在または濃度を評価することができる。

30

【0023】

本開示のシステム及び方法は、人間が操作したまたは天然に存在する任意のタイプのプログラム可能ヌクレアーゼと互換性のあるデバイスを使用して実施することができる。プログラム可能ヌクレアーゼは、ガイド核酸及び標的核酸セグメントまたはその一部と複合化したときに活性化することができるヌクレアーゼを含むことができる。プログラム可能ヌクレアーゼは、ガイド核酸及び目的の標的遺伝子の標的配列と複合化したときに、活性化され得る。プログラム可能ヌクレアーゼは、ガイド核酸が標的核酸に結合すると活性化することができ、活性化されるとトランス切断活性を示すまたは可能にすることができる。CRISPRベースのプログラム可能ヌクレアーゼが記載または使用される任意の例または実施形態において、そのようなCRISPRベースのプログラム可能ヌクレアーゼに加えて、またはその代わりに、任意の他のタイプのプログラム可能ヌクレアーゼを使用することが本明細書において認識される。

40

50

【0024】

本開示のシステム及び方法は、複数のプログラム可能ヌクレアーゼと互換性のあるデバイスを使用して実施することができる。デバイスは、複数のプログラム可能ヌクレアーゼと、1つ以上の対応するガイド核酸とを含む複数のプログラム可能ヌクレアーゼプローブを含むことができる。複数のプログラム可能ヌクレアーゼプローブは同じであり得る。あるいは、複数のプログラム可能ヌクレアーゼプローブは異なってもよい。例えば、複数のプログラム可能ヌクレアーゼプローブは、異なるプログラム可能ヌクレアーゼ、及び／またはプログラム可能ヌクレアーゼに関連する異なるガイド核酸を含むことができる。

【0025】

本明細書で使用する場合、プログラム可能ヌクレアーゼは、一般に、核酸を切断できる任意の酵素を指す。プログラム可能ヌクレアーゼは、酵素が核酸を配列特異的に標的化または切断するように、人間の寄与によって設計、改変、または操作できる、またはそれらがなされた任意の酵素であり得る。プログラム可能ヌクレアーゼには、例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、及び／またはRNAガイドヌクレアーゼ、例えば細菌のクラスター化された規則的に間隔を空けた短い回文反復（CRISPR）-Cas（CRISPR関連）ヌクレアーゼまたはCpf1を含み得る。プログラム可能ヌクレアーゼには、例えばPfa1及び／またはNgA1も含まれる。

【0026】

ZFNは、配列特異的な事物において遺伝物質を切断することができ、特定のウイルス標的を標的とするように設計またはプログラムすることができる。ZFNは2つのドメイン、FokIヌクレアーゼドメインにリンクされているDNA結合亜鉛フィンガータンパク質で構成されている。DNA結合ジンクフィンガータンパク質は、非特異的なFokI切断ドメインと融合してZFNを作成する。タンパク質は通常、活性のために二量体化する。2つのZFNモノマーが活性ヌクレアーゼを形成する。各モノマーは、標的上の隣接する半分の部位に結合する。ZFNの配列特異度は、ZFPによって決定される。各ジンクフィンガーは3bpのDNA配列を認識し、3から6個のジンクフィンガーを使用して、9から18bpのDNA配列に結合する単一のZFNサブユニットを生成する。ジンクフィンガーのDNA結合特異度は、突然変異誘発によって変更される。新しいZFPは、事前に特徴付けられたジンクフィンガーのモジュラーアセンブリによってプログラムされる。

【0027】

転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）は、配列特異的な事物において遺伝物質を切断することができ、特定のウイルス標的を標的とするように設計またはプログラムすることができる。TALENは、そのカルボキシル末端にFokIヌクレアーゼドメインと、転写活性化因子様エフェクター（TALE）として知られるDNA結合ドメインのクラスを含んでいる。TALENは、33から35アミノ酸反復のタンデムアレイで構成されており、それぞれが標的ウイルスDNAの主要な溝にある単一の塩基対を認識する。ドメインのヌクレオチド特異度は、Asn-Asn、Asn-Ile、His-Asp、及びAsn-Glyがそれぞれグアニン、アデニン、シトシン、及びチミンを認識する位置12及び13の2つのアミノ酸に由来する。そのパターンにより、様々な核酸を標的とするようにTALENをプログラムすることができるようになる。

【0028】

プログラム可能ヌクレアーゼは、任意のタイプのヒト被操作酵素を含むことができる。あるいは、プログラム可能ヌクレアーゼは、天然に存在する細菌またはファージに由来するCRISPR酵素を含むことができる。プログラム可能ヌクレアーゼは、Casタンパク質（交換可能にCasヌクレアーゼとも呼ばれる）であり得る。crRNAとCasタンパク質は、CRISPR酵素を形成することができる。プログラム可能ヌクレアーゼは、ガイド核酸と標的核酸との結合によって活性化され得る、トランス切断活性を有するCRISPR-Cas（クラスター化された規則的に間隔を空けた短い回文反復-CRIS

PR 関連) 核タンパク質複合体であり得る。プログラム可能ヌクレアーゼは、1つまたは複数のアミノ酸修飾を含むことができる。プログラム可能ヌクレアーゼは、CRISPR-Cas系由来のヌクレアーゼである。プログラム可能ヌクレアーゼは、組換え由来のヌクレアーゼであり得る。

【0029】

プログラム可能ヌクレアーゼ

プログラム可能ヌクレアーゼ及びその使用、例えば、標的核酸の検出及び編集が、本明細書に開示される。ある場合には、プログラム可能ヌクレアーゼはV型CRISPR/Casタンパク質である。場合によってはV型CRISPR/Casタンパク質は核酸切断活性を含む。場合によってはV型CRISPR/Casタンパク質は、一本鎖核酸、二本鎖核酸、またはそれらの組み合わせを切断するまたは切れ目を入れる。場合によってはV型CRISPR/Casタンパク質は一本鎖核酸を切断する。場合によってはV型CRISPR/Casタンパク質は二本鎖核酸を切断する。場合によってはV型CRISPR/Casタンパク質は二本鎖核酸に切れ目を入れる。通常、V型CRISPR/Casタンパク質のガイドRNAはssDNAまたはdsDNAにハイブリダイズする。ただし、V型CRISPR/Casタンパク質のトランス切断活性は通常、ssDNAに向けられている。[41]ある場合には、V型CRISPR/Casタンパク質は、触媒的に不活性なヌクレアーゼドメインを含む。ある場合には、V型CRISPR/Casタンパク質は、触媒的に不活性なヌクレアーゼドメインを含む。V型CRISPR/Casタンパク質の触媒的に不活性なドメインは、V型CRISPR/Casタンパク質の野生型ヌクレアーゼドメインと比較して、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、または少なくとも5つの突然変異を含み得る。当該変異は、ヌクレアーゼの切断部位または活性部位内に存在し得る。[42]V型CRISPR/Casタンパク質はCas14タンパク質であり得る。Cas14タンパク質は、Cas14a.1タンパク質であり得る。Cas14a.1タンパク質は、表1に示される配列番号：1によって表すことができる。Cas14タンパク質は、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%、配列番号：1と同一であるアミノ酸配列からなり得る。Cas14タンパク質は、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%、配列番号：1と同一であるアミノ酸配列からなり得る。Cas14タンパク質は、少なくとも約50、少なくとも約100、少なくとも約150、少なくとも約200、少なくとも約250、少なくとも約300、少なくとも約350、少なくとも約400、少なくとも約450、少なくとも約500の配列番号：1の連続したアミノ酸を含み得る。

【0030】

(表1) Cas14a.1タンパク質配列

10

20

30

40

50

配列番号	配列
配列番号：1	MAKNTITKTLKLRIVRPYNsAEVEKIVADEKNNREKIALEKNKDKVKEACS KHLKVAAYCTTQVERNACLFCKARKLDDKFYQKLRGQFPDAVFWQEISEIF RQLQKQAAEIYNQSLIELYYEIFIKGKGIANASSVEHYLSDV CYTRAAELFK NAAIASGLRSKIKSNFRLKELKNMKSGLPTTKSDNFPIPLVKQKGGQYTGF ISNHNSDFIIPFGRWQVKKEIDKYRPWEKFD FEQVQKSPKPISLLLSTQRR KRNGWSKDEGTEAEIKKVMNGDYQTSYIEVKRGSKIGEKS AWMLNLSID VPKIDKGVDPsIIGGIDVG VKSPLVCAINNAFSRYSISDNDLFHFNKKMFARR RILLKKNRHKRAGHGAKNKLKPITILTEKSERFRKKLIERWACEIADFFIKNK VGTVMENLESMKRKEDSYFNIRLRGFWPYAEMQNKIEFKLKQYGIEIRK VAPNNTSKTCSKCGHLNNYFNFEYRKKNKFP HFKCEKCNFKENADYNAAL NISNPKLKSTKEEP

10

20

【0031】

ある場合には、V型CRISPR／Casタンパク質は改変されている（被操作タンパク質とも呼ばれる）。例えば、本明細書に開示されているV型CRISPR／Casタンパク質、またはその変異体は、核局在シグナル（NLS）を含み得る。ある場合には、NLSは、KRPAATKKAGQAKKKKEF（配列番号：2）の配列を含み得る。V型CRISPR／Casタンパク質は、特定の細胞、例えば、細菌細胞、植物細胞、真核細胞、動物細胞、哺乳動物細胞、またはヒト細胞における発現のために、コドン最適化され得る。いくつかの実施形態では、V型CRISPR／Casタンパク質は、ヒト細胞用にコドン最適化される。

30

【0032】

ある場合には、V型CRISPR／Casタンパク質は改変されている（被操作タンパク質とも呼ばれる）。例えば、本明細書に開示されているV型CRISPR／Casタンパク質、またはその変異体は、核局在シグナル（NLS）を含み得る。ある場合には、NLSは、KRPAATKKAGQAKKKKEFの配列を含むことができる。V型CRISPR／Casタンパク質は、特定の細胞、例えば、細菌細胞、植物細胞、真核細胞、動物細胞、哺乳動物細胞、またはヒト細胞における発現のためにコドン最適化され得る。いくつかの実施形態では、V型CRISPR／Casタンパク質は、ヒト細胞用にコドン最適化される。

40

【0033】

Cas14タンパク質

ある場合には、V型CRISPR／Casタンパク質はCas14タンパク質を含む。Cas14タンパク質は、異なるアミノ末端ドメインとカルボキシ末端ドメインを持つ二葉構造を含む場合がある。アミノ末端ドメイン及びカルボキシ末端ドメインは、柔軟なリンカーによって接続され得る。柔軟なリンカーは、アミノ末端ドメインとカルボキシ末端ドメインの相対的な立体構造に影響を与え得る。柔軟なリンカーは短くてもよく、例えば、10アミノ酸未満、8アミノ酸未満、6アミノ酸未満、5アミノ酸未満、または4アミノ酸未満の長さであり得る。柔軟なリンカーは、Cas14二量体複合体の2つのCas14タンパク質間でアミノ末端ドメインとカルボキシ末端ドメインの異なる立体構造を可能にするのに十分な長さであり得る（例えば、アミノ末端ドメインとカルボキシ末端ド

50

メインの相対的な向きは、C a s 1 4 ホモ二量体複合体の2つのC a s 1 4 タンパク質間で異なる)。リンカードメインは、アミノ末端ドメイン及びカルボキシル末端ドメインの相対的立体構造に影響を与える変異を含んでもよい。リンカーは、C a s 1 4 の二量体化に影響を与える突然変異を含み得る。例えば、リンカー変異は、C a s 1 4 二量体の安定性を高める可能性がある。

【0034】

ある場合には、C a s 1 4 タンパク質のアミノ末端ドメインは、ウェッジドメイン、認識ドメイン、ジンクフィンガードメイン、またはそれらの任意の組み合わせを含む。ウェッジドメインは、マルチストランドβバレル構造を含み得る。マルチストランドβバレル構造は、オリゴヌクレオチド／オリゴ糖結合を含み得、これは、いくつかのC a s 1 2 タンパク質のものと構造的に同等である。認識ドメイン及びジンクフィンガードメインはそれぞれ（個別にまたは集合的に）ウェッジドメインのβバレル鎖間に挿入され得る。認識ドメインは、構造的に同等であるが、いくつかのC a s 1 2 タンパク質に見られるものよりも短い4-α-ヘリックス構造を含む場合がある。認識ドメインは、ガイド核酸に対する、またはガイド核酸-標的核酸ヘテロ二本鎖に対する結合親和性を含み得る。ある場合には、R E C ロープは、標的核酸中のP A M 配列に対する結合親和性を含み得る。アミノ末端は、ウェッジドメイン、認識ドメイン、及びジンクフィンガードメインを含み得る。カルボキシ末端は、R u v C ドメイン、ジンクフィンガードメイン、またはそれらの任意の組み合わせを含み得る。カルボキシ末端は、1つのR u v C 及び1つのジンクフィンガードメインを含み得る。

【0035】

C a s 1 4 タンパク質は、R u v C ドメインまたは部分的なR u v C ドメインを含み得る。R u v C ドメインは、単一、連続配列、またはC a s 1 4 タンパク質の一次アミノ酸配列に関して連続していない部分的なR u v C ドメインのセットによって定義され得る。一部の実施例では、部分的なR u v C ドメインは、それ自体ではいずれの基質結合活性または触媒活性をも持たない。本開示のC a s 1 4 タンパク質は、基質結合または触媒活性を有するR u v C ドメインを生成するために結合し得る複数の部分的なR u v C ドメインを含み得る。例えば、C a s 1 4 は、C a s 1 4 タンパク質の一次アミノ酸配列に関して隣接していない3つの部分的なR u v C ドメイン（R u v C -I、R u v C -I I、及びR u v C -I I I、本明細書ではサブドメインとも呼ばれる）を含み得るが、タンパク質が生成されて折り畳まれると、R u v C ドメインを形成する。C a s 1 4 タンパク質は、C a s 1 4 タンパク質のカルボキシ末端ドメインをC a s 1 4 タンパク質のアミノ末端ドメインと接続するリンカーループを含んでもよく、カルボキシ末端ドメインは1つまたは複数のR u v C ドメインを含み、アミノ末端ドメインは認識ドメインを含む。

【0036】

C a s 1 4 タンパク質は、ジンクフィンガードメインを含み得る。ある場合には、C a s 1 4 タンパク質のカルボキシ末端ドメインはジンクフィンガードメインを含む。ある場合には、C a s 1 4 タンパク質のアミノ末端ドメインはジンクフィンガードメインを含む。ある場合には、アミノ末端ドメインは、ウェッジドメイン（例えば、マルチβバレルウェッジ構造）、ジンクフィンガードメイン、またはそれらの任意の組み合わせを含む。ある場合には、カルボキシ末端ドメインは、R u v C ドメイン及びジンクフィンガードメインを含み、アミノ末端ドメインは、認識ドメイン、ウェッジドメイン、及びジンクフィンガードメインを含む。

【0037】

C a s 1 4 タンパク質は、他の多くのC a s タンパク質と比較して相対的に小さくなり得るため、核酸検出や遺伝子編集に適したものにしている。例えば、C a s 1 4 タンパク質は、サイズが小さいため、表面や別の生物種に吸着する可能性が低くなり得る。これらのタンパク質の小さい性質は、他の大きなC a s タンパク質と比較して、システムまたはアッセイで試薬としてより簡単にパッケージ化することも可能にし、より高い効率で送達されることも可能にする。ある場合には、C a s 1 4 タンパク質は、400から800ア

ミノ酸残基長、400から600アミノ酸残基長、440から580アミノ酸残基長、460から560アミノ酸残基長、460から540アミノ酸残基長、460から500アミノ酸残基長、400から500アミノ酸残基長、または500から600アミノ酸残基長である。ある場合には、Cas14タンパク質の長さは約550アミノ酸残基未満である。ある場合には、Cas14タンパク質の長さは約500アミノ酸残基未満である。

【0038】

ある場合には、Cas14タンパク質は、標的核酸内の特定の位置で切断を触媒するエンドヌクレアーゼとして機能し得る。ある場合には、Cas14タンパク質は、一本鎖核酸の非配列特異的切断を触媒することができる。ガイド核酸が標的核酸に結合した後、Cas14タンパク質が活性化されてトランス切断活性を示す場合がある。このトランス切断活性は、「傍系」または「トランス傍系」切断とも呼ばれる。トランス切断活性は、検出部分によるディテクタ核酸のトランス切断など、活性化されたプログラム可能ヌクレアーゼによる、近くの一本鎖核酸の非特異的切断であり得る。

【0039】

被操作プログラム可能ヌクレアーゼプローブ

本明細書では、被操作Casタンパク質及び被操作ガイド核酸のうちの少なくとも1つを含む非天然の組成物及びシステムが開示され、これらは、本明細書では単にCasタンパク質及びガイド核酸と各々呼ぶことができる。一般に、被操作Casタンパク質及び被操作ガイド核酸は、天然には見出されないCasタンパク質及びガイド核酸をそれぞれ指す。ある場合には、システム及び組成物は、少なくとも1つの天然に存在しない成分を含む。例えば、組成物及びシステムは、ガイド核酸の配列が天然に存在するガイド核酸の配列とは異なるかまたは改変されているガイド核酸を含み得る。ある場合には、組成物及びシステムは、天然には一緒に存在しない少なくとも2つの成分を含む。例えば、組成物及びシステムは、天然には一緒に存在しない反復領域及びスペーサー領域を含むガイド核酸を含み得る。また、例として、組成物及びシステムは、天然には一緒に存在しないガイド核酸及びCasタンパク質を含み得る。逆に、明確にするために、「天然の」、「天然に存在する」、または「自然界に見出される」Casタンパク質またはガイド核酸には、人間または機械により遺伝的に改変されていない細胞または生物からのCasタンパク質及びガイド核酸が含まれる。

【0040】

ある場合には、ガイド核酸は、非天然の核酸塩基配列を含み得る。ある場合には、非天然配列は、天然には見出されない核酸塩基配列である。非天然配列は、天然に存在する配列の一部を含んでもよく、天然に存在する配列の一部は、天然に存在する配列の残りがなければ自然界には存在しない。ある場合には、ガイド核酸は、天然には観察されない順序または近接で配置された2つの天然に存在する配列を含み得る。ある場合には、組成物及びシステムは、天然には一緒に存在しないCRISPR/Casエフェクタータンパク質とガイド核酸を含むリボヌクレオチド複合体を含む。被操作ガイド核酸は、天然には一緒に存在しない第1の配列及び第2の配列を含み得る。例えば、被操作ガイド核酸は、天然に存在する反復領域の配列と、天然に存在する真核配列に相補的なスペーサー領域とを含み得る。被操作ガイド核酸は、生物に天然に存在する反復領域の配列と、その生物に天然に存在しないスペーサー領域とを含み得る。被操作ガイド核酸は、第1の生物において生じる第1の配列及び第2の生物において生じる第2の配列を含み得、第1の生物及び第2の生物は異なる。ガイド核酸は、ガイド核酸の3'末端または5'末端に、またはガイド核酸の第1の配列と第2の配列との間に配置された第3の配列を含み得る。例えば、被操作ガイド核酸は、リンカー配列によって結合された天然に存在するcrRNA及びtracrRNAを含み得る。

【0041】

ある場合には、本明細書に記載の組成物及びシステムは、天然に存在するCasタンパク質に類似する被操作Casタンパク質を含む。被操作Casタンパク質は、天然のCasタンパク質の一部を欠いている可能性がある。Casタンパク質は、天然に存在するC

a s タンパク質と比較して突然変異を含んでもよく、この突然変異は自然界では見られない。C a s タンパク質はまた、天然に存在するC a s タンパク質と比較して、少なくとも1つの追加のアミノ酸を含み得る。例えば、C a s タンパク質は、天然に存在するC a s タンパク質に対する核局在化シグナルの付加を含み得る。特定の実施形態では、C a s タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、天然に存在する配列と比較してコドン最適化されている（例えば、真核細胞における発現のために）。

【0042】

ある場合には、本明細書で提供される組成物及びシステムは、本明細書に記載のC a s タンパク質及びガイド核酸をコードするマルチベクターシステムを含み、ガイド核酸及びC a s タンパク質は、同じまたは異なるベクターによってコードされる。いくつかの実施形態では、被操作ガイド及び被操作C a s タンパク質は、システムの異なるベクターによってコードされる。

【0043】

熱安定性プログラム可能ヌクレアーゼ

本明細書に記載されるのは、熱安定性プログラム可能ヌクレアーゼの様々な実施形態である。いくつかの実施形態では、プログラム可能ヌクレアーゼはエフェクタータンパク質と呼ばれる。エフェクタータンパク質は熱安定性であり得る。ある場合には、既知のエフェクタータンパク質（例えば、C a s 12ヌクレアーゼ）は比較的熱感受性であり、40℃未満、最適には約37℃の温度で診断アッセイで検出可能なシグナルを生成するのに十分な活性（例えば、シス及び／またはトランス切断）のみを示す。熱安定性タンパク質は、37℃での酵素活性、安定性、またはフォールディングに匹敵する可能性がある。ある場合には、40℃でのトランス切断アッセイにおけるエフェクタータンパク質のトランス切断活性（例えば、蛍光シグナル生成によって測定される最大トランス切断速度）は、37℃での少なくとも50%であり得る。ある場合には、40℃でのトランス切断アッセイにおけるエフェクタータンパク質のトランス切断活性は、37℃でのものの少なくとも55%であり得る。ある場合には、40℃でのトランス切断アッセイにおけるエフェクタータンパク質のトランス切断活性は、37℃でのものの少なくとも60%であり得る。ある場合には、40℃でのトランス切断アッセイにおけるエフェクタータンパク質のトランス切断活性は、37℃でのものの少なくとも65%であり得る。ある場合には、40℃でのトランス切断アッセイにおけるエフェクタータンパク質のトランス切断活性は、37℃でのものの少なくとも70%であり得る。ある場合には、40℃でのトランス切断アッセイにおけるエフェクタータンパク質のトランス切断活性は、37℃でのものの少なくとも75%であり得る。ある場合には、40℃でのトランス切断アッセイにおけるエフェクタータンパク質のトランス切断活性は、37℃でのものの少なくとも80%であり得る。ある場合には、40℃でのトランス切断アッセイにおけるエフェクタータンパク質のトランス切断活性は、37℃でのものの少なくとも85%であり得る。ある場合には、40℃でのトランス切断アッセイにおけるエフェクタータンパク質のトランス切断活性は、37℃でのものの少なくとも90%であり得る。ある場合には、40℃でのトランス切断アッセイにおけるエフェクタータンパク質のトランス切断活性は、37℃でのものの少なくとも95%であり得る。ある場合には、40℃でのトランス切断アッセイにおけるエフェクタータンパク質のトランス切断活性は、37℃でのものの少なくとも100%であり得る。ある場合には、40℃でのトランス切断アッセイにおけるエフェクタータンパク質のトランス切断活性は、37℃での活性の少なくとも1倍であり得る。ある場合には、40℃でのトランス切断アッセイにおけるエフェクタータンパク質のトランス切断活性は、37℃での活性の少なくとも2倍であり得る。ある場合には、40℃でのトランス切断アッセイにおけるエフェクタータンパク質のトランス切断活性は、37℃での活性の少なくとも3倍であり得る。ある場合には、40℃でのトランス切断アッセイにおけるエフェクタータンパク質のトランス切断活性は、37℃での活性の少なくとも4倍であり得る。ある場合には、40℃でのトランス切断アッセイにおけるエフェクタータンパク質のトランス切断活性は、37℃での活性の少なくとも5倍であり得る。ある場合には、40℃でのトランス

10

20

30

40

50

10

20

30

40

50

10

20

30

40

50

ある場合には、55℃でのトランス切断アッセイにおけるエフェクタータンパク質のトランス切断活性は、37℃での活性の少なくとも50%であり得る。ある場合には、55

30

50

ッセイにおけるエフェクタータンパク質のトランス切断活性は、37℃での活性の少なくとも100%であり得る。ある場合には、65℃でのトランス切断アッセイにおけるエフェクタータンパク質のトランス切断活性は、37℃での活性の少なくとも1倍であり得る。ある場合には、65℃でのトランス切断アッセイにおけるエフェクタータンパク質のトランス切断活性は、37℃での活性の少なくとも2倍であり得る。ある場合には、65℃でのトランス切断アッセイにおけるエフェクタータンパク質のトランス切断活性は、37℃での活性の少なくとも3倍であり得る。ある場合には、65℃でのトランス切断アッセイにおけるエフェクタータンパク質のトランス切断活性は、37℃での活性の少なくとも4倍であり得る。ある場合には、65℃でのトランス切断アッセイにおけるエフェクタータンパク質のトランス切断活性は、37℃での活性の少なくとも5倍であり得る。ある場合には、65℃でのトランス切断アッセイにおけるエフェクタータンパク質のトランス切断活性は、37℃での活性の少なくとも6倍であり得る。ある場合には、65℃でのトランス切断アッセイにおけるエフェクタータンパク質のトランス切断活性は、37℃での活性の少なくとも7倍であり得る。ある場合には、65℃でのトランス切断アッセイにおけるエフェクタータンパク質のトランス切断活性は、37℃での活性の少なくとも8倍であり得る。ある場合には、65℃でのトランス切断アッセイにおけるエフェクタータンパク質のトランス切断活性は、37℃での活性の少なくとも9倍であり得る。ある場合には、65℃でのトランス切断アッセイにおけるエフェクタータンパク質のトランス切断活性は、37℃での活性の少なくとも10倍であり得る。ある場合には、65℃でのトランス切断アッセイにおけるエフェクタータンパク質のトランス切断活性は、37℃での活性の少なくとも11倍、少なくとも12倍、少なくとも13倍、少なくとも14倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍、少なくとも25倍、少なくとも30倍、少なくとも35倍、少なくとも40倍、少なくとも45倍、少なくとも50倍以上であり得る。ある場合には、70℃、75℃、80℃、またはそれより高いときのトランス切断アッセイにおけるエフェクタータンパク質のトランス切断活性は、37℃での少なくとも50、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも95%、少なくとも100%、少なくとも1倍、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍、少なくとも11倍、少なくとも12倍、少なくとも13倍、少なくとも14倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍、少なくとも25倍、少なくとも30倍、少なくとも35倍、少なくとも40倍、少なくとも45倍、少なくとも50倍であり得る。

10

20

30

40

50

【0049】

ある場合には、トランス切断活性は、トランス切断アッセイにおいて陰性対照に対して測定することができる。ある場合には、37℃でのトランス切断アッセイにおける核酸に対するエフェクタータンパク質のトランス切断活性は、陰性対照の核酸に対して、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも100%、少なくとも1倍、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、または少なくとも10倍であり得る。ある場合には、37℃でのトランス切断アッセイにおける核酸に対するエフェクタータンパク質のトランス切断活性は、陰性対照の核酸に対して、少なくとも11倍、少なくとも12倍、少なくとも13倍、少なくとも14倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍、少なくとも25倍、少なくとも30倍、少なくとも35倍、少なくとも40倍、少なくとも45倍、少なくとも50倍、またはそれより多いものであり得る。ある場合には、40℃でのトランス切断アッセイにおける核酸に対するエフェクタータンパク質のトランス切断活性は、陰性対照の核酸に対して、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも100%、少なくとも1倍、少なくとも2倍、少

[illegible]

5 倍、少なくとも 40 倍、少なくとも 45 倍、少なくとも 50 倍、またはそれより多いものであり得る。ある場合には、65℃でのトランス切断アッセイにおける核酸に対するエフェクタータンパク質のトランス切断活性は、陰性対照の核酸に対して、少なくとも 50 %、少なくとも 55 %、少なくとも 60 %、少なくとも 65 %、少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 100 %、少なくとも 1 倍、少なくとも 2 倍、少なくとも 3 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 5 倍、少なくとも 6 倍、少なくとも 7 倍、少なくとも 8 倍、少なくとも 9 倍、または少なくとも 10 倍であり得る。ある場合には、65℃でのトランス切断アッセイにおける核酸に対するエフェクタータンパク質のトランス切断活性は、陰性対照の核酸に対して、少なくとも 11 倍、少なくとも 12 倍、少なくとも 13 倍、少なくとも 14 倍、少なくとも 15 倍、少なくとも 20 倍、少なくとも 25 倍、少なくとも 30 倍、少なくとも 35 倍、少なくとも 40 倍、少なくとも 45 倍、少なくとも 50 倍、またはそれより多いものであり得る。ある場合には、70℃、75℃、80℃、またはそれより高いときのトランス切断アッセイにおける核酸に対するエフェクタータンパク質のトランス切断活性は、陰性対照の核酸に対して、少なくとも 50 %、少なくとも 55 %、少なくとも 60 %、少なくとも 65 %、少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 100 %、少なくとも 1 倍、少なくとも 2 倍、少なくとも 3 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 5 倍、少なくとも 6 倍、少なくとも 7 倍、少なくとも 8 倍、少なくとも 9 倍、または少なくとも 10 倍であり得る。ある場合には、70℃、75℃、80℃、またはそれより高いときのトランス切断アッセイにおける核酸に対するエフェクタータンパク質のトランス切断活性は、陰性対照の核酸に対して、少なくとも 11 倍、少なくとも 12 倍、少なくとも 13 倍、少なくとも 14 倍、少なくとも 15 倍、少なくとも 20 倍、少なくとも 25 倍、少なくとも 30 倍、少なくとも 35 倍、少なくとも 40 倍、少なくとも 45 倍、少なくとも 50 倍、またはそれより多いものであり得る。

10

20

30

40

50

【0050】

本明細書に記載のレポーターは、RNAレポーターであり得る。RNAレポーターは、少なくとも1つのリボ核酸及び検出可能な部分を含むことができる。いくつかの実施形態では、Cas酵素を含むプログラム可能ヌクレアーゼプロローブまたはCRISPRプロローブは、ssDNAを認識及び検出することができ、さらに、RNAレポーターを特異的にトランス切断することができる。サンプル中の標的核酸の検出は、サンプル中の疾患（または疾患の原因因子）の存在を示すことができ、疾患の影響を受ける環境または疾患を保有する個体における疾患の伝染を減少させるための行動をとるための情報を提供することができる。

【0051】

レポーター（例えば、タンパク質-核酸）の切断は、シグナルを生成することができる。シグナルは、サンプル中に標的核酸が存在することを示すことができ、シグナルが存在しないことは、サンプル中に標的核酸が存在しないことを示すことができる。ある場合には、タンパク質-核酸の切断により、比色シグナル、電位差測定シグナル、電流測定シグナル、光シグナル、または圧電シグナルを生成することができる。各種デバイス及び／またはセンサーを使用して、サンプル中に標的核酸が存在するかどうかを示す、これらの様々なタイプのシグナルを検出できる。そのようなシグナルを検出するために使用可能なセンサーには、例えば、光センサー（例えば、様々な波長及び周波数を有する蛍光または光シグナルを検出するためのイメージングデバイス）、電位センサー、表面プラズモン共鳴（SPR）センサー、干渉センサー、または比色シグナル、電位差測定シグナル、電流測定シグナル、光シグナル、または圧電シグナルの検出に適した他の任意のタイプのセンサーを含み得る。

【0052】

態様では、本開示は、標的検出のための方法を提供する。この方法は、サンプルの収集を含むことができる。この方法は、サンプルの調製をさらに含むことができる。この方法

は、収集及び調製されたサンプル中の1つまたは複数の標的分子の検出をさらに含むことができる。

【0053】

別の態様では、本開示は、標的検出のための検出デバイスを提供する。検出デバイスは、多重化標的検出用に構成することができる。検出デバイスを使用して、1つまたは複数のサンプルを収集し、検出のために1つまたは複数のサンプルを調製または処理し、任意で、1つまたは複数の標的配列または標的核酸の増幅のために、1つまたは複数のサンプルを複数の液滴、アリコート、またはサブサンプルに分割することができる。標的配列は、例えば、生物学的配列を含み得る。生物学的配列は、核酸配列またはアミノ酸配列を含むことができる。いくつかの実施形態では、標的配列は、目的の生物、目的の疾患、目的の疾患状態、目的の表現型、目的の遺伝子型、または目的の遺伝子に関連している。

10

【0054】

検出デバイスは、複数の液滴、アリコート、またはサブサンプル内に含まれる標的核酸を増幅するように構成することができる。検出デバイスは、複数の液滴のそれぞれを個別に処理することによって（例えば、サーモサイクリングプロセスまたは以下でより詳細に説明する任意の他の適切な増幅プロセスを使用することによって）、複数の液滴内に含まれる標的配列または標的核酸を増幅するように構成することができる。ある場合には、複数の液滴は別々のサーモサイクリングプロセスを受けることができる。ある場合には、サーモサイクリングプロセスが同時に発生することがある。他の場合では、サーモサイクリングプロセスは、各液滴に対して異なる時間に発生する可能性がある。

20

【0055】

検出デバイスはさらに、各液滴中の標的核酸が増幅を受けた後に、液滴、アリコート、またはサブサンプルを再混合するように構成することができる。検出デバイスは、液滴、アリコート、またはサブサンプルを含む再混合サンプルをデバイスの検出チャンバに供給するように構成することができる。検出チャンバは、再混合された液滴、アリコート、またはサブサンプルを複数のプログラム可能ヌクレアーゼプローブに向けるように構成することができる。検出チャンバは、再混合された液滴、アリコート、またはサブサンプルが、1つまたは複数のプログラム可能ヌクレアーゼプローブに隣接して及び／またはそれと接触するように配置されるように、再混合された液滴、アリコート、またはサブサンプルを1つまたは複数の流体流路に沿って導くように構成することができる。ある場合には、検出チャンバは、再混合された液滴、アリコート、またはサブサンプルが所定の期間にわたって1つまたは複数のプログラム可能ヌクレアーゼプローブと接触して繰り返し配置されるように、再混合された液滴、アリコート、またはサブサンプルを再循環またはリサイクルするように構成することができる。

30

【0056】

検出デバイスは、1つ以上のセンサーを含むことができる。検出デバイスの1つまたは複数のセンサーは、1つまたは複数のプログラム可能ヌクレアーゼプローブの中の1つまたは複数のプログラム可能ヌクレアーゼが、プログラム可能ヌクレアーゼプローブのガイド核酸の、サンプル中に存在する標的核酸との結合により活性化された後に生成される1つまたは複数のシグナルを検出するように構成することができる。本明細書の他の箇所に記載されているように、活性化されたプログラム可能ヌクレアーゼは、標的核酸を切断することができる、トランス切断活性をもたらしすることができる。トランス切断活性は、検出部分による標的核酸のトランス切断など、活性化されたプログラム可能ヌクレアーゼによる近くの一本鎖核酸の非特異的切断であり得る。標的核酸が活性化されたプログラム可能ヌクレアーゼによって切断されると、検出部分がレポーターから放出または分離され、それによって、1つまたは複数の検出可能なシグナルが生成され得る。検出デバイスの1つまたは複数のセンサーは、特定の標的（例えば、標的核酸）の存在及び／または非存在を確認するために、1つまたは複数の検出可能なシグナルを登録及び／または処理するように構成できる。

40

【0057】

50

検出デバイスの1つ以上のプログラム可能ヌクレアーゼプローブは、多重化検出のために構成することができる。ある場合には、各プログラム可能ヌクレアーゼプローブを特定の標的を検出するように構成できる。他の場合には、各プログラム可能ヌクレアーゼプローブは、複数の標的を検出するように構成することができる。ある場合には、第1のプログラム可能ヌクレアーゼプローブは、第1の標的または第1の標的のセットを検出するように構成することができ、第2のプログラム可能ヌクレアーゼプローブは、第2の標的または第2の標的のセットを検出するように構成することができる。他の場合には、第1のプログラム可能ヌクレアーゼプローブは、第1の標的のセットを検出するように構成することができ、第2のプログラム可能ヌクレアーゼプローブは、第2の標的のセットを検出するように構成することができる。本開示のプログラム可能ヌクレアーゼプローブを使用して、複数の異なる標的配列または標的核酸を検出することができる。本明細書に記載の実施形態のいずれにおいても、検出デバイスに提供されるサンプルは、複数の標的配列または標的核酸を含むことができる。本明細書に記載の実施形態のいずれにおいても、検出デバイスに提供されるサンプルは、複数の標的配列または標的核酸のクラスを含むことができる。標的配列の各クラスまたは標的核酸のクラスは、サンプル内に存在する特定の生物、疾患状態、表現型、または遺伝子型に関連する複数の標的配列または標的核酸を含むことができる。ある場合には、各プログラム可能ヌクレアーゼプローブを使用して、サンプル内に存在する特定の生物、疾患状態、表現型、または遺伝子型に関連する特定のクラスの標的配列または特定のクラスの標的核酸を検出することができる。ある場合には、2つ以上のプログラム可能ヌクレアーゼプローブを使用して、異なるクラスの標的配列または異なるクラスの標的核酸を検出することができる。そのような場合、2つ以上のプログラム可能ヌクレアーゼプローブは、プローブのプログラム可能ヌクレアーゼと複合化されたガイド核酸の異なるセットまたはクラスを含むことができる。

10

20

30

40

50

【0058】

本明細書に記載の実施形態のいずれにおいても、検出デバイスは、サンプルの収集、サンプル処理、液滴の生成、液滴処理（例えば、液滴中の標的核酸の増幅）、液滴の再混合、及び／または検出チャンバ内での再混合された液滴の循環を実行して、再混合された液滴の少なくとも一部が、検出チャンバに結合された1つまたは複数のプログラム可能ヌクレアーゼプローブと接触して配置されるようにする。本開示の検出デバイスは、1つまたは複数の標的配列または標的核酸の存在及び／または不在を検出するために1つまたは複数の迅速な単一反応またはマルチ反応試験を実施するように構成された使い捨てデバイスであり得る。

【0059】

本開示のシステム及び方法を使用して、1つまたは複数のサンプル中の1つまたは複数の標的配列または核酸を検出することができる。1つまたは複数のサンプルは、疾患、がん、または遺伝性障害などの病気、または表現型、遺伝子型、または祖先の決定などの遺伝情報を検出するための1つまたは複数の標的配列または核酸を含むことができ、本明細書に記載の試薬及び支持媒体と適合し得る。一般に、サンプルは、核酸が見出され得る任意の場所から採取することができる。サンプルが、個体／ヒト、ヒト以外の動物、または作物から取得できるか、または環境サンプルが疾患、ウイルス、病原体、がん、遺伝性障害、またはいずれかの目的の突然変異または病原体の存在をテストできるように獲得され得る。生物学的サンプルは、血液、血清、血漿、肺液、呼気凝縮液、唾液（saliva、spit）、尿、大便、糞便、粘液、リンパ液、腹膜液、脳脊髄液、羊水、母乳、胃分泌物、排泄物、潰瘍からの分泌物、膿、鼻汁、痰、咽頭滲出液、尿道分泌物／粘液、膈分泌物／粘液、肛門分泌物／粘液、精液、涙、浸出液、滲出液、組織液、間質液（例えば、腫瘍間質液）、囊胞液、組織、または場合によってはそれらの任意の組み合わせであり得る。サンプルは、動物（例えば、ヒト、動物、家畜、ペットなど）または植物からの体液の吸引物であり得る。組織サンプルは、病原体により感染または罹患する可能性のある任意の組織（例えば、疣贅、肺組織、皮膚組織など）に由来する可能性がある。組織サンプル（例えば、動物、植物、またはヒト由来）は、本開示の検出システムに適用する前に解離

または液化することができる。サンプルは、植物（例えば、作物、水耕栽培された作物または植物、及び／または観葉植物）由来であり得る。植物サンプルには、組織（例えば、根、葉、莖、幹など）からの細胞外液が含まれる場合がある。サンプルは、水耕液／水、または土壌など、植物のすぐ周囲の環境から採取できる。環境からのサンプルは、土壌、空気、または水からのものであり得る。ある場合には、環境サンプルは、目的の表面からスワブとして採取されるか、目的の表面から直接採取される。ある場合には、生のサンプルが検出システムに適用される。ある場合には、検出システムに適用する前に、サンプルを緩衝液または流体で希釈するか、または濃縮する。ある場合には、サンプルは約200ナノリットル（nL）以下に含まれる。ある場合には、サンプルは約200nLに含まれる。ある場合には、サンプルは、約200nLを超え、約20マイクロリットル（μL）未満の容量で含まれる。ある場合には、サンプルは20μL以下に含まれる。ある場合には、サンプルは1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90、100、200、300、400、500μL以下、または1μLから500μLの値のいずれかに含まれる。ある場合には、サンプルは1μLから500μL、10μLから500μL、50μLから500μL、100μLから500μL、200μLから500μL、300μLから500μL、400μLから500μL、1μLから200μL、10μLから200μL、50μLから200μL、100μLから200μL、1μLから100μL、10μLから100μL、50μLから100μL、1μLから50μL、10μLから50μL、1μLから20μL、10μLから20μL、または1μLから10μLに含まれる。ある場合には、サンプルが500μLを超えて含まれていることもある。

10

20

【0060】

ある場合には、サンプルは単細胞真核生物；植物または植物細胞；藻類細胞；真菌細胞；動物または動物の細胞、組織、または器官；無脊椎動物の細胞、組織、または器官；魚類、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳類などの脊椎動物の細胞、組織、体液、または器官；ヒト、ヒト以外の霊長類、有蹄動物、ネコ、ウシ、ヒツジ、及びヤギなどの哺乳動物由来の細胞、組織、体液、または器官から採取される。ある場合には、サンプルは、線虫、原生動物、蠕虫、またはマラリア原虫から採取される。ある場合には、サンプルは、真核細胞、哺乳動物細胞、ヒト細胞、原核細胞、または植物細胞からの細胞溶解物からの核酸を含み得る。ある場合には、サンプルは、細胞から発現された核酸を含み得る。

30

【0061】

疾患検査に使用されるサンプルは、本明細書に記載の試薬のガイド核酸に結合できる少なくとも1つの標的配列を含むことができる。ある場合には、標的配列は核酸の一部である。核酸は、ゲノム遺伝子座、転写mRNA、または逆転写cDNAに由来し得る。核酸は、5から100、5から90、5から80、5から70、5から60、5から50、5から40、5から30、5から25、5から20、5から15、または5から10ヌクレオチドの長さであり得る。核酸は、10から90、20から80、30から70、または40から60ヌクレオチドの長さであり得る。核酸配列は、10から95、20から95、30から95、40から95、50から95、60から95、10から75、20から75、30から75、40から75、50から75、5から50、15から50、25から50、35から50、または45から50ヌクレオチドの長さであり得る。核酸は、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、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、45、50、60、70、80、90、または100ヌクレオチドの長さであり得る。標的核酸は、ガイド核酸に対して逆相補的であり得る。ある場合には、少なくとも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、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、45、50、60、70、80、90、または100ヌクレオチドのガイド核酸は、標的核酸に逆相補的であり得る。

40

50

【 0 0 6 2 】

ある場合には、標的配列は、サンプル中の疾患の原因となるウイルスまたは細菌または他の因子に由来する核酸の一部である。ある場合には、標的配列は、サンプル中の性感染症または伝染病からの核酸の一部である。ある場合には、標的配列は、サンプル中の上気道感染症、下気道感染症、または伝染病からの核酸の一部である。ある場合には、標的配列は、サンプル中の院内感染または伝染病からの核酸の一部である。ある場合には、標的配列は、サンプル中の敗血症由来の核酸の一部である。これらの疾患には、呼吸器ウイルス（例えば、SARS-CoV-2（つまり、COVID-19を引き起こすウイルス）、SARS、MERS、インフルエンザ、アデノウイルス、コロナウイルスHKU1、コロナウイルスNL63、コロナウイルス229E、コロナウイルスOC43、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2（SARS-CoV-2）、ヒトメタニューモウイルス（hMPV）、ヒトライノウイルス／エンテロウイルスは、インフルエンザA、インフルエンザA／H1、インフルエンザA／H3、インフルエンザA／H1-2009、インフルエンザB、インフルエンザC、パラインフルエンザウイルス1、パラインフルエンザウイルス2、パラインフルエンザウイルス3、パラインフルエンザウイルス4、呼吸器合胞体ウイルス）及び呼吸器細菌（例えば、ボルデテラパラペルツシス、ボルデテラペルツシス、肺炎クラミジア、肺炎マイコプラズマ）が含まれるが、これらに限定されない。他のウイルスには、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、ヒトパピローマウイルス（HPV）、クラミジア、淋病、梅毒、トリコモナス症、性感染症、マラリア、デング熱、エボラ、チクングニア熱、リーシュマニア症などがある。病原体には、ウイルス、真菌、蠕虫、原生動物、マラリア病原虫、マラリア原虫、トキソプラズマ原虫、及び住血吸虫原虫が挙げられる。蠕虫には、回虫、糸状虫、及び植物食性の線虫、吸虫、アカントセファラ、及びサナダムシが含まれる。原虫感染には、ジアルジア種、トリコモナス種、アフリカトリパノソーマ症、アメーバ赤痢、バベシア症、バランチジウム赤痢、チャーガ病、コクシジウム症、マラリア及びトキソプラズマ症による感染が含まれる。病原体の例、例えば寄生／原生動物病原体には、熱帯熱マラリア原虫、三日熱マラリア、トリパノソーマ・クルージ、及びトキソプラズマ原虫が含まれるが、これらに限定されない。真菌性病原体には、クリプトコッカス・ネオフォルマンズ、ヒストプラズマ・カプスラタム、コクシジオイデス・イミティス、プラストミセス・デルマティティディス、クラミジア・トラコマチス、クラミジア・ニューモニエ、クラミジア・シッタシ、及びカンジダ・アルビカンズが含まれるが、これらに限定されない。病原性ウイルスには、呼吸器系ウイルス（アデノウイルス、パラインフルエンザウイルス、重症急性呼吸器症候群（SARS）、コロナウイルス、MERSなど）、胃腸ウイルス（ノロウイルス、ロタウイルス、一部のアデノウイルス、アストロウイルスなど）、発疹性ウイルス（例えば、はしかを引き起こすウイルス、風疹を引き起こすウイルス、水痘／帯状疱疹を引き起こすウイルス、発疹を引き起こすウイルス、天然痘を引き起こすウイルス、第五病を引き起こすウイルス、チクングニアウイルス感染症）；肝ウイルス性疾患（例えば、A型、B型、C型、D型、E型肝炎）；皮膚のウイルス性疾患（例えば、いぼ（性器、肛門を含む）、ヘルペス（口腔、性器、肛門を含む）、伝染性軟属腫）；出血性ウイルス性疾患（例えば、エボラ熱、ラッサ熱、デング熱、黄熱病、マールブルグ出血熱、クリミア・コンゴ出血熱）神経ウイルス（例えば、ポリオ、ウイルス性髄膜炎、ウイルス性脳炎、狂犬病）、性感染症ウイルス（例えば、HIV、HPVなど）、免疫不全ウイルス（例えば、HIV）；インフルエンザウイルス；デング熱；ウエストナイルウイルス；ヘルペスウイルス；黄熱病ウイルス；肝炎ウイルスC；肝炎ウイルスA；肝炎ウイルスB；パピローマウイルス；などを含むが、これらに限定されない。病原体には、例えば、HIVウイルス、結核菌、肺炎桿菌、アシネトバクター・バウマニ、炭疽菌、百日咳菌、パークホルデリア・セパシア、コリネバクテリウム・ジフテリア、コクシエラ・バーネッティ、ストレプトコッカス・アガラクティエ、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、レジオネラ・ロングビーチエ、レジオネラ・ニューモフィラ、レプトスピラ・インターロガン、モラクセラ・カタラーリス、化膿連鎖球菌、大腸菌、淋菌、ナイセリア・メニンギティディス、ナイセリア・エロンガタ、淋菌、パレコウイルス、肺炎球菌

10

20

30

40

50

、ニューモシスチス・ジロベチー、クリプトコッカス・ネオフォルマンズ、ヒストプラズマ・カプスラタム、インフルエンザ菌B、梅毒トレポネーマ、ライム病スピロヘータ、緑膿菌、マイコバクテリウム・レブラエ、ブルセラ・アボルタス、狂犬病ウイルス、インフルエンザウイルス、サイトメガロウイルス、単純ヘルペスウイルスI、単純ヘルペスウイルスII、ヒト血清パルボ様ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)、M. ジェニタリウム、臙トリコモナス、水痘带状疱疹ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、麻疹ウイルス、アデノウイルス、ヒトT細胞白血病ウイルス、エプスタイン・バーウイルス、マウス白血病ウイルス、おたふく風邪ウイルス、水疱性口内炎ウイルス、シンドビスウイルス、リンパ性脈絡膜髄膜炎ウイルス、いぼウイルス、青舌ウイルス、センダイウイルス、ネコ白血病ウイルス、レオウイルス、ポリオウイルス、サルウイルス40、マウス乳腺腫瘍ウイルス、デングウイルス、風疹ウイルス、ウエストナイルウイルス、熱帯熱マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、トキソプラズマ原虫、トリパノソーマ・ランジェリ、トリパノソーマ・クルージ、トリパノソーマローデシエンセ、トリパノソーマ・ブルーセイ、マンソン住血吸虫、日本住血吸虫、バベシア・ボビス、アイメリア・テネラ、回旋糸状虫、リーシュマニア・トロピカ、結核菌、旋毛虫、タイレリア・パルバ(*Theileria parva*)、胞状条虫(*Taenia hydatigena*)、ヒツジ条虫(*Taenia ovis*)、無鉤条虫(*Taenia saginata*)、エキノコックスグラニュロサス、メソセストイド・コルチ、マイコプラズマ関節炎、M. ヒオリニス、M. オラレ、M. アルギニニ、アコレプラズマ・レイラウィ、M. サリバリウム、肺炎マイコプラズマ、エンテロバクター・クロアカエ、クレブシエラ・エロゲネス、プロテウス・ブルガリス、セラチア・マセセンス、エンテロコッカス・フェカリス、エンテロコッカス・フェシウム、連鎖球菌インターミディウス、肺炎連鎖球菌、及び化膿連鎖球菌が挙げられる。多くの場合、標的核酸は、ウイルスまたは細菌、またはサンプル中に見出され得る疾患の原因となる他の因子由来の配列を含み得る。ある場合には、標的核酸は、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、ヒトパピローマウイルス(HPV)、クラミジア、淋病、梅毒、トリコモナス症、性感染症、マラリア、デング熱、エボラ、チクングニア熱、及びリーシュマニア症の少なくとも1つにおける遺伝子座からのゲノム遺伝子座、転写mRNA、または逆転写cDNAからの核酸の一部である。病原体には、ウイルス、真菌、蠕虫、原生動物、マラリア病原虫、マラリア原虫、トキソプラズマ原虫、及び住血吸虫原虫が含まれる。蠕虫には、回虫、糸状虫、及び植物食性の線虫、吸虫、アカントセファラ、及びサナダムシが含まれる。原虫感染には、ジアルジア種、トリコモナス種、アフリカトリパノソーマ症、アメーバ赤痢、バベシア症、バランチジウム赤痢、チャーガ病、コクシジウム症、マラリア及びトキソプラズマ症による感染が含まれる。病原体の例、例えば寄生／原生動物病原体には、熱帯熱マラリア原虫、三日熱マラリア、トリパノソーマ・クルージ、及びトキソプラズマ原虫が含まれるが、これらに限定されない。真菌性病原体には、クリプトコッカス・ネオフォルマンズ、ヒストプラズマ・カプスラタム、コクシジオイデス・イミティス、ブラストミセス・デルマティティディス、及びカンジダ・アルビカンスが含まれるが、これらに限定されない。病原性ウイルスには、免疫不全ウイルス(例えば、HIV)、インフルエンザウイルス、デング熱、ウエストナイルウイルス、ヘルペスウイルス、黄熱病ウイルス、肝炎ウイルスC、肝炎ウイルスA、肝炎ウイルスB、パピローマウイルスなどが含まれるが、これらに限定されない。病原体には、例えば、HIVウイルス、結核菌、ストレプトコッカス・アガラクティエ、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、レジオネラ・ニューモフィラ、化膿連鎖球菌、サリバリウス連鎖球菌、大腸菌、淋菌、ナイセリア・メニンギティディス、肺炎球菌、クリプトコッカス・ネオフォルマンズ、ヒストプラズマ・カプスラタム、インフルエンザ菌B、梅毒トレポネーマ、ライム病スピロヘータ、緑膿菌、マイコバクテリウム・レブラエ、ブルセラ・アボルタス、狂犬病ウイルス、インフルエンザウイルス、サイトメガロウイルス、単純ヘルペスウイルスI、単純ヘルペスウイルスII、ヒト血清パルボ様ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)、M. ジェニタリウム、臙トリコモナス、水痘带状疱疹ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、麻疹ウイルス、アデノウイルス、ヒトT細胞白血病ウイ

10

20

30

40

50

ルス、エプスタイン・バーウイルス、マウス白血病ウイルス、おたふく風邪ウイルス、水疱性口内炎ウイルス、シンドビスウイルス、リンパ性脈絡膜髄膜炎ウイルス、いぼウイルス、青舌ウイルス、センダイウイルス、ネコ白血病ウイルス、レオウイルス、ポリオウイルス、サルウイルス40、マウス乳腺腫瘍ウイルス、デングウイルス、風疹ウイルス、ウエストナイルウイルス、熱帯熱マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、トキソプラズマ原虫、トリパノソーマ・ランジェリ、トリパノソーマ・クルージ、トリパノソーマローデシエンセ、トリパノソーマ・ブルーセイ、マンソン住血吸虫、日本住血吸虫、バベシア・ボビス、アイメリア・テネラ、回旋糸状虫、リーシュマニア・トロピカ、結核菌、旋毛虫、タイレリア・パルバ (*Theileria parva*)、胞状条虫 (*Taenia hydatigena*)、ヒツジ条虫 (*Taenia ovis*)、無鉤条虫 (*Taenia saginata*)、エキノкокクスグラニューロサス、メソセストイド・コルチ、マイコプラズマ関節炎、M. ヒオリニス、M. オラレ、M. アルギニニ、アコレプラズマ・レイラウィ、M. サリバリウム、及び肺炎マイコプラズマが挙げられる。ある場合には、標的配列は、抗生物質の治療への耐性を付与する単一ヌクレオチド突然変異などの、治療への耐性を付与する突然変異を含むサンプル中の疾患の原因となる、細菌または他の病原体の遺伝子座からの、ゲノム遺伝子座、転写mRNA、または逆転写cDNAからの核酸の一部である。

10

【0063】

がん試験またはがんリスク試験に使用されるサンプルは、本明細書に記載の試薬のガイド核酸に結合できる少なくとも1つの標的配列または標的核酸セグメントを含むことができる。ある場合には、標的核酸セグメントは、がんに関連する突然変異を有する遺伝子、過剰発現ががんに関連する遺伝子、腫瘍抑制遺伝子、がん遺伝子、チェックポイント阻害遺伝子、細胞の増殖に関連する遺伝子、細胞代謝に関連する遺伝子、または細胞周期に関連する遺伝子からの核酸の一部である。時々、標的核酸は、前立腺がんバイオマーカーまたは非小細胞肺がんなどのがんバイオマーカーをコードする。ある場合には、このアッセイを使用して、肺がん、子宮頸がんなどのがんを予測できる標的核酸の「ホットスポット」を検出できる。また、がんがウイルスによって引き起こされるがんである場合もある。ヒトにおいてがんを引き起こすウイルスのいくつかの非限定的な例には、エプスタイン・バーウイルス（例えば、バーキットリンパ腫、ホジキン病、及び鼻咽頭がん）；パピローマウイルス（例えば、子宮頸がん、肛門がん、中咽頭がん、陰茎がん）；B型及びC型肝炎ウイルス（例えば、肝細胞がん）；ヒトT細胞白血病ウイルス1型（HTLV-1）（例えば、T細胞白血病）；及びメルケル細胞ポリオーマウイルス（例えば、メルケル細胞がん）が含まれる。当業者は、ウイルスが他のタイプのがんを引き起こすか、または一因となり得ることを認識するであろう。ある場合には、標的核酸は、血熱（blood fever）に関連する核酸の一部である。ある場合には、標的核酸セグメントは、ALK、APC、ATM、AXIN2、BAP1、BARD1、BLM、BMPR1A、BRCA1、BRCA2、BRIP1、CASR、CDC73、CDH1、CDK4、CDKN1B、CDKN1C、CDKN2A、CEBPA、CHEK2、CTNNA1、DICER1、DIS3L2、EGFR、EPCAM、FH、FLCN、GATA2、GPC3、GREM1、HOXB13、HRAS、KIT、MAX、MEN1、MET、MITF、MLH1、MSH2、MSH3、MSH6、MUTYH、NBN、NF1、NF2、NTHL1、PALB2、PDGFRA、PHOX2B、PMS2、POLD1、POLE、POT1、PRKAR1A、PTCH1、PTEN、RAD50、RAD51C、RAD51D、RB1、RECQL4、RET、RUNX1、SDHA、SDHAF2、SDHB、SDHC、SDHD、SMAD4、SMARCA4、SMARCB1、SMARCE1、STK11、SUFU、TERC、TERT、TMEM127、TP53、TSC1、TSC2、VHL、WRN、及びWT1のうちの少なくとも1つの遺伝子座由来のゲノム遺伝子座、転写mRNA、または逆転写cDNA由来の核酸の一部である。

20

30

40

【0064】

遺伝性障害の試験に使用されるサンプルは、本明細書に記載の試薬のガイド核酸に結合

50

できる少なくとも1つの標的配列または標的核酸セグメントを含むことができる。いくつかの実施形態では、遺伝性障害は、血友病、鎌状赤血球貧血、βサラセミア、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、重度の複合免疫不全、または嚢胞性線維症である。ある場合には、標的核酸セグメントは、遺伝性障害に関連する変異を有する遺伝子、過剰発現が遺伝性障害に関連する遺伝子、遺伝性障害をもたらす異常な細胞増殖に関連する遺伝子、または遺伝性障害をもたらす異常な細胞代謝に関連する遺伝子からの核酸の一部である。ある場合には、標的核酸セグメントは、C F T R、F M R 1、S M N 1、A B C B 1 1、A B C C 8、A B C D 1、A C A D 9、A C A D M、A C A D V L、A C A T 1、A C O X 1、A C S F 3、A D A、A D A M T S 2、A D G R G 1、A G A、A G L、A G P S、A G X T、A I R E、A L D H 3 A 2、A L D O B、A L G 6、A L M S 1、A L P L、A M T、A Q P 2、A R G 1、A R S A、A R S B、A S L、A S N S、A S P A、A S S 1、A T M、A T P 6 V 1 B 1、A T P 7 A、A T P 7 B、A T R X、B B S 1、B B S 1 0、B B S 1 2、B B S 2、B C K D H A、B C K D H B、B C S 1 L、B L M、B S N D、C A P N 3、C B S、C D H 2 3、C E P 2 9 0、C E R K L、C H M、C H R N E、C I I T A、C L N 3、C L N 5、C L N 6、C L N 8、C L R N 1、C N G B 3、C O L 2 7 A 1、C O L 4 A 3、C O L 4 A 4、C O L 4 A 5、C O L 7 A 1、C P S 1、C P T 1 A、C P T 2、C R B 1、C T N S、C T S K、C Y B A、C Y B B、C Y P 1 1 B 1、C Y P 1 1 B 2、C Y P 1 7 A 1、C Y P 1 9 A 1、C Y P 2 7 A 1、D B T、D C L R E 1 C、D H C R 7、D H D D S、D L D、D M D、D N A H 5、D N A I 1、D N A I 2、D Y S F、E D A、E I F 2 B 5、E M D、E R C C 6、E R C C 8、E S C O 2、E T F A、E T F D H、E T H E 1、E V C、E V C 2、E Y S、F 9、F A H、F A M 1 6 1 A、F A N C A、F A N C C、F A N C G、F H、F K R P、F K T N、G 6 P C、G A A、G A L C、G A L K 1、G A L T、G A M T、G B A、G B E 1、G C D H、G F M 1、G J B 1、G J B 2、G L A、G L B 1、G L D C、G L E 1、G N E、G N P T A B、G N P T G、G N S、G R H P R、H A D H A、H A X 1、H B A 1、H B A 2、H B B、H E X A、H E X B、H G S N A T、H L C S、H M G C L、H O G A 1、H P S 1、H P S 3、H S D 1 7 B 4、H S D 3 B 2、H Y A L 1、H Y L S 1、I D S、I D U A、I K B K A P、I L 2 R G、I V D、K C N J 1 1、L A M A 2、L A M A 3、L A M B 3、L A M C 2、L C A 5、L D L R、L D L R A P 1、L H X 3、L I F R、L I P A、L O X H D 1、L P L、L R P P R C、M A N 2 B 1、M C O L N 1、M E D 1 7、M E S P 2、M F S D 8、M K S 1、M L C 1、M M A A、M M A B、M M A C H C、M M A D H C、M P I、M P L、M P V 1 7、M T H F R、M T M 1、M T R R、M T T P、M U T、M Y O 7 A、N A G L U、N A G S、N B N、N D R G 1、N D U F A F 5、N D U F S 6、N E B、N P C 1、N P C 2、N P H S 1、N P H S 2、N R 2 E 3、N T R K 1、O A T、O P A 3、O T C、P A H、P C、P C C A、P C C B、P C D H 1 5、P D H A 1、P D H B、P E X 1、P E X 1 0、P E X 1 2、P E X 2、P E X 6、P E X 7、P F K M、P H G D H、P K H D 1、P M M 2、P O M G N T 1、P P T 1、P R O P 1、P R P S 1、P S A P、P T S、P U S 1、P Y G M、R A B 2 3、R A G 2、R A P S N、R A R S 2、R D H 1 2、R M R P、R P E 6 5、R P G R I P 1 L、R S 1、R T E L 1、S A C S、S A M H D 1、S E P S E C S、S G C A、S G C B、S G C G、S G S H、S L C 1 2 A 3、S L C 1 2 A 6、S L C 1 7 A 5、S L C 2 2 A 5、S L C 2 5 A 1 3、S L C 2 5 A 1 5、S L C 2 6 A 2、S L C 2 6 A 4、S L C 3 5 A 3、S L C 3 7 A 4、S L C 3 9 A 4、S L C 4 A 1 1、S L C 6 A 8、S L C 7 A 7、S M A R C A L 1、S M P D 1、S T A R、S U M F 1、T A T、T C I R G 1、T E C P R 2、T F R 2、T G M 1、T H、T M E M 2 1 6、T P P 1、T R M U、T S F M、T T P A、T Y M P、U S H 1 C、U S H 2 A、V P S 1 3 A、V P S 1 3 B、V P S 4 5、V R K 1、V S X 2、W N T 1 0 A、X P A、X P C、及び Z F Y V E 2 6 のうちの少なくとも1つの遺伝子座由来のゲノム遺伝子座、転写mRNA、または逆転写cDNA由来の核酸の一部である。

【0065】

10

20

30

40

50

表現型判定試験に使用されるサンプルは、本明細書に記載の試薬のガイド核酸に結合できる少なくとも1つの標的核酸セグメントを含むことができる。標的核酸セグメントは、ある場合には、表現型形質に関連する遺伝子からの核酸の一部である。

【0066】

遺伝子型判定試験に使用されるサンプルは、本明細書に記載の試薬のガイド核酸に結合できる少なくとも1つの標的核酸セグメントを含むことができる。標的核酸セグメントは、ある場合には、遺伝子型に関連する遺伝子からの核酸の一部である。

【0067】

祖先に関する試験に使用されるサンプルは、本明細書に記載の試薬のガイド核酸に結合できる少なくとも1つの標的核酸セグメントを含むことができる。ある場合には、標的核酸セグメントは、起源の地理的領域または民族集団に関連する遺伝子由来の核酸の一部である。

10

【0068】

サンプルは、疾患の状態を識別するために使用できる。例えば、サンプルは、本明細書に記載の任意のサンプルであり、対象の疾患の状態を同定するために使用するために対象から得られる。この疾患は、がんまたは遺伝性障害であり得る。ある場合には、方法は、対象から血清サンプルを取得すること、及び対象の疾患の状態を特定することを含み得る。多くの場合、疾患状態は前立腺疾患の状態である。本明細書に記載の実施形態のいずれにおいても、デバイスは、免疫に関係なく、無症候性、前症候性、及び／または症候性の診断の用途で構成し得る。本明細書に記載の実施形態のいずれにおいても、デバイスは、サンプル（例えば、血液を含むサンプル）に対して1つまたは複数の血清学的アッセイを実施するように構成することができる。

20

【0069】

いくつかの実施形態では、サンプルを使用して、植物または植物の核酸、もしくは土壌に関連する細菌、ウイルス、または微生物の標的核酸における突然変異を同定することができる。本開示のデバイス及び方法を使用して、遺伝子の発現に影響を与える標的核酸の突然変異を同定することができる。遺伝子の発現に影響を及ぼす突然変異は、遺伝子内の標的核酸の突然変異、遺伝子の発現に関連するRNAを含む標的核酸の突然変異、またはRNAまたは遺伝子のプロモーター、エンハンサー、またはリプレッサーなどの遺伝子の発現の調節に関連する核酸の突然変異を含む標的核酸であり得る。多くの場合、変異は一塩基変異である

30

【0070】

ある場合には、標的核酸は一本鎖核酸である。あるいは、または組み合わせて、標的核酸は二本鎖核酸であり、試薬との接触前または接触時に一本鎖核酸に調製される。標的核酸は、RNA、DNA、合成核酸、または生物学的サンプルまたは環境サンプルに見られる核酸であり得る。標的核酸には、mRNA、rRNA、tRNA、非コードRNA、長い非コードRNA、及びマイクロRNA (miRNA) が含まれるが、これらに限定されない。ある場合には、標的核酸はmRNAである。ある場合には、標的核酸は、本明細書に記載のウイルス、寄生虫、または細菌に由来する。ある場合には、標的核酸は、本明細書に記載の遺伝子から転写される。

40

【0071】

多くの標的核酸は、本明細書に開示されるシステム及び方法と一致する。本明細書に記載のいくつかの方法は、標的核酸集団として様々な濃度または量でサンプルに存在する標的核酸を検出することができる。ある場合には、サンプルは少なくとも2つの標的核酸を有する。ある場合には、サンプルは少なくとも3、5、10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、または10000の標的核酸を有する。ある場合には、サンプルは、1から10,000、100から8000、400から6000、500から5000、1000から4000、または2000から3000の標的核酸を有する。ある場合には、サンプルは10

50

0 から 9 5 0 0、1 0 0 から 9 0 0 0、1 0 0 から 8 5 0 0、1 0 0 から 8 0 0 0、1 0 0 から 7 5 0 0、1 0 0 から 7 0 0 0、1 0 0 から 6 5 0 0、1 0 0 から 6 0 0 0、1 0 0 から 5 5 0 0、1 0 0 から 5 0 0 0、2 5 0 から 9 5 0 0、2 5 0 から 9 0 0 0、2 5 0 から 8 5 0 0、2 5 0 から 8 0 0 0、2 5 0 から 7 5 0 0、2 5 0 から 7 0 0 0、2 5 0 から 6 5 0 0、2 5 0 から 6 0 0 0、2 5 0 から 5 5 0 0、2 5 0 から 5 0 0 0、2 5 0 0 から 9 5 0 0、2 5 0 0 から 9 0 0 0、2 5 0 0 から 8 5 0 0、2 5 0 0 から 8 0 0 0、2 5 0 0 から 7 5 0 0、2 5 0 0 から 7 0 0 0、2 5 0 0 から 6 5 0 0、2 5 0 0 から 6 0 0 0、2 5 0 0 から 5 5 0 0、または 2 5 0 0 から 5 0 0 0 の標的核酸を有する。ある場合には、本方法は、非標的核酸 10^1 、非標的核酸 10^2 、非標的核酸 10^3 、非標的核酸 10^4 、非標的核酸 10^5 、非標的核酸 10^6 、非標的核酸 10^7 、非標的核酸 10^8 、非標的核酸 10^9 、または非標的核酸 10^{10} あたり少なくとも 1 コピー存在する標的核酸を検出する。

10

【0072】

多くの標的核酸集団が、本明細書に開示されるシステム及び方法と一致する。本明細書に記載のいくつかの方法は、サンプル中に様々な濃度または量で存在する 2 つ以上の標的核酸集団を検出するために実施することができる。ある場合には、サンプルは少なくとも 2 つの標的核酸集団を有する。ある場合には、サンプルは、少なくとも 3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、または 50 の標的核酸集団を有する。ある場合には、サンプルは、3 から 50、5 から 40、または 10 から 25 の標的核酸集団を有する。ある場合には、サンプルは 2 から 50、5 から 50、10 から 50、2 から 25、3 から 25、4 から 25、5 から 25、10 から 25、2 から 20、3 から 20、4 から 20、5 から 20、10 から 20、2 から 10、3 から 10、4 から 10、5 から 10、6 から 10、7 から 10、8 から 10、または 9 から 10 の標的核酸集団を有する。ある場合には、本開示の方法は、非標的核酸 10^1 、非標的核酸 10^2 、非標的核酸 10^3 、非標的核酸 10^4 、非標的核酸 10^5 、非標的核酸 10^6 、非標的核酸 10^7 、非標的核酸 10^8 、非標的核酸 10^9 、または非標的核酸 10^{10} あたり少なくとも 1 コピー存在する標的核酸集団を検出するために実行され得る。標的核酸集団は、サンプル中に異なる濃度または量で存在することができる。

20

【0073】

図 1 は、プログラム可能ヌクレアーゼベースの検出のための例示的な方法を示している。この方法は、サンプルを収集することを含むことができる。サンプルは、本明細書に記載の任意のタイプのサンプルを含むことができる。この方法は、サンプルを調製することを含むことができる。サンプルの調製は、1 つまたは複数のサンプル調製ステップを含むことができる。1 つまたは複数のサンプル調製ステップは、任意の適切な順序で実行することができる。1 つまたは複数のサンプル調製ステップは、マクロフィルタを使用した非標的物質の物理的濾過を含むことができる。1 つまたは複数のサンプル調製ステップは、核酸の精製を含むことができる。1 つまたは複数のサンプル調製ステップは、溶解を含むことができる。1 つまたは複数のサンプル調製ステップは、熱不活性化を含むことができる。1 つまたは複数のサンプル調製ステップは、1 つまたは複数の酵素または試薬を添加して、標的検出用のサンプルを調製することを含むことができる。

30

40

【0074】

この方法は、サンプルから 1 つまたは複数の液滴、アリコート、またはサブサンプルを生成することを含むことができる。1 つまたは複数の液滴、アリコート、またはサブサンプルは、サンプルの体積測定的部分に対応することができる。サンプルは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、またはそれより多い液滴、アリコート、またはサブサンプルに分割できる。一部の実施形態では、サンプルはサブサンプルに分割されない。

【0075】

この方法は、各々の液滴、アリコート、またはサブサンプル内で 1 つまたは複数の標的

50

を増幅することを含むことができる。各液滴内の1つまたは複数の標的の増幅を、各液滴に対して並行して及び／または同時に実行できる。サンプルを複数の液滴に分割することで増幅プロセス（例えば、サーモサイクリングプロセス）の高速化及び／または効率化が可能になる、なぜなら液滴が、導入されたバルクサンプルよりも少量の材料を含むためである。個々の液滴内の1つまたは複数の標的を増幅することにより、バルクサンプルが単一の増幅プロセスを受ける場合、様々な標的核酸を含むバルクサンプルでは効率的に増幅できない様々な標的核酸の効果的な増幅も可能になる。いくつかの実施形態では、最初にサンプルをサブサンプルに分割することなく、バルクサンプルに対して増幅が行われる。

【0076】

この方法は、サンプル中の1つまたは複数の標的（例えば、標的配列または標的核酸）を検出するために、CRISPRベースまたはプログラム可能ヌクレアーゼベースの検出モジュールを使用することをさらに含み得る。ある場合には、サンプルを複数の液滴、アリコート、またはサブサンプルに分割して、サンプルの調製を容易にし、本開示のデバイスの検出能力を高めることができる。ある場合には、サンプルはサブサンプルに分割されない。

10

【0077】

いくつかの実施形態では、サンプルは、本開示の検出デバイスに手で供給することができる。例えば、スワブサンプルを溶液に浸し得、サンプル／溶液は、デバイスにピペティングできる。他の実施形態では、サンプルは、自動シリンジを介して供給することができる。自動シリンジは、サンプルが検出デバイスに供給される流量を制御するように構成することができる。自動シリンジは、所定の期間にわたって検出デバイスに供給されるサンプルの量を制御するように構成することができる。

20

【0078】

いくつかの実施形態では、サンプルは、本開示の検出デバイスに直接供給することができる。例えば、スワブサンプルを検出デバイスのサンプルチャンバに挿入することができる。

【0079】

サンプルは、サンプル内で1つまたは複数の標的が検出される前に調製できる。本明細書に記載のサンプル調製ステップは、粗サンプルを処理して、純粋またはより純粋なサンプルを生成することができる。サンプルの調製は、例えば、核酸の精製、溶解、結合、洗浄、及び／または溶出を含む、1つまたは複数の物理的または化学的なプロセスであり得る。特定の実施例では、サンプルの調製は、いずれかの順序で以下のステップ、すなわちサンプルの収集、核酸精製、熱不活性化、及び／または塩基／酸の溶解を含むステップを含み得る。

30

【0080】

いくつかの実施形態では、サンプルに対して核酸精製を行うことができる。精製は、細胞の生物学的マトリックスを破壊して核酸を放出すること、核酸に関連する構造タンパク質（核タンパク質）を変性すること、単離された生成物を分解できるヌクレアーゼ（RNase及び／またはDNase）を不活性化すること、及び／または夾雑物（例えば、タンパク質、炭水化物、脂質、生物学的または環境的要素、不要な核酸、及び／または他の細胞破片）を除去することを含み得る。

40

【0081】

いくつかの実施形態では、収集したサンプルの溶解を行うことができる。溶解は、プロテアーゼ（例えば、プロテイナーゼKまたはPK酵素）を使用して行うことができる。ある場合には、試薬の溶液を使用してサンプルの細胞を溶解し、核酸を放出して、それらがプログラム可能ヌクレアーゼにアクセスできるようにすることができる。溶液の有効成分は、カオトロピック剤、界面活性剤、塩であり得、浸透圧、イオン強度、及びpHが高い場合があり得る。カオトロピック剤またはカオトロップは、タンパク質、DNA、またはRNAなどの高分子の3次元構造を破壊する物質である。プロトコルの一例は、4Mのグアニジニウムイソチオシアネート、25mMのクエン酸ナトリウム、2H₂O、0.5%

50

(w/v) ラウリルサルコシン酸ナトリウム、及び 0.1 M の β -メルカプトエタノール) を含み得るが、様々な細胞標的用の多数の市販の緩衝液も使用できる。アルカリ緩衝液は、特に環境サンプルの場合、硬い殻を持つ細胞にも使用できる。ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) やセチルトリメチルアンモニウムブロマイド (CTAB) などの洗浄剤も化学的溶解緩衝液に実装できる。細胞溶解は、前述の化学的に誘導された細胞溶解に加えて、物理的、機械的、熱的または酵素的手段によっても行うことができる。ある場合には、サンプルの種類に応じて、ナノスケールバンプ、ナノワイヤー、音響発生器、統合レーザー、統合ヒーター、及び／またはマイクロ毛細管プローブが、溶解を実行するために使用できる。

【0082】

ある場合には、サンプルに対して熱不活性化を行うことができる。いくつかの実施形態では、処理／溶解されたサンプルは、溶解されたサンプルにおいて、溶解の間に使用されるタンパク質（例えば、PK 酵素または溶解試薬）を不活性化するために熱不活性化を受けることができる。ある場合には、検出デバイスに組み込まれた加熱要素を熱不活性化に使用することができる。加熱要素は、バッテリー、または検出デバイスと統合された熱エネルギーまたは電気エネルギーの別の供給源によって電力を供給され得る。

【0083】

いくつかの場合では、サンプル内の標的核酸は、ガイド核酸、例えば CRISPR 酵素の crRNA に結合する前に増幅を受けることができる。精製サンプル内の標的核酸を増幅することができる。ある場合には、ループ媒介増幅 (LAMP)、等温リコンビナーゼポリメラーゼ増幅 (RPA)、及び／またはポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いて増幅を達成し得る。ある場合には、デジタル液滴増幅を使用できる。サンプルのそのような核酸増幅は、標的 RNA の検出の感度、特異度、または精度のうちの少なくとも 1 つを改善することができる。核酸増幅のための試薬は、リコンビナーゼ、オリゴヌクレオチドプライマー、一本鎖 DNA 結合 (SSB) タンパク質、及びポリメラーゼを含むことができる。核酸増幅は、転写媒介増幅 (TMA) であり得る。核酸増幅は、ヘリカーゼ依存増幅 (HDA) または環状ヘリカーゼ依存増幅 (cHDA) であり得る。さらなる場合において、核酸増幅は、鎖置換増幅 (SDA) である。核酸増幅は、リコンビナーゼポリメラーゼ増幅 (RPA) であり得る。核酸増幅は、ループ媒介増幅 (LAMP) または指数増幅反応 (EXPAR) の少なくとも 1 つであり得る。核酸増幅は、ある場合には、ローリングサークル増幅 (RCA)、リガーゼ連鎖反応 (LCR)、RNA 標的を増幅する単純な方法 (SMART)、単一プライマー等温増幅 (SPIA)、複数置換増幅 (MDA)、核酸配列ベースの増幅 (NASBA)、核酸のヒンジ開始プライマー依存増幅 (HIP)、ニッキング酵素増幅反応 (NEAR)、または改良型多重置換増幅 (IMDA) によるものである。核酸増幅は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50、または 60 分以下で行うことができる。時々、核酸増幅は、1 から 60、5 から 55、10 から 50、15 から 45、20 から 40、または 25 から 35 分間行われる。時々、核酸増幅は、5 から 60、10 から 60、15 から 60、30 から 60、45 から 60、1 から 45、5 から 45、10 から 45、から 30 から 45、1 から 30、5 から 30、10 から 30、15 から 30、1 から 15、5 から 15、または 10 から 15 分間行われる。

【0084】

いくつかの実施形態では、増幅は、サンプルのサーモサイクリングを含み得る。サーモサイクリングは、別々の場所で、サンプルの 1 つまたは複数の液滴に対して並行して及び／または独立して実行できる。これは、(1) 加熱要素が液滴の一方の側で液滴に近接し、ヒートシンク要素が液滴の他方の側に近接している場所で液滴を静止状態に保持する、または (2) 液滴を流体チャネル内のゾーンを経て流し、それにおいて熱は加熱源からそれを越えてヒートシンクに至る、などの方法によって達成できる。ある場合には、1 つまたは複数の抵抗加熱要素を使用してサーモサイクリングを実行できる。時々、核酸増幅反応は、20 から 45 °C 前後の温度で行われる。核酸増幅反応は、20 °C、25 °C、30 °C

10

20

30

40

50

、35℃、37℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、または65℃以下の温度で実行され得る。核酸増幅反応は、少なくとも20℃、25℃、30℃、35℃、37℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、または65℃の温度で行うことができる。ある場合には、核酸増幅反応は、20℃から45℃、25℃から40℃、30℃から40℃、または35℃から40℃の温度で実施される。ある場合には、核酸増幅反応は、45℃から65℃、50℃から65℃、55℃から65℃、または60℃から65℃の温度で実施される。いくつかの場合において、核酸増幅反応は、約20℃から45℃、25℃から45℃、30℃から45℃、35℃から45℃、40℃から45℃、20℃から37℃、25℃から37℃、30℃から37℃、35℃から37℃、20℃から30℃、25℃から30℃、20℃から25℃、または約22℃から25℃の範囲の温度で行うことができる。ある場合には、核酸増幅反応は、約40℃から65℃、45℃から65℃、50℃から65℃、55℃から65℃、60℃から65℃、40℃から60℃、45℃から60℃、50℃から60℃、55℃から60℃、40℃から55℃、45℃から55℃、50℃から55℃、40℃から50℃、または約45℃から50℃の範囲の温度で行うことができる。

10

20

30

40

50

【0085】

さらに、プログラム可能ヌクレアーゼ（例えば、CRISPR酵素）のガイド核酸（例えば、crRNA）に結合する前に、標的核酸を任意に増幅することができる。この増幅は、PCR増幅または等温増幅であり得る。このサンプルの核酸増幅は、標的RNAの検出の感度、特異度、または精度のうちの少なくとも1つを改善することができる。核酸増幅用の試薬は、リコンビナーゼ、オリゴヌクレオチドプライマー、一本鎖DNA結合（SSB）タンパク質、及びポリメラーゼを含むことができる。核酸増幅は、転写媒介増幅（TMA）であり得る。核酸増幅は、ヘリカーゼ依存増幅（HDA）または環状ヘリカーゼ依存増幅（cHDA）であり得る。さらなる場合において、核酸増幅は、鎖置換増幅（SDA）である。核酸増幅は、リコンビナーゼポリメラーゼ増幅（RPA）であり得る。核酸増幅は、ループ媒介増幅（LAMP）または指数増幅反応（EXPAR）の少なくとも1つであり得る。核酸増幅は、ある場合には、ローリングサークル増幅（RCA）、リガーゼ連鎖反応（LCR）、RNA標的を増幅する単純な方法（SMART）、単一プライマー等温増幅（SPIA）、複数置換増幅（MDA）、核酸配列ベースの増幅（NASBA）、核酸のヒンジ開始プライマー依存増幅（HIP）、ニックング酵素増幅反応（NEAR）、または改良型多重置換増幅（IMDA）によるものである。核酸増幅は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50、または60分以下で行うことができる。時々、核酸増幅反応は、20から45℃前後の温度で行われる。時々、核酸増幅反応は約45から65℃の温度で行われる。核酸増幅反応は、20℃、25℃、30℃、35℃、37℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、または65℃以下の温度で行われ得る。核酸増幅反応は、少なくとも20℃、25℃、30℃、35℃、37℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、または65℃の温度で行うことができる。

【0086】

図3Aは、サンプルの連続した流れが通過してサーモサイクリングの処置を受けることができるチャンネルの例を示す。デバイスは、デバイスに組み込まれた1つまたは複数の可動機構を含むことができる。1つまたは複数の可動機構は、デバイスと一体化されたバッテリーを使用して電力を供給され得る。1つまたは複数の可動機構は、1つまたは複数の所定の時間間隔でチャンネルを通るサンプルの連続的な流れを停止及び開始するように構成することができる。1つまたは複数の可動機構は、サンプルの連続的な流れを、本明細書で「液滴」と呼ぶことができるより小さな複数の体積にチョップまたは分割するように構成することができる。1つまたは複数の可動機構は、開構成及び閉構成を有することができる。開構成は、図3Aに見られるように、チャンネルの1つまたは複数のセクションを通るサンプルの連続的な流れを可能にすることができる。図3Bに見られるように、閉構成は、チャンネルの1つまたは複数のセクションを通るサンプルの流れを制限または完全に阻

止することができる。閉構成により、チャンネルを通して流れるサンプルの1つまたは複数の体積または部分の物理的な及び／または熱的な分離が可能になり得る。可動機構が閉位置にあるとき、可動機構は、チャンネルを通して流れるサンプルの異なる体積または部分の間に物理的障壁を設けることができる。液滴の体積は、0.01から1マイクロリットル、1から5マイクロリットル、及び5から50マイクロリットルの範囲にすることができる。異なる体積または区画は、本明細書の他の箇所で説明されている液滴に対応することができる。可動機構は、サンプルを供給するシリンジ、またはチャンネルを通してサンプルの流れを制御する別の流れ調整器の動作に応じて、開位置から閉位置に、または閉位置から開位置に、切り替えることができる。可動機構は、デバイスと一体化されたバッテリーを使用して電力を供給され得る。

10

【0087】

ある場合には、可動機構は複数の弁を含むことができる。複数の弁は、例えば逆止弁を含むことができる。ある場合には、可動機構はプランジャまたはプリストルを含むことができる。プランジャまたはプリストルは、開構成及び閉構成を有することができる。上述のように、開構成は、チャンネルの1つまたは複数のセクションを通るサンプルの連続的な流れを可能にすることができ、閉構成は、チャンネルの1つまたは複数のセクションを通るサンプルの流れを制限または完全に阻止することができる。閉構成により、チャンネルを通して流れるサンプルの1つまたは複数の体積または部分の物理的な及び／または熱的な分離が可能になり得る。開構成では、サンプルがチャンネルを通して流れることができるように、プランジャまたはプリストルをチャンネルの底と同じ高さに配置することができる。閉構成にある場合、プランジャまたはプリストルは、チャンネルの底部からチャンネルの上部まで延びるように構成することができ、サンプルの流れが制限され、サンプルが、互いに物理的に及び／または熱的に絶縁されている、複数の異なる液滴、またはパーティションに分割されるようにする。ある場合には、可動機構は、チャンネルの1つまたは複数のセクションでチャンネルを通る流れを制限するように構成できる任意の物理的物体（例えば、プレート）を含むことができる。ある場合には、可動機構は、可動機構を開構成と閉構成との間で移動させるヒンジまたはばね機構を含むことができる。

20

【0088】

可動機構を使用して、1つまたは複数の液滴、アリコート、またはサブサンプルを生成できる。可動機構を使用して生成された1つまたは複数の液滴、アリコート、またはサブサンプルのそれぞれは、チャンネル内の複数の異なる部分の中で物理的に及び／または熱的に隔離され得る。液滴、アリコート、またはサブサンプルは、チャンネル内の異なる部分の中に物理的に拘束することができる。液滴、アリコート、またはサブサンプルは、閉位置にある第1の可動機構と閉位置にある第2の可動機構との間に拘束され得る。第1の可動機構はチャンネルの入口から第1の距離に配置することができ、第2の可動機構はチャンネルの入口から第2の距離に配置することができる。チャンネルは、サンプルが流れ得る閉じたシステムの一部である場合がある。ある場合には、チャンネルの入口を通るサンプルの流れが停止する（例えば、サンプルを含むシリンジのプランジャが引き戻される）とき、1つまたは複数の可動機構を閉構成にすることができ、それによって、すでにチャンネル内にあるサンプルを熱的及び物理的に分離された複数の液滴に分離することができる。液滴、アリコート、またはサブサンプルを生成すると、溶液が簡素化され、溶液の複雑さが軽減され、増幅のための標的へのアクセスが向上する。

30

40

【0089】

可動機構を使用して生成された1つまたは複数の液滴、アリコート、またはサブサンプルは、本明細書の他の場所で説明されているように、増幅ステップまたはサーモサイクリングステップを受けることができる。ある場合には、可動機構を使用して生成された1つまたは複数の液滴は、2つの可動機構の間に拘束されている間に、別個の加熱ユニット及びヒートシンクと接触する可能性がある。チャンネルの異なるセクションは、異なる液滴のサーモサイクリングを実行するように構成された複数の加熱ユニット及びヒートシンクを含むことができる。液滴、アリコート、またはサブサンプルの個々のサーモサイクリング

50

は、より少量の流体のより効率的なサーモサイクリングを可能にし、必要なエネルギー使用量（例えば、バッテリーから）を少なくすることができる。1つまたは複数の弁が、チャンネルを通るサンプルの流れまたは動きを制御することができる。1つまたは複数の弁は、サンプルまたは1つまたは複数の液滴がチャンネルの入口部分に向かって後方に移動しないように、サンプルまたは1つまたは複数の液滴の移動を制限するように構成された逆止弁を含むことができる。1つ以上の弁は、サンプルまたは液滴が加熱ユニット及び／またはヒートシンクと熱的に接触するときを制御できる。そのような熱的な接触のタイミングは、1つまたは複数のサーモサイクリングステップのタイミングに対応することができる。ある場合には、サンプルの第1の液滴は、第1の加熱ユニット及び第1のヒートシンクと熱的に接触することができ、サンプルの第2の液滴は、第2の加熱ユニット及び第2のヒートシンクと熱的に接触することができるなどがある。

10

【0090】

上述のように、本開示のデバイスは、液滴のデジタル化または液滴生成を実行するように構成することができる。液滴のデジタル化または生成は、サンプルの容積を複数の液滴、アリコート、またはサブサンプルに分割することを含むことができる。サンプルは、約10マイクロリットルから約500マイクロリットルの範囲の容積を有することができる。複数の液滴、アリコート、またはサブサンプルは、約0.01マイクロリットルから約100マイクロリットルの範囲の容積を有することができる。複数の液滴、アリコート、またはサブサンプルは、同じまたは実質的に同様の容積を有することができる。ある場合には、複数の液滴、アリコート、またはサブサンプルは、異なる容積を有することができる。ある場合には、液滴、アリコート、またはサブサンプルは、物理的フィルタまたは上記の1つまたは複数の可動機構を使用して生成することができる。ある場合には、サンプルの各液滴は、1つまたは複数のサンプル調製ステップ（例えば、核酸精製、溶解、熱不活性化、増幅など）を、液滴が物理的に拘束されているか、2つの可動機構間で熱的に分離されている間、独立して及び／または並行して受けることができる。

20

【0091】

増幅後、サンプルを再混合することができる。図7Aに示すように、再混合されたサンプルが1つ以上のプログラム可能ヌクレアーゼプローブと接触するように、再混合されたサンプルを攪拌するように構成されたバルク循環機構を使用して、サンプルを検出チャンバを通して循環させることができる。ある場合には、サンプルは、図7Cに示されるように、1つまたは複数のプログラム可能ヌクレアーゼプローブに近接する検出チャンバの表面の一部に供給され得る。ある場合には、検出チャンバは、再混合されたサンプルを1つまたは複数のプログラム可能ヌクレアーゼプローブに隣接して及び／または近位に配置する1つまたは複数の流体流路に沿って、サンプルを誘導するように、構成することができる。1つまたは複数の流体流路を使用して、再混合された液滴の少なくとも一部を、1つまたは複数のプログラム可能ヌクレアーゼプローブに関連する1つまたは複数の検出領域に標的送達することができる。再混合された液滴は、圧電デバイスの助けを借りて、1つまたは複数の所望の流体流路に沿って検出チャンバを通して循環することができる。

30

【0092】

いくつかの実施形態では、エレクトロウェットティングは、サンプル輸送のためにデバイスによって使用することができる。ある場合には、デバイスをエレクトロウェットティングオンディエレクトリック（EWOD）アプリケーション用に構成できる。本開示のデバイスは、デバイスに統合された独立してアドレス可能な電極のアレイを含むことができる。

40

【0093】

プログラム可能ヌクレアーゼに基づく（例えば、CRISPRに基づく）アッセイのためのデバイスの様々な実施形態が、本明細書に記載される。図2Aは、CRISPRベースの検出のための例示的なデバイスの上面図を示す。デバイスは、サンプルを受け取るように構成されたサンプル境界面（200）を含むことができる。サンプルは、本明細書の他の箇所で説明されているように、1つまたは複数の処理ステップを受けることができる。本明細書に記載のデバイスのいずれも、1つ以上の標的（例えば、目的の遺伝子）を含

50

まないサンプルから1つ以上の粒子を濾過するための物理的フィルタ(201)を含み得る。いくつかの実施形態では、デバイスは、サーモサイクリング構成要素(202)を含み得る。ある場合には、サンプルを複数のデジタル化された液滴に分割することができる。複数のデジタル化された液滴は、デバイスの複数の異なるチャンバに供給することができる。複数のデジタル化された液滴は、別個の処理ステップ(例えば、サーモサイクリング)を受けることができる。いくつかの実施形態では、独立したデジタル反応は、その間にクロストークなしで並行して行うことができる。他の実施形態では、独立したデジタル反応は、最小限のレベルまたは量のクロストークで並行して行うことができる。複数の液滴は、別個の処理ステップの後に、処理ステップの完了時に一緒に混合することができる。1つまたは複数のプログラム可能ヌクレアーゼ(例えば、Cas酵素)を含む複数のプログラム可能ヌクレアーゼプローブは、検出チャンバ(203)に動作可能に結合されて、サンプル中の1つまたは複数の標的、または検出チャンバで一緒に混合される複数のデジタル化された液滴を検出することができる。1つまたは複数のディテクタ(204)は、本明細書に記載の検出チャンバからのシグナルを検出するように構成され得る。例示的なプログラム可能ヌクレアーゼベースのデバイスの実施形態の側面プロファイルが図2Bに示されている。いくつかの実施形態では、デバイスは、側面図で見られるように、1つまたは複数のサーモサイクリング区画(205)を含み得る。いくつかの実施形態では、デバイスは、検出チャンバ(206)を含むことができる。いくつかの実施形態では、デバイスは、1つまたは複数のディテクタ(207)を含むことができる。いくつかの実施形態では、デバイスはバッテリー(208)を含んでもよい。いくつかの実施形態では、デバイスは、遠隔医療構成要素を含み得る。

10

20

【0094】

図4A、4B、5A、及び5Bは、本開示のデバイスと互換性のある方法で使用できる例示的なプログラム可能ヌクレアーゼプローブを示す。プログラム可能ヌクレアーゼプローブは、プログラム可能ヌクレアーゼと複合化されたガイド核酸を含むことができる。プログラム可能ヌクレアーゼは、本明細書に記載の任意のタイプのプログラム可能ヌクレアーゼを含むことができる。ある場合には、プログラム可能ヌクレアーゼプローブは、CRISPR酵素と複合化されたガイド核酸を含み得る。例えば、図4Aは、ガイドRNAに結合する前の循環チャンバの結合していない標的アンプリコンを示し、これはプログラム可能ヌクレアーゼ(例えば、CRISPR酵素)に順次接触する。ガイドRNA-CRISPR酵素複合体にはレポーターも含まれている。プログラム可能ヌクレアーゼプローブ(例えば、CRISPRプローブ)は、固定化マトリックスに固定化され、固定化マトリックスの内側は循環チャンバの内壁に露出される。ガイド核酸またはガイドRNAは、循環チャンバ内の標的アンプリコンにさらされる。レポーターは固定化マトリックスの「外側」側に近接しており、固定化マトリックスの外側は検出領域に近接している。図4Bは、相補的標的アンプリコンと結合した後のプログラム可能ヌクレアーゼプローブ(例えば、CRISPRプローブ)を示す。結合事象は、レポーターを検出可能な領域に解放するか、レポーターを変更するトランスカットをトリガーする。検出メカニズムには、干渉法、表面プラズモン共鳴、電位差測定などの電気化学的検出、または他の検出メカニズムが含まれる場合がある。

30

40

【0095】

特定の実施例では、図5A及び5Bに見られるように、プログラム可能ヌクレアーゼプローブのレポーターは、相補的結合がトランス切断を誘導した後、別の分子種とのシグナル増幅反応を開始することができる。そのような種は、反応性固体またはゲルマトリックス、または検出中に増幅シグナルを生成する他の反応性エンティティであり得る。シグナル増幅反応は、本質的に物理的または化学的であり得る。特定の実施例では、図5A及び5Bで見られるように、相補的結合がトランスカットを誘導した後、放出されたレポーターXは、増幅または修飾されたシグナルを生成するための別のエンティティYとの相互作用及び／または反応を開始することができる。そのようなエンティティは、分子種、固体、ゲル、または他のエンティティを含むことができる。シグナル増幅相互作用は、物理的

50

または化学的反応であり得る。いくつかの実施形態では、相互作用は、フリーラジカル、アニオン、カチオンまたは配位重合反応を含む。他の実施形態では、カットレポーターは、分子、細胞、またはナノ粒子の凝集または凝集を引き起こすことができる。ある場合には、カットレポーターは半導体材料と相互作用することができる。いくつかの実施形態では、相互作用によって引き起こされる化学的または物理的变化は、干渉法、表面プラズモン共鳴、反射率などの光学的検出手段によって検出される。他の実施形態では、相互作用によって引き起こされる化学的または物理的变化は、電位差測定、電流測定、電界効果トランジスタ、または他の電子的手段によって検出される。

【0096】

プログラム可能ヌクレアーゼプローブは、プログラム可能ヌクレアーゼ及び／またはガイド核酸を含むことができる。以下により詳細に記載されるように、ガイド核酸は、標的核酸に結合することができる。ある場合には、オフターゲット結合（検出が遅くなる、または正確な検出が阻害される可能性がある）を最小限に抑えるために、電位勾配を生成するか、プログラム可能ヌクレアーゼプローブに近い1つまたは複数の領域に熱エネルギーを供給して、ターゲティングを強化するように、デバイスを構成できる。

【0097】

いくつかの実施形態では、1つまたは複数のガイド核酸を使用して、標的核酸がサンプル中に存在するかどうかを検出するための非常に効率的で迅速かつ正確な反応を実行することができる。ガイド核酸は、ウイルスまたは細菌または本明細書に記載の疾患の原因となる他の因子由来の核酸の一部を含む一本鎖標的核酸に結合する。ガイド核酸は、細菌または本明細書に記載の疾患の原因となる他の作用物質由来の核酸の一部を含み、一塩基多型（SNP）などの変異をさらに含む一本鎖標的核酸に結合することができ、それは、抗生物質治療などの治療に対する耐性を与えることができる。ガイド核酸は、本明細書に記載のがん遺伝子または遺伝性障害に関連する遺伝子由来の核酸の一部を含む一本鎖標的核酸に結合する。ガイド核酸は、標的核酸に相補的である。多くの場合、ガイド核酸は標的核酸に特異的に結合する。標的核酸は、RNA、DNA、または合成の核酸であり得る。ガイド核酸は、標的核酸の配列に逆相補的な配列を含むことができる。ガイド核酸はcrRNAであってもよい。時々、ガイド核酸は、crRNA及びtracrRNAを含み得る。ガイド核酸は標的核酸に特異的に結合できる。ある場合には、ガイド核酸は天然に存在せず、別の方法で配列の別々のセグメントを人為的に組み合わせることによって作られる。多くの場合、人工的な組み合わせは、化学合成、遺伝子工学技術、または核酸の分離セグメントの人為的操作によって行われる。標的核酸は、所望の機能を提供するように設計及び作成することができる。ある場合には、ガイド核酸の標的領域は長さが20ヌクレオチドである。ガイド核酸の標的領域の長さは、少なくとも10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30ヌクレオチドの長さを有することができる。ある場合には、ガイド核酸の標的領域は、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30ヌクレオチドの長さである。ある場合には、ガイド核酸の標的領域は、正確にまたは約12ヌクレオチド（nt）から約80nt、約12ntから約50nt、約12ntから約45nt、約12ntから約40nt、約12ntから約35nt、約12ntから約30nt、約12ntから約25nt、約12ntから約20nt、約12ntから約19nt、約19ntから約20nt、約19ntから約25nt、約19ntから約30nt、約19ntから約35nt、約19ntから約40nt、約19ntから約45nt、約19ntから約50nt、約19ntから約60nt、約20ntから約25nt、約20ntから約30nt、約20ntから約35nt、約20ntから約40nt、約20ntから約45nt、約20ntから約50nt、または約20ntから約60ntの長さを有する。ある場合には、ガイド核酸の標的領域は、約10ntから約60nt、約20ntから約50nt、または約30ntから約40ntの長さを有する。ある場合には、ガイド核酸の標的領域は、15ntから55nt、25ntから55nt、35ntから5

10

20

30

40

50

5 nt、45 ntから55 nt、15 ntから45 nt、25 ntから45 nt、35 ntから45 nt、15 ntから35 nt、25 ntから35 nt、または15 ntから25 ntの長さを有する。ポリヌクレオチドの配列は、特異的にハイブリダイズ可能であるか特異的に結合するためにその標的核酸配列に対して100%相補的である必要はないことが理解される。ガイド核酸は、標的核酸の修飾可変領域に逆相補的である核酸残基5から20までの領域に少なくとも1つのウラシルを含む配列を有することができる。ある場合には、ガイド核酸は、標的核酸の修飾可変領域に逆相補的である核酸残基5から9、10から14、または15から20の領域に少なくとも1つのウラシルを含む配列を有することができる。ガイド核酸は、標的核酸のメチル化可変領域に逆相補的である核酸残基5から20までの領域に少なくとも1つのウラシルを含む配列を有することができる。ある場合には、ガイド核酸は、標的核酸のメチル化可変領域に逆相補的である核酸残基5から9、10から14、または15から20の領域に少なくとも1つのウラシルを含む配列を有することができる。

10

20

30

40

50

【0098】

ガイド核酸は、目的の感染株またはゲノム遺伝子座の核酸に対してタイル化されたガイド核酸の群から選択することができる。ガイド核酸は、HPV16またはHPV18の株の核酸に対してタイル化されたガイド核酸の群から選択することができる。多くの場合、目的の感染株またはゲノム遺伝子座の核酸に対してタイル化されたガイド核酸は、本明細書に記載の方法で使用するためにプールすることができる。多くの場合、これらのガイド核酸は、単一のアッセイで標的核酸を検出するためにプールされる。単一の標的核酸に対してタイル化されたガイド核酸のプールは、本明細書に記載の方法を使用して標的核酸の検出を増強することができる。単一の標的核酸に対してタイル化されたガイド核酸のプールは、本明細書に記載の方法を使用して、単一の反応内で広い範囲の標的核酸を確実にすることができる。タイル化は、例えば、標的核酸に沿って連続的である。ある場合には、タイル化が標的核酸に沿って重なっていることがある。ある場合には、タイル化は、標的核酸に沿ってタイル化されたガイド核酸間にギャップを含み得る。ある場合には、ガイド核酸のタイル化は非連続的である。多くの場合、標的核酸を検出する方法は、標的核酸をガイド核酸のプール及びプログラム可能ヌクレアーゼに接触させることであって、ガイド核酸のプールのガイド核酸は、標的核酸の配列に逆相補的であるタイル化されたガイド核酸の群から選択される配列を有する、接触させること、及びディテクタ核酸の集団の少なくともいくつかのディテクタ核酸の切断によって生成されるシグナルについてアッセイすること、を含み得る。ガイド核酸をプールすることで、1回の反応の中で標的種を広範囲に同定する、または広範囲にカバーすることが確実にできる。これは、複数の生物によって引き起こされる可能性のある敗血症などの疾患や兆候に特に役立ち得る。

【0099】

いくつかの実施形態では、プログラム可能ヌクレアーゼを使用して、標的核酸がサンプル中に存在するかどうかを検出するための非常に効率的で迅速かつ正確な反応を実行することができる。プログラム可能ヌクレアーゼは、ガイド核酸及び標的核酸と複合化したときに活性化することができるプログラム可能ヌクレアーゼを含むことができる。プログラム可能ヌクレアーゼは、ガイド核酸が、標的核酸と結合した後に、活性化され得て、活性化されたプログラム可能ヌクレアーゼは、標的核酸を切断することができ、トランス切断活性を有することができる。トランス切断活性は、検出部分によるディテクタ核酸のトランス切断など、活性化されたプログラム可能ヌクレアーゼによる近くの一本鎖核酸の非特異的切断であり得る。ディテクタ核酸が活性化されたプログラム可能ヌクレアーゼによって切断されると、検出部分がディテクタ核酸から放出され得、シグナルを生成することができる。シグナルは、比色、電位差測定、電流測定、光学（例えば、蛍光、比色など）、または圧電シグナルであり得る。多くの場合、シグナルはディテクタ核酸の切断前に存在し、ディテクタ核酸の切断時に変化する。ある場合には、ディテクタ核酸の切断前にはシグナルが存在せず、ディテクタ核酸の切断時にシグナルが存在することがある。検出可能なシグナルは、検出のために支持媒体に固定化することができる。プログラム可能ヌクレ

アーゼは、ガイド核酸と標的核酸との結合によって活性化され得る、トランス切断活性を有するCRISPR-Cas（クラスター化された規則的に間隔を空けた短い回文反復-CRISPR関連）核タンパク質複合体であり得る。CRISPR-Cas核タンパク質複合体は、CRISPR酵素とも呼ばれ得るガイド核酸と複合化されたCasタンパク質（Casヌクレアーゼとも呼ばれる）を含むことができる。ガイド核酸はCRISPR RNA（crRNA）であってもよい。時々、ガイド核酸は、crRNA及びトランス活性化crRNA（tracrRNA）を含み得る。

【0100】

修飾された標的核酸を検出するために使用されるプログラム可能ヌクレアーゼシステムは、CRISPR RNA（crRNA）、トランス活性化crRNA（tracrRNA）、Casタンパク質、及びディテクタ核酸を含むことができる。

10

【0101】

本明細書に記載されるのは、ガイド核酸及び標的核酸セグメントまたは部分と複合化されたときに活性化することができるプログラム可能ヌクレアーゼを含む試薬である。プログラム可能ヌクレアーゼは、ガイド核酸及び標的配列と複合化されたときに活性化することができる。プログラム可能ヌクレアーゼは、ガイド核酸がその標的核酸に結合すると活性化され、その環境で非特異的に核酸を分解することができる。プログラム可能ヌクレアーゼは、活性化されるとトランス切断活性を有する。プログラム可能ヌクレアーゼは、Casタンパク質（交換可能にCasヌクレアーゼとも呼ばれる）であり得る。crRNAとCasタンパク質は、CRISPR酵素を形成することができる。

20

【0102】

いくつかのプログラム可能ヌクレアーゼは、本開示の方法及びデバイスと一致する。例えば、CRISPR/Cas酵素は、本明細書に開示される方法及びシステムで使用されるプログラム可能ヌクレアーゼである。CRISPR/Cas酵素には、CRISPR/Cas酵素の既知のクラス及びタイプのいずれかを含めることができる。本明細書に開示されるプログラム可能ヌクレアーゼには、クラス1 CRISPR/Cas酵素、例えばI型、IV型、III型CRISPR/Cas酵素が含まれる。本明細書に開示されるプログラム可能ヌクレアーゼにはまた、クラス2 CRISPR/Cas酵素、例えばII型、V型、VI型CRISPR/Cas酵素が含まれる。本明細書に開示されるいくつかのデバイス（例えば、空気圧弁デバイスまたはスライド式弁デバイスまたはラテラルフローアッセイなどのマイクロ流体デバイス）及びその使用方法に含まれる好ましいプログラム可能ヌクレアーゼには、V型またはVI型CRISPR/Cas酵素が含まれる。

30

【0103】

いくつかの実施形態では、V型CRISPR/Cas酵素はプログラム可能Cas12ヌクレアーゼである。V型CRISPR/Cas酵素（例えば、Cas12またはCas14）はHNHドメインを欠いている。本開示のCas12ヌクレアーゼは、単一の触媒RuvCドメインを介して核酸を切断する。RuvCドメインは、タンパク質のヌクレアーゼまたは「NUC」ローブ内にあり、Cas12ヌクレアーゼは、認識または「REC」ローブをさらに含む。RECとNUCローブはブリッジヘリックスによって接続されており、Cas12タンパク質には、PAM相互作用（PI）ドメインとウェッジ（WED）ドメインと呼ばれるPAM認識用の2つのドメインがさらに含まれている。ある場合には、プログラム可能Cas12ヌクレアーゼは、Cas12a（Cpf1とも呼ばれる）タンパク質、Cas12bタンパク質、Cas12cタンパク質、Cas12dタンパク質、またはCas12eタンパク質であり得る。

40

【0104】

いくつかの実施形態では、プログラム可能ヌクレアーゼはCas13であり得る。ある場合には、Cas13は、Cas13a、Cas13b、Cas13c、Cas13d、またはCas13eであり得る。ある場合には、プログラム可能ヌクレアーゼはMad7またはMad2である。ある場合には、プログラム可能ヌクレアーゼはCas12であり得る。ある場合には、Cas12は、Cas12a、Cas12b、Cas12c、Ca

50

s 1 2 d、またはC a s 1 2 eであり得る。ある場合には、C a s 1 2は、C a s 1 2 タンパク質ファミリー分類) 内の特定のタンパク質バリエーションであるC a s 1 2 M 0 8である可能性があり得る。ある場合には、プログラム可能ヌクレアーゼは、C s m 1、C a s 9、C 2 c 4、C 2 c 8、C 2 c 5、C 2 c 1 0、C 2 c 9、またはC a s Zであり得る。C s m 1は、s m C m s 1、m i C m s 1、o b C m s 1、またはs u C m s 1と呼ばれることもある。時には、C a s 1 3 aはまた、C 2 c 2と呼ばれることもあり得る。時には、C a s Zは、C a s 1 4 a、C a s 1 4 b、C a s 1 4 c、C a s 1 4 d、C a s 1 4 e、C a s 1 4 f、C a s 1 4 g、またはC a s 1 4 hと呼ばれることもある。時々、プログラム可能ヌクレアーゼは、V型C R I S P R-C a sシステムである場合もある。ある場合には、プログラム可能ヌクレアーゼはV I型C R I S P R-C a sシステムであり得る。時々、プログラム可能ヌクレアーゼは、I I I型C R I S P R-C a sシステムである場合もある。時々、プログラム可能ヌクレアーゼは、天然に存在するC R I S P R-C a sシステムに由来しない被操作ヌクレアーゼである場合もある。ある場合には、プログラム可能ヌクレアーゼは、*Leptotrichia shahii* (Lsh)、*Listeria seeligeri* (Lse)、*Leptotrichia buccalis* (Lbu)、*Leptotrichia wadei* (Lwa)、*Rhodobacter capsulatus* (Rca)、*Herbinix hemicellulosilytica* (Hhe)、*Paludibacter propionici genes* (Ppr)、*Lachnospiraceae bacterium* (Lba)、[*Eubacterium*] *rectale* (Ere)、*Listeria newyorkensis* (Lny)、*Clostridium aminophilum* (Cam)、*Prevotella* sp. (Psm)、*Capnocytophaga canimorsus* (Cca)、*Lachnospiraceae bacterium* (Lba)、*Bergeyella zoohelcum* (Bzo)、*Prevotella intermedia* (Pin)、*Prevotella buccae* (Pbu)、*Alistipes* sp. (Asp)、*Riemerella anatipes tifer* (Ran)、*Prevotella aurantiaca* (Pau)、*Prevotella saccharolytica* (Psa)、*Prevotella intermedia* (Pin2)、*Capnocytophaga canimorsus* (Cca)、*Porphyromonas gulae* (Pgu)、*Prevotella* sp. (Psp)、*Porphyromonas gingivalis* (Pig)、*Prevotella intermedia* (Pin3)、*Enterococcus italicus* (Ei)、*Lactobacillus salivarius* (Ls)、または*Thermus thermophilus* (Tt)の少なくとも1つ由来であり得る。時々、C a s 1 3は、L b u C a s 1 3 a、L w a C a s 1 3 a、L b a C a s 1 3 a、H h e C a s 1 3 a、P p r C a s 1 3 a、E r e C a s 1 3 a、C a m C a s 1 3 a、またはL s h C a s 1 3 aの少なくとも1つである。c r R N Aが標的核酸と複合化されたときに、C R I S P R酵素のトランス切断活性が活性化され得る。C R I S P R酵素のトランス切断活性は、t r a c r R N A及びc r R N Aを含むガイド核酸が標的核酸と複合化されたときに活性化され得る。核酸は、D N AまたはR N Aであってもよい。

10

20

30

40

50

【0105】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるプログラム可能ヌクレアーゼは、R N A活性化プログラム可能R N Aヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるプログラム可能ヌクレアーゼは、D N A活性化プログラム可能R N Aヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、プログラム可能ヌクレアーゼは、標的R N Aによって活性化されてR N Aレポーターのトランス切断を開始することができ、標的D N Aによって活性化されてV I型C R I S P R/C a s酵素(例えば、C a s 1 3ヌクレアーゼ)などのR N Aレポーターのトランス切断を開始することができる。例えば、本開示のC a s 1 3 aは、標的R N Aによって活性化されて、R N Aレポーターの切断のためにC

a s 1 3 a のトランス切断活性を開始することができ、標的 DNA によって活性化されて、RNA レポーターのトランス切断のために C a s 1 3 a のトランス切断活性を開始することができる。RNA レポーターは、RNA ベースのレポーターであり得る。いくつかの実施形態では、C a s 1 3 a は、s s DNA を認識及び検出して、RNA レポーターのトランス切断を開始する。複数の C a s 1 3 a 分離株は、標的 DNA とのガイド核酸のハイブリダイゼーション時に、s s DNA を含む標的 DNA を認識、活性化、及び検出できる。例えば、L b u - C a s 1 3 a と L w a - C a s 1 3 a の両方を活性化して、標的 DNA によって RNA レポーターを傍系的に切断することができる。したがって、V I 型 C R I S P R / C a s 酵素（例えば、C a s 1 3 a などの C a s 1 3 ヌクレアーゼ）は、DNA 活性化プログラム可能 RNA ヌクレアーゼであることができ、したがって、本明細書に記載の方法を使用して標的 DNA を検出するために使用することができる。s s DNA の DNA 活性化プログラム可能 RNA ヌクレアーゼの検出は、複数の pH の値で堅牢にすることができる。例えば、C a s 1 3 による標的 s s DNA の検出は、p H 6 . 8 から p H 8 . 2 など、幅広い pH の条件で一貫した切断を示すことができる。対照的に、C a s 1 3 による標的 RNA の検出は、7 . 9 から 8 . 2 という pH の値である高い切断活性を示すことができる。いくつかの実施形態では、RNA 活性化プログラム可能 RNA ヌクレアーゼであることもできる DNA 活性化プログラム可能 RNA ヌクレアーゼは、その RNA ターゲティング選択とは異なる DNA ターゲティング選択を有することができる。例えば、C a s 1 3 a の最適な s s DNA 標的は、C a s 1 3 a の最適な RNA 標的とは異なる特性を持っている。一例として、s s DNA での g RNA の能力は、RNA での同じ g RNA の能力と必ずしも相関するとは限らない。別の例として、g RNA は、標的 RNA 配列の 3 ' の位置での標的ヌクレオチドの同一性に関係なく、高レベルで実行できる。いくつかの実施形態では、g RNA は、標的 s s DNA 配列上の 3 ' の位置に G が存在しない場合でも高いレベルで機能することができる。さらに、本明細書に開示される C a s 1 3 によって検出される標的 DNA は、生物から直接採取され得るか、または P C R 及び L A M P などの核酸増幅法または本明細書に記載される任意の増幅方法によって間接的に生成され得る。C a s 1 3 a などの DNA 活性化プログラム可能 RNA ヌクレアーゼによる標的 s s DNA などの標的 DNA の高感度検出の重要なステップには、（１）インビトロでの診断のための反応につき約 0 . 1 n M を超える濃度までの DNA の産生または単離、（２）特徴が RNA 検出に必要な特徴とは異なるとき、DNA の検出を可能にする適切な配列の特徴を含む標的配列の選択、及び（３）DNA の検出を強化する緩衝液の組成が含まれ得る。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 6 】

DNA 活性化プログラム可能 RNA ヌクレアーゼによる標的 DNA の検出は、蛍光、ラテラルフロー、電気化学、または他のいずれかの本明細書に記載の他の読み出しを含む様々な読み出しに関連付けることができる。V 型 C R I S P R - C a s タンパク質などのプログラム可能 DNA ヌクレアーゼと、V I 型タンパク質などの DNA 活性化プログラム可能 RNA ヌクレアーゼ、DNA レポーター及び RNA レポーターの多重化により、標的 s s DNA または標的 d s DNA と標的 s s DNA の組み合わせの多重化検出をそれぞれ可能にする。独自の RNA レポーター切断選好を有する異なる RNA 活性化プログラム可能 RNA ヌクレアーゼの多重化により、追加の多重化が可能にできる。DNA 活性化プログラム可能 RNA ヌクレアーゼベースの診断のための s s DNA の生成方法は、（１）非対称 P C R、（２）R P A、L A M P、S D A などの非対称等温増幅、（３）短い s s DNA 分子の生成のための N E A R、及び（４）逆転写酵素とそれに続く R N a s e H 消化による RNA 標的の s s DNA への変換を含み得る。したがって、標的 DNA の DNA 活性化プログラム可能 RNA ヌクレアーゼ検出は、本明細書に開示される様々なシステム、キット、組成物、試薬、及び方法に適合する。例えば、C a s 1 3 a による標的 s s DNA の検出は、本明細書に開示される検出デバイスにおいて使用することができる。

【 0 1 0 7 】

明細書に記載の実施形態のいずれにおいても、プログラム可能ヌクレアーゼは、ガイド

核酸及び標的核酸と複合化されたときに活性化することができるプログラム可能ヌクレアーゼを含むことができる。プログラム可能ヌクレアーゼは、ガイド核酸が標的核酸と結合した後に活性化され得て、活性化されたプログラム可能ヌクレアーゼは、標的核酸を切断することができる、それはトランス切断活性を開始することができる。ある場合には、トランスカットまたはトランス切断はレポーターを切断及び／または解放できる。他の場合では、トランスカットまたはトランス切断は、直接検出できる標的の類似体を生成することができる。トランス切断活性は、検出部分によるディテクタ核酸のトランス切断など、活性化されたプログラム可能ヌクレアーゼによる近くの核酸の非特異的切断であり得る。ディテクタ核酸が活性化されたプログラム可能ヌクレアーゼによって切断されると、検出部分がディテクタ核酸から放出され得、シグナルを生成することができる。例えば、検出部分は、図4A、4B、5A、5B、及び図6に示される要素または部分(X)に対応し得る。シグナルは、検出のために支持媒体に固定化することができる。シグナルを視覚化して、標的核酸が存在するか不在かを評価することができる。

10

【0108】

レポーターまたはディテクタ核酸と交換可能に呼ばれるレポーターは、本明細書に開示される組成物(例えば、プログラム可能ヌクレアーゼ、ガイド核酸など)と組み合わせて使用して、サンプル中に標的核酸が存在するかどうかを検出するための非常に効率的で迅速かつ正確な反応を行うことができる。レポーターは、溶液中に懸濁するか、表面に固定化することができる。例えば、レポーターは、本明細書に開示される装置のチャンバの表面に固定化することができる。ある場合には、レポーターは、磁気ビーズなどのビーズに、本明細書に開示される装置のチャンバにおいて固定化することができ、チャンバの下に配置された磁石によって所定の位置に保持される。レポーターは、活性化されたプログラム可能ヌクレアーゼによって切断でき、それによって、検出可能なシグナルを生成することができる。検出可能なシグナルは、図5A及び5Bに示されるように、1つまたは複数の元素(X)の放出に対応し得る。1つ以上の元素(X)の放出は、元素(Y)が元素(X)の存在下にあるとき、別の元素(Y)との反応を開始することができる。元素(Y)と元素(X)との反応により、固相材料中で化学連鎖反応を開始することができる。このような化学連鎖反応は、1つまたは複数の物理的または化学的变化を引き起こす可能性がある。ある場合には、物理的または化学的变化を光学的に検出できる。いくつかの実施形態では、感知または検出の前にシグナルをさらに増幅するために、1つまたは複数のカスケード増幅反応が起こり得る。レポーターと元素(X)の間に単一の結合点が存在する場合がある。単一の結合点を切断すると、巨大分子(X)が放出され、巨大分子(X)自体に基づく一連の反応が起こり得る。本明細書に記載の実施形態のいずれにおいても、レポーターは、検出部分を含む一本鎖ディテクタ核酸を含むことができる。

20

30

【0109】

本明細書で使用される場合、ディテクタ核酸は、レポーターまたはレポーターと交換可能に使用される。ある場合には、ディテクタ核酸は、デオキシリボヌクレオチドを含む一本鎖核酸である。別の場合には、ディテクタ核酸は、リボヌクレオチドを含む一本鎖核酸である。ディテクタ核酸は、少なくとも1つのデオキシリボヌクレオチド及び少なくとも1つのリボヌクレオチドを含む一本鎖核酸であり得る。ある場合には、ディテクタ核酸は、切断部位として機能する内部位置に少なくとも1つのリボヌクレオチド残基を含む一本鎖核酸である。ある場合には、ディテクタ核酸は、内部位置に少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のリボヌクレオチド残基を含み得る。ある場合には、ディテクタ核酸は、内部位置に2から10個、3から9個、4から8個、または5から7個のリボヌクレオチド残基を含み得る。ある場合には、ディテクタ核酸は、内部位置に3から10、4から10、5から10、6から10、7から10、8から10、9から10、2から8、3から8、5から8、6から8、7から8、2から5、3から5、または4から5のリボヌクレオチド残基を含み得る。リボヌクレオチド残基が連続している場合もある。あるいは、リボヌクレオチド残基は、非リボヌクレオチド残基の間に散在している。ある場合には、ディテクタ核酸はリボヌクレオチド残基のみを有する。ある場合には、デ

40

50

ィテクタ核酸はデオキシリボヌクレオチド残基のみを有する。ある場合には、ィテクタ核酸は、本明細書に記載のプログラム可能ヌクレアーゼによる切断に耐性のあるヌクレオチドを含み得る。ある場合には、ィテクタ核酸は合成ヌクレオチドを含み得る。ある場合には、ィテクタ核酸は、少なくとも1つのリボヌクレオチド残基及び少なくとも1つの非リボヌクレオチド残基を含み得る。ある場合には、ィテクタ核酸は、長さが5から20、5から15、5から10、7から20、7から15、または7から10ヌクレオチドである。ある場合には、ィテクタ核酸は、3から20、4から20、5から20、6から20、7から20、8から20、9から20、10から20、15から20、3から15、4から15、5から15、6から15、7から15、8から15、9から15、10から15、3から10、4から10、5から10、6から10、7から10、8から10、9から10、3から8、4から8、5から8、6から8、または7から8ヌクレオチドの長さである。ある場合には、ィテクタ核酸は、少なくとも1つのウラシルリボヌクレオチドを含み得る。ある場合には、ィテクタ核酸は、少なくとも2つのウラシルリボヌクレオチドを含み得る。時々、ィテクタ核酸はウラシルリボヌクレオチドのみを有している。ある場合には、ィテクタ核酸は、少なくとも1つのアデニンリボヌクレオチドを含み得る。ある場合には、ィテクタ核酸は、少なくとも2つのアデニンリボヌクレオチドを含み得る。ある場合には、ィテクタ核酸はアデニンリボヌクレオチドのみを有する。ある場合には、ィテクタ核酸は、少なくとも1つのシトシンリボヌクレオチドを含み得る。ある場合には、ィテクタ核酸は、少なくとも2つのシトシンリボヌクレオチドを含み得る。ある場合には、ィテクタ核酸は、少なくとも1つのグアニンリボヌクレオチドを含み得る。ある場合には、ィテクタ核酸は、少なくとも2つのグアニンリボヌクレオチドを含み得る。ィテクタ核酸は、非修飾リボヌクレオチドのみ、非修飾デオキシリボヌクレオチドのみ、またはそれらの組み合わせを含むことができる。ある場合には、ィテクタ核酸は長さが5から12ヌクレオチドである。ある場合には、ィテクタ核酸は、少なくとも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、または30ヌクレオチドの長さである。ある場合には、ィテクタ核酸は、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、または30ヌクレオチドの長さである。Cas13を含むプログラム可能ヌクレアーゼによる切断では、ィテクタ核酸は長さが5、8、または10ヌクレオチドであり得る。Cas12を含むプログラム可能ヌクレアーゼによる切断では、ィテクタ核酸は10ヌクレオチドの長さであり得る。

10

20

30

40

50

【0110】

一本鎖ィテクタ核酸は、第1の検出可能なシグナルを生成することができる検出部分を含むことができる。ある場合には、ィテクタ核酸は、シグナルを生成できるタンパク質を含むことがある。シグナルは、比色、電位差測定、電流測定、光学（例えば、蛍光、比色など）、または圧電シグナルであり得る。ある場合には、検出部分は切断部位の片側にある。必要に応じて、切断部位の反対側に消光部分がある。消光部分が蛍光消光部分である場合もある。ある場合には、消光部分は切断部位の5'側にあり、検出部分は切断部位の3'側にある。ある場合には、検出部分は切断部位の5'側にあり、消光部分は切断部位の3'側にある。ある場合には、消光部分がィテクタ核酸の5'末端にある。検出部分がィテクタ核酸の3'末端にある場合もある。ある場合には、検出部分はィテクタ核酸の5'末端にある。ある場合には、消光部分はィテクタ核酸の3'末端にある。ある場合には、一本鎖ィテクタ核酸は、第1の検出可能なシグナルを生成することができる一本鎖核酸の少なくとも1つの集団である。ある場合には、一本鎖ィテクタ核酸は、第1の検出可能なシグナルを生成することができる一本鎖核酸の集団である。任意選択で、一本鎖ィテクタ核酸の複数の集団が存在する。ある場合には、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、30、40、50、または50を超える、または任意の数の検出可能なシグナルを生成できる一本鎖ィテクタ核酸の異なる

る集団のこのリストの範囲にまたがる。ある場合には、検出可能なシグナルを生成できる一本鎖ディテクタ核酸の2から50、3から40、4から30、5から20、または6から10の異なる集団が存在する。ある場合には、2から50、5から50、10から50、15から50、20から50、25から50、30から50、35から50、40から50、2から40、5から40、10から40、15から40、20から40、25から40、30から40、35から40、2から30、5から30、10から30、15から30、20から30、25から30、2から20、5から20、10から20、15から20、2から10、または5から10の検出可能なシグナルを生成することができる一本鎖ディテクタ核酸の異なる集団が存在する。

【0111】

いくつかの実施形態では、標的核酸アンプリコンは、例えばCRISPR-CASガイドRNAプローブ（CRISPRプローブと呼ばれる）などの固定化されたプログラム可能ヌクレアーゼプローブによって検出される。標的核酸アンプリコンとプログラム可能ヌクレアーゼプローブ（例えば、固定化されたCRISPR-CAS／ガイドRNA複合体など）との間の相補的な結合事象により、センサーによってそのとき検出されるレポーターを放出する切断事象が発生する。標的とプログラム可能ヌクレアーゼプローブとの間の結合事象を検出するための2つの主なスキームがあり、図7Aに示される移動相スキームと、図7Cに示される固定相スキームである。本明細書に記載の実施形態のいずれかにおいて、各プログラム可能ヌクレアーゼプローブは、異なる標的核酸または異なるクラスの標的核酸を検出するための1つまたは複数の特異的なガイドRNAを有する1つまたは複数のプログラム可能ヌクレアーゼ（例えば、CRISPR酵素）を有することができる。

【0112】

特定の状況では、移動相検出スキーム（図7A）が使用される。このような状況では、再混合されたサンプルがチャンネルを介して流される。チャンネルの壁は、1つまたは複数のプログラム可能ヌクレアーゼプローブまたはCRISPRプローブが配置される1つまたは複数の領域を含むことができる。プログラム可能ヌクレアーゼプローブまたはCRISPRプローブは、本明細書の他の場所に記載されているように、プログラム可能ヌクレアーゼと複合化されたガイド核酸（例えば、ガイドRNA）を含み得る。ガイド核酸及び／またはプログラム可能ヌクレアーゼは、チャンネルの壁に対して固定化することができる。ガイド核酸及び／またはプログラム可能ヌクレアーゼは、チャンネルを流れる再混合されたサンプルにさらされ得る。レポーター化合物は、標的核酸アンプリコンと特定のガイド核酸との相補的な結合事象によって切断及び放出され得る。レポーター化合物は、図6に示されるように、増幅シグナルを生成する1つ以上のカスケード増幅反応に自由に関与することができる。増幅されたシグナルは、本明細書に記載の1つまたは複数のセンサーを使用して検出することができる。

【0113】

いくつかの実施形態では、固定相検出スキームが使用される。これらの実施形態では、リミックスされるサンプルは、1つまたは複数の標的核酸アンプリコンの配列タイプ及びそのコピーを含むことができる。図7Bは、反応チャンバの内壁の既知の位置に配置されたプログラム可能ヌクレアーゼプローブと相互作用することができる複数の標的アンプリコンの上から見た図を示す。図7Cは、プログラム可能ヌクレアーゼプローブと相互作用する標的アンプリコンを有する検出チャンバの断面側面図を示す。プログラム可能ヌクレアーゼまたはCRISPRプローブのガイドRNAは、チャンバの底面に隣接して固定化することができる。プローブと標的の間で相補的な相互作用が起こるとき、CRISPR酵素がレポーターを切断して放出し、それは次いで感知される。固定化されたプログラム可能ヌクレアーゼまたはCRISPRプローブの特定のガイドRNAを空間的に登録できるため、多重化検出を実現できる。ある場合には、1つのセンサーが1つの固定化プローブに対応する場合には、電気的検出を使用できる。光学イメージング、表面プラズモン共鳴（SPR）、及び／または干渉センシングなどの他の検出方法もまた使用できる。

【0114】

図 2、図 7 A、及び図 7 C に示され、本明細書に記載された複数のプログラム可能ヌクレアーゼプローブは、様々な構成で配置することができる。例えば、複数のプログラム可能ヌクレアーゼプローブは、横方向の構成で配置することができる。あるいは、複数のプログラム可能ヌクレアーゼプローブは、各プログラム可能ヌクレアーゼプローブが共通の中心点から等距離になるように、環状の構成にて配置することができる。ある場合には、複数のプログラム可能ヌクレアーゼプローブを、プログラム可能ヌクレアーゼプローブ間の分離距離または間隔を同じにして分布させることができる。他の場合では、第 1 のプログラム可能ヌクレアーゼプローブ及び第 2 のプログラム可能ヌクレアーゼプローブは、第 1 の分離距離または間隔によって分離することができ、第 3 のプログラム可能ヌクレアーゼプローブ及び第 4 のプログラム可能ヌクレアーゼプローブは、第 2 の分離距離または間隔によって分離することができ、これは第 1 の分離距離または間隔とは異なる。

10

【0115】

上述のように、一本鎖ディテクタ核酸は、第 1 の検出可能なシグナルを生成することができる検出部分を含むことができる。ある場合には、ディテクタ核酸は、シグナルを生成できるタンパク質を含むことがある。シグナルは、比色、電位差測定、電流測定、光学（例えば、蛍光、比色など）、または圧電シグナルであり得る。検出部分の放出による検出可能なシグナルの生成は、プログラム可能ヌクレアーゼによる切断が生じたこと、及びサンプルが標的核酸を含むことを示す。検出部分は、比色、電位差測定、電流測定、光学（例えば、蛍光、比色など）、または圧電シグナルを生成できる任意の部分であり得る。ディテクタ核酸は、時には、核酸の切断時に比色、電位差測定、電流測定、光学（例えば、蛍光、比色など）、または圧電シグナルを生成できるタンパク質-核酸である。多くの場合、比色シグナルは、ディテクタ核酸の切断後に生成される熱である。ある場合には、比色シグナルは、ディテクタ核酸の切断後に熱吸収される。例えば、電位差測定シグナルは、ディテクタ核酸の切断後に生成される電位である。電流測定シグナルは、ディテクタ核酸の切断後に生成される電子の動きであり得る。多くの場合、シグナルは、比色シグナルまたは蛍光シグナルなどの光学シグナルである。光学シグナルは、例えば、ディテクタ核酸の切断後に生成される光出力である。ある場合には、光学シグナルは、ディテクタ核酸の切断の前後の間での吸光度の変化である。多くの場合、圧電シグナルは、ディテクタ核酸の切断前後の間の質量の変化である。

20

【0116】

目的の標的核酸の存在または非存在の検出は、活性化されたプログラム可能ヌクレアーゼによるレポーターの切断後に、レポーターに存在する検出部分から放出されるシグナルを測定することを含み得る。シグナルは、デバイスに統合された、またはデバイスに動作可能に結合された 1 つまたは複数のセンサーを使用して測定できる。したがって、本明細書に開示される検出ステップは、標的核酸の存在を測定すること、存在する標的核酸の量を定量化すること、またはサンプル中に標的核酸が不在であることを示すシグナルを測定することを含み得る。いくつかの実施形態では、シグナルは、プログラム可能ヌクレアーゼによるディテクタ核酸の切断時に生成される。他の実施形態では、シグナルは、プログラム可能ヌクレアーゼによるディテクタ核酸の切断時に変化する。他の実施形態では、シグナルは、ディテクタ核酸の切断がない場合に存在し、プログラム可能ヌクレアーゼによる標的核酸の切断により消失し得る。例えば、サンプルをプログラム可能ヌクレアーゼを含む組成物と接触させた後、マイクロ流体デバイスまたはラテラルフローデバイスでシグナルを生成することができる。

30

40

【0117】

ある場合には、シグナルは比色シグナルまたは肉眼で見えるシグナルを含むことができる。ある場合には、シグナルは、蛍光、電気、化学、電気化学、または磁気である。シグナルは、比色、電位差測定、電流測定、光学（例えば、蛍光、比色など）、または圧電シグナルであり得る。ある場合には、検出可能なシグナルは比色シグナルまたは肉眼で見えるシグナルである。ある場合には、検出可能なシグナルは、蛍光、電気、化学、電気化学、または磁気である。ある場合には、第 1 の検出シグナルは、検出部分が検出領域内の捕

50

捉分子に結合することによって生成され、第1の検出シグナルは、サンプルが標的核酸を含有したことを示す。ある場合には、システムは、複数のタイプの標的核酸を検出することができ、システムは、複数のタイプのガイド核酸及び複数のタイプのディテクタ核酸を含み得る。ある場合には、検出可能なシグナルは、切断事象によって直接生成される。あるいは、または組み合わせで、検出可能なシグナルは、シグナル事象によって間接的に生成される。検出可能なシグナルが蛍光シグナルでない場合もある。ある場合には、検出可能なシグナルは比色または色ベースのシグナルである。ある場合には、検出された標的核酸は、支持媒体の検出領域におけるその空間的位置に基づいて識別される。

【0118】

ある場合には、切断後に生成される1つまたは複数の検出可能なシグナルは、屈折率の変化または1つまたは複数の電気化学的变化を生じさせ得る。ある場合には、C a s 反応のリアルタイムでの検出は、蛍光、電気化学的検出、及び／または電気化学発光を用いて達成できる。

【0119】

ある場合には、検出可能なシグナルを様々な方法で検出及び分析することができる。例えば、検出可能なシグナルは、撮像デバイスを使用して検出することができる。撮像デバイスは、モバイルデバイスのデジタルカメラなどのデジタルカメラであり得る。モバイルデバイスには、蛍光、紫外線（UV）、赤外線（IR）、または可視波長シグナルをキャプチャできるソフトウェアプログラムまたはモバイルアプリケーションを搭載できる。任意の適切な検出または測定デバイスを使用して、本明細書に記載の比色、蛍光、電流測定、電位差測定、または電気化学シグナルを検出及び／または分析することができる。いくつかの実施形態では、比色、蛍光、電流測定、電位差測定、または別の電気化学的兆候は、装置の検出チャンバに接続された測定デバイスを用いて検出され得る（例えば、蛍光測定デバイス、分光光度計、及び／またはオシロスコープ）。

【0120】

本開示の特定の態様において、多重化は、複数のプローブによる、1つのサンプルの複数の標的核酸配列の並行検出を指す。

【0121】

図7A、7B、及び7Cは、本明細書に記載のCRISPR検出デバイスの2つの多重化実施形態を示す。図7A、7B、及び7Cは、CRISPR検出デバイスの2つの多重化実施形態を示す。図7Aは、毛細管のフローまたは移動サンプル相の実施形態を示し、図7B及び7Cは、固定サンプル相の実施形態を示す。図7Aは、特定の実施形態において、毛細管回路の形態である反応チャンバを示す。機能化されたプログラム可能ヌクレアーゼプローブ、例えばCRISPRプローブを毛細管壁に配置することができ、プログラム可能ヌクレアーゼプローブ、例えばCRISPRプローブに関連付けられた1つまたは複数のガイド核酸を、結合のためにサンプルにさらすことができる。相補的な標的核酸アンプリコン（または標的核酸配列）に結合すると、プログラム可能ヌクレアーゼプローブまたはCRISPRプローブは、その後特定の標的核酸アンプリコンの存在を示すシグナルを生成するレポーターの少なくとも一部を切断及び放出する。この識別プロセスは、複数のプログラム可能ヌクレアーゼプローブまたはCRISPRプローブにわたって並行して繰り返され、各プログラム可能ヌクレアーゼまたはCRISPRプローブは、特定の標的配列、核酸アンプリコン、標的配列のセット、または標的核酸アンプリコンのセットを検出するように構成されている。特定の態様では、図7B及び7Cに見られるように、固定相またはマイクロアレイ形式で多重化検出を達成することもできる。いくつかの実施形態では、特定の標的核酸配列を検出するようにそれぞれ設計されたプログラム可能ヌクレアーゼプローブまたはCRISPRプローブが、既知の位置に固定化される。複数のタイプの標的アンプリコンを含む再混合されたサンプルがプログラム可能ヌクレアーゼまたはCRISPRプローブのアレイにさらされると、特定のプローブと標的のペアが結合し、シグナル事象をトリガーする。これらのシグナル事象は、特定の標的核酸アンプリコンまたは標的核酸アンプリコンのセットと、イメージングが使用されるときはその位置によ

10

20

30

40

50

て、またはセンサーが各プローブに個別にリンクされているときは特定のセンサーによって受信されるシグナルによって関連付けることができる。ある場合には、プログラム可能ヌクレアーゼプローブによって、1つまたは複数の標的核酸アンプリコンを検出することができる。ある場合には、プログラム可能ヌクレアーゼプローブは配列のクラスまたは標的核酸アンプリコンのクラスと相互作用及び／またはそれを検出することができ、サンプル内に存在する特定の生物、疾患状態、または表現型の存在または存在を示すことができる。

【0122】

本開示のデバイスを使用して、サンプル内の1つまたは複数の標的核酸の検出を実施することができる。本開示のデバイスは、サンプルの調製、プログラム可能ヌクレアーゼとの混合、サンプル内の標的核酸の任意の増幅、及びプログラム可能ヌクレアーゼによるディテクタ核酸の切断から生じる検出可能なシグナルの検出のために、1つまたは複数のポンプ、弁、リザーバー、及びチャンバを含むことができる。

10

【0123】

本開示と一致する方法には、サンプル中の複数の標的核酸についてアッセイする多重化法が含まれる。多重化法は、標的核酸のセグメントに逆相補的であるセグメントを含むガイド核酸と、標的核酸のセグメントに結合するガイド核酸のセグメントを含む複合体を形成する際に配列非依存性切断を示すプログラム可能ヌクレアーゼとを含む複合体にサンプルを接触させること、及びレポーター分子（例えば、タンパク質-核酸）の集団の少なくともいくつかのレポーター（例えば、タンパク質-核酸）の切断を示すシグナルをアッセイすることを含み得、シグナルはサンプル中の標的核酸の存在を示し、シグナルの不在は、サンプル中に標的核酸が存在しないことを示す。

20

【0124】

多重化は、複数の異なる標的核酸が同時に検出される空間的多重化を含むことができるが、反応は空間的に分離される。ある場合には、複数の標的核酸が、同じプログラム可能ヌクレアーゼを使用して検出されるが、ガイド核酸は異なる。複数の標的核酸は、異なるプログラム可能ヌクレアーゼを使用して検出される場合がある。異なるプログラム可能ヌクレアーゼを使用して複数の標的核酸が検出される場合、この方法は、第1のプログラム可能ヌクレアーゼの使用を含み、それは、活性化されると（例えば、第1のガイド核酸が第1の標的に結合した後）、第1のレポーターの核酸を切断し、第2のプログラム可能ヌクレアーゼを使用し、そのことは、活性化されると（例えば、第2のガイド核酸が第2の標的に結合した後）、第2のレポーターの核酸を切断する。

30

【0125】

ある場合には、多重化は、複数の異なる標的酸が単一の反応体積で検出される単一反応の多重化であり得る。多くの場合、少なくとも2つの異なるプログラム可能ヌクレアーゼが単一の反応多重化で使用される。例えば、多重化は、流体システム内で複数のカテゴリーのディテクタ核酸を固定化することによって可能になり、単一の流体システム内で複数の標的核酸の検出を可能にすることができる。多重化により、1つのキットまたはシステムで複数の標的核酸を検出できる。ある場合には、複数の標的核酸は、1つの疾患の原因となるウイルス、細菌、または病原体に対する異なる標的核酸を含む。ある場合には、複数の標的核酸は、がんまたは遺伝性障害に関連する異なる標的核酸を含む。1つの疾患、がん、または遺伝性障害の多重化は、サンプル中の疾患の存在を検出するアッセイの感度、特異度、または精度の少なくとも1つを増加させる。ある場合には、複数の標的核酸は、複数の疾患の原因となる異なるウイルス、細菌、または病原体を対象とする標的核酸を含む。ある場合には、多重化により、細菌または病原体の野生型遺伝子型と、抗生物質での治療などの治療に対する耐性を付与できる一塩基多型（SNP）などの突然変異を含む細菌または病原体の遺伝子型といった、疾患の原因となる同じ細菌または病原体の異なる遺伝子型を含む標的核酸などの、複数の標的核酸間の識別が、可能になる。したがって、多重化により、複数のゲノム対立遺伝子の多重化検出が可能になる。例えば、多重化は、第1のプログラム可能ヌクレアーゼを使用する微生物種、及び第2のプログラム可能ヌク

40

50

レアーゼを使用する微生物における抗生物質耐性パターンについての単一アッセイを含むアッセイ方法を含み得る。ある場合には、多重化により、HPV16とHPV18など、異なるHPV株の複数の標的核酸間の識別が可能になる。ある場合には、複数の標的核酸は、異なるがんまたは遺伝性障害を対象とする標的核酸を含む。多くの場合、多重化は、異なる遺伝子型、例えば野生型遺伝子型及びSNP遺伝子型を含む標的核酸などの複数の標的核酸間の識別を可能にする。複数の疾患、がん、または遺伝性障害のための多重化により、単一のサンプルから疾患のパネルをテストする機能がもたらされる。例えば、複数の疾患のための多重化は、新しい患者の幅広いパネルテストや疫学的調査で価値がある場合がある。多くの場合、多重化は、敗血症または複数の病原体に関連する他の疾患における細菌性病原体を特定するために使用される。

10

【0126】

さらに、多重化からのシグナルを定量化することができる。例えば、疾患パネルの定量化の方法は、サンプルからの複数のアリコート中の複数の固有の標的核酸についてアッセイすること、サンプルの第2のアリコート中の対照核酸対照についてアッセイすること、及び第2のアリコートで生成されたシグナルと比較して、ディテクタ核酸の切断によって生成されたシグナルを測定することによって、複数の固有の標的核酸のシグナルを定量化することを含み得る。この文脈において、固有の標的核酸は、複数の他の核酸の配列と少なくとも1つのヌクレオチドの相違を有する核酸の配列を指す。各標的核酸の複数のコピーが存在し得る。例えば、固有の標的核酸集団は、固有の標的核酸の複数のコピーを含むことができる。多くの場合、複数の固有の標的核酸は、サンプル中の複数の細菌性病原体に由来する。

20

【0127】

ある場合には、多重化デバイス、システム、流体デバイス、キット、及び方法は、単一の反応で少なくとも2つの異なる標的核酸を検出する。ある場合には、多重化デバイス、システム、流体デバイス、キット、及び方法は、単一の反応で少なくとも3つの異なる標的核酸を検出する。ある場合には、多重化デバイス、システム、流体デバイス、キット、及び方法は、単一の反応で少なくとも4つの異なる標的核酸を検出する。ある場合には、多重化デバイス、システム、流体デバイス、キット、及び方法は、単一の反応で少なくとも5つの異なる標的核酸を検出する。ある場合には、多重化デバイス、システム、流体デバイス、キット、及び方法は、単一の反応で少なくとも6、7、8、9、または10の異なる標的核酸を検出する。ある場合には、多重化キットは、単一のキットで少なくとも2つの異なる標的核酸を検出する。ある場合には、多重化キットは、単一のキットで少なくとも3つの異なる標的核酸を検出する。ある場合には、多重化キットは、単一のキットで少なくとも4つの異なる標的核酸を検出する。ある場合には、多重化キットは、単一のキットで少なくとも5つの異なる標的核酸を検出する。ある場合には、多重化キットは、単一のキットで少なくとも6、7、8、9、または10の異なる標的核酸を検出する。ある場合には、多重化キットは、2から10、3から10、4から10、5から10、6から10、7から10、8から10、9から10、2から9、3から9、4から9、5から9、6から9、7から9、8から9、2から8、3から8、4から8、5から8、6から8、7から8、2から7、3から7、4から7、5から7、6から7、2から6、3から6、4から6、5から6、2から5、3から5、4から5、2から4、3から4、または2から3の異なる標的核酸を単一のキット内において検出する。多重化は、シングルポットまたは「ワンポット」反応で行うことができ、逆転写、増幅、インビトロ転写、またはそれらの任意の組み合わせ、及び検出が単一容量で行われる。多重化は、逆転写、増幅、インビトロ転写、またはそれらの任意の組み合わせが第1の体積で実施され、検出が第2の体積で実施される「ツーポット反応」で実施することができる。

30

40

【0128】

ある場合には、多重化は、単一のプローブで複数の標的を検出することを含み得る。あるいは、多重化は、複数のプローブで複数の標的を検出することを含み得る。複数のプローブは、特定の配列、標的核酸、または複数の異なる標的配列もしくは核酸の存在を検出

50

するように構成することができる。

【0129】

本開示のデバイスは、様々な異なる材料から製造することができる。使用可能な例示的な材料には、ポリメタクリレート（PMMA）、環状オレフィンポリマー（COP）、環状オレフィンコポリマー（COC）、ポリエチレン（PE）、高密度ポリエチレン（HDPE）、ポリプロピレン（PP）、ガラス、及びシリコンなどのプラスチックポリマーが含まれる。デバイスの特徴（例えば、チャンバ、チャンネルなど）は、様々なプロセスによって製造することができる。例えば、特徴は、（１）射出成形を使用してエンボス加工する、（２）コンピュータ数値制御（CNC）マイクロマシニングまたは非接触レーザー穴あけ（CO₂レーザー光源による）を使用してマイクロミリングまたはマイクロ彫刻する、（３）付加製造を使用して生成された、及び／または（４）１つまたは複数のフォトリソグラフィまたはステレオリソグラフィ法を使用して生成することができる。

10

【0130】

いくつかの実施形態では、本開示のデバイスのいずれも、少なくとも１つの目的の遺伝子を含み得るサンプルを受け取るように構成されたサンプル境界面を含み得る。デバイスは、サンプル境界面及び検出チャンバと流体連通するチャンネルをさらに含むことができる。ある場合には、チャンネルは、サンプルを複数の液滴に分離するための１つまたは複数の可動機構を含んでいてもよい。本明細書で使用されるように、液滴は、サンプルの体積測定的部分、サンプルの分割されたサブサンプル、及び／またはサンプルのアリコートを示し得る。ある場合には、検出チャンバは、複数の液滴を受け取り、当該検出チャンバの表面に配置された少なくとも１つのプログラム可能ヌクレアーゼプローブと接触するように構成される。少なくとも１つのプログラム可能ヌクレアーゼプローブは、プログラム可能ヌクレアーゼと複合化されたガイド核酸を含むことができる。ある場合には、プログラム可能ヌクレアーゼプローブは、CRISPR/Cas酵素を含み得る。ある場合には、ガイド核酸はガイドRNAを含み得る。いくつかの実施形態では、デバイスは、異なるガイドRNAを含む複数のプログラム可能ヌクレアーゼプローブを含み得る。

20

【0131】

デバイスは、当該少なくとも１つのプログラム可能ヌクレアーゼプローブによる当該少なくとも１つの目的の遺伝子中の標的核酸領域の切断時に生成されるシグナルを検出することによって、当該少なくとも１つの目的の遺伝子の存在を決定する複数のセンサーをさらに含むことができる。標的核酸領域の切断は、当該少なくとも１つのプログラム可能ヌクレアーゼプローブの当該ガイド核酸への当該標的核酸領域の相補的結合の後に起こり得る。

30

【0132】

本明細書の他の箇所で説明されるように、１つまたは複数の可動機構は、チャンネルの１つまたは複数のセクションを通る流れを制限するように構成された１つまたは複数の弁を含むことができる。１つまたは複数の可動機構は、チャンネルの１つまたは複数のセクションを通る流れを制限するように構成されたプランジャまたはブリストルを含むことができる。１つまたは複数の可動機構は、デバイスと一体化されるかまたは挿入可能な電源に動作可能に結合することができる。電源は電池を含むことができる。

40

【0133】

ある場合には、本明細書に記載のデバイスのいずれも、１つ以上の標的（例えば、目的の遺伝子）を含まないサンプルから１つ以上の粒子を濾過するための物理的フィルタを含み得る。ある場合には、デバイスはサンプル調製チャンバを含み得る。サンプル調製チャンバは溶解剤を含むことができる。サンプル調製チャンバは、熱不活性化のために構成された加熱ユニットを含むことができる。サンプル調製チャンバは、核酸精製のための１つまたは複数の試薬を含むことができる。

【0134】

ある場合には、サンプル境界面と検出チャンバとの間のチャンネルは、少なくとも１つの目的の遺伝子またはその一部を増幅するための複数の加熱要素及び複数のヒートシンクを

50

含み得る。複数の加熱要素及び複数のヒートシンクは、サンプルまたはサンプルの少なくとも一部（例えば、複数の液滴）に対して1つまたは複数のサーモサイクリング操作を実行するように構成することができる。

【0135】

本明細書の他の箇所に記載されているように、標的核酸の切断により生成されるシグナルは、物理的、化学的、または電気化学的变化または反応に関連し得る。シグナルは、光学シグナル、蛍光シグナルまたは比色シグナル、電位差測定シグナルまたは電流測定シグナル、及び／または圧電シグナルを含むことができる。ある場合には、シグナルは、少なくとも1つのプログラム可能ヌクレアーゼプローブが配置される固体またはゲルの体積の屈折率の変化に関連する。

【0136】

いくつかの実施形態では、デバイスは、目的の1つまたは複数のゲノム標的を含み得るサンプルを受け取るように構成されたサンプル境界面を含み得る。ある場合には、目的の1つまたは複数のゲノム標的は、核酸を含む核酸の配列を含む。

【0137】

デバイスは、サンプルを分割されたサンプルに分離するための1つまたは複数の可動機構を含む1つまたは複数のチャンネルをさらに含むことができる。1つまたは複数のチャンネルは、サンプル境界面、及び分配されたサンプルを受容し、酵素、試薬、または当該1つまたは複数の目的のゲノム標的核酸を切断するように構成されたプログラム可能な検出剤を分割されたサンプルと接触させるように構成された反応チャンバと流体連通することができる。

【0138】

デバイスは、当該核酸の当該切断によって放出される1つまたは複数のレポーターを検出することによって、1つまたは複数の目的のゲノム標的の存在を判定するための複数のセンサーをさらに含むことができる。プログラム可能な検出剤は、CRISPR/Cas酵素であり得る。ある場合には、レポーターは、核酸及び検出部分を含み得る。ある場合には、レポーターは、少なくとも1つのリボヌクレオチドまたは少なくとも1つのデオキシリボヌクレオチドを含み得る。ある場合には、レポーターは、DNA核酸またはRNA核酸を含み得る。レポートされた分子は、検出チャンバの表面に固定することができる（すなわち、レポーターの動きを物理的または化学的に拘束することができる）。

【0139】

ある場合には、1つまたは複数の可動機構は、1つまたは複数のチャンネルを通してサンプル境界面に向かう第1の方向の流れを制限するように構成された複数の弁を含む。ある場合には、複数の弁は、1つまたは複数のチャンネルを通して反応チャンバに向かう第2の方向の流れを選択的に可能にするように構成することができる。複数の弁のうちの第1の弁及び第2の弁は、第1の弁及び第2の弁が真空の状態にあるときに、サンプルの第2の部分からサンプルの第1の部分を物理的、流体的、または熱的に分離するように構成され得る。

【0140】

1つまたは複数のチャンネルは、複数の加熱要素及び複数のヒートシンクを含み、分割されたサンプルに対してサーモサイクリングを実行することができる。複数の加熱要素の第1の加熱要素及び複数のヒートシンクの第1のヒートシンクは、1つまたは複数の可動機構の第1の可動機構と第2の可動機構との間に配置され得る。

【0141】

本明細書に記載の実施形態のいずれにおいても、デバイスは、デバイスから離れたコンピューティングユニットに1つまたは複数の検出結果を伝えるように構成された遠隔医療ユニットをさらに含むことができる。いくつかの実施形態では、遠隔医療ユニットは、クラウドベースの接続を介してデバイスから離れたコンピューティングユニットに1つまたは複数の検出結果を伝える。いくつかの実施形態では、遠隔医療ユニットはHIPAA準拠である。いくつかの実施形態では、遠隔医療ユニットは、暗号化されたデータを送信す

10

20

30

40

50

る。コンピューティングユニットは、モバイルデバイスまたはコンピュータを含むことができる。1つまたは複数の検出結果は、サンプル中の目的の標的核酸の存在または非存在を示し得る。

【0142】

別の態様において、本開示は、標的検出のための方法を提供する。方法は、サンプルを先行請求項のいずれかに記載のデバイスと接触させ、当該サンプル中の1つまたは複数の目的の遺伝子の存在または非存在を検出する段階を含むことができる。ある場合には、方法は、サンプル中の1つまたは複数の目的の遺伝子の存在または非存在を示す1つまたは複数の検出結果を生成する段階を含むことができる。ある場合には、方法は、1つまたは複数の検出結果をリモートコンピューティングユニットに送信する段階を含むことができる。リモートコンピューティングユニットは、例えば、モバイルデバイスを含むことができる。

10

【0143】

別の態様において、本開示は、標的検出のための方法を提供する。方法は、少なくとも1つの目的の遺伝子を含むサンプルを提供する段階を含むことができる。方法は、本明細書に記載の1つまたは複数の可動機構を使用してサンプルを複数のサブサンプルに分離する段階を含むことができる。方法は、検出チャンバ内に複数のサブサンプルを受け取り、複数のサブサンプルを当該検出チャンバの表面に配置された少なくとも1つのプログラム可能ヌクレアーゼプローブと接触させる段階を含むことができる。少なくとも1つのプログラム可能ヌクレアーゼプローブは、プログラム可能ヌクレアーゼと複合化したガイド核酸を含むことができる。ある場合には、方法は、複数のサブサンプルを、異なるガイドRNAを含む複数のプログラム可能ヌクレアーゼプローブと接触させる段階を含み得る。方法は、当該少なくとも1つのプログラム可能ヌクレアーゼプローブによる当該少なくとも1つの目的の遺伝子中の標的核酸領域の切断時に生成されるシグナルを検出することによって、当該少なくとも1つの目的の遺伝子の存在または非存在を判定する複数のセンサーをさらに含むことができる。

20

【0144】

ある場合には、方法は、サンプルを複数のサブサンプルに分離した後に、少なくとも1つの目的の遺伝子を増幅する段階をさらに含むことができる。ある場合には、方法は、検出チャンバ内で複数のサブサンプルを混合する前に、少なくとも1つの目的の遺伝子を増幅する段階をさらに含むことができる。少なくとも1つの目的の遺伝子を増幅する段階は、複数の加熱要素及び複数のヒートシンクを使用して、複数のサブサンプルに対してサーモサイクリングを実行する段階を含み得る。

30

【0145】

ある場合には、方法は、1つまたは複数の目的の標的遺伝子を含まない1つまたは複数の粒子をサンプルから濾過するために、物理的フィルタを使用する段階を含むことができる。ある場合には、方法は、1つまたは複数の目的の標的遺伝子を検出する前に、サンプルを溶解する段階を含むことができる。ある場合には、方法は、サンプルに対して熱不活性化を行う段階を含むことができる。ある場合には、方法は、サンプルに対して核酸の精製を行う段階を含むことができる。

40

【0146】

ある場合には、本明細書に記載の検出デバイスは、プロセス制御手順を実行して、サンプル調製、標的増幅、及び標的検出プロセスが正確かつ意図したとおりに実行されることを保証するように構成することができる。

【0147】

使い捨て流体ワークフロー

本明細書に記載されるのは、ポイントオブニード（PON）プログラム可能ヌクレアーゼベースのデバイスのための様々な実施形態である。いくつかの実施形態では、PONデバイスは、図8に示されるように5重呼吸パネル用に構成される。図8は、ウイルス検出のための別個の領域にプールされたCRISPR-Cas複合体を含むPON5重パネル

50

の例示的なアッセイの設計を示す。個別の領域は、(1) SARS-CoV-2、(2) Flu A、(3) Flu B、(4) Pan-CoV、及び(5) 内因性ヒト制御の検出用である。(1) SARS-CoV-2 領域は、N 遺伝子標的及び E 遺伝子標的を検出するための gRNA を含むことができ、(2) Flu A 領域は、H1N1 標的、H3N2 標的、及び H1N1 pdm2009 標的を検出するための gRNA を含むことができ、(3) Flu B 領域は、Yamagata 標的及び Victoria 標的を検出するための gRNA を含むことができ、(4) Pan-CoV 領域は、HCoV-OC43 標的、HCoV-NL63 標的、HCoV-229E 標的、及び HCoV-HKU1 標的を検出するための gRNA を含むことができ、(5) 内因性ヒト制御領域は、ヒト rpp30 標的に対する gRNA を含み得る。各領域は、プールされた gRNA を含むことができる。例えば、Flu A 領域の gRNA は、マトリックスタンパク質 1 (MP)、非構造タンパク質 1 (NS)、ノイラミニダーゼ (NA)、核タンパク質 (NP)、ヘマグルチニン (HA)、PB1、ポリメラーゼ酸性タンパク質 (PA)、及びポリメラーゼ塩基性タンパク質 2 (PB2) など、H1N1、H3N2、及び H1N1 pdm2009 の間で 98% 保存されている標的部位に結合する。各領域から検出されたシグナルは、その領域内の標的の検出を示すことができる。いくつかの実施形態では、PON プログラム可能ヌクレアーゼベースのデバイスは、図 9 に示されるように使い捨てである。

10

【0148】

本明細書に記載されているのは、患者が必要とする場所で病気の原因を迅速に特定できる様々なポイントオブニード (PON) 診断である。いくつかの実施形態では、使い捨て PON デバイスを製造し、無菌状態でユーザーに送達して、この必要性を満たすのを助けることができる。しかし、いくつかの実施形態では、アッセイを実験室からポイントオブニードデバイスに移すことは困難な場合がある。いくつかの実施形態では、依然使い捨てでありながら、迅速で信頼性が高く、解釈が容易な結果を提供できる流体システムを統合することは、特に困難である。

20

【0149】

本明細書では、使い捨て流体ワークフローのための方法、デバイス、及び組成物の様々な実施形態が開示される。いくつかの実施形態では、ワークフロー方法は、(1) 患者からのサンプル収集及びデバイスへの送達、(2) 溶解、(3) 増幅、及び(4) 検出／読出しを含むことができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の使い捨て流体デバイスのいずれも、外部ハウジングと、サブコンポーネントを取り付けるための内部制御プリント回路基板 (PCB) とを含むことができる。いくつかの実施形態では、そのようなサブコンポーネントは、患者からサンプルを収集するためのスワブ、スワブからサンプルを抽出するための機構 (例えばスクレーパー)、デバイス内でサンプルを移動させるように構成された流体工学、1 つまたは複数のサンプルチャンバ、1 つまたは複数の試薬保管バッグまたはチャンバ、増幅メカニズム、ディテクタ、弁、及び加熱要素を含み得る。本明細書に記載のいくつかの実施形態では、弁は、1 つのチャンバまたはチャンネルとの間でサンプルを複数の他のチャンバまたはチャンネルに迂回させることができる回転弁であり得る。

30

【0150】

図 10A は、消耗品の外装ハウジングの例を示す。図 10B は、プリント回路基板 (PCB) 1007 上に取り付けられ、図 10A の消耗デバイスハウジング内に収容されたコンポーネントの例を示す。いくつかの実施形態では、スワブキャップ 1001 は、ユーザーがデバイスを作動させることを可能にするように構成され得る (例えば、回転される、押し下げられるなど)。いくつかの実施形態では、試薬保管バッグ (またはチャンバなど) 1002 は、PCB 1007 上に垂直に取り付けられ得る。いくつかの実施形態では、図 11D に見られる弁を駆動するためのモーター 1003 が、PCB 1007 上に統合され得る。いくつかの実施形態では、サンプルまたはその一部の加熱を容易にするために、ヒートトレース 1004 を PCB 1007 上に統合することができる。いくつかの実施形態では、レポーター (例えば、1 つまたは複数の蛍光標識) を励起するための発光ダイオ

40

50

ード（LED）1005をPCB上に組み込むことができる。いくつかの実施形態では、スワブキャップ1006を押すことによって開始ボタンを作動させることができる。図10Cは、スワブ1008からのサンプルの除去を容易にするように構成されたスクレーパを含む例示的なスワブハウジングを示す。いくつかの実施形態では、サンプル境界面はスクレーパを含んでもよい。図9は、スワブが内部使い捨て器具に挿入されたときに、サンプルを担持するスワブを攪拌するスクレーパを含むデバイスの実施形態を示す。図10Cは、スクレーパ（1008）を含むデバイスの別の実施形態を示す。当業者は、スクレーパが、インプットサンプルを攪拌するその機能を保持しながら、様々な形態、形状、及びサイズを含み得ることを認識するであろう。いくつかの実施形態では、スクレーパは、スワブからデバイスへのサンプルの移送を容易にする。

10

【0151】

図11A、11B、11C、11Dは、本明細書に記載の消耗品の様々な例示的構成要素をさらに示す。図11Aは、放出検出用のフォトダイオード1101、拡張チャンババッグ1102、エンコーダPCB1103、及びシリンジポンプの例を示しており、PCBの上の層に配置することができる。いくつかの実施形態では、シリンジポンプは、モーター1004によって駆動され得る。他の実施形態では、シリンジポンプは、大量生産のために形状記憶合金（SMA）（例えば、圧縮ばね）によって駆動される。図11Bは、例示的な拡張バッグ1102を示す。図11Cは、拡張バッグ1102の例示的な射出成形バッグコアを示し、フィルタ（図示せず）をその近位端1105上でヒートシールすることができる。いくつかの実施形態では、製造中に拡張バッグ（1102）をデバイスに結合するのを容易にするために、射出成形されたバッグコア1106の遠位端にリングシールを形成することができる。他の実施形態では、オーバーモールド構成要素1106、またはTPEなどの軟質ポリマーを、大量生産のために射出成形されたバッグコアと一体化することができる。図11Dは、本明細書に記載のデバイス内の流体の流れを調節するように構成された回転弁オーバーモールドの実施形態を示す。

20

【0152】

図12は、次のようなワークフローの方法の間に使用される消耗品デバイスの様々な弁の位置の例を示す。溶解を抽出する（1201）、サンプルを抽出するために溶解スワブを移す（1202）、溶解を加熱ゾーン（Z1）に移動する（1203）、結合のために溶解をビーズに移動する（1204）、溶解を廃棄する（1205）、溶出を抽出する（1206）、溶出をビーズに移動する（1207）、溶出をMMに移動する（1208）、PCRサイクリングに移動する（1209）、希釈に移動する（1210）、DETECTOR（1211）に移動する、というものである。図12は、95℃での溶解の加熱（Z1）、95℃でのPCRサイクリング（Z2）、65℃でのPCRサイクル（Z3）、及び37℃でのDETECTOR加熱（Z4）のための加熱ゾーン（Z）を含む消耗品の実施形態をさらに示す。いくつかの実施形態では、サンプルは、1つのチャンバまたはチャネル内の複数の加熱ゾーンにさらされてもよく、これにより、一定のサンプル流体の流れが可能になる。

30

【0153】

電気化学DETECTOR反応

本開示は、迅速な試験のための様々なデバイス、システム、流体デバイス、及びキットを提供し、これは、流体システムの官能化表面と相互作用して検出可能なシグナルを生成できるプログラム可能ヌクレアーゼを使用して、サンプルに標的核酸が存在するかどうかを素早く評価することができる。例えば、本明細書に開示されるのは、標的核酸の存在を検出するための非常に効率的で、迅速で、正確な反応（例えば、DETECTOR反応）を実行するのに特によく適している当該デバイスにおける使用のための特定のマイクロ流体デバイス、ラテラルフローデバイス、サンプル調製デバイス、及び組成物（例えば、プログラム可能ヌクレアーゼ、ガイドRNA、インビトロ転写、増幅、逆転写、及びレポーターのための試薬、またはそれらの任意の組み合わせ）である。本明細書に開示されるシステム及びプログラム可能ヌクレアーゼは、本明細書に開示される任意の疾患（例えば、R

40

50

S V、敗血症、インフルエンザ、C O V I D - 1 9) のコンパニオン診断として使用することができ、または試薬キット、ポイントオブケア診断、または店頭診断で使用できる。システムは、ポイントオブケア診断として、または標的核酸の検出のための実験室試験として使用することができ、それによって、例えば、サンプルが採取された対象における状態を検出することができる。システムは、研究所、病院、診療室／医師の研究室（P O L）、診療所、遠隔地、または自宅などで、様々な場所や場所で使用できる。ある場合には、本開示は、消費者の遺伝子の使用または処方箋不要（o v e r - t h e - c o u n t e r）の使用のための様々なデバイス、システム、流体デバイス、及びキットを提供する。

【0154】

ガイド核酸

ガイド核酸は、本明細書に記載のデバイス（例えば、空気圧弁デバイス、スライディング弁デバイス、回転弁デバイス、及びラテラルフローデバイス）での使用に適合し、本明細書に開示の組成物（例えば、プログラム可能ヌクレアーゼ、インビトロ転写用の試薬、増幅用試薬、逆転写用試薬、及びレポーター、またはそれらの任意の組み合わせ）と共に使用して、標的核酸がサンプル中に存在するかどうかを検出するための非常に効率的、迅速、かつ正確な反応（例えば、D E T E C T R 反応）を実行する。ガイド核酸は、ウイルスまたは細菌または本明細書に記載の疾患の原因となる他の因子由来の核酸の一部を含む一本鎖標的核酸に結合する。ガイド核酸は、細菌または本明細書に記載の疾患の原因となる他の作用物質由来の核酸の一部を含み、一塩基多型（S N P）などの変異をさらに含む一本鎖標的核酸に結合することができ、それは、抗生物質治療などの治療に対する耐性を与えることができる。ガイド核酸は、本明細書に記載のがん遺伝子または遺伝性障害に関連する遺伝子由来の核酸の一部を含む一本鎖標的核酸に結合する。ガイド核酸は、標的核酸に相補的である。多くの場合、ガイド核酸は標的核酸に特異的に結合する。標的核酸は、RNA、DNA、または合成の核酸であってよい。ガイド核酸は、標的核酸の配列に逆相補的な配列を含むことができる。ガイド核酸はc r RNAであってもよい。時々、ガイド核酸は、c r RNA及びt r a c r RNAを含み得る。ガイド核酸は標的核酸に特異的に結合できる。ある場合には、ガイド核酸は天然に存在せず、別の方法で配列の別々のセグメントを人為的に組み合わせることによって作られる。多くの場合、人工的な組み合わせは、化学合成、遺伝子工学技術、または核酸の分離セグメントの人為的操作によって行われる。標的核酸は、所望の機能を提供するように設計及び作成することができる。ある場合には、ガイド核酸の標的領域は長さが20ヌクレオチドである。ガイド核酸の標的領域の長さは、少なくとも10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30ヌクレオチドの長さ有することができる。ある場合には、ガイド核酸の標的領域は、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30ヌクレオチドの長さである。ある場合には、ガイド核酸の標的領域は、正確にまたは約12ヌクレオチド（n t）から約80 n t、約12 n tから約50 n t、約12 n tから約45 n t、約12 n tから約40 n t、約12 n tから約35 n t、約12 n tから約30 n t、約12 n tから約25 n t、約12 n tから約20 n t、約12 n tから約19 n t、約19 n tから約20 n t、約19 n tから約25 n t、約19 n tから約30 n t、約19 n tから約35 n t、約19 n tから約40 n t、約19 n tから約45 n t、約19 n tから約50 n t、約19 n tから約60 n t、約20 n tから約25 n t、約20 n tから約30 n t、約20 n tから約35 n t、約20 n tから約40 n t、約20 n tから約45 n t、約20 n tから約50 n t、または約20 n tから約60 n tの長さを有する。ある場合には、ガイド核酸の標的領域は、約10 n tから約60 n t、約20 n tから約50 n t、または約30 n tから約40 n tの長さを有する。ある場合には、ガイド核酸の標的領域は、15 n tから55 n t、25 n tから55 n t、35 n tから55 n t、45 n tから55 n t、15 n tから45 n t、25 n tから45 n t、35 n tから45 n t、15 n tから35 n t、25 n tから35 n t、または15 n tから25 n tの長さを有する。ポリヌクレオ

10

20

30

40

50

チドは、特異的にハイブリダイズ可能またはハイブリダイズ可能または特異的に結合するためにその標的核酸配列に対して100%相補的である必要はないことが理解される。ガイド核酸は、標的核酸の修飾可変領域に逆相補的である核酸残基5から20までの領域に少なくとも1つのウラシルを含む配列を有することができる。ある場合には、ガイド核酸は、標的核酸の修飾可変領域に逆相補的である核酸残基5から9、10から14、または15から20の領域に少なくとも1つのウラシルを含む配列を有することができる。ガイド核酸は、標的核酸のメチル化可変領域に逆相補的である核酸残基5から20までの領域に少なくとも1つのウラシルを含む配列を有することができる。ある場合には、ガイド核酸は、標的核酸のメチル化可変領域に逆相補的である核酸残基5から9、10から14、または15から20の領域に少なくとも1つのウラシルを含む配列を有することができる。

10

【0155】

ガイド核酸は、目的の感染株またはゲノム遺伝子座の核酸に対してタイル化されたガイド核酸の群から選択することができる。ガイド核酸は、HPV16またはHPV18の株の核酸に対してタイル化されたガイド核酸の群から選択することができる。多くの場合、目的の感染株またはゲノム遺伝子座の核酸に対してタイル化されたガイド核酸は、本明細書に記載の方法で使用するためにプールすることができる。多くの場合、これらのガイド核酸は、単一のアッセイで標的核酸を検出するためにプールされる。単一の標的核酸に対してタイル化されたガイド核酸のプールは、本明細書に記載の方法を使用して標的核酸の検出を増強することができる。単一の標的核酸に対してタイル化されたガイド核酸のプールは、本明細書に記載の方法を使用して、単一の反応内で広い範囲の標的核酸を確実にすることができる。タイル化は、例えば、標的核酸に沿って連続的である。ある場合には、タイル化が標的核酸に沿って重なっていることがある。ある場合には、タイル化は、標的核酸に沿ってタイル化されたガイド核酸間にギャップを含み得る。ある場合には、ガイド核酸のタイル化は非連続的である。多くの場合、標的核酸を検出する方法は、標的核酸をガイド核酸のプール及びプログラム可能ヌクレアーゼに接触させることであって、ガイド核酸のプールのガイド核酸は、標的核酸の配列に逆相補的であるタイル化されたガイド核酸の群から選択される配列を有する、接触させること、及びディテクタ核酸の集団の少なくともいくつかのディテクタ核酸の切断によって生成されるシグナルについてアッセイすること、を含み得る。ガイド核酸をプールすることで、1回の反応の中で標的種を広範囲に同定する、または広範囲にカバーすることが確実にできる。これは、複数の生物によって引き起こされる可能性のある敗血症などの疾患や兆候に特に役立ち得る。

20

30

【0156】

レポーター

本明細書に記載の、交換可能にレポーター、またはディテクタ核酸と呼ぶことができるレポーターは、本明細書に記載のデバイス（例えば、空気圧弁デバイス、スライディング弁デバイス、回転弁デバイス、及びラテラルフローデバイス）での使用に適合し、本明細書に開示の組成物（例えば、プログラム可能ヌクレアーゼ、ガイド核酸、インビトロ転写用の試薬、増幅用試薬、逆転写用試薬、レポーター、またはそれらの任意の組み合わせ）と共に使用して、標的核酸がサンプル中に存在するかどうかを検出するための非常に効率的、迅速、かつ正確な反応（例えば、DETECTR反応）を実行する。本明細書に記載されるのは、検出部分を含む一本鎖ディテクタ核酸を含むレポーターであり、レポーターは、活性化されたプログラム可能ヌクレアーゼによって切断され、それによって、第1の検出可能なシグナルを生成することができる。本明細書で使用されるディテクタ核酸は、レポーターまたはレポーターと交換可能に使用される。ある場合には、ディテクタ核酸は、デオキシリボヌクレオチドを含む一本鎖核酸である。別の場合には、ディテクタ核酸は、リボヌクレオチドを含む一本鎖核酸である。ディテクタ核酸は、少なくとも1つのデオキシリボヌクレオチド及び少なくとも1つのリボヌクレオチドを含む一本鎖核酸であり得る。ある場合には、ディテクタ核酸は、切断部位として機能する内部位置に少なくとも1つのリボヌクレオチド残基を含む一本鎖核酸である。ある場合には、ディテクタ核酸は、

40

50

内部位置に少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のリボヌクレオチド残基を含み得る。ある場合には、ディテクタ核酸は、内部位置に2から10個、3から9個、4から8個、または5から7個のリボヌクレオチド残基を含み得る。ある場合には、ディテクタ核酸は、内部位置に3から10、4から10、5から10、6から10、7から10、8から10、9から10、2から8、3から8、5から8、6から8、7から8、2から5、3から5、または4から5のリボヌクレオチド残基を含み得る。リボヌクレオチド残基が連続している場合もある。あるいは、リボヌクレオチド残基は、非リボヌクレオチド残基の間に散在している。ある場合には、ディテクタ核酸はリボヌクレオチド残基のみを有する。ある場合には、ディテクタ核酸はデオキシリボヌクレオチド残基のみを有する。ある場合には、ディテクタ核酸は、本明細書に記載のプログラム可能ヌクレアーゼによる切断に耐性のあるヌクレオチドを含み得る。ある場合には、ディテクタ核酸は合成ヌクレオチドを含み得る。ある場合には、ディテクタ核酸は、少なくとも1つのリボヌクレオチド残基及び少なくとも1つの非リボヌクレオチド残基を含み得る。ある場合には、ディテクタ核酸は、長さが5から20、5から15、5から10、7から20、7から15、または7から10ヌクレオチドである。ある場合には、ディテクタ核酸は、3から20、4から20、5から20、6から20、7から20、8から20、9から20、10から20、15から20、3から15、4から15、5から15、6から15、7から15、8から15、9から15、10から15、3から10、4から10、5から10、6から10、7から10、8から10、9から10、3から8、4から8、5から8、6から8、または7から8ヌクレオチドの長さである。ある場合には、ディテクタ核酸は、少なくとも1つのウラシルリボヌクレオチドを含み得る。ある場合には、ディテクタ核酸は、少なくとも2つのウラシルリボヌクレオチドを含み得る。時々、ディテクタ核酸はウラシルリボヌクレオチドのみを有している。ある場合には、ディテクタ核酸は、少なくとも1つのアデニンリボヌクレオチドを含み得る。ある場合には、ディテクタ核酸は、少なくとも2つのアデニンリボヌクレオチドを含み得る。ある場合には、ディテクタ核酸はアデニンリボヌクレオチドのみを有する。ある場合には、ディテクタ核酸は、少なくとも1つのシトシンリボヌクレオチドを含み得る。ある場合には、ディテクタ核酸は、少なくとも2つのシトシンリボヌクレオチドを含み得る。ある場合には、ディテクタ核酸は、少なくとも1つのグアニンリボヌクレオチドを含み得る。ある場合には、ディテクタ核酸は、少なくとも2つのグアニンリボヌクレオチドを含み得る。ディテクタ核酸は、非修飾リボヌクレオチドのみ、非修飾デオキシリボヌクレオチドのみ、またはそれらの組み合わせを含むことができる。ある場合には、ディテクタ核酸は、5から12ヌクレオチドの長さである。ある場合には、ディテクタ核酸は、少なくとも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、または30ヌクレオチドの長さである。ある場合には、ディテクタ核酸は、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、または30ヌクレオチドの長さである。Cas13を含むプログラム可能ヌクレアーゼによる切断では、ディテクタ核酸は5、8、または10ヌクレオチドの長さであり得る。Cas12を含むプログラム可能ヌクレアーゼによる切断では、ディテクタ核酸は10ヌクレオチドの長さであり得る。

10

20

30

40

50

【0157】

シグナル

本明細書に記載のサンプル中の標的核酸の存在を検出するためのデバイス、システム、流体デバイス、キット、及び方法は、サンプル中の標的核酸の存在または非存在を示すシグナルの生成を含み得る。本明細書に記載のサンプル中の標的核酸の存在または非存在を示すシグナルの生成は、本明細書に開示の方法及びデバイス（例えば、空気圧弁デバイス、スライディング弁デバイス、回転弁デバイス、及びラテラルフローデバイス）に適合し、本明細書に開示の組成物（例えば、プログラム可能ヌクレアーゼ、ガイド核酸、インビトロ転写用の試薬、増幅用試薬、逆転写用試薬、及びレポーター、またはそれらの任意の

組み合わせ)を使用して、標的核酸がサンプル中に存在するかどうかを検出するための非常に効率的、迅速、かつ正確な反応(例えば、DETECTR反応)を生じ得る。本明細書に開示される場合、いくつかの実施形態では、目的の標的核酸の存在または非存在の検出は、活性化されたプログラム可能ヌクレアーゼによるレポーターの切断後に、レポーターに存在する検出部分から放出されるシグナルを測定することを含み得る。別法では、または組み合わせで、いくつかの実施形態では、目的の標的核酸の存在または非存在の検出は、活性化されたプログラム可能ヌクレアーゼによるレポーターの切断後に、レポーターに存在する検出部分を結合するコンジュゲートから放出されるシグナルを測定することを含み得る。コンジュゲートは、ナノ粒子、金ナノ粒子、ラテックスナノ粒子、量子ドット、化学発光ナノ粒子、炭素ナノ粒子、セレンナノ粒子、蛍光ナノ粒子、リポソーム、またはデンドリマーを含み得る。コンジュゲートの表面は、本明細書に記載のように、切断された検出分子の検出部分または別の親和性分子に結合するコンジュゲート結合分子によってコーティングされ得る。したがって、本明細書に開示される検出ステップは、標的核酸の存在を測定すること、存在する標的核酸の量を定量化すること、またはサンプル中に標的核酸が不在であることを示すシグナルを間接的に(例えば、レポーターを介して)測定することを含む。いくつかの実施形態では、シグナルは、プログラム可能ヌクレアーゼによるディテクタ核酸の切断時に生成される。他の実施形態では、シグナルは、プログラム可能ヌクレアーゼによるディテクタ核酸の切断時に変化する。他の実施形態では、シグナルは、ディテクタ核酸の切断がない場合に存在し、プログラム可能ヌクレアーゼによる標的核酸の切断により消失し得る。例えば、サンプルを、プログラム可能ヌクレアーゼを含む組成物と接触させた後、マイクロ流体デバイスまたはラテラルフローデバイスでシグナルを生成することができる。

10

20

【0158】

緩衝液

本明細書に記載される試薬は、本明細書に開示されるデバイス、システム、流体デバイス、キット、及び方法に適合する緩衝液も含むことができる。本明細書に記載の緩衝液は、本明細書に記載のデバイス(例えば、空気圧弁デバイス、スライディング弁デバイス、回転弁デバイス、及びラテラルフローデバイス)での使用に適合し、本明細書に開示の組成物(例えば、プログラム可能ヌクレアーゼ、ガイド核酸、インビトロ転写用の試薬、増幅用試薬、逆転写用試薬、レポーター、またはそれらの任意の組み合わせ)と共に使用して、標的核酸がサンプル中に存在するかどうかを検出するための非常に効率的、迅速、かつ正確な反応(例えば、DETECTR反応)を実行することができる。これらの緩衝液は、病気、がん、または遺伝性障害などの病気の検出、または表現型、遺伝子型決定、または祖先の決定などの遺伝情報の検出のために、本明細書に記載されている他の試薬、サンプル、及び支持媒体と互換性がある。本明細書に記載の方法はまた、本明細書に開示の方法に適合する緩衝液の使用を含むことができる。例えば、緩衝液は、HEPES、MES、TCEP、EGTA、Tween 20、KCl、MgCl₂、グリセロール、またはそれらの任意の組み合わせを含み得る。ある場合には、緩衝液は、Tris-HCl pH 8.8、VLB、EGTA、CH₃COOH、TCEP、IsoAmp、(NH₄)₂SO₄、KCl、MgSO₄、Tween 20、KOAc、MgOAc、BSA、TCEP、またはそれらの任意の組み合わせを含み得る。ある場合には、緩衝液は、0から100、0から75、0から50、0から25、0から20、0から10、0から5、5から10、5から15、5から20、5から25、5から30、5から40、5から50、5から75、5から100、10から20、10から30、10から40、10から50、15から20、15から25、15から30、15から40、15から50、20から25、20から30、20から40、or 20から50 mMのHEPES、pH 6.8を含み得る。緩衝液は、0から500、0から400、0から300、0から250、0から200、0から150、0から100、0から75、0から50、0から25、0から20、0から10、0から5、5から10、5から15、5から20、5から25、5から30、5から40、5から50、5から75、5から100、5から150、5から200、5

30

40

50

から250、5から300、5から400、5から500、25から50、25から75、25から100、50から100、50 150、50から200、50から250、50から300、100から200、100から250、100から300、または150から250mMのKClを含み得る。他の場合には、緩衝液は、0から100、0から75、0から50、0から25、0から20、0から10、0から5、5から10、5から15、5から20、5から25、から30、5から40、5から50、5から75、5から100、10から20、10から30、10から40、10から50、15から20、15から25、15から30、15から4、15から50、20から25、20から30、20から40、or 20から50mMのMgCl²を含み得る。緩衝液は、0から25、0から20、0から10、0から5、5から10、5から15、5から20、5から25、5から30%のグリセロールを含むことができる。緩衝液は、0%から30%、5%から30%、10%から30%、15%から30%、20%から30%、25%から30%、0%から25%、2%から25%、5%から25%、10%から25%、15%から25%、20%から25%、0%から20%、5%から20%、10%から20%、15%から20%、0%から15%、5%から15%、10%から15%、0%から10%、5%から10%、または0%から5%のグリセロールを含むことができる。緩衝液は、0から500、0から400、0から300、0から250、0から200、0から150、0から100、0から75、0から50、0から25、0から20、0から10、0から5、5から10、5から15、5から20、5から25、から30、5から40、5から50、5から75、5から100、5から150、5から200、5から250、5から300、5から400、5から500、25から50、25から75、25から100、50から100、50 150、50から200、50から250、50から300、100から200、100から250、100から300、または150から250mMのTris-HCl、pH8.8を含み得る。緩衝液は、0から500、0から400、0から300、0から250、0から200、0から150、0から100、0から75、0から50、0から25、0から20、0から10、0から5、5から10、5から15、5から20、5から25、から30、5から40、5から50、5から75、5から100、5から150、5から200、5から250、5から300、5から400、5から500、25から50、25から75、25から100、50から100、50 150、50から200、50から250、50から300、100から200、100から250、100から300、または150から250mMのKOA cを含み得る。緩衝液は、0から500、0から400、0から300、0から250、0から200、0から150、0から100、0から75、0から50、0から25、0から20、0から10、0から5、5から10、5から15、5から20、5から25、から30、5から40、5から50、5から75、5から100、5から150、5から200、5から250、5から300、5から400、5から500、25から50、25から75、25から100、50から100、50 150、50から200、50から250、50から300、100から200、100から250、100から300、または150から250mMのMgOA cを含み得る。ある場合には、緩衝液は、0から100、0から75、0から50、0から25、0から20、0から10、0から5、5から10、5から15、5から20、5から25、から30、5から40、5から50、5から75、5から100、10から20、10から30、10から40、10から50、15から20、15から25、15から30、15から4、15から50、20から25、20から30、20から40、または20から50mMのEGTAを含み得る。緩衝液は、0%から30%、5%から30%、10%から30%、15%から30%、20%から30%、25%から30%、0%から25%、2%から25%、5%から25%、10%から25%、15%から25%、20%から25%、0%から20%、5%から20%、10%から20%、15%から20%、0%から15%、5%から15%、10%から15%、0%から10%、5%から10%、または0%から5%のTween 20を含むことができる。

10

20

30

40

50

【0159】

DETECTORデバイスのレイアウト

図43は、本明細書に記載のプログラム可能ヌクレアーゼアッセイ（例えば、DETECTORアッセイ）を実行するように構成されたデバイスカートリッジのレイアウトを示している。上部に示されているのは、カートリッジと接続するように構成された空気圧ポンプである。中央に示されているのは、リザーバーを含む最上層を示すカートリッジの上面図である。下部に示されているのは、サンプルを含むスライディング弁（4301）であり、左側の溶解チャンバ（4302）を指す矢印、右側に増幅チャンバ（4303）、さらに右側に検出チャンバ（4304）が続く。図44は、スライディング弁デバイスの概略図を示す。チャンネルのオフセットピッチにより、各ウェルへの個別の吸引及び分注が可能になり、増幅チャンバ（4402）と対応する検出チャンバ（4303）の間のクロストークを軽減するのに役立つ。図45は、図44に示されるスライディング弁（4500）デバイスを通るサンプル移動の図を示す。最初の閉位置（i.）で、サンプルはサンプルウェルにロードされ、溶解される。次いで、スライディング弁（4500）が器具によって作動され、ピペットポンプを使用してサンプルが各チャンネルにロードされ、チャンネル（ii.）に適切な量が分注される。サンプルは、スライディング弁（4500）を作動させることによって増幅チャンバに送達され、ピペットポンプ（iii.）で混合される。増幅チャンバからのサンプルは、各チャンネル（iv.）に吸引され、次いでスライディング弁（4500）とピペットポンプを作動させることにより、各DETECTORチャンバ（v.）に分配及び混合される。いくつかの実施形態では、スライディング弁デバイスは、5cm×8cm、5×6cm、6×7cm、7×8cm、8×9cm、9×10cm、10×11cm、11×12cm、6×9cm、7×10cm、8×11cm、9×12cm、10×13cm、11×14cm、12×11cm、約30平方センチメートル、約35平方センチメートル、約40平方センチメートル、約45平方センチメートル、約50平方センチメートル、約55平方センチメートル、約60平方センチメートル、約65平方センチメートル、約70平方センチメートル、約75平方センチメートル、約25平方センチメートル、約20平方センチメートル、約15平方センチメートル、約10平方センチメートル、約5平方センチメートル、1から100平方センチメートル、5から10平方センチメートル、10から15平方センチメートル、15から20平方センチメートル、20から25平方センチメートル、25から30平方センチメートル、30から35平方センチメートル、35から40平方センチメートル、40から45平方センチメートル、45から50平方センチメートル、5から90平方センチメートル、10から0平方センチメートル、15から5平方センチメートル、20から10平方センチメートル、または25から15平方センチメートルの表面積を有する。

10

20

30

40

50

【0160】

いくつかの実施形態では、スライディング弁デバイスは、サンプル溶解用の第1のチャンバ、検出用の第2のチャンバ、及び増幅用の第3のチャンバを含み得る。これらのチャンバを指す別の方法は、サンプルチャンバ（例えば、第1のチャンバ）、検出チャンバ（例えば、第2のチャンバ）、及び増幅チャンバ（例えば、第3のチャンバ）である。このレイアウトにおいて、本開示は、シグナルを測定するためのデバイスを提供し、これは、チャンネルの第1の端部に開口部を有し、チャンネルの第2の端部に開口部を有するチャンネルを含むスライディング層と、固定層であって、i) 開口部を有する第1のチャンバと、ii) 開口部を有する第2のチャンバであって、プログラム可能ヌクレアーゼと、核酸を及び検出部分含むレポーターとを含み得る、第2のチャンバと、iii) 第1のチャンバの開口部と位置合わせされた開口部を有する第1のサイドチャンネルと、iv) 第2のチャンバの開口部と位置合わせされた開口部を有する第2のサイドチャンネルとを含む、固定層を含み得、スライディング層と固定層は、チャンネルの第1の端部の開口部、チャンネルの第2の端部の開口部、第1のチャンバの開口部、及び第1のサイドチャンネルの開口部を介して、第1のチャンバと第1のサイドチャンネルを流体接続するために、互いに対して移動し、スライディング層と固定層は、チャンネルの第1の端部の開口部、チャンネルの第2の端部の開口部、第2のチャンバの開口部、及び第2のサイドチャンネルの開口部を介して、第2の

チャンバと第2のサイドチャネルを流体接続するために、互いに対して移動する。固定層はさらに、i) 開口部を有する第3のチャンバ、及びii) 第3のチャンバの開口部と位置合わせされた開口部を有する第3のサイドチャネルを含むことができ、スライディング層と固定層とが互いに対して移動して、チャネルの第1の端部の開口部、チャネルの第2の端部の開口部、第3のチャンバの開口部、及び第3のサイドチャネルの開口部を介して第3のチャンバと第3のサイドチャネルとを流体接続する。第2のチャンバは、レポーターの核酸の切断によって生成される検出部分からのシグナルを測定するための測定デバイスに連結される。さらに、チャネルの第1の端部の開口部は第1のチャンバの開口部と重なり、チャネルの第2の端部の開口部は第1のサイドチャネルの開口部と重なる。チャネルの第1の端部の開口部は第2のチャンバの開口部と重なり、チャネルの第2の端部の開口部は第2のサイドチャネルの開口部と重なる。チャネルの第1の端部の開口部は第3のチャンバの開口部と重なり、チャネルの第2の端部の開口部は第3のチャンネルの開口部と重なる。さらに、第1のサイドチャネル、第2のサイドチャネル、及び第3のサイドチャネルは、混合チャンバに流体接続される。この実施形態では、第2のチャンバはさらにガイド核酸を含む。

10

【0161】

別の実施形態では、スライディング弁デバイスは、サンプル溶解のための第1のチャンバと、検出のための第2のチャンバとを含み得る。これらのチャンバを指す別の方法は、サンプルチャンバ（例えば、第1のチャンバ）及び検出チャンバである。このレイアウトにおいて、本開示は、シグナルを測定するためのデバイスを提供し、チャネルの第1の端部に開口部を有し、チャネルの第2の端部に開口部を有するチャネルを含むスライディング層と、固定層であって、i) 開口部を有する第1のチャンバと、ii) 開口部を有する第2のチャンバであって、プログラム可能ヌクレアーゼと、核酸を及び検出部分含むレポーターとを含み得る、第2のチャンバと、iii) 第1のチャンバの開口部と位置合わせされた開口部を有する第1のサイドチャネルと、iv) 第2のチャンバの開口部と位置合わせされた開口部を有する第2のサイドチャネルとを含む、固定層を含み得、スライディング層と固定層は、チャネルの第1の端部の開口部、チャネルの第2の端部の開口部、第1のチャンバの開口部、及び第1のサイドチャネルの開口部を介して、第1のチャンバと第1のサイドチャネルを流体接続するために、互いに対して移動し、スライディング層と固定層は、チャネルの第1の端部の開口部、チャネルの第2の端部の開口部、第2のチャンバの開口部、及び第2のサイドチャネルの開口部を介して、第2のチャンバと第2のサイドチャネルを流体接続するために、互いに対して移動する。第2のチャンバは、レポーターの核酸の切断によって生成される検出部分からのシグナルを測定するための測定デバイスに連結される。さらに、チャネルの第1の端部の開口部は第1のチャンバの開口部と重なり、チャネルの第2の端部の開口部は第1のサイドチャネルの開口部と重なる。チャネルの第1の端部の開口部は第2のチャンバの開口部と重なり、チャネルの第2の端部の開口部は第2のサイドチャネルの開口部と重なる。さらに、第1のサイドチャネル、及び第2のサイドチャネルは、混合チャンバに流体接続される。この実施形態では、第2のチャンバはさらにガイド核酸を含む。

20

30

【0162】

いくつかの実施形態では、DETECTRアッセイは、蛍光ベースの検出に依存する。特定の実施形態では、DETECTRアッセイは、電気化学に基づく検出に依存する。電気化学ベースのアッセイは、蛍光ベースのアッセイよりも、検出の限界が2桁ほど低いことがわかっている (Lou et al., 2015)。

40

【0163】

いくつかの実施形態では、検出の下限を達成するために、電気化学的プローブがDETECTRアッセイに組み込まれる。例えば、次の電気化学プローブは、5'-2XXTTATTXX-3'を含み得、式中2=5'-6-FAM、X=フェロセン^dT、また3'=3'-ビオチンTEG、式中、TEGは15原子のトリエチレングリコールスパーサーである。いくつかの実施形態では、電気化学プローブは、サイクリックボルタンメトリーで試験さ

50

れる。いくつかの実施形態では、電気化学プローブは、矩形波ボルタンメトリーで試験される。いくつかの実施形態では、DropSens μ STAT ECL装置が電気化学的測定に使用される。いくつかの実施形態では、DropSensのスクリーン印刷された炭素電極が電気化学的測定に使用される。

【0164】

図13は、電位の関数として電流を表す線グラフを示す。電位 (V) がx軸に0 Vから0.25 Vまで0.05 V刻みで示される。電流 (μ A) は0 μ Aから0.20 μ Aまで0.02 μ A刻みでy軸に示される。グラフには2本の線が描かれている。破線は、反応の時間=0における50 nMのHERC2 DETECTORの酸化曲線を示している。実線は、反応開始から33分後の50 nMのHERC2 DETECTORの酸化曲線を示している。この実施例では、エラーバーは、各測定からの3つのトレースを使用して、同じ溶液の2つの測定の標準偏差を表す。シグナルの40 nAの差は、50 nMのHERC2 DETECTORの検出を示す。

10

【0165】

図14は、電位の関数として電流を表す線グラフを示す。電位 (V) がx軸に0 Vから0.25 Vまで0.05 V刻みで示される。電流 (μ A) は0 μ Aから-0.14 μ Aまで0.02 μ A刻みでy軸に示される。グラフには2本の線が描かれている。破線は、反応の時間=0における50 fMでのHERC2 DETECTORの還元曲線を示している。実線は、反応開始から33分後の50 fMでのHERC2 DETECTORの還元曲線を示している。この実施例では、エラーバーは、各測定からの3つのトレースを使用して、同じ溶液の2つの測定の標準偏差を表す。

20

【0166】

図15は、電位の関数として電流を表す線グラフを示す。電位 (V) はx軸に-0.4 Vから0.6 Vまで0.2 V刻みで示される。電流 (μ A) はy軸に-1 μ Aから1 μ Aまで0.2 μ A刻みで示される。濃い緑色の線 (1501) と薄緑色の線 (1502) は、それぞれ24 μ Mの電気化学レポーターを使用して、HERC2 DETECTOR反応の前後に取得したサイクリックボルタモグラムを示している。この実施例では、各トレースは同じ溶液の3回のスキンの平均であり、エラーバーは標準偏差を表している。ボルタモグラム間の電流の差は、24 μ MでのHERC2 DETECTORの検出を示す。

【0167】

30

SARS-CoV-2 電気化学 DETECTOR 反応

特定の実施形態では、本明細書に記載の DETECTOR は、SARS-CoV-2 などの病原体を検出するための強力な技術であることが実証されている (Broughton et al., 2020)。いくつかの実施形態では、病原体の検出のための DETECTOR アッセイにおいて電気化学的プローブが利用される。いくつかの実施形態では、電気化学的プローブベースの DETECTOR アッセイは、病原体 SARS-CoV-2 の検出のために構成される。いくつかの実施形態では、電気化学的プローブは、5'-2XXTTATTXX-3' であり、式中 2=5'-6-FAM、X=フェロセン dT、また 3=3' ビオチン TEG である。

【0168】

40

図16は、電位の関数として電流を表す線グラフの例を示す。電位 (V) はx軸に-0.3 Vから0.5 Vまで0.1 V刻みで表示される。電流 (μ A) はy軸に-0.04 μ Aから0.05 μ Aまで0.01 μ A刻みで示される。緑色の線 (1601) は、反応開始0秒での SARS-CoV2 の酸化曲線を示し、黄色の線 (1602) は、反応開始から20分後の SARS-CoV2 の酸化曲線を示している。いくつかの実施形態では、エラーバーは、各測定値からの3つのトレースの標準偏差を表す。20分の酸化曲線は、時間0の酸化曲線よりも20 nA高いことが観察される。20 nAの差は、SARS-CoV2 の存在を示している。

【0169】

図17は、電位の関数として電流を表す線グラフの例を示す。電位 (V) はx軸に-0

50

． 3 V から 0 . 5 V まで 0 . 1 V 刻みで示される。電流 (μ A) は y 軸に - . 6 μ A から 0 . 6 μ A まで 0 . 2 μ A 刻みで表示される。線は、電気化学レポーター及びコントロールとの SARS - COV - 2 DETECTOR 反応の矩形波ボルタンメトリー測定値を示している。

【 0 1 7 0 】

図 1 8 は、R 1 7 6 3 (N 遺伝子) との複合化マスターミックスの例を示す。

【 0 1 7 1 】

図 1 9 は、矩形波ボルタンメトリーについて、本明細書に記載される実験条件の例を示す。

【 0 1 7 2 】

DETECTOR アッセイの固定化

C R I S P R 診断反応は、通常、C a s タンパク質 - R N A 複合体が標的分子やレポーターに自由に結合できる溶液中で行われる。ただし、すべての成分が溶液にある反応は、特にマイクロ流体デバイスでの C R I S P R 診断アッセイの設計を制限する。C R I S P R 診断反応の様々な成分が表面に固定化されているシステムにより、単一の反応チャンバ内で複数の読み出しを実行できる設計が可能になる。

【 0 1 7 3 】

C R I S P R 診断反応成分を反応チャンバの表面または他の表面 (例えば、ビーズの表面) に固定化するための様々な方法が、本明細書に記載される。本明細書に記載のデバイスのいずれも、1つまたは複数の固定された検出試薬成分 (例えば、プログラム可能ヌクレアーゼ、ガイド核酸、及び／またはレポーター) を含む得る。特定の例において、方法は、プログラム可能ヌクレアーゼ (例えば、C a s タンパク質または C a s 酵素)、レポーター、及びガイド核酸 (例えば、g R N A) の固定化を含む。いくつかの実施形態では、様々な C R I S P R 診断反応成分がビオチンで修飾される。いくつかの実施形態では、これらのビオチン化 C R I S P R 診断反応成分は、ストレプトアビジンでコーティングされた表面での固定化について試験される。いくつかの実施形態では、ビオチン - ストレプトアビジン相互作用は、他の固定化の化学のモデルのシステムとして使用される。

【 0 1 7 4 】

表 1 は、g R N A 及びレポーターの固定化配列を示している。

10

20

30

40

50

名称	配列	説明
R003	rGrGrCrCrArCrCrCrCrArArArArUrGrArArGrGrGrGrArCrUrArArArArCrArGrUrGrArUrArArGrUrGrGrArArUrGrCrCrArUrG	未修飾 Cas13 crRNA
mod023	/5ピオチンTEG/rGrGrCrCrArCrCrCrCrArArArArUrGrArArGrGrGrGrArCrUrArArArArCrArCrGrArCrCrUrArCrUrCrUrCrCrArUrArCrUrC	ピオチン修飾 Cas13 crRNA
R1763	rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrArArGrUrGrUrArGrArUrCrCrCrCrArGrCrGrCrUrUrCrArGrCrGrUrUrC	SARS-CoV-2の配列を標的とする未修飾gRNA
mod011	/5Biosg/rUrA rArUrU rUrCrU rArCrUrArArGrUrGrU rArGrArUrCrCrCrCrArGrCrGrCrUrUrCrA rGrCrG rUrUrC	5' ピオチンを有するR1763
mod012	/5Biosg/T*T*T*T*T*rUrArArUrUrCrUrArCrUrArArGrUrGrUrArGrArUrCrCrCrArGrCrGrCrUrUrCrArGrCrGrUrUrC	5' 末端に5個のホスホロチオエート化ヌクレオチドを有するR1763
mod013	/5Biosg/T*T*T*T*T*T*T*T*T*rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrArArGrUrGrUrArGrArUrCrCrCrCrArGrCrGrCrUrUrCrArGrCrGrUrUrC	5' 末端に10個のホスホロチオエート化ヌクレオチドを有するR1763
mod014	rUrArArUrUrUrCrUrA/iBiodUK/rCrUrArArGrUrGrUrArGrArUrCrCrCrCrArGrCrGrCrUrUrCrArGrCrGrUrUrC	内部ピオチン修飾を施したR1763
mod015	rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrArArGrUrGrUrArGrArUrC/iBiodUK/rCrCrCrCrArGrCrGrCrUrUrCrArGrCrGrUrUrC	内部ピオチン修飾を施したR1763
mod016	rUrArArUrUrUrC/iBiodUK/rArCrUrArArGrUrGrUrArGrArUrCrCrCrCrArGrCrGrCrUrUrCrArGrCrGrUrUrC	内部ピオチン修飾を施したR1763
mod017	rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrArArGrUrGrUrArGrA/iBiodUK/rCrCrCrCrArGrCrGrCrUrUrCrArGrCrGrUrUrC	内部ピオチン修飾を施したR1763
mod018	/5ピオチンTEG/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrArArGrUrGrUrArGrArUrCrCrCrCrArGrCrGrCrUrUrCrArGrCrGrUrUrC	5' ピオチン-TEG修飾を施したR1763
mod019	rUrA rArUrU rUrCrU rArCrU rArArGrUrGrUrArGrA rUrCrC rCrCrC rArGrCrGrCrUrUrCrA rGrCrG rUrUrC/3Bio/	3' ピオチン修飾を施したR1763
mod020	rUrA rArUrU rUrCrU rArCrU rArArGrUrGrUrArGrA rUrCrC rCrCrCrArGrCrGrCrUrUrCrA rGrCrGrUrUrC/3BioTEG/	3' ピオチン-TEG修飾を施したR1763
rep072	/56-FAM/TTATTATT/3Bio/	3'ピオチンを有するFAMレポーター
rep103	/5Alex488N/TT ATT ATT /3Bio/	5' はAlexa488レポーターで修飾、3' はピオチンで修飾される。
rep104	/5Alex488N/TT ATT ATT AT/iBiodT/ATT/3IABkFQ/	5' は内部ピオチンを有するAlexa488レポーターで修飾、3' はクエンチャーで修飾される。

10

20

30

40

50

rep105	/5ビオチンTEG/*T*T* /i6-FAMK/*TATTA TTA TTA TTA TT/3IABkFQ/	5' はビオチン-TEGで修飾され、その後に2個のホスホロチオエート化ヌクレオチドが続く。 (*)は切断可能ではなく、内部FAM及び3' はクエンチャーで修飾される。 *T*はまた、他の切断不可能なsuである可能性もある。
rep106	/56-FAM/TT ATT ATT ATT A/3Dig_N/	3' DIGを有する 5' FAMレポーター
rep115	[ビオチンTEG]TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT[フィコエリトリン]	ビオチンTEGで修飾された5'、及びフィコエリトリンで修飾された3'、5' と3' はT30によって連結されている。
rep116	[FAM]n[ブランチ]TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT[ビオチンTEG]	5' は9個のFAMで修飾され、3' はビオチンTEGで修飾され、5' と3' はT20によって連結されている。
rep117	[ビオチンTEG]*T*T*[内部FAM]*TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT[IABkFQ]	5' はビオチンTEGで修飾され、3' はFQで修飾され、5' と3' はT20によって連結されている。
rep118	[FAM]TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT* [内部ビオチン]*T[IABkFQ]	5' はFAMで修飾され、3' はビオチン-FQで修飾され、5' と3' はT20によって連結されている。
rep119	[5ビオチンTEG]*T*T*[内部Cy5]*TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT[RQ]	5' はビオチンTEGで修飾され、3' はBHQ-2で修飾され、T20によってクエンチャーに連結された内部Cy5色素を含む。
rep121	/5ビオチンTEG//iSp18//iCy5/ TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT/3IAbRQSp/	5' はビオチンTEG、内部18原子スパーサー、及び内部Cy5で修飾され、その後にT20及びIAbRQSpクエンチャーが続く。
rep120	[Cy5]TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT* [内部ビオチン]*T[RQ]	5' はCy5で修飾され、その後に内部ビオチンに対するT20リンカーとRQクエンチャーが続く。*はホスホロチオエート化ヌクレオチドを示す。
rep125	/5Alexa647N//iBiodT/TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT/3IAbRQSp/	5' はAlexa647で修飾され、その後に内部ビオチンドT T20と3' IAbRQSpクエンチャーが続く。
rep126	/5ビオチンTEG/TT/i6-FAMK/TTTTTTTTTTUrUrUrUrUTTTTTTT/3IABkFQ/	ビオチンTEGで修飾された5'、その後に2個のT、内部FAM、及び10T、5 RNA U、6T、及びクエンチャーが続く。RNA切断レポーターとして機能する。

10

20

30

40

50

rep110	/5AmMC6T/TTTTTTTTTTTT/3AlexF488N/	6個の炭素を有する 5' アミノに続いて、 T12、及び3' 端の Alexa488修飾
rep111	/5AmMC6T//i6- FAMK/TTTTTTTTTTTT/3IABkFQ/	6個の炭素を有する 5' アミノに続いて、内部FAM、 T12、及び3' のクエンチャー
rep112	/5AmMC6T/TT TTT TTT TTT T/36-FAM/	6個の炭素を有する 5' アミノに続いて、 T12及び3' FAMの修飾
rep122	/5AmMC12//iSp18//iCy5/ TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT/3IABRQSp/	12個の炭素を有する 5' アミノに続いて、 18原子リンカー、Cy5、T20、 及び3' クエンチャー
rep123	/5AmMC12//iCy5/ TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT/3IABRQSp/	12個の炭素を有する 5' アミノに続いて、内部Cy5、 T20リンカー、3' クエンチャー
rep135	/5AmMC12//i6- FAMK/TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT/3IABkFQ /	12個の炭素を有する 5' アミノに続いて、内部FAM、 T20リンカー、3' クエンチャー
rep136	/5AmMC6//i6- FAMK/TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT/3IABkFQ /	6個の炭素を有する 5' アミノに続いて、内部FAM、 T20リンカー、3' クエンチャー
mod026	/5AmMC6/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrArAr GrUrGrUrArGrArUrCrCrCrCrCrArGrCrGrCr UrUrCrArGrCrGrUrUrC	SARS-CoV-2 N遺伝子の gRNAに連結された 6個の炭素を有する5' アミノ
mod027	/5AmMC12/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrArAr GrUrGrUrArGrArUrCrCrCrCrCrArGrCrGrCr UrUrCrArGrCrGrUrUrC	SARS-CoV-2 N遺伝子の gRNAに連結された 12個の炭素を有する5' アミノ
mod028	/5AmMC6T/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrArAr GrUrGrUrArGrArUrCrCrCrCrCrArGrCrGrCr UrUrCrArGrCrGrUrUrC	SARS-CoV-2 N遺伝子の gRNAに連結された、dTにおける 6個の炭素を有する5' アミノ
mod029	rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrArArGrUrGrUrAr GrArUrCrCrCrCrCrArGrCrGrCrUrUrCrArGrC rGrUrUrC/3AmMC6T/	3' 末端に6個の炭素を有する 5' アミノを有する SARS-CoV-2 N遺伝子のgRNA
mod030	/5AmMC12/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrArAr GrUrGrUrArGrArUrUrUrArCrArUrGrGrCrUr CrUrGrGrUrCrCrGrArG	ヒトRNase P POP7のgRNAに 連結された 12個の炭素を有する5' アミノ
mod031	/5AmMC12/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrArAr GrUrGrUrArGrArUrGrCrCrGrArUrArArUrGr ArUrGrUrArGrGrGrArU	マムーサス・プリミゲニウス 制御配列のgRNAに連結された 12個の炭素を有する5' アミノ
mod059	/5チオMC6-D/rUrA rArUrU rUrCrU rArCrU rArArG rUrGrU rArGrA rUrCrC rCrCrC rArGrC rGrCrU rUrCrA rGrCrG rUrUrC	SARS-CoV-2 N遺伝子のgRNAに 連結された6個の炭素を有する 5' チオールの修飾

10

20

30

40

50

rep130	/5チオMC6-D/*T*T*/i6-FAMK/*TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT/3IABk FQ/	5' はビオチンTEGで修飾され、3' はFQで修飾され、5' と3' はT20によって連結されている；チオールと内部FAMの間の2個のホスホロチオエート化ヌクレオチド。
mod024	/5ビオチンTEG/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrArArGrUrGrUrArGrArUrGrCrCrGrArUrArArUrGrArUrGrUrArGrGrGrArU	5' は、マムーサス・プリミゲニウスの配列を標的とするgRNAに連結されたビオチンTEGで修飾される。
mod025	/5ビオチンTEG/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrArArGrUrGrUrArGrArUrUrUrArCrArUrGrGrCrUrCrUrGrGrUrCrCrGrArG	5' は、ヒトRNase P POP7を標的とするgRNAに連結されたビオチンTEGで修飾される。
mod058	/5ビオチンTEG/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrArArGrUrGrUrArGrArUrCrUrGrCrCrArArUrUrGrCrArGrGrArArUrGrArU	5' は、マムーサス・プリミゲニウスの配列を標的とするgRNAに連結されたビオチンTEGで修飾される。

10

【0175】

図20Aから20Cは、CRISPR-Cas診断アッセイ成分の3つの例示的な固定戦略を示す。いくつかの実施形態では、図20Aに見られるように、Casタンパク質のアミノ酸残基の化学修飾は、表面への結合を可能にする。いくつかの実施形態では、図20Bに見られるように、gRNAは、選択された表面化学と適合するgRNAの5'または3'末端に様々な化学修飾を加えることによって固定化される。いくつかの実施形態では、図20Cに見られるように、蛍光消光(FQ)、または他のレポーター化学は、gRNAと同様の化学修飾を使用して表面に結合される。いくつかの実施形態では、これらの付着したレポーターはCasタンパク質によって活性化され、表面に付着したままの活性化分子、または溶液中に放出される活性化分子のいずれかをもたらす。

20

【0176】

本明細書に記載のいくつかの実施形態について、図21は、RNP複合体がgRNAによって固定化され、表面にも固定化されている周囲のFQレポーターを切断する、本明細書に記載の方法及び組成物と共に使用するための固定化戦略の実例を提供する。ここで、クエンチャーが溶液の中に放出され、局所的な蛍光シグナルが残る。

30

【0177】

いくつかの実施形態では、プログラム可能ヌクレアーゼ、ガイド核酸、またはレポーターは、結合またはリンカーによってデバイス表面に固定化される。いくつかの実施形態では、結合は、共有結合、非共有結合、静電結合、ストレプトアビジンとビオチンとの間の結合、アミド結合、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、結合は非特異的吸収を含む。いくつかの実施形態では、プログラム可能ヌクレアーゼは、結合によってデバイス表面に固定化され、結合は、プログラム可能ヌクレアーゼと表面の間にある。いくつかの実施形態では、レポーターは、結合によってデバイス表面に固定化され、結合はレポーターと表面の間にある。いくつかの実施形態では、ガイド核酸は、結合によって表面に固定化され、結合はガイド核酸の5'末端と表面の間にある。いくつかの実施形態では、ガイド核酸は、結合によって表面に固定化され、結合はガイド核酸の3'末端と表面の間にある。

40

【0178】

いくつかの実施形態では、gRNAに対する様々な化学修飾が、図22に示されるように記載される。y軸は経時的な蛍光強度の観点から反応速度を示し、x軸はcrRNAの様々な修飾を示す。いくつかの実施形態では、非修飾のビオチン及びビオチン修飾のバリエーションが、Cas12M08 gRNAに沿った様々な位置に配置される。次に、修

50

飾された gRNA がタンパク質と複合化し、dsDNA 標的が追加される。いくつかの実施形態では、同じ期間にわたるより高い平均蛍光は、修飾が gRNA の 5' 末端及び 3' 末端で許容されるが、gRNA の内部では許容されないことを示す。5' 修飾 gRNA は、3' 修飾よりも堅牢であるように見える。

【0179】

いくつかの実施形態において、ストレプトアビジン表面への gRNA の固定化は、図 23 に示されるように記載される。2つのプロットが示され、左側のプロットは、ストレプトアビジンでコーティングされた表面に結合した RNA を示し、右側のプロットは、標的、レポーター、及びタンパク質溶液と混合した溶液の中の結合していない対照 RNA を示している。いくつかの実施形態では、y 軸は、それぞれの表において、crRNA の様々な修飾を示し、x 軸は、crRNA が受ける様々な緩衝条件を示す。左側の実験プロットは、5' または 3' 側の gRNA がどちらも機能的なアプローチであることを示しているが、5' ビオチン修飾 gRNA は 3' 修飾 gRNA と比較してシグナルの増加を示している。いくつかの実施形態では、修飾されていない gRNA は、プレートに結合したときにシグナルを示さない。逆に、右側の対照プロットは、いくつかの実施形態において、遊離 gRNA が標的、レポーター、及びタンパク質溶液と混合される非結合対照を示す。この実施形態では、十分なシグナルが観察され、修飾されていない gRNA における官能性を示している。

【0180】

いくつかの実施形態では、Cas タンパク質は、本明細書に記載され、図 5 に示されるように、RNA 複合体と複合化する。図 24 は、5' ビオチン修飾 gRNA によって結合された RNP 複合体がより高いシグナルを示し、ストレプトアビジン被覆プレートの表面への機能的結合を示していることを示している。未結合の高塩分「B アンド W」緩衝条件にさらされたサンプルは、タンパク質活性の阻害、またはプレート表面への官能性 RNP 複合体の結合の破壊を示す蛍光シグナルが少なくなることを示す。非修飾の gRNA はまた、プレート表面への RNP への結合に不成功であることを示す低次の蛍光を示す。右側のプロットに示されているコントロールアッセイは、結合していない gRNA がまだ官能性があることを示している。

【0181】

いくつかの実施形態では、レポーターは、図 25 A から 25 B に示されるように表面に固定化される。図 25 A は、ストレプトアビジンでコーティングされた表面を有する 4 つのウェルの蛍光画像を示し、ウェルの左側の列は、ストレプトアビジンでコーティングされた表面に固定化された FAM-ビオチンレポーターを含む。ウェルの右側の列には、ビオチン官能化なしの FAM レポーターが含まれている。左側の列はより高次のシグナルを示している。図 25 B は、ストレプトアビジンプレートでインキュベートした後の溶液に対する FAM-ビオチン結合前溶液の蛍光強度の比較を示す。FAM-ビオチンを含む両方のウェルのシグナルの減少が観察される。

【0182】

いくつかの実施形態では、組み合わせた RNP 及びレポーター系は、図 26 に示すように機能試験のために固定化される。未加工の蛍光 (AU) は、(1) 溶液中の非修飾 crRNA、(2) 表面に結合した非修飾 crRNA、(3) 表面に結合した 5' ビオチン-TEG 修飾 crRNA の 3 つの条件に対してプロットされる。レポーターと RNP のプレートへの複合的な結合は、結合したレポーターを含む溶液中の RNP と同様のシグナルを示す。

【0183】

いくつかの実施形態では、DETECTR アッセイの評価のために、異なるレポーターがストレプトアビジン表面に Cas 複合体と組み合わせて固定化される。図 27 A から 27 E は、ストレプトアビジンの表面での Cas 複合体固定化と組み合わせた固定化のための様々なレポーターの評価の結果を示す。各図では、未加工の蛍光が分単位の時間に対してプロットされており、陽性対照 (+) 及び陰性対照 (-) の標的と結合している間の各

タイプのレポーターの速度論的結合曲線を表している。図 27 A は、フルオロフォア F A M 及びビオチンから構成される F A M-ビオチンレポーター「rep」の結合の結果を提示し、rep 72 として列挙される。図 27 B は、フルオロフォア A l e x a F l u o r 488、「AF 488」、及び T A 10 内部ビオチン Q から構成されるレポーターの未加工の蛍光をプロットする。予想どおり、陽性対照は、反応の過程で結合が増加したことを示す正の勾配を示す。これは、F A M 色素が結合及びトランス切断時に溶液中に放出されるためである。rep 104 では、切断点は F A M とビオチンの間にあるが、すべてのレポーターのビオチンはストレプトアビジン表面への結合点である。図 27 C は、対照、rep 105 の標的結合動力学プロットをプロットする。Rep 105 は、ビオチン-F A M-T 16-F Q で構成されている。この場合、F A M 色素とクエンチャーの間の領域が結合時に切断され、クエンチャーが放出されるため、ストレプトアビジンでコーティングされた表面が蛍光を発する。図 27 D は、rep 117 の対照をプロットする。Rep 117 は、ビオチン-F A M-T 20-F Q で構成されている。この実施形態では、レポーターは、F A M 色素とクエンチャーとの間で切断され、したがって、結合及びトランス切断の際に溶液中でクエンチャーを放出することが可能になる。これにより、順次表面が蛍光を発する。図 27 E は、rep 118 の対照をプロットする。Rep 118 は F A M-T 20-ビオチン-F Q で構成されている。この実施形態では、ビオチンと F A M との間の核酸領域が結合するとトランス切断され、F A M が溶液中に放出されるため、溶液は蛍光を発する。

10

20

30

40

50

【0184】

いくつかの実施形態では、C y 5 色素をレポーターまたはレポーターの構成要素として使用することができる。図 28 A から 28 C は、C y 5 レポーター (rep 108) についての結果を示しており、それは D E T E C T R に対して機能的であるが、より弱いシグナルを生成することを示している (利得に関連している可能性がある)。図 28 A 及び 28 B は、それぞれ、C y 5 色素及び A l e x a F l u o r 594「AF 594」の色素を読み取るように構成されたチャンネルについて、未加工の蛍光対レポータータイプをプロットする。これらのプロットでは、各レポーターの平均の未加工の蛍光が示されている。レポーター、rep 033、「AF 594」チャンネルでの読み出しは、最も顕著な蛍光シグナルを示した。図 28 C は、C y 5 色素のプレートリーダーでの励起波長と発光波長の様々な組み合わせの未加工の蛍光をプロットする。同様のアッセイ条件下では、AF 594 は C y 5 よりも強いシグナルを示すが、C y 5 は機能的である。C y 5 の最適な励起波長と発光波長は、それぞれ 643 nm と 672 nm であることが示されている。

【0185】

図 29 A から 29 F は、本明細書に記載されるように、特定の構成要素が固定化される複合体形成ステップの最適化の結果を提示する。各図では、未加工の蛍光が時間 (分) に対してプロットされている。図 29 A から 29 C は、複製 1 の結果を示す。図 29 D から 29 F は、複製 2 の結果を示す。図 29 A 及び 29 D では、レポーター及び g R N A が固定化されている。図 29 B 及び 29 E では、すべての構成要素が溶解している。図 29 C 及び 29 F では、レポーター及び g R N A が固定化され、C a s 12 及び標的が同時に添加される。

【0186】

図 30 A から 30 B は、g R N A /レポーター結合時間とレポーター濃度を含む固定化最適化の結果を提示する。図 30 A は、経時的な表面反応の上清の測定値であり、蛍光の低下を示し、したがってストレプトアビジン表面によるビオチン化色素レポーターの取り込みを示している。この実施形態では、15 分の結合時間で十分であることが判明した。

【0187】

いくつかの実施形態では、g R N A が修飾される。いくつかの実施形態では、修飾 g R N A は、表面上への固定化のためにリンカー分子で修飾される。図 31 A から 31 C は、修飾された g R N A の標的識別を示す結果を提示する。

【0188】

いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、表面の修飾のために修飾される。いくつかの実施形態では、レポーターは表面の固定化のために修飾される。これらの実施形態では、固定化されたgRNA、または固定化されたレポーター、またはそれらの組み合わせが、プログラム可能ヌクレアーゼを含む診断アッセイに参与する。図32Aから32Eは、ビオチン修飾Cas13a gRNAの機能性を実証する結果を提示する。各図では、未加工の蛍光が分単位の時間に対してプロットされ、破線のつながりが、標的が存在するときのデータを表し、境界のつながりのスペckルの量が少ない細い実線は、標的が存在しないときを表す（標的対照がない場合、またはNTC）。図32A及び32Bは、ビオチン修飾レポーターであるmod023及び非ビオチン修飾レポーターであるR003の溶液の結果をそれぞれ示す。いくつかの実施形態では、ビオチン修飾gRNAは、溶液中の非ビオチン修飾gRNAと同様の能力を有する。図32Cは、ビオチンで修飾され、表面に固定化されたgRNAの結果を示す。図32Dは、ビオチンで修飾されていないが、図32Cと同じ方法で表面に堆積されたgRNAの結果を示す。図32Eは、図32Aから32Dと同様で、非修飾及び溶液の中のgRNAの結果を示す。これらの結果を総合すると、ビオチン修飾と表面固定化により機能性が維持され、DETECTRアッセイの能力に悪影響がないことが示された。

10

【0189】

いくつかの実施形態では、生体分子が表面に固定化される。一部の実施形態では、この表面は、ガラスであった。図33は、試験レポーターRep072及び陰性対照Rep106の結果を示す。5µMでのRep072の複製は最も強いシグナルを示し、1µMの濃度でのRep072の3つの複製が、次に強いシグナルを示す。陰性対照レポーター、rep106は、5µMと1µMの両方の濃度で同じ低いシグナル（まったくシグナルなし）を示す。この結果は、5µMと1µMの両方の濃度で30分のインキュベーション時間でのFAMビオチン化レポーターの特異的結合を示している。図34Aから34Bは、図34Aにおける5mMの濃度、及び図34Bにおける2.5mMの濃度でのレポーターによる同様の結果を示す。図34A及び34Bの一番上の行は、明るい蛍光を示すスポットを示し、図34A及び34Bの一番下の行は、同様に低い蛍光を示すスポットを示している。

20

【0190】

錯化混合物の実施形態を調製するための実験パラメータは、図35に見られる。

30

【0191】

いくつかの実施形態では、蛍光クエンチャーベースのレポーターが固定化DETECTRアッセイで使用される。図36は、いくつかの実施形態で使用されるレポーターの配列及び他の詳細を示す。いくつかの実施形態では、レポーターrep072、rep104、rep105、rep117及びrep118が、リーダープレートへの結合に使用される。レポーター結合の詳細及び複合体化混合パラメータは、いくつかの実施形態に対し、図37A及び図37Bにそれぞれ見られる。

【0192】

gRNA、レポーター及びCASタンパク質とは対照的に、gRNA及びレポーターの両方がプレートに結合される様々な実施形態が本明細書に記載される。これにより、gRNAとCASタンパク質の前複合体で表面を機能化する必要がなくなり、製造プロセスが容易になる。さらに、より厳密な洗浄を可能にすることで、より高い特異度を実現できる。この実施形態の実験計画及びこの実施形態におけるレポーターをプレートに結合させるための条件は、それぞれ図38A及び38Bに見られる。mod018（5'ビオチン-TEG R1763 SARS-CoV-2 N遺伝子）及びR1763 CDC-N2-Wuhanの複合体化反応は、図39Aに示す条件に従って特定の実施形態のために調製された。実施形態のための完全複合体化混合物の2つのセットが、図39Bに見られる。

40

【0193】

本明細書に記載されるのは、DETECTR反応のための固定されたレポーターの標的識別を実証する様々な実施形態である。このような実施形態の実験計画を図40Aに示し

50

、レポーター結合条件を図 4 0 B に示す。反応条件を図 4 1 A 及び 4 1 B に示す。P C R 条件を図 4 2 に示す。

【0194】

いくつかの実施形態では、空気圧ポンプがカートリッジと連動する。いくつかの実施形態では、上から見下ろした見え方で示されているように、デバイスの図 4 3 の中央には、リザーバーを含み得る最上層を有するカートリッジを含み得る。図 4 3 の下部に示されているように、デバイスは、サンプルを収容するスライディング弁を含んでもよい。いくつかの実施形態では、デバイスは、左側に示される溶解チャンバ、右側の増幅チャンバ、及びさらに右側の検出チャンバを含み得る。

【0195】

いくつかの実施形態では、D E T E C T R アッセイデバイスは、図 4 4 に見られるようにスライディング弁を含んでもよい。いくつかの実施形態では、チャンネルのオフセットピッチは、各ウェルへの個別の吸引及び分注を可能にし、増幅チャンバと対応するチャンバとの間のクロストークを軽減するのに役立つ。いくつかの実施形態では、サンプルは、図 4 5 に見られるようにスライディング弁デバイスを通して移動する。

【0196】

いくつかの実施形態では、N H S - アミン化学が D E T E C T R 構成要素の固定化に使用される。図 8 3 は、g R N A とレポーターの固定化を組み合わせた概略図、及びそのような実施形態の結果を示す。この実施形態では、機能的 D E T E C T R 反応は、第 1 級アミン修飾レポーター及び g R N A を使用して固体基板（N H S プレート）に固定化された。示されている例では、修飾されたレポーター（r e p 1 1 1）が、非修飾の c r R N A（R 1 7 6 3）または修飾された c r R N A（m o d 0 2 7）と組み合わせて表面に結合された。これらの核酸を表面でインキュベートした後、表面を 3 回洗浄し、次いで C a s 1 2 M 0 8 に標的 d s D N A を加えた。次いで、固定された D E T E C T R 反応物を、蛍光を連続的にモニターしながら、プレートリーダー内で 3 7 ° C で 6 0 分間インキュベートした。

【0197】

図 8 4 は、非特異的結合を低減するための最適化コンジュゲーション緩衝液を含む様々な実施形態の結果を提示する。いくつかの実施形態では、結合試験を実施するための緩衝液として、1 × コンジュゲーション緩衝液 3（C B 3）が選択された。C B 3 がアミン修飾レポーター（r e p 1 1 1）の結合を改善し、N H S に共有結合しないはずのビオチン化レポーター（r e p 1 1 7）の結合を減少させることが判明した。いくつかの実施形態では、使用した洗浄緩衝液は 1 × M B 3 であった。いくつかの実施形態では、1 × M B 3：2 0 m M の H E P E S、p H 7. 2、2 m M の K O A c、5 m M の M g A c、1 % グリセロール、0. 0 0 1 6 % の T r i i t o n X - 1 0 0 を使用した。いくつかの実施形態では、1 × C B：2 0 m M の H E P E S、p H 8. 0、2 m M の K O A c、5 m M の M g A c、1 % グリセロール、0. 0 0 1 6 % の T r i i t o n X - 1 0 0 を使用した。いくつかの実施形態では、1 × C B 3：1 0 0 m M の H E P E S、p H 8. 0、1 0 m M の K O A c、2 5 m M の M g A c を使用した。

【0198】

いくつかの実施形態では、レポーター + ガイド + C a s 1 2 M 0 8 の異なる組み合わせは固定化されている。図 8 5 は、アッセイの最適化を含む、そのような実施形態の結果を提示する。このような実施形態では、最初にガイド及びレポーターを固定し、続いて C a s 1 2 M 0 8 及び標的を同時に添加すると、十分なシグナルが得られることが見出された。

【0199】

固定化 D E T E C T R アッセイの単一对ノイズ比を改善するために g R N A 及び標的濃度を最適化した結果を図 8 6 に示す。いくつかの実施形態では、図 8 6 の左側に見られるように、レポーターの濃度を 0. 5 μ M で一定に保ちながら、ガイド濃度を増加させる。このような実施形態では、シグナルはあまり変化しない。いくつかの実施形態では、図 8

10

20

30

40

50

6の右側に見られるように、標的濃度を2倍に増加させると、rep135の全体的なシグナルが改善された。さらに、そのような実施形態では、rep135は、rep111と比較してより良好なシグナル強度を示した。2つのレポーターの配列は次のとおりである。rep111: 5AmMC6T//i6-FAMK/TTTTTTTTTTTTTT/3IABkFQ/、及びrep135: 5AmMC12//i6-FAMK/TTTTTTTTTTTTTT/3IABkFQ/。

【0200】

いくつかの実施形態では、DETECTR固定化のためにアミノ修飾が使用される。図87は、そのような実施形態の結果を提示する。各サブプロットについて、未加工の蛍光が時間に対して分単位でプロットされる。4つのサブプロットのそれぞれは、異なる修飾を表す。実線のトレースは標的対照なし(NTC)を表し、破線のトレースは標的-GF676の1:10の希釈を表す。

【0201】

いくつかの実施形態では、SARS-CoV-2を検出するために、迅速なサーモサイクリング及びCRISPR診断が使用される。結果が図88に示される。いくつかの実施形態では、CDCアッセイからのN2プライマーを使用してSARS-CoV-2の迅速な増幅を可能にするポリメラーゼと緩衝液の組み合わせが特定された。そのような実施形態のアッセイは、2つの標的濃度、2コピー/rxnと10コピー/rxnで実施された。いくつかの実施形態では、反応条件は、以下の、98℃で30秒間の初期変性、続いて98℃で1秒及び65℃で3秒からなる45サイクルである。サーモサイクリングの後、アンプリコンをCas12M08検出反応に37℃で30分間移した。最高の能力の酵素/緩衝液の対を図88に示しており、試験された両方の濃度で強いシグナルを示したものであった。

【0202】

様々な濃度で複数の複製を使用して以前に特定された上位の酵素と緩衝液を、FASTRアッセイで検証した。いくつかの実施形態では、以前に開示されたスクリーニング研究で同定された最良の能力の酵素及び緩衝液が使用された。そのような実施形態の結果を図89に示す。そのような実施形態の反応条件は、以下の、98℃で30秒間の初期変性、続いて98℃で1秒及び65℃で3秒からなる45サイクルである。使用したプライマーは、SARS-CoV-2のCDCN2アッセイからのものであった。サーモサイクリングの後、アンプリコンをCas12M08検出反応に37℃で30分間移した。存在するデータは、CRISPR反応からのシグナルである。最高の能力の酵素/緩衝液のペアは、試験された最低濃度で強いシグナルを出し、複製全体で検出されたものであった。

【0203】

いくつかの実施形態では、FASTRアッセイを用いたSARS-CoV-2の単一コピー検出が、図90に示されるように実証されている。いくつかの実施形態では、FASTRアッセイの検出の限界は、反応につき1000コピーのSARS-CoV-2から反応につき1コピーで構成される溶液を使用して評価された。いくつかの実施形態では、反応条件は、以下の、55℃で60秒間の逆転写、98℃で30秒間の初期変性、続いて98℃で1秒間、65℃で3秒間からなる45サイクルである。使用したプライマーは、SARS-CoV-2のCDCN2アッセイからのものであった。サーモサイクリングの後、アンプリコンをCas12M08検出反応に37℃で30分間移した。図90に提示されている存在するデータは、CRISPR反応からのシグナルである。CRISPRアッセイの検出限界は、反応あたり1コピーのSARS-CoV-2であることが判明した。

【0204】

いくつかの実施形態の変形版において、急速サイクル時間を変化させて、FASTRアッセイでの変性、アニーリング/拡張を評価した。そのような実施形態の結果を図91に示す。いくつかの実施形態では、逆転写を55℃で60秒間行い、初期変性を98℃で30秒間行う。いくつかの実施形態では、試験された循環条件は、98℃で1秒間、65℃で3秒間、98℃で2秒間、65℃で2秒間、または98℃で1.5秒間、65℃で1.

5 秒間であった。いくつかの実施形態では、使用したプライマーは、SARS-CoV-2 の CDC N2 アッセイからのものであった。サーモサイクリングの後、アンプリコンを Cas12M08 検出反応に 37℃ で 30 分間移した。図 9 1 に示す結果は、65℃ での > 2 秒の アニリング／拡張時間が、堅牢な感度を得るには必要であることを示している。

【0205】

図 9 2 は、FAST R の RT 時間を最小化するための結果を示す。FAST R アッセイの能力は、温度を 55℃ に保持して逆転写インキュベーション時間を変化させた様々な実施形態について評価された。図 9 2 に示した結果は、30 秒を超える逆転写でアッセイが最も堅牢であることを示している。

10

【0206】

図 9 3 は、より高い pH 緩衝液が FAST R の能力を向上させる結果を示す。いくつかの実施形態では、FAST R アッセイは、pH 9.2 または pH 7.8 の緩衝液を利用する。FAST R アッセイは、これらの緩衝液の pH の値を使用して評価された。図 9 3 に示す結果は、より高い pH 緩衝液が、アンプリコンの収量及び感度に関して優れた結果をもたらしたことを示している。

【0207】

いくつかの実施形態では、FAST R アッセイと粗溶解緩衝液との適合性が調査された。結果を図 9 4 に示し、それにおいて、3 つの行グループがあり、それぞれが上から下までの緩衝液と対照を表す 2 つの副次的な行から各々なっている。緩衝液、VTE5、A3、及び溶出緩衝液は、それぞれ上から下に、対照に対してプロットされる。図 9 4 には、コピー数が左から右に減少することを示す 7 つのサブグループもある。特定の実施形態について、様々な粗溶解緩衝液と組み合わせた場合の FAST R アッセイの能力を評価し、粗溶解緩衝液 VTE5、A3、及び Charge Switch キット (Thermo) からの溶出緩衝液を試験した。特定の実施形態では、FAST R アッセイは VTE5 に対して最良の能力を示したが、A3 緩衝液及び Charge Switch キットからの溶出緩衝液では対照反応 (水) と同様に、わずかに堅牢さに劣る能力であった。

20

【0208】

いくつかの実施形態では、FAST R の最適化されていない多重化が、図 9 5 に示されるように実証された。図 9 5 では、各サブプロットについて未加工の蛍光が y 軸にプロットされ、時間が x 軸にプロットされている。各列は特定の配列を示しており、それぞれ R1965 と R1763 に対して、それぞれ上から下へ、各行は二重、RNase P、N2、及び標的対照なしを表す。いくつかの実施形態では、SARS-CoV-2 及び RNase P POP7 (内因性対照) に対する多重化された FAST R の最初の試験は、一重アッセイが DETECTR において強いシグナルを生成する一方で、二重アッセイは SARS-CoV-2 (R1763) について弱いシグナルを生成し、RNase P (R1965) についてシグナルはほとんど生成しない傾向があることを示した。いくつかの実施形態では、反応条件は、以下の、55℃ で 60 秒間の逆転写、98℃ で 30 秒間の初期変性、続いて 98℃ で 1 秒間、65℃ で 3 秒間からなる 45 サイクルであった。いくつかの実施形態では、SARS-CoV-2 の CDC N2 アッセイからのプライマー、及び M3637/M3638 が使われていた。

30

40

【0209】

本明細書に記載される様々な態様において、FAST R は、図 9 6 に示されるように、多重化検出に使用することができる。プライマー濃度、dNTP 濃度、DMSO の存在／非存在、及びその他の要因などの FAST R 反応の構成要素が、多重 FAST R 反応の能力に影響を与える可能性がある。図 9 8 は、ヒト RNase P POP7 及び SARS-CoV-2 を標的とする多重 FAST R 反応のための 18 の異なる実験条件を示す。図 9 6 において、y 軸の各行は実験試行 1 から 18 を表し、各列は反応中の 30 分の時点での特定の crRNA からの検出シグナルを表す。色は未加工の蛍光の値を表す。いくつかの実施形態では、SARS-CoV-2 及び RNase P のための多重化 FAST R アッセ

50

イは、SARS-CoV-2プライマーのセット（M3257/M3258）を含む。このような実施形態の一連の実験は、緩衝液、プライマー濃度、dNTP、及びDMSOの異なる組み合わせを含む様々な反応条件で実施された。その結果、マルチプレックス反応で堅牢に機能する2つの反応条件が特定された。これらの実施形態のうちの1つである反応4では、条件は1倍のFastBuffer 2、1 uMのRNase Pプライマー、0.5 uMのCoVプライマー、0.2 mMのdNTP、及び2% DMSOからなっていた。別の実施形態である反応9では、条件は、1倍のKlentag 1緩衝液、1 uMのRNase Pプライマー、0.5 uMのCoVプライマー、0.4 mMのdNTP、及び0% DMSOからなっていた。いくつかの実施形態では、通常の反応条件は、55℃で60秒間の逆転写、98℃で30秒間の初期変性、続いて98℃で1秒間、65℃で3秒間からなる45サイクルからなっていた。様々な態様において、許容反応条件は、55℃で60秒間の逆転写、98℃で30秒間の初期変性、続いて98℃で3秒間及び65℃で5秒間からなる45サイクルからなった。

10

【0210】

いくつかの実施形態では、FASTRアッセイは、多重化検出を可能にする。そのような実施形態の検出限界（LOD）の研究の結果を図97に示す。図97において、x軸はウイルスRNAの反応あたりのコピー数を示し、各サブプロットのy軸は特定のcrRNAを識別する。各サブプロットは、反応あたりのヒトRNAのナノグラムを示しており、左から右に濃度が減少している。4番目のサブプロットには、ヒトRNAは含まれず、標的対照なし（NTC）と分類されている。いくつかの実施形態では、最適化された多重化FASTRアッセイが、ヒトRNA及びウイルスRNAの様々な濃度で実行された。いくつかの実施形態では、結果は、アッセイが一定範囲のヒトRNA濃度で実施される一方で、反応ごとに約5コピーの感度を維持したことを示した。特定の態様において、示された結果は、R1965を使用してヒトRNase Pを検出するか、またはR3185（M3309と標識）を使用してSARS-CoV-2を検出するDETECTR反応からのものである。様々な態様では、反応条件は、以下の、55℃で60秒間の逆転写、98℃で30秒間の初期変性、続いて98℃で1秒間、65℃で3秒間からなる45サイクルである。いくつかの実施形態では、使用したプライマーはM3257/M3258（SARS-CoV-2）及びM3637/M3638（RNase P）であった。

20

【0211】

いくつかの実施形態では、主要なプライマー及びgRNAは、図98に列挙される配列を有する。

30

【0212】

サンプル調製と凍結乾燥

本明細書には、サンプルの調製及び試薬保存の様々な方法が記載されている。本明細書に記載のデバイスのいずれも、1つまたは複数のサンプル調製試薬を含むことができる。本明細書に記載のデバイスのいずれも、サンプル調製試薬を乾燥試薬として含むことができる。乾燥試薬は固体及び／または半固体を含み得る。ある場合には、乾燥試薬は凍結乾燥試薬を含んでもよい。本明細書に記載のデバイスのいずれも、1つ以上の凍結乾燥試薬（例えば、増幅試薬、プログラム可能ヌクレアーゼ、緩衝液、賦形剤など）を含み得る。特定の実施例では、方法には、サンプルの溶解、濃縮、及び／または濾過が含まれる。特定の実施例では、方法には、1つまたは複数の凍結乾燥試薬の再構成が含まれる。いくつかの実施形態では、凍結乾燥試薬は、凍結乾燥ビーズ、球体、及び／または微粒子の形態であり得る。いくつかの実施形態では、凍結乾燥ビーズ、球、及び／または微粒子は、単一または複数の化合物のいずれかを含み得る。いくつかの実施形態では、凍結乾燥ビーズ、球、及び／または微粒子は、様々な水分レベルまたは吸湿性に調整できる。いくつかの実施形態では、凍結乾燥ビーズ、球、及び／または微粒子は、アッセイ内部標準を含む場合がある。いくつかの実施形態では、凍結乾燥ビーズ、球、及び／または微粒子は、直径約0.5ミリメートルから約5ミリメートルの間の直径を有し得る。

40

【0213】

50

本明細書には、サンプル調製及び凍結乾燥の最適化を含む D E T E C T R 反応の様々な実施形態が記載されている。そのような実施形態は、基質を結合するための緩衝液を適合させて、濃縮ステップを実施することを可能にする。いくつかの実施形態では、異なる成分を有する緩衝液の溶解（サンプルをアッセイで直接評価する）及び結合（サンプルを磁気ビーズから溶出させる）特性を評価するために実験を行うことができる。そのような実施形態では、投入サンプルは、溶出サンプルと同じ濃度である。強い溶菌活性だが、最小限の結合／濃度の潜在性を示す結果が図 4 6 に示されている。そのような実施形態の緩衝液 a 1、a 3、及び潜在的に a 1 1 は、許容可能な結合活性を示す。そのような実施形態の緩衝液 a 5 は、溶解及び結合の両方に対して中程度の活性を示し、緩衝液 a 2 はいずれの活性にも適していない。

10

【 0 2 1 4 】

いくつかの実施形態では、C a s 1 4 a . 1 を用いたワンポットアッセイで粗溶解緩衝液を使用する。結果は図 4 7 に見ることができる。

【 0 2 1 5 】

いくつかの実施形態では、酵素 C a s 1 2 M O 8 が D E T E C R アッセイで使用される。一部の実施形態では、C a s 1 2 M O 8 の配列は、

```

MKKIDNFVGCYPVSKTLRFKAIPIGKTQENIEKKRLVEEDEVRADYKAVKKLIDRYHR
EFIEGVLDNVKLDGLEEYYMLFNKSDREESDNKKIEIMEERFRRVISKSFKNNEEYKKIFS
KKIIEEILPNYIKDEEEKELVKGFGFYTA FVGYAQNRENMYSDKKSTAI SYRIVNENM
PRFITNIKVF EKA KSILDVDKINEINEYILNNDYYVDDFFNIDFFNYVLNQKGIDIYNAIIG
GIVTGDGRKIQGLNECINLYNQENKKIRLPQFKPLYKQILSESESMSFYIDEIESDDMLID
MLKESLQIDSTINNAIDDLKVL FNNIFDYDL SGIFINNGLPITTISNDVYGQWSTISDGWNE
RYDVL SNAKDK ESEK YFEKRRKEYKKVKSFSISDLQELGGKDL SICKKINEIISEMIDDYK
SKIEEIQYLF DIKELEKPL VTDLNKIELIKNSLDGLKRIERYVIPFLGTGKEQNRDEVFYGY
FIKCIDAIKEIDGVYNKTRNYLTKKPYSKDKFKLYFENPQLMGGWDRNKESDYRSTLLR
KNGKYYVAIIDKSSSNMNMNIEEDENDNYEKINYKLLPGPNKMLPKVFFSKKNREYFAP
SKEIERIYSTGTFFKDTNFVKKDCENLITFYKDSLDRHEDWSKSFDFSFKESSAYRDISEF
YRDVEKQGYRVSFDLLSSNAVNTLVEEGKLYLFQLYNKDFSEKSHGIPNLHTMYFRSLF
DDNNKGNIRLNGGAEMFMRRASLNKQDVTVHKANQPIKNKNLLNPKKTTTTLPYDVYK
DKRFTEDQYEVHIPITMNKVPNNPYKINHMVREQLVKDDNPYVIGIDRGERNLIYVVVV
DGQGHIVEQLSLNEIINENNGISIRTDYHTLLDAKERERDES RKQWKQIENIKELKEGYIS
QVVHKICELVEKYDAVIALEDLNSGFKNSRVKVEKQVYQKFEKMLITKLNYMVDKKK
DYNKPGGV LNGYQLTTQFESFSKMGTQNGIMFYIPAWLTSKMDPTTG FVDLLKPKYKN
KADAQKFFSQFDSIRYDNQEDAFVFKVNYTKFPRTDADYNKEWEIYTNGERIRVFRNPK
KNNEYDYETVNVSERMKELFDSYDLLYDKGELKETICEMEESKFFEELIKLFRLTLQMR
NSISGRTDVDYLISPVKNSNGYFYNSNDYKKEGAKYPKDADANGAYNIARKVLWAIEQ
FKMADEDKLDKTKISIKNQEWLEYAQTHCE*

```

20

30

40

である。＊は、終止コドンを示す。

【 0 2 1 6 】

50

図48は、LANCR (Cas12MO8 DETECTOR) アッセイのサンプル調製の最適化を含む対照研究の結果を示す。そのような実施形態では、粗溶解は25 μ Lのサンプル+25 μ Lの溶解緩衝液及び25 $^{\circ}$ Cで1分間のインキュベーションを含む。いくつかの実施形態では、LANCR反応は、以下の、25 μ Lの反応体積の5 μ Lのサンプル（標準条件）のように実行される。いくつかの実施形態では、DETECTOR反応は、以下の、20 μ Lの反応体積中の2 μ LのLANCR生成物（標準条件）のように行われる。サンプル：250コピー／rxnのSeraCare。

【0217】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥能力について2群の条件を評価した。一実施形態では、グループIのトレハロースが使用される。図49Aから49Bは、RTLAMPアッセイを使用したグループ1の凍結乾燥最適化結果を示し、RTLAMPアッセイの使用を図49Aに示し、DETECTORアッセイは、図49Bに見られる。

10

【0218】

別の実施形態では、PVP40、ソルビトール、マンニトール、及びマンノッセを含むグループIIが使用されている。図50Aから50Bは、図50Aに示される候補賦形剤の3から8%のRTLAMPを使用して評価されたグループ2の図50Bに見られるように、DETECTORアッセイ条件を使用したグループ2の凍結乾燥最適化の結果を提示する。

【0219】

図51Aから51Bは、グループ2の実施形態、すなわちPVP40、ソルビトール、マンニトール、マンノースについて、3から5%の候補賦形剤と共にDETECTOR Mを使用した凍結乾燥最適化結果を示す。

20

【0220】

いくつかの実施形態では、反応速度を制御するためにトレハロースが使用される。図52は、RTLAMP反応成分及び様々なパーセンテージのトレハロースが使用された、そのような実施形態を含む研究からの結果を提示する。

【0221】

図53Aから53Bは、DETECTOR反応成分及びトレハロースが使用される実施形態を含む研究の結果を提示する。サブプロットが一番上の行は、液体バルク溶液中のトレハロースのパーセンテージを増加させた結果を示している。下の行は、凍結乾燥粉末形態でトレハロースを増加させた結果を示している。そのような実施形態では、一次乾燥は90時間続き、充填量は2mLバイアル中250 μ Lであり、250 μ Lの水で再構成され、二次乾燥は6時間で、温度勾配は毎分0.5 $^{\circ}$ Cである。

30

【0222】

本明細書に記載されるのは、DETECTORアッセイを実行するための様々な方法及びデバイスである。いくつかの実施形態では、DETECTORアッセイは、Cas12MO8タンパク質を利用する。いくつかの実施形態では、試薬のRTLAMP及びDETECTORマスターミックスは、同じ合わせたマスターミックス中で凍結乾燥される。いくつかの実施形態では、試薬及び標的のRTLAMP及びDETECTORマスターミックスは、同じ合わせたマスターミックス中で凍結乾燥される。図99Aは、ワンポットRTLAMPアッセイの結果を提示する。いくつかの実施形態では、ワンポットは、1つのサンプル中のRTLAMP及びDETECTOR反応試薬の両方の組み合わせを指す。図99Bは、Cas12MO8ベースのDETECTORアッセイの結果を提示する。左側のy軸は未加工の蛍光をプロットする。x軸は時間を分単位でプロットする。サブプロット1は、マスターミックスが凍結乾燥されておらず、賦形剤が含まれていない場合の結果を示している。サブプロット2は、マスターミックスが凍結乾燥されていないが、賦形剤が含まれている場合の結果を示している。いくつかの実施形態では、賦形剤を使用して、凍結工程及び乾燥ステップを含む凍結乾燥プロセス全体で試薬の安定性を確認する。いくつかの実施形態では、賦形剤は糖である。いくつかの実施形態では、賦形剤は、図105に列挙された化合物の1つまたは複数を含む。図99Aのサブプロット7及び11は、賦形剤

40

50

トレハロース及びラフィノースを含有するマスターミックスの実施形態の結果を提示し、ここで、トレハロース及びラフィノースは、右側の y 軸に記載されているように、様々なパーセンテージで含まれる。サブプロット 7 は、10%トレハロース及び3%ラフィノースの混合の結果を提示する。サブプロット 11 は、10%トレハロースと5%ラフィノースの混合の結果を提示する。サブプロット 8 は、10%ラフィノースと3%トレハロースの混合の結果を提示する。サブプロット 12 は、10%ラフィノースと5%トレハロースの混合物のデータを示す。

【0223】

いくつかの実施形態では、RT-LAMPアッセイ及びDETECTRアッセイの両方からの試薬及び標的を、1つのサンプルで凍結乾燥した。図99Bは、Cas12M08ベースのDETECTRアッセイを実行したそのような実施形態の結果を示し、図99Aについて説明したので、解釈することができる。

【0224】

いくつかの実施形態では、サンプル混合物は複数の標的分子を含む。いくつかの実施形態では、サンプル混合物は、核酸標的の複数のコピーを含む。いくつかの実施形態では、核酸標的の1000コピー(cps)が1つのサンプル中に存在する。図99Aから99Bの右側の凡例では、において、「1000cps」は、標的の1000コピーを指し、実線として表される。NTCは標的対照なしを指し、大きな破線で表される。図99Aから99B、100、101、102Aから102B、及び103のすべてのデータ系列の境界を示す細い実線は、データセットの境界を表す。さらに、いくつかの実施形態では、「混合反復」はマスターミックスの形態を指し、「液体」は凍結乾燥されていないマスターミックスを指し、実線で表され、「Lyophilized」は凍結乾燥されたマスターミックスを指し、小さな破線として表される。

【0225】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥後にアッセイ試薬のマスターミックスを再構成する。いくつかの実施形態では、凍結乾燥後にDETECTRアッセイ試薬のマスターミックスを再構成する。いくつかの実施形態において、Cas12M08タンパク質を含むDETECTRアッセイ試薬のマスターミックスは、凍結乾燥後に再構成される。いくつかの実施形態において、Cas12M08タンパク質を含む、増幅及びDETECTRアッセイ試薬のマスターミックスは、凍結乾燥後に再構成される。いくつかの実施形態において、Cas12M08タンパク質を含むRT-LAMP及びDETECTRアッセイ試薬のマスターミックスは、凍結乾燥後に再構成される。再構成された凍結乾燥されたCas12M08 DETECTRマスターミックスの結果が図100に示されている。左側の y 軸は未加工の蛍光をプロットする。x 軸は時間を分単位でプロットする。サブプロット A には、グリセロールコントロール(10001)、IB1緩衝液(10003)、及び水(10002)の結果が含まれており、賦形剤は存在しない。サブプロット B には、ワンポットコントロールの結果が含まれている。サブプロット G は、10%トレハロースと3%ラフィノースを含むサンプルの結果を示す。サブプロット K は、10%トレハロースと5%ラフィノースを含むサンプルの結果を示す。サブプロット H は、それぞれラフィノースとトレハロースが10%と3%、及びサブプロット L は、それぞれ10%と5%のラフィノースとトレハロースを示している。太字の実線は、IB1反応緩衝液を使用した一連の実験を示している。細い実線は、図99Aから99B(9901)を見ると、IB1緩衝液を表す太い実線の両側にあり、データの境界を示している。

【0226】

図101は、Cas14a1ベースのDETECTRアッセイの結果を示す。左側の y 軸は未加工の蛍光をプロットする。x 軸は時間を分単位でプロットする。サブプロット A は、標的としてRT-LAMPプールを含む非凍結乾燥コントロールマスターミックスの結果を示し、データ境界の斑点のある背景を持つ実線として表示される。背景が斑点のある細い実線のつながりには、標的が存在しない非凍結乾燥コントロールが含まれている。サブプロット E、F、H、及び I は、RT-LAMPプールを標的として、マスターミ

ックスの結果を示す。標的として R T - L A M P プールを使用した凍結乾燥マスターミックスは実線で表され、非凍結乾燥マスターミックスは斑点のある背景のつながりの細い実線で表される。標的のない凍結乾燥マスターミックスは太線のつながりで表され、標的のない凍結乾燥されていないサンプルは斑点のある背景のつながりの細い実線で表される。さらに、サブプロット E には賦形剤 10 %トレハロースと 3 %ラフィノースを含有する。サブプロット H には 10 %のトレハロースと 5 %ラフィノースが含まれる。サブプロット F には 10 %のラフィノースと 3 %トレハロースが含まれ、サブプロット I には 10 %のラフィノースと 5 %トレハロースが含まれる。

【0227】

いくつかの実施形態において、1つのアッセイのための試薬及び標的のマスターミックスは凍結乾燥される。いくつかの実施形態では、2つ以上のアッセイからのマスターミックスがプールされ、凍結乾燥される。いくつかの実施形態では、混合と凍結乾燥の間にある期間が生じる。図 102 A 及び図 102 B は、R T - L A M P 及び C a s 1 2 M 0 8 ベースの D E T E C T R アッセイの両方のマスターミックスがそれぞれ作製され、一緒に混合され、凍結乾燥前に 2 週間保存された実施形態の結果を提示する。図 102 A のサブプロットは、賦形剤を含まず、凍結乾燥されていないが、R T - L A M P アッセイを実行する直前に調製されたサンプルの結果を示している。サブプロット 2 は、賦形剤を含まず、最初の調製から 2 週間後に凍結乾燥したサンプルの結果を示している。図 102 A のサブプロット 7、8、11、12、15 及び 16 は、軸上に記載された様々なタイプ及び量の賦形剤を含有するサンプルについての結果を示す。各色の線は、3つの複製の1つを表す。実線はサンプルあたり 1000 コピーの標的の濃度を表し、破線は標的を含まない。図 102 B は、同じサンプルのアリコートで実行された D E T E C T R アッセイについての同様の結果を示す。

【0228】

いくつかの実施形態では、2つ以上のアッセイからの試薬の凍結乾燥マスターミックスは、1 mL 未満の容量で調製される。いくつかの実施形態では、2つ以上のアッセイからの試薬の凍結乾燥マスターミックスは、250 μ L 未満の容量で調製される。いくつかの実施形態では、2つ以上のアッセイからの試薬の凍結乾燥マスターミックスは、25 μ L 未満の容量で調製される。いくつかの実施形態では、2つ以上のアッセイからの試薬の凍結乾燥マスターミックスは、10 μ L 未満の容量で調製される。図 103 は、容量 25 μ L での凍結乾燥反応の結果を提示する。サブプロット A、B、C は、R T - L A M P アッセイの結果を示している。サブプロット A は、賦形剤を含む凍結乾燥サンプルの R T - L A M P の結果を示している。ここで、実線は標的のサンプルあたり 500 コピーのサンプルを表し、破線は標的対照なしを表す。サブプロット B は、賦形剤のない凍結乾燥サンプルの結果を示している。ここで、実線は標的のサンプルあたり 500 コピーのサンプルを表し、破線は標的対照なしを表す。サブプロット C は、賦形剤を含まないサンプルの結果を示している。サブプロット D、E、及び F は、C a s 1 2 M 0 8 ベースの D E T E C T R アッセイの結果を示している。サブプロット G、H、及び I は、C a s 1 4 ベースの D E T E C T R アッセイの結果を示している。両方のアッセイについて、実線は、R T - L A M P アッセイで使用されたのと同じ標的を持つサンプルの結果を示し、3つの複製がある。破線は、標的対照なしを表す。

【0229】

いくつかの実施形態において、アッセイ試薬の凍結乾燥マスターミックスは、動的走査熱量測定 (D S C) によって分析される。図 104 は、そのような実施形態について摂氏温度での熱流対温度をプロットする。いくつかの実施形態では、そのような測定は、凍結乾燥プロセス、特にフリーズドライステップ全体にわたるマスターミックスの品質の尺度を提供する。いくつかの実施形態では、D S C 測定により、サンプルの長期安定性を示すことができるガラス転移温度が得られる。

【0230】

いくつかの実施形態では、賦形剤は、凍結及び乾燥ステップを含み得る凍結乾燥プロセ

ス全体にわたってサンプルを安定化するために使用される。図105は、賦形剤のリストと各賦形剤の主要／副次的な状態、機能、DSCによって決定される凍結温度 (T_f)、DSCによって決定される臨界温度 ($T_{critical}$)、及び事象を示している。いくつかの実施形態では、 $T_{critical}$ は、サンプルが完全に凍結することを確実にするために必要な温度である。

【0231】

いくつかの実施形態において、酵素及び試薬の吸湿性は、凍結乾燥能力を改善するために最適化される。

【0232】

単一反応容量 (ワンポット) での Cas14a DETECTORを用いた LAMP 増幅
本明細書に記載されるのは、単一の反応容量におけるサンプル増幅及び検出の様々な方法である。本明細書に記載のデバイスのいずれも、デバイス内の同じウェル、チャンバ、チャンネル、または容量内で増幅及び検出を行うように構成することができる。特定の実施例では、方法は、同じ容量での同時増幅及び検出を含む。特定の実施例では、方法は、同じ容量での順次増幅及び検出を含む。いくつかの実施形態では、サンプル増幅は、LAMP 増幅を含み得る。

【0233】

図54Aから54Bは、単一反応容量 (ワンポット) における Cas14a DETECTORによる LAMP 増幅を含む Hot Potの実施形態についての結果を提示する。このような実施形態では、Cas14は、標準的な LAMP 条件においてワンポットとして機能しない。いくつかの実施形態では、Cas14aは、DNAポリメラーゼとして Klenow (exo-) を使用して、50℃で Low LAMPを使用するワンポット反応で機能できるかどうかを調べるために試験された。(a) DNA結合色素である SYTO9からのシグナルは、LAMPによるDNAの生成を示す。Low LAMPが3つの異なる緩衝液で Cas14の存在下でDNAアンプリコンを生成できることが確認された。(b) (a)に示すワンポット反応条件での Cas14 FQレポーターからのシグナルである。DNAが生成されたにもかかわらず、ワンポット反応ではシグナルは検出されなかった。この実施形態について、結果は、LAMP反応において Cas14が阻害されることを示唆している。

【0234】

いくつかの実施形態では、RT-LAMPは、Klenow (exo-) または Bsuポリメラーゼ、Low LAMPを使用することによって低温で行うことができる。RT-LAMPは通常、55℃から70℃の温度で実行される。結果は図55に見ることができる。この温度範囲は、使用するポリメラーゼの影響を受ける。標準的な RT-LAMPでは、55℃以上でピーク活性を示す Bstまたは Bsmポリメラーゼが使用される。この実施形態では、37℃から50℃の温度での RT-LAMPの能力である。Klenow (exo-) 及び Bsuポリメラーゼを使用することにより、SARS-CoV-2のRNA標的に対して40℃という低温で、機能する RT-LAMPが評価され、実証された。この実施形態では、4つの異なる緩衝液におけるこれらの酵素の能力が試験され、Klenow (exo-) のピーク活性は50℃で観察され、Bsuのピーク活性は45℃であった。いくつかの実施形態では、この方法は、標準 RT-LAMPよりも低い温度で機能するため、Low LAMPと呼ばれる。

【0235】

Cas14a1配列は、

10

20

30

40

50

MAKNTITKTLKLRIVRPYN SAEVEKIV ADEKNNREKIALEKNKDKVKEACSKHLKVAA
YCTTQVERNACLFCKARKLDDKFYQKLRGQFPDAVFWQEISEIFRQLQKQAAEIYNQSL
IELYYEIFIKGKGIANASSVEHYLSDVCYTRAAELFKNAAIASGLRSKIKSNFRLKELKNM
KSGLPPTTKSDNFPIPLVKQKGGQYTGFEISNHNSDFIIPFGRWQVKKEIDKYRPWEKFD
FEQVQKSPKPISLLLSTQRRKRNRK GWSKDEGTEAEIKKVMNGDYQTSYIEVKRGSKIGE
KSAWMLNLSIDVPKIDKGVDPSIIGGIDVG VKSPLVCAINNAFSRYSISDNDLFHFNKKM
FARRRILLKKNRHKRAGHGAKNKLKPITILTEKSERFRKKLIERWACEIADFFIKNKVGT
VQMENLESMKRKEDSYFNIRLRGFWPYAEMQNKIEFKLKQYGIEIRKVAPNNTSKTCSK
CGHLNNYFNFEYRKKNKFP HFKCEKCNFKENADYNAALNISNPKLKSTKEEP

である。

【0236】

いくつかの実施形態では、R1518として知られる *tracrRNA* が使用され、システムにとって天然であり、

CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUA
GAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUC
UUCGGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUU

の配列を有する。

【0237】

いくつかの実施形態では、Cas14a.1は、*tracrRNA* 及び *crRNA* の2つのRNA成分を使用する。いくつかの実施形態では、この系で生じる天然の *crRNA* リピートが使用される。

【0238】

いくつかの実施形態では、使用される *crRNA* は以下である。

【0239】

GUUGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGAAUGCAACCC
CCAGCGCGUUCAGCGUUCの配列を有するR3297-SARS-CoV-2 N遺伝子。

【0240】

GUUGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGAAUGCAACGCG
CGAUAAUGAUGUAGGGAUの配列を有するR3298-マンモス。

【0241】

GUUGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGAAUGCAACUG
GCACUGAGAAUUUGACUAの配列を有するR4336-SARS-CoV-2。

【0242】

GUUGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGAAUGCAACUA
CAAGUGCCUGUAGGUUAUAの配列を有するR4783-OC43。

【0243】

いくつかの実施形態では、Cas14a及び低温RT-LAMP (LowLAMP) と適合する緩衝液が同定された。結果が図56Aから56Bに示される。この実施形態では、LowLAMP及びCas14aは、異なる緩衝液中で最適に機能することが見出された。この実施形態では、LowLAMPに最適な緩衝液 (IB1、IB13、IB14)

10

20

30

40

50

及び Cas 14 a に最適な緩衝液 (A 3、H 2、T M) 中の 50℃での Low LAMP の能力を、同じ 50℃の緩衝液での Cas 14 a の能力と同様に評価した。図 56 A から 56 B の結果は、Low LAMP 及び Cas 14 a の両方が Low LAMP 最適緩衝液で機能するが、Cas 14 a が緩衝液 I B 14 と最も適合することを示す。この作業により、等温増幅と Cas 14 a D E T E C T R の両方に対応する緩衝液条件の識別が可能になり、ワンポット反応に向けた重要なステップとなる。

【0244】

いくつかの実施形態では、プライマー及び d N T P は、図 57 に示される結果に見られるように、Cas 14 の能力に対して最大の阻害効果を有する。ここでは、Cas 14 の能力に対する Low LAMP の個々の成分の影響をテストして、ワンポット反応を試みたときに見られる阻害の原因となる成分を特定した。各成分を 1 n M の標的 d s D N A と共に Cas 14 a 反応に添加し、反応を 50℃で 60 分間行なった。結果は、プライマーと d N T P が LAMP の阻害に寄与することを示している。

【0245】

いくつかの実施形態では、LAMP は、図 58 に示されるように、d N T P 及びプライマーの濃度がより低い場合に機能する。いくつかの実施形態では、LAMP 中の d N T P 及びプライマーの両方が、Cas 14 に対して阻害効果を有する。この実施形態では、低濃度の d N T P 及びプライマーの能力を試験して、50℃で K l e n o w (e x o -) を使用して Low LAMP の能力への影響を調べた。この実施形態では、結果は結果までの時間を示し、値が低いほど増幅が速いことを示す。(a) d N T P の滴定は、Low LAMP が 0.8 m M の d N T P まで機能することを示している。この実施形態では、アッセイの能力は、標準の 1.4 m M に対して 1.2 m M 以下で改善された。(b) Low LAMP でのプライマーの滴定である。このアッセイの結果は、0.5 倍未満のプライマーが阻害効果を持つ可能性があることを示している。これらの結果を合わせると、Low LAMP の能力に悪影響を与えることなく d N T P とプライマーの濃度を下げることができ、観測された Cas 14 の阻害を緩和するのに役立つ可能性があることが示唆される。

【0246】

いくつかの実施形態では、Low LAMP を有するワンポット Cas 14 を 50℃で試験した。このような実施形態では、Cas 14 及び K l e n o w (e x o -) D N A ポリメラーゼを使用する 50℃での Low LAMP を使用するワンポット D E T E C T R は、図 59 A から 59 B に見られるように機能的であることが示された。この実施形態では、より低いプライマー及び d N T P 濃度が試験された。他の実施形態は、Cas 14 が標準の 1.4 m M 及び 1 倍のプライマー濃度で阻害されることを示唆している。(a) Cas 14 a ワンポットからのシグナルである。この実施形態では、Cas 14 を使用するワンポット D E T E C T R 反応は、Low LAMP によって生成されたアンプリコンを標的とする S A R S - C o V - 2 N 遺伝子 c r R N A と複合化されるか、またはマムーサス・プリミゲニウス (M a m m u t h u s p r i m i g e n i u s) の m t D N A の遺伝子を標的とする非標的 c r R N A と複合化された。この実施形態からの結果は、標的 R N A 及びアンプリコンを標的とする c r R N A を用いて行った反応においてのみシグナルを示した。標的が存在しないとき、または Cas 14 c r R N A がマンモス (M a m m u t h u s) 遺伝子を標的にしているとき、シグナルは見られなかった。(b) LAMP による目的の標的の生成を確認するために、ワンポット反応で生成されたアンプリコンを、S A R S - C o V - 2 N 遺伝子 c r R N A を使用して Cas 12 D E T E C T R 反応で実行した。これらの結果は、標的 R N A が存在するときにアンプリコンが生成されたことを示している。さらに、この結果は、ワンポット反応が 0.8 及び 0.6 m M d N T P では機能するが、この濃度の d N T P での Cas 14 阻害により 1.4 m M d N T P では機能しないことを示している。

【0247】

いくつかの実施形態では、Cas 14 は、One Pot アッセイのためにポリメラーゼ (例えば、B s m D N A ポリメラーゼ、B s t D N A ポリメラーゼ、K l e n o w (

e x o -) D N A ポリメラーゼ、または B s u D N A ポリメラーゼ) (5 5 ° C) と共に使用される。反応温度を 5 0 ° C から 5 5 ° C に上げると、ワンポット反応が速くなる場合がある。ただし、L o w L A M P で使用される D N A ポリメラーゼは 5 5 ° C では機能しないため、ここでは、B s t などの他の L A M P ポリメラーゼよりも 5 5 ° C でより確実に機能する B s m D N A ポリメラーゼを使用した。いくつかの異なる濃度の d N T P とプライマーをテストし、アッセイの能力を評価した。図 6 0 に示す結果は、C a s 1 4 が標的アンプリコン (N 遺伝子) と一致する c r R N A を有するとき、及び標的 R N A が反応中に存在するときに、C a s 1 4 によってシグナルが生成されることを示す。反応速度は 1 m M d N T P で最も速かったが、全体的なシグナルは 0 . 8 及び 0 . 6 m M d N T P を使用した場合よりも低かった。

10

【 0 2 4 8 】

いくつかの実施形態では、H o t P o t と呼ばれるワンポット D E T E C T R 反応の初期の能力を評価した。結果が図 6 1 に示される。この実験では、5 5 ° C で 2 つの異なる D N A ポリメラーゼの検出限界実験を行った。S A R S - C o V - 2 N 遺伝子またはオフターゲット遺伝子のいずれかを標的とする C a s 1 4 c r R N A が実験に含まれていた。S A R S - C o V - 2 R N A ゲノムの 1 0 0 0 、 5 0 0 、 2 5 0 、または 1 2 5 コピー / r x n がテストされた。3 / 3 に対する 1 2 5 コピー / r x n の最低テスト濃度でのアッセイの堅牢な能力が、図 6 1 に示されるように、複製する。

【 0 2 4 9 】

いくつかの実施形態では、検出実験の限界は、5 5 ° C で 2 つの異なる D N A ポリメラーゼで実施した。結果が図 6 2 に示される。これらの実施形態では、S A R S - C o V - 2 N 遺伝子またはオフターゲット遺伝子のいずれかを標的とする C a s 1 4 c r R N A が実験に含まれ、S A R S - C o V - 2 R N A ゲノムの 1 0 0 、 7 5 、 5 0 、 1 0 、または 1 コピー / r x n でのアッセイがテストされた。これらの実施形態では、3 / 3 の複製に対して 1 0 0 コピー / r x n でのアッセイの堅牢な能力が観察された。7 5 コピー以下では、いくつかの複製は現れなかったが、2 / 3 の複製で 1 0 コピー / r x n までの検出が観察された。

20

【 0 2 5 0 】

本明細書に記載の様々な実施形態では、アッセイターンアラウンドタイムは 5 分である。いくつかの実施形態では、アッセイターンアラウンドタイムは 1 0 分である。いくつかの実施形態では、ターンアラウンドタイムは 1 5 分である。いくつかの実施形態では、ターンアラウンドタイムは、約 2 0 分間である。いくつかの実施形態では、ターンアラウンドタイムは、約 3 0 分間である。いくつかの実施形態では、ターンアラウンドタイムは、約 4 0 分間以下である。

30

【 0 2 5 1 】

ワンポット N E C T R : 単一の反応容量での N E A R 増幅 + C a s 1 4 a D E T E C T R

本明細書に記載されるのは、単一の反応容量におけるサンプル増幅及び検出の様々な方法である。本明細書に記載のデバイスのいずれも、デバイス内の同じウェル、チャンバ、チャンネル、または容量内で増幅及び検出を行うように構成することができる。特定の実施例では、方法は、同じ容量での同時増幅及び検出を含む。特定の実施例では、方法は、同じ容量での順次増幅及び検出を含む。いくつかの実施形態では、サンプル増幅は、N E A R 増幅を含み得る。

40

【 0 2 5 2 】

いくつかの実施形態では、N E A R の B s t ポリメラーゼを置換することにより、図 6 3 に示すように低温での S A R S - C o V - 2 検出を可能にすることができる。これらの実施形態では、N E A R プロトコルは、B s t 2 . 0 を使用して、6 0 ° C で S A R S - C o V - 2 からアンプリコンを生成する。このポリメラーゼは 5 5 ° C でも機能するが、能力は低下する。低温での B s u 及び K l e n o w (- e x o) ポリメラーゼの能力を、これらの実施形態について評価した。これらの実施形態では、K l e n o w (- e x o) ポリ

50

メラーゼが55℃及び50℃でロバストな増幅を可能にすることが見出された。図63に示すデータは、NEAR増幅反応後のCas12M08 DETECTORである。いくつかの実施形態では、増幅反応は、1倍のIsoAmp緩衝液+0.5倍のCutSmart緩衝液の混合物で構成された緩衝液中にて示された温度で10分間行われた。この実施形態では、Cas14aが55℃及び50℃でピーク活性を示すが、60℃では示さないことが観察された。

【0253】

いくつかの実施形態では、NEAR増幅は、図64に示されるように、Cas14a最適緩衝液中で機能する。Cas14aに最適な緩衝液は、NEAR増幅に最適な緩衝液よりも塩分が少なく、Mg²⁺が高くなっている。この実施形態では、Cas14aのための2つの緩衝液、1倍のTM緩衝液及び1倍のH2緩衝液におけるNEAR増幅の実施である。この実施形態では、増幅反応は、Nt.BstNBI、OmniscryptRT、M2805 FWD、M2811 REVを用いて、示されたポリメラーゼ、緩衝液、及び反応温度で行われた。図64に示すデータは、産生されたアンプリコンの量を評価するためのCas12M08 DETECTOR反応の結果である。この実施形態について、結果は、TM緩衝液及びH2緩衝液がNEAR増幅に対して機能し得ることを示している。しかし、結果は、反応が最適なNEAR反応よりも約10分の1のアンプリコンを生成していることを示唆している。これは、緩衝液をさらに最適化する余地があることを示している。いくつかの実施形態では、1倍のTM緩衝液、20mMのTricine、pH8.5、2mMのKOAc、100µg/mLのBSA、15mMのMgOAcである。一部の実施形態では、1倍のH2緩衝液、20mMのTris-HCl、pH8.8、2mMのKOAc、0.1%Tween-20、17.5mMのMgOAcである。

【0254】

いくつかの実施形態では、Cas14aは、図65に示されるように、KOAc塩濃度の範囲で機能する。いくつかの実施形態では、Cas14a反応緩衝液（H2緩衝液）は、2mMのKOAcを含有する。いくつかの実施形態では、増幅反応は、最適な効率のためにより高い濃度を必要とする。いくつかの実施形態では、KOAcの濃度を増加させた場合のCas14a DETECTOR反応の能力である。Cas14a DETECTOR反応は、tracrRNA R1518、crRNA R2424を用いて、標的濃度1nM、反応温度50℃で評価した。図65に示す結果は、Cas14aが2から10mMのKOAcで最大に活性であるが、60mMまでしっかりと活性を維持することを示している。70mMのKOAcで、Cas14aの能力が低下し始める。一部の実施形態では、1倍のH2緩衝液は、20mMのTris-HCl、pH8.8、2mMのKOAc、0.1%Tween-20、17.5mMのMgOAcで構成される。

【0255】

いくつかの実施形態では、図66に見られるように、KOAcの濃度が増加すると、Cas14a最適緩衝液におけるNEAR性能が向上する。Cas14a最適反応緩衝液でのNEAR増幅は、最初は、増幅が最適なNEAR緩衝液（1倍のIsoAmp+0.5倍のCutSmart）で実行される場合よりも効率が低いことが見られた。いくつかの実施形態では、Cas14a最適増幅緩衝液（H2緩衝液）のバックグラウンドでのNEAR増幅の能力に対するKOAcの量の増加の影響である。図66に見られるように、結果は、増幅効率を測定するためにNEAR増幅後Cas12M08 DETECTORアッセイがいかに行われるかを示している。結果は、KOAcを最大60mMまで増加させると、生成されるNEARアンプリコンの量が改善されることを示している。2mMから60mMのKOAcが、Cas14aの機能範囲である。一部の実施形態では、1倍のH2緩衝液、20mMのTris-HCl、pH8.8、2mMのKOAc、0.1%Tween-20、17.5mMのMgOAcである。いくつかの実施形態では、図67に見られるように、KOAcの濃度が増加すると、Cas14a最適緩衝液におけるNEAR性能が向上する。

【0256】

いくつかの実施形態について、SARS-CoV-2 遺伝子アンプリコンに対する Cas14a.1 crRNA の能力を図 70 に示す。いくつかの実施形態では、プライマー M2805/M2811 によって生成された SARS-CoV-2 遺伝子 NEAR アンプリコンを標的とするように設計された Cas14a crRNA である。結果が図 68A から 68B に示される。図 68A は crRNA の位置を示す。R1765 及び R1764 は、アンプリコンを標的とする Cas12M08 crRNA である。Cas12M08 の PAM 配列が示されているが、このアンプリコン内で使用する Cas14 の TTT R PAM はない。図 68B は、NEAR アンプリコン（60℃で15分間生成）に対する Cas14a.1 crRNA の能力を示す。テストしたすべての crRNA は、R3960、R3961、及び R3962 からの最小限のバックグラウンドで確実に機能した。

10

【0257】

いくつかの実施形態では、塩の濃度を減少させた IB13 緩衝液中の Klenow (exo-) NEAR アッセイの能力を、図 69 に示すように評価した。これらの実施形態では、標準 NEAR 反応緩衝液は、1 倍の IsoAmp 緩衝液と 0.5 倍の NEBuffer 3.1 の混合物から構成され、最終塩濃度 100mM を与える。これらの実施形態では、塩として様々な濃度の KOAc を有する IB13 緩衝液のバリエーションが試験された。これらの緩衝液のバリエーションにおいて、ポリメラーゼとして Klenow (exo-) を使用する NEAR アッセイを 55℃で20分間行った。生成されたアンプリコンの量を読み取るために、2µL の NEAR アンプリコンで Cas12M08 DETECTR アッセイを実行した。結果は、最高の NEAR 能力は、標準の NEAR 反応緩衝液と同様に 100mM の KOAc を使用した場合であり、生成されるアンプリコンの量は塩が減少するにつれて減少したことを示している。アッセイは、80 から 70mM の KOAc で許容可能な能力を示す。いくつかの実施形態では、IB13 緩衝液は、20mM の Tris-HCl、pH 8.8、10mM (NH₄)₂SO₄、50mM の KOAc、5mM の MgOAc、1% Tween-20、1mg/mL の BSA の組成を有する。

20

【0258】

ワンポット sRCA：単一反応容量での Cas14a DETECTR を使用したローリングサークル増幅

本明細書に記載されるのは、単一の反応容量におけるサンプル増幅及び検出の様々な方法である。本明細書に記載のデバイスのいずれも、デバイス内の同じウェル、チャンバ、チャンネル、または容量内で増幅及び検出を行うように構成することができる。特定の実施例では、方法は、同じ容量での同時増幅及び検出を含む。特定の実施例では、方法は、同じ容量での順次増幅及び検出を含む。いくつかの実施形態では、サンプル増幅は、RCA を含み得る。

30

【0259】

図 70 は、sRCA の概要を示す。このシステムでは、ワンポット RCA + Cas タンパク質反応のコンポーネントを含むシステムに標的核酸が追加される。システムの RCA 部分は、ダンベル型の DNA テンプレート、プライマー、及び DNA ポリメラーゼで構成されている。いくつかの実施形態では、反応の DETECTR 部分は、Cas12 または Cas14 などの Cas タンパク質、RCA によって生成されたアンプリコンを標的とするがダンベル型の DNA テンプレートを標的としない crRNA、及び FQ ssDNA レポーターから構成される。ダンベル DNA テンプレートに結合することができる標的核酸（例えばウイルス RNA）が系に加えられる。標的核酸の塩基は DNA テンプレートと対になる。標的と DNA テンプレート間のより広範な塩基対形成により、ダンベルの内部塩基対形成が破壊され、プライマーの結合部位が開かれる。次に、DNA ポリメラーゼはこのプライマーを使用して RCA を開始できる。いくつかの実施形態では、RCA が進行するにつれて、Cas タンパク質の標的部位を含むアンプリコンが生成される。Cas タンパク質は、crRNA との塩基対形成によってこの部位を認識し、FQ ssDNA レポーターのトランス切断を開始する。いくつかの実施形態では、システムは、他のワンポットアプローチよりも成分が少なく、RT 酵素を必要としない。

40

50

【0260】

いくつかの実施形態では、ダンベルDNAテンプレートのスクリーニングは、図71に示されるように、sRCA能力についてスクリーニングされる。いくつかの実施形態では、RCA用の4つのダンベルDNAテンプレートは、Cas12またはCas14標的部位を含む。これらの実施形態では、DNA結合色素、SYTO9を使用して、これらのダンベルがRCAにおいて様々な温度で1時間機能するかどうかをモニターする。図71に見られる結果は、ダンベル4のみがRCAによるDNAの生成に機能していたことを示している。システムの最高能力は35から45℃で見られた。

【0261】

いくつかの実施形態では、RCA反応の生成物を検出するためのCas14aの能力が、図72に見られるようにモニターされた。他の実施形態では、ダンベル4はRCAにおいて機能的であり、ダンベル1は機能的でないことが示された。いくつかの実施形態では、2μLまたは5μLのRCA反応を、RCAによって生成されたアンプリコンを検出できるがダンベルDNAテンプレートを検出できないcrRNAを含む20μLのCas14a DETECTR反応に添加した。結果は、Cas14aが期待どおりにアンプリコンを検出できること、及び反応に添加するRCAの量が少ないほど能力の向上が見られることを示している。

【0262】

ワンポットアッセイsRCAのいくつかの実施形態では、Cas14が使用される。そのような実施形態の機能上の結果は、図73に示されている。反応は、2つの実施形態として2つの条件で45℃で行った。一実施形態では、DNAテンプレートであるダンベル4は、トリガーオリゴを含まず、他の実施形態では、DNAテンプレートはトリガーオリゴを有する。RCAを開始するトリガーオリゴを含む実施形態では、トリガーオリゴを含まない他の実施形態と比較して、より高いシグナルが観察される。これは、Cas14がワンポット反応でRCAアンプリコンを検出できること、及びsRCA反応がトリガーオリゴの存在によって制御されることを示している。

【0263】

いくつかの実施形態では、トリガーオリゴは、Cas14 One-Pots RCAアッセイのために滴定される。この実施形態では、ワンポットCas14 sRCA反応を開始するのに必要なトリガーオリゴの最小濃度が決定された。図74に示す結果は、sRCA反応を開始するために少なくとも0.5nMのトリガーオリゴが必要であることを示している。

【0264】

いくつかの実施形態では、Cas12M08酵素がワンポットsRCAアッセイで使用する。他の実施形態では、Cas14がワンポットsRCA反応で機能できることが示されている。この実施形態では、Cas12M08もこのアッセイにおいて45℃で機能できることが示された。sRCA反応に含まれるssDNA FQレポーターの切断の結果を図75に示す。このような実施形態の結果は、Cas12M08がワンポットsRCA形式で機能できることを示している。いくつかの実施形態では、ストックトリガーオリゴの濃度は(1)40nMのストック=2nMの最終濃度、(2)20pMのストック=1pMの最終濃度、(3)20fMのストック=1fMの最終濃度である。

【0265】

図76は、Cas13のRCA正のフィードバックの概要を示す。いくつかの実施形態では、Cas13は、RNA標的を認識するようにプログラムされる(g)。ウイルスRNA標的が存在するとき、プライマー(v)の3'末端のブロッキングモチーフが除去される。このブロッキングモチーフを除去した後、プライマーは次いで環状テンプレートを開き、DNAポリメラーゼを使用したRCAによる増幅を可能にし得る。アンプリコンが生成されると、元のRNA(g)と同じ標的配列が生成される。このssDNA標的配列は、そのとき、プライマー(v)から追加のブロックグループを削除するか、蛍光シグナルを生成するFQレポーターを切断することができるCas13によって認識されること

10

20

30

40

50

ができる。このシステムは、Cas13の正のフィードバックループを形成する。

【0266】

図77は、RCAのためのCas13適合DNAテンプレートの評価についての結果を提示する。いくつかの実施形態では、Cas13 ssDNAターゲティング部位を含むRCA用の2つのダンベルDNAテンプレートである。いくつかの実施形態では、DNA結合色素SYTO9を使用して、これら2つのダンベルが30℃のRCAで機能するかどうかをモニターする。2つのテンプレートの能力は、増幅をトリガーするために使用されるプライマーの滴定を監視した。結果は、図77に示すように、ダンベル8ではなくダンベル7がRCAと互換性があることを示している。

【0267】

いくつかの実施形態では、Cas13適合性DNAテンプレートがRCAに使用される。図78は、Cas13適合性DNAテンプレートがRCAにおいて機能的であるかどうかを決定するために、そのような実施形態についての結果を提示する。いくつかの実施形態では、sRCA用の環状DNAダンベルは、ダンベル7として知られるCas13 ssDNA標的部位を有する。いくつかの実施形態では、DNAテンプレートがRCAにおいて、2nMのトリガーオリゴ（sRCAのプライマー）を使用した2つの異なるポリメラーゼで様々な温度で機能するかどうかをモニターするために、DNA結合色素、SYTO9が使用される。図78に示す結果は、ダンベル7が30から55℃の温度でアンプリコンを生成できることを示している。30から55℃でアンプリコンを生成するためのダンベル7の利用からなるそのような実施形態は、One Pot反応におけるCas13酵素の使用を可能にする。

【0268】

いくつかの実施形態では、ワンポットsRCA反応でCas13M26が使用される。図79は、RCAによって生成されたアンプリコンが、Cas13 gRNAによって認識され得るssDNA領域を含む、そのような実施形態についての結果を提示する。反応が進行するにつれて、追加のssDNA標的が生成されるが、活性化されたCas13M26はFQ RNAレポーターを切断してシグナルを生成する。様々な温度でのこの反応の能力が評価され、Cas13M26が30から40℃のRCAアンプリコンのこのssDNA領域を検出できることが示された。これは、Cas13M26の以前に確立された活性温度と一致する。目的の温度での2つの異なるポリメラーゼの能力も比較した。図79に示す結果は、RCAが増幅方法であるワンポット反応においてCas13を使用できること、及びssDNAを検出するCas13の能力がこの実施形態において保持されることを示唆している。

【0269】

CasPin: Cas13 ssDNAターゲティングを活用したCas13の正のフィードバックループ

本明細書に記載されるのは、シグナル増幅の様々な方法である。本明細書に記載のデバイスのいずれも、レポーターがプログラム可能ヌクレアーゼによって切断された後にシグナル増幅を行うように構成され得る。シグナル増幅は、複雑なサンプル中の希少な標的の検出を改善する可能性がある。特定の実施例では、方法は、プログラム可能ヌクレアーゼ（例えば、Cas13）のssDNAターゲティングを活用して、プログラム可能ヌクレアーゼが標的核酸に結合する際に正のフィードバックループを作成して、追加のレポーターを切断し、標的核酸の存在によって生成されるシグナルを増幅することを含む。

【0270】

図80は、CasPinの概要を示す。いくつかの実施形態では、CasPin系は、Cas13の2つの集団を使用する。1つは、ウイルスゲノムなどの目的のRNAを標的とするcrRNAでプログラムされている。他の集団は、ssDNA検出に最適なcrRNAでプログラムされている。いくつかの実施形態では、システムはまた、DNA及びRNAの両方から構成されるヘアピン形状のオリゴを含む。最後に、いくつかの実施形態では、アッセイの結果を読み取るために使用されるFQ RNAレポーターが存在する。C

10

20

30

40

50

a s 1 3 が目的の R N A を検出すると、F Q R N A レポーターまたはヘアピンオリゴの R N A を切断できる。ヘアピンオリゴ上の R N A が切断されると、それは D N A から解離し、C a s 1 3 R N P の他の集団によって認識され得る s s D N A 標的部位が明らかになる。これにより、C a s 1 3 が s s D N A 標的を認識し、より多くのヘアピン分子を切断する正のフィードバックループが開始される。これにより、システム内の標的の総量が増加し、システムがさらに活性化される。このプロセスが継続するにつれて、いっそう多くの F Q R N A レポーターが切断され、これがアッセイの最終的な読み取り値になる。

【 0 2 7 1 】

図 8 1 は、C a s P i n のヘアピンの潜在的な構造を示している。いくつかの実施形態では、標的 s s D N A 配列は紫色の長方形によって示される。R N A ループ構造は、標的の鎖のいずれかの側（5'、3'、または両方）に発生する可能性がある。標的部位に相補的な鎖は、D N A または R N A であり得る。標的部位に相補的な鎖は、標的部位と完全に一致するか、標的部位よりも短くなるか、C a s 1 3 によるトランス切断を不安定化または促進するのに役立つミスマッチを含む可能性がある。

【 0 2 7 2 】

いくつかの実施形態では、標的部位のいずれかの端で 2 つのヘアピンが使用される。図 8 2 は、そのような実施形態の結果を提示し、C a s 1 3 が s s D N A 標的部位を認識することをブロックする能力を示す。いくつかの実施形態では、C a s P i n オリゴは、様々な長さのヘアピンステムを有する。いくつかの実施形態では、C a s P i n オリゴはステム構造を持たない。いくつかの実施形態では、C a s P i n オリゴは別の D N A 配列を含む。そのような実施形態が評価され、c r R N A によって認識されないことがわかった。製造から未加工のオリゴと、C a s 1 3 D E T E C T R 反応で 2 5 ° C で変性及びリフォールディングされたオリゴの両方をテストした。この実験の結果を図 8 4 に示す。これは、C a s 1 3 がステムの長さに関係なく標的部位を認識できたことを示している。いくつかの実施形態では、より長いステムの長さのオリゴは、構造を解放するための R N A 切断なしで C a s 1 3 認識をブロックする。ハンドヘルドマイクロ流体デバイスのワンポット D E T E C T R

【 0 2 7 3 】

本明細書には、ハンドヘルドデバイスでワンポット D E T E C T R アッセイを実行するための様々なデバイス及び方法が記載されている。本明細書に記載のデバイスのいずれも、ワンポット D E T E C T R アッセイを実行するように構成することができる。例えば、図 1 0 A から 1 2 に示されるデバイスは、ワンポット D E T E C T R アッセイを実行するように構成することができる。このような実施形態の結果は、図 1 0 6 に示されている。Y 軸は未加工の蛍光（A U）を表示し、X 軸は時間を分単位で示す。3 つのトレースは、3 つの異なる取得設定で収集された同じデータを示している。四角形で表されるライントレース、低サイクル補正平均は、ディテクタを飽和させなかった設定を示しているため、アッセイ全体のシグナルのダイナミックレンジ全体を示している。

【 0 2 7 4 】

マルチブックス D E T E C T R アッセイベースのラテラルフローアッセイ

本明細書に記載されるのは、多重化検出の様々な方法である。本明細書に記載のデバイスのいずれも、多重化（例えば、複数の標的核酸の検出）のために構成することができる。ある場合には、多重化検出は、1 つまたは複数のラテラルフローアッセイストリップを利用することができる。

【 0 2 7 5 】

ここに記載されるのは、図 1 0 7 に示されるように、D E T E C T R（商標）アッセイに基づく多重ラテラルフローストリップのための様々なデバイス及び方法である。いくつかの実施形態では、レポーター（1 0 7 0 1）は、固体支持体の表面（1 0 7 0 0）に固定化される。いくつかの実施形態では、プログラム可能ヌクレアーゼ（例えば、C a s 複合体）プローブ（1 0 7 0 7）が表面（1 0 7 0 0）に固定化される。いくつかの実施形態では、プログラム可能ヌクレアーゼプローブ（1 0 7 0 7）は、単一ガイド R N A（s

10

20

30

40

50

gRNA) (10708) などのガイド核酸を含む。いくつかの実施形態では、プログラム可能ヌクレアーゼプロンプ (10707) は、サンプルの標的核酸の相補体となるように設計されたsgRNA (10708) を含み得る。いくつかの実施形態では、プログラム可能ヌクレアーゼプロンプ (10707) 及びレポーター (10701) は両方とも表面 (10700) に固定化される。いくつかの実施形態では、プログラム可能ヌクレアーゼプロンプ (10707) 及びレポーター (10701) は両方とも、プログラム可能ヌクレアーゼプロンプ (10707) のプログラム可能ヌクレアーゼによってレポーター (10701) が切断され得るのに十分に近接して表面 (10700) に固定化される。いくつかの実施形態では、プログラム可能ヌクレアーゼプロンプ (10707) 及びレポーター (10701) は両方とも、十分近くで表面 (10700) に固定化され、レポーター (10701) は、標的核酸とsgRNA (10708) が相補的であるとき、プログラム可能ヌクレアーゼプロンプ (10707) のsgRNA (10708) への標的核酸の結合時にプログラム可能ヌクレアーゼプロンプ (10707) のプログラム可能ヌクレアーゼによって切断され得る (10709)。そのような実施形態では、これは、標的の存在を示し、標的に対する「ヒット」である。いくつかの実施形態では、プログラム可能ヌクレアーゼプロンプ (10707) のsgRNA (10708) に相補的な標的核酸の結合により、プログラム可能ヌクレアーゼプロンプ (10707) のプログラム可能ヌクレアーゼが、プログラム可能ヌクレアーゼの十分に近接した範囲内で核酸の切断を開始する。いくつかの実施形態では、表面 (10700) はウェルの底にある。いくつかの実施形態では、第1のプログラム可能ヌクレアーゼプロンプ (10707) 及び第1のレポーター (10701) のコレクションが、表面 (10700) の1つの位置で表面に固定化される。

10

20

【0276】

いくつかの実施形態では、図107Aに示すように、レポーター (10701) は、表面リンカー (10702)、核酸 (10703)、第2のリンカー (10706)、検出部分 (例えば、標識) (10704)、及び親和性分子 (例えば、結合部分) (10705) を含み得る。いくつかの実施形態では、結合部分 (10705) はビオチンである。いくつかの実施形態では、表面に固定化された同じレポーター (10701) の複数のコピーが存在する。

【0277】

いくつかの実施形態では、ラテラルフローアッセイストリップ (10710) を使用して、切断されたレポーター (10709) を検出する。いくつかの実施形態において、切断されたレポーター (10709) は、ラテラルフローストリップ (10710) のサンプルパッド (10711) に接触される。いくつかの実施形態では、切断されたレポーター (10709) は、サンプルパッドに存在するコンジュゲート粒子に結合する。いくつかの実施形態では、コンジュゲート粒子は金ナノ粒子である。いくつかの実施形態では、金ナノ粒子は抗ビオチンで官能化される。いくつかの実施形態では、抗ビオチン官能化金ナノ粒子は、結合部分 (10705) に1つまたは複数のビオチンを含む切断されるレポーターに結合する。

30

【0278】

いくつかの実施形態では、レポーターは第2のリンカーを含む。いくつかの実施形態では、第2のリンカーは、1つまたは複数の結合部分を核酸に連結する。いくつかの実施形態では、第2のリンカーは、1つまたは複数の標識を核酸に連結する。いくつかの実施形態では、第2のリンカーは、1つまたは複数の結合部分及び1つまたは複数の標識の両方をレポーターの核酸に連結する。いくつかの実施形態では、レポーターはデンドリマーまたはトレブラー分子である。

40

【0279】

いくつかの実施形態では、レポーターは標識を含む。いくつかの実施形態では、標識は、FITC、DIG、TAMRA、Cy5、AF594、Cy3、またはラテラルフローアッセイのための任意の適切な標識である。

50

【0280】

いくつかの実施形態では、レポーターは、結合のための化学官能基を含み得る。いくつかの実施形態では、化学官能基はビオチンである。いくつかの実施形態では、化学官能基は、フロー捕捉プローブ（例えば、コンジュゲート粒子または捕捉分子）上の捕捉プローブに相補的である。いくつかの実施形態では、フロー捕捉プローブは、抗ビオチンで官能化された金ナノ粒子である。いくつかの実施形態では、フロー捕捉プローブはサンプルパッドに配置される。いくつかの実施形態では、フロー捕捉プローブは、サンプルパッドと接触するコンジュゲートパッド内に配置され、ラテラルフローアッセイストリップの両方が、サンプルパッドとコンジュゲートパッドの両方を含んでもよく、さらに、サンプルパッドとコンジュゲートパッドの両方が検出領域と流体連通にある。

10

【0281】

いくつかの実施形態では、ラテラルフローアッセイストリップ（10710）は検出領域（10712）を含む。いくつかの実施形態では、検出領域（10712）は、1つまたは複数の検出スポットを含み得る。いくつかの実施形態では、検出スポットは固定捕捉プローブ（例えば、捕捉分子）を含む。いくつかの実施形態では、固定捕捉プローブは、1つまたは複数の捕捉抗体を含み得る。いくつかの実施形態では、捕捉抗体は、抗FITC、抗DIG、抗TAMRA、抗Cy5、抗AF594、または検出部分またはコンジュゲートに結合できる任意の他の適切な捕捉抗体である。

【0282】

いくつかの実施形態では、FITCを含むフロー捕捉プローブは、抗FITC抗体を含む固定捕捉プローブによって捕捉される。いくつかの実施形態では、TAMRAを含むフロー捕捉プローブは、抗TAMRA抗体を含む固定捕捉プローブによって捕捉される。いくつかの実施形態では、DIGを含むフロー捕捉プローブは、抗DIG抗体を含む固定捕捉プローブによって捕捉される。いくつかの実施形態では、Cy5を含むフロー捕捉プローブは、抗Cy5抗体を含む固定捕捉プローブによって捕捉される。いくつかの実施形態では、AF594を含むフロー捕捉プローブは、抗AF594抗体を含む固定捕捉プローブによって捕捉される。

20

【0283】

いくつかの実施形態では、ラテラルフローアッセイストリップ（10710）は、コントロールライン（10714）を含み得る。いくつかの実施形態では、コントロールライン（10714）は、フロー捕捉プローブすべてに相補的な抗IgGを含み得る。いくつかの実施形態では、フロー捕捉プローブがレポーターに結合しないとき、フロー捕捉プローブはコントロールライン上の抗IgGによって捕捉され、試験ラインからシグナルが読み取られなくてもデバイスが適切に機能していることをユーザーに保証する。

30

【0284】

いくつかの実施形態では、ラテラルフローアッセイストリップ（10710）は、サンプルパッドを含み得る。いくつかの実施形態では、フロー捕捉プローブは、抗ビオチンを含み得る。いくつかの実施形態では、フロー捕捉プローブは、HRPを含み得る。いくつかの実施形態では、フロー捕捉プローブは、HRP-抗ビオチンを含み得る。いくつかの実施形態では、フロー捕捉プローブは、HRP-抗ビオチンDAB/TMBである。

40

【0285】

ここに記載されるのは、図108に示されるように、DETECTR（商標）アッセイに基づく多重ラテラルフローストリップのための様々なデバイス及び方法である。図108は、ラテラルフローアッセイストリップ上で読み出されるDETECTR（商標）アッセイの非限定的な例示的なワークフローを示す。いくつかの実施形態では、サンプル（10801）は、1つまたは複数の標的核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、サンプル（10801）（例えば、サンプル溶液）は、少なくとも第1及び第2の標的核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、サンプル（10801）は、ウェルの表面に固定化されたsgRNAなどの異なるガイド核酸が1つまたは複数の位置にあるウェル（10802）（例えば、D1からD5）に導入される。いくつかの実施形態では、sgRNAは、

50

表面に固定化されたプログラム可能ヌクレアーゼプローブの一部である。いくつかの実施形態では、sgRNAは、サンプル中の標的核酸に特異的に結合するように設計される。いくつかの実施形態では、ウェルの表面上の異なる位置（例えば、位置D1からD5）に対応する異なるsgRNAが存在し、異なるsgRNAはそれぞれ、サンプル中に存在する場合も存在しない場合もある異なる標的核酸配列に対して相補的である。いくつかの実施形態では、sgRNAを含むプログラム可能ヌクレアーゼプローブに加えて、各位置は、異なる官能基を有する1つまたは複数のレポータープローブで官能化される。いくつかの実施形態では、レポータープローブは、プログラム可能ヌクレアーゼプローブによって切断されるのに十分に近接している。いくつかの実施形態では、実施例13に記載されるように、特定のsgRNAと、sgRNAが特異的に結合するように設計された標的核酸との間の結合は、1つまたは複数のレポーターのセクションが対応する核酸から切断され、サンプル溶液中に放出されることが可能になるように特異的に結合されるよう設計される。いくつかの実施形態では、レポーターは標識で官能化される。いくつかの実施形態では、ラテラルフローアッセイストリップは、検出スポット（例えば、10803、10804）を含む検出領域を含み、各検出スポットは異なるタイプの捕捉抗体を含む。いくつかの実施形態では、各捕捉抗体タイプは、レポーターの特定の標識タイプに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、第1の検出スポット（10803）は、捕捉抗体抗FITCを含有する。いくつかの実施形態では、ウェル（10802）の表面上の位置D5は、第1の標的核酸配列に特異的なsgRNAを含む第1の固定化プログラム可能ヌクレアーゼプローブを含む。いくつかの実施形態では、D5は、FITCで標識された固定化された第1のレポーター（10806）をさらに含む。いくつかの実施形態では、第1の標的核酸配列がプログラム可能ヌクレアーゼプローブに結合すると、第1のレポーター（10806）の切断可能な核酸が切断され、溶液中に放出される。あるいは、または組み合わせて、いくつかの実施形態では、第2の検出スポット（10804）は捕捉抗体抗DIGを含有する。いくつかの実施形態では、第2の位置D4は、第2の標的核酸配列に特異的なsgRNAを含む、固定化されたプログラム可能ヌクレアーゼプローブを含む。いくつかの実施形態では、D4は、DIGで標識された固定化された第2のレポーター（10805）をさらに含む。したがって、いくつかの実施形態では、第2の標的核酸配列が結合すると、固定化された第2のレポーター（10805）が切断され、溶液中に放出される。いくつかの実施形態では、切断された第1及び第2のレポーター（10805）及び（10806）を含有する溶液を、チェイス緩衝液とともにラテラルフローアッセイストリップのサンプルパッドに接触させる。いくつかの実施形態では、サンプルパッドは、その上に配置された1つまたは複数のフロー捕捉プローブ（例えば、抗ビオチン-AuNP）を有する。いくつかの実施形態では、切断された第1及び第2のレポーターを含むサンプル溶液は、チェイス緩衝液とともに、レポーターがコンジュゲート（例えば、抗ビオチン-金ナノ粒子）に結合しているサンプルパッドを横切って流れる。いくつかの実施形態において、切断されたレポーターを含む溶液は、手動でピペッティングすることによってサンプルパッドに接触される。いくつかの実施形態では、切断されたレポーターを含む溶液は、サンプルパッドと流体接続しているチャンバから引き出されるサンプルパッドに接触する。いくつかの実施形態では、切断されたレポーターを含む溶液は、切断されたレポーター溶液をもたらすアッセイが行われるチャンバから引き出されることによってサンプルパッドに接触する。いくつかの実施形態では、レポーターはサンプルパッドで切断される。いくつかの実施形態では、レポーターは、DETECTR（商標）アッセイによってサンプルパッド内で切断される。いくつかの実施形態では、溶液は、毛細管作用またはウィッキングによってサンプルパッドに引き込まれ、サンプルパッドから引き出される。いくつかの実施形態では、毛細管作用またはウィッキングは、液体が吸収パッドに引き込まれることによって引き起こされる。いくつかの実施形態では、毛細管作用またはウィッキングは、電力を必要とするのではなく、液体が吸収パッドに引き込まれることによって引き起こされる。ある場合には、溶液は圧力勾配によってサンプルパッドに出入りする。いくつかの実施形態では、FITCで標識されたレポーター（10806）を有する金ナノ粒

10

20

30

40

50

子ーレポーターコンジュゲートは、捕捉抗体抗 F I T C を含有する第 1 の検出スポット（10803）に選択的に結合し、したがって、サンプルにおける第 1 の標的核酸配列の存在を示す。いくつかの実施形態では、D I G で標識されたほとんどのレポーター（10805）を有する A u N Pーレポーターコンジュゲートは、捕捉抗体抗 D I G を含有する第 2 の検出スポット（10804）に選択的に結合し、したがって、サンプルにおける第 2 の標的核酸配列の存在を示す。このようにして、いくつかの実施形態では、多重化サンプル中に存在する 2 つ以上の標的核酸配列の並行検出が可能になる。

【0286】

本明細書に記載されるのは、図 109 に示されるラテラルフローベースの検出の様々な実施形態である。いくつかの実施形態では、西洋ワサビペルオキシダーゼ（H R P）（10901）を使用して、ラテラルフローベースの D E T E C T R（商標）アッセイにおける検出を強化する。いくつかの実施形態では、標的（複数可）核酸配列を含むサンプルを表面（10900）に曝露し、その上でプログラム可能ヌクレアーゼプローブ及びレポータープローブを表面に固定化する。いくつかの実施形態では、レポータープローブは H R P 分子を含む。いくつかの実施形態では、標的とガイド R N A との間の特異的結合事象に続くプログラム可能ヌクレアーゼによるレポーターの切断時に、レポーターの切断された部分がサンプル溶液中に放出される（10906）。いくつかの実施形態では、次に、サンプル溶液は、過炭酸ナトリウム（10904）を含むサンプルパッドを含むかまたはそれに隣接するラテラルフローアッセイストリップ（10902）にさらされ、水溶液にさらされると H₂O₂ を生成する。いくつかの実施形態では、H₂O₂ を形成するための過炭酸ナトリウムの再水和は、サンプルが領域を通してウィッキングされるときに起こる。いくつかの実施形態では、基質は、D A B、T M B、または任意の他の十分な基質を含む。いくつかの実施形態では、「スポット」は青色から赤色に変化し、H R P の存在を示し、次いで標的核酸配列に対する「ヒット」を示す。いくつかの実施形態では、読み取りは、サンプル溶液の色の变化時に溶液中で達成される（10908）。

【0287】

ここに記載されているのは、読み出し用のラテラルフローアッセイストリップを利用した H R P 増強多重化 D E T E C T R（商標）アッセイを利用した様々な方法とデバイスである。いくつかの実施形態では、H R P シグナル増強多重化ラテラルフローアッセイは、図 110 に示されている。いくつかの実施形態では、支持培地の固定化表面（11000）及びラテラルフローアッセイストリップ（11010）上での検出は、図 107 A から 110 に記載されるように実行される。ただし、金ナノ粒子散乱光によるシグナル伝達が行われない。代わりに、いくつかの実施形態では、抗ビオチン標識 A u N P は、H R P 抗ビオチン D A B / T M B に取って代わられる。いくつかの実施形態では、H R P は、反応緩衝液及び／またはチェイス緩衝液によって再水和されるラテラルフローアッセイストリップ中に存在する過炭酸ナトリウムによって活性化される。いくつかの実施形態では、H R P は、P C R などのサンプル増幅を必要としないように、十分に強いシグナルを可能にする。

【0288】

D N A に対する C a s 13 R N A 切断特異度、H R P シグナル増強、及び捕捉オリゴプローブ特異度を利用する多重化標的核酸検出のための様々な実施形態が、本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、図 111 に示すように、サンプル（11100）は異なる標的核酸を含む。いくつかの実施形態では、サンプル（11100）は、次いで、1 つ以上の位置（例えば、5 つの位置、D 1 から D 5）で官能化されたウェル（11101）の表面に接触される。いくつかの実施形態では、1 つまたは複数の位置がある。いくつかの実施形態では、C a s 13 酵素がプログラム可能ヌクレアーゼプローブに存在する。いくつかの実施形態では、C a s 13 は R N A を切断するが D N A は切断しないため、D N A 及び R N A 鎖の両方を有する核酸配列を含むレポーター（11102）の使用が可能になる。いくつかの実施形態では、標的核酸が s g R N A に結合すると、レポーターの R N A が C a s 13 酵素によって切断され、R N A の一部、完全な D N A 配列、及び（F I

10

20

30

40

50

TC 標識を含む断片が溶液中に放出される。いくつかの実施形態では、このアクションは、各位置または異なるレポーターを有するスポットで並行して繰り返される。いくつかの実施形態では、このアクションは、5つの異なる標的核酸について位置D1からD5で並行して繰り返され、5つの別個のレポーター断片を生成する。いくつかの実施形態では、次いで、溶液をラテラルフローアッセイストリップのサンプルパッドに接触させ、サンプルパッドはHRP抗FITCを含む。いくつかの実施形態では、次に、FITC標識レポーター断片は、HRP-抗FITCに結合して複合体(11103)を形成し、検出領域を横切って下流に運ばれ、複合体(11103)のオリゴの補数になるように設計された捕捉オリゴを含む検出スポットに特異的に結合する。

【0289】

図112は、1週間間隔で2回繰り返して実行したDNAse及びDETECTRベースのアッセイ両方の結果を示す。

【0290】

シグナル増強のためのガイドRNAプーリング

いくつかの実施形態では、1つまたは複数のプログラム可能ヌクレアーゼプローブ(11300から11302)をガイドプーリングに使用して、図113Aに示すようにラテラルフローアッセイにおけるシグナル検出の増強を達成する。いくつかの実施形態では、第1のプログラム可能ヌクレアーゼプローブ(11300)は、標的核酸の第1のセグメントに相補的な第1のsgRNAを含み得る。いくつかの実施形態では、第2のプログラム可能ヌクレアーゼプローブ(11301)は、同じ標的核酸の第2のセグメントに相補的な第2のsgRNAを含み得る。いくつかの実施形態では、第3のプログラム可能ヌクレアーゼプローブ(11302)は、同じ標的核酸の第3のセグメントに相補的な第3のsgRNAを含み得る。いくつかの実施形態では、第1のプログラム可能ヌクレアーゼプローブ、第2のプログラム可能ヌクレアーゼプローブ、及び第3のプログラム可能ヌクレアーゼプローブはすべて、標的核酸の存在を示すために標識されたレポーターの十分な切断を可能にするのに十分近くに位置する。図113Bは、サンプルパッド(11303)、試験ライン(11304)、及びコントロールライン(11305)を含む典型的なラテラルフローアッセイストリップを示す。

【0291】

本明細書に記載されるのは、ラテラルフローアッセイにおいて増強されたシグナル検出を達成するためのガイドプーリングの様々な実施形態である。本明細書に記載のいくつかの実施形態では、ガイドプーリングは増強されたCas12a活性を示す。図114(実施例20に記載)は、個々のgRNAフォーマットを使用するDETECTR(商標)Cas12aベースのアッセイと比較した、プールガイド(プールgRNA)フォーマットを使用した、GF184標的の強化されたCas12aベースの検出を示すDETECTR(商標)アッセイの結果を示す。図114において、「赤」とラベル付けされたy軸は強度の単位を表示し、x軸は異なるDETECTR(商標)反応が生じたチャンバの番号を示す。図115(実施例20に記載)は、個々のガイドフォーマットを使用するCas13aベースのアッセイと比較して、プールガイドフォーマットを使用するSC2標的のCas13aベースの検出の感度の増強を示すDETECTR(商標)アッセイの結果を示す。

【0292】

図116(実施例20に記載)は、各チャンバに対応する画像を示し、陽性液滴の数をカウントするために使用され、プールされたガイドRNAを含有するCas13a-DETECTR(商標)アッセイサンプルが、標的RNAの開始コピー当たりの増幅産物を含有する結晶を、個々のフォーマットのガイドRNAを含むCas13a-DETECTR(商標)アッセイのサンプルより多く生成したことを示している。

【0293】

図117(実施例20に記載)は、増幅後のシグナルの強度の測定により、プールされたガイドRNAを含むCas13a-DETECTR(商標)アッセイサンプルが、個々

10

20

30

40

50

のフォーマットのガイドRNAを含むCas13a-DETECTR（商標）アッセイのサンプルよりも、標的テンプレートRNAの開始コピーにつき、より多くのシグナル強度を生成したことを示している。図118（実施例20に記載）は、増幅後のシグナルの強度の測定により、プールされたガイドRNAを含むCas13a-DETECTR（商標）アッセイサンプルが、個々のフォーマットのガイドRNAを含むCas13a-DETECTR（商標）アッセイのサンプルよりも、標的テンプレートRNAの開始コピーにつき、より多くのシグナル強度を生成したことを示している。図118はまた、陽性液滴の数をカウントすることによって実行された相対定量化により、プールされたガイドRNAを含むCas13a-DETECTR（商標）アッセイのサンプルが、ガイドRNAが個別の形式で含まれているCas13a-DETECTR（商標）アッセイのサンプルよりも、標的テンプレートRNAの開始コピーあたりの増幅産物を含む結晶を、多く生成したことを示す。

10

【0294】

図119は、（実施例20に記載）プールされたガイド（R4637、R4638、R4667、R4676、R4684、R4689、R4691）を含むCas13a-DETECTR（商標）アッセイのサンプルが、個別の形式の単一のガイドR4684、R4667、またはR4785（RNAsePガイド）を含むCas13a-DETECTR（商標）サンプルよりも高い標的の開始コピーあたりの標的検出感度を呈さなかったことを示す。

【0295】

20

DETECTRベースの多重化ラテラルフローPONデバイス

本明細書に記載されるのは、プログラム可能ヌクレアーゼ（例えば、DETECTR）アッセイに基づく、図120に示される多重ラテラルフローアッセイのための様々な方法及びデバイスである。図120は、多重化プログラム可能ヌクレアーゼ（例えば、DETECTR）アッセイを実行するための非限定的な例示的なハンドヘルドデバイスを描写する。いくつかの実施形態では、サンプルは、1つまたは複数の標的核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、サンプルは、サンプル投入（12001）（本明細書ではサンプル境界面とも呼ばれる）に導入され、1つまたは複数の乾燥または凍結乾燥されたプログラム可能ヌクレアーゼ試薬（例えば、ガラスビーズに固定化）を含む1つまたは複数のゾーン（例えば、加熱領域または反応チャンバ、12003）に搭載される。いくつかの実施形態では、サンプル境界面は、本明細書に記載されるように、サンプルを濃縮、濾過、溶解、または別の方法で調製するように構成され得る。いくつかの実施形態では、サンプルをDETECTRゾーンに装填するために、負圧源（例えば、シリンジ、12007）によって負圧ポート（12006）に負圧が加えられる。いくつかの実施形態では、サンプルは、溶解サンプルである。いくつかの実施形態では、複数のDETECTRゾーン（12003）が、曲がりくねった流体経路（12004）に沿って互いに結合される。いくつかの実施形態では、流体経路は、本明細書に記載されているように螺旋であってもよい。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の標的核酸の増幅は、1つまたは複数のDETECTRゾーン（12003）を含む増幅領域で行われる。増幅領域（12004）を加熱して（例えば、55℃で20分以内）、本明細書に記載の1つまたは複数の標的核酸を増幅することができる。いくつかの実施形態では、増幅領域（12004）は、散在ポリマーを含み得る。加熱には、液相化学的加熱、固相化学的加熱、及び電気加熱（抵抗／ジュール加熱、誘導加熱、ペルチェヒートポンプなどを含むがこれらに限定されない）が含まれ得る。いくつかの実施形態では、デバイスは、複数のラテラルフローストリップ（12005）を含む。いくつかの実施形態では、希釈剤が希釈剤投入（12002）に導入される。当業者は、検出領域（例えば、ラテラルフローアッセイ領域（12005））が、本明細書に記載の任意の適合アッセイまたはラテラルフローストリップを含み得ることを理解するであろう。

30

40

【0296】

いくつかの実施形態では、増幅領域（12004）をコーティングすることができる。

50

いくつかの実施形態では、コーティングは、親水性コーティング、疎水性コーティング、無機コーティング、または有機コーティングであってもよい。いくつかの実施形態では、コーティングはポリマーコーティングを含んでもよい。いくつかの実施形態では、コーティングは、ポリエチレングリコールコーティングを含み得る。いくつかの実施形態では、コーティングは、ストレプトアビジンコーティングを含み得る。いくつかの実施形態では、散在するポリマーはクラウディング剤であり得る。いくつかの実施形態において、クラウディング剤は、ポリエチレングリコールを含み得る。

【0297】

いくつかの実施形態では、1つまたは複数の反応または加熱ゾーンは、表面（例えば、DET ECT Rゾーン内に配置されたガラスビーズ）に固定化されたガイド核酸（例えば、sgRNA）を含み得る。いくつかの実施形態では、ガイド核酸は、表面に固定化されたプログラム可能ヌクレアーゼ（例えば、Cas複合体）プローブの一部である。いくつかの実施形態では、ガイド核酸は、サンプル中の標的核酸に特異的に結合するように設計される。いくつかの実施形態では、表面上の異なる位置及び／または1つまたは複数のゾーンの異なる表面に対応する異なるガイド核酸が存在し、それぞれの異なるガイド核酸は、サンプル中に存在してもしなくてもよい異なる標的核酸配列に対して相補的である。いくつかの実施形態では、ガイド核酸を含むプログラム可能ヌクレアーゼプローブに加えて、各表面位置は、別個の官能基を有する1つまたは複数のレポーターで官能化される。いくつかの実施形態では、レポーターは、プログラム可能ヌクレアーゼプローブによって切断されるのに十分に近接し得る。いくつかの実施形態では、実施例13に記載されるように、レポーターは、特定のガイド核酸と、ガイド核酸が特異的に結合するように設計された標的核酸との間の結合時に切断され、溶液中に放出される。いくつかの実施形態では、レポーターは、検出部分（例えば、標識）で官能化される。

【0298】

いくつかの実施形態では、化学的加熱を使用することができる。いくつかの実施形態では、化学的加熱を使用してエネルギーを供給し、反応を開始及び実行することができる。いくつかの実施形態では、化学的加熱を使用してエネルギーを供給し、プログラム可能ヌクレアーゼアッセイの反応を開始及び実行することができる。いくつかの実施形態では、化学的加熱を使用して、反応ゾーンまたは加熱ゾーンを加熱することができる。いくつかの実施形態では、デバイスの領域、チャンバ、ボリューム、ゾーン、表面、または領域を加熱するために、化学的加熱を使用することができる。

【0299】

いくつかの実施形態では、デバイスは、増幅領域の下流に配置された検出領域内に1つまたは複数のラテラルフローアッセイストリップを含み得る。各ラテラルフローアッセイストリップには、1つまたは複数の検出領域またはスポットが含まれており、各検出領域またはスポットには、異なる種類の捕捉抗体が含まれている。いくつかの実施形態では、各ラテラルフローアッセイストリップは、異なるタイプの捕捉抗体を含む。いくつかの実施形態では、各捕捉抗体タイプは、レポーターの特定の標識タイプに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、第1のラテラルフローアッセイストリップは、捕捉抗体抗FITCを含有する。いくつかの実施形態では、第1のDET ECT R領域または表面位置（例えば、反応チャンバまたは加熱領域内）は、第1の標的核酸配列に特異的なガイド核酸（例えば、sgRNA）を含む、固定化されたプログラム可能ヌクレアーゼ（例えば、Cas複合体）を含む。いくつかの実施形態では、第1のDET ECT R領域または表面位置は、第1の検出部分（例えば、FITC）で標識された第1の固定化レポーターをさらに含む。いくつかの実施形態では、第1の標的核酸配列が結合すると、第1の固定化レポーターが切断され、溶液中に放出される。いくつかの実施形態では、第1の検出部分は溶液中に放出され、第1のレポーターの残りは表面に固定されたままである。あるいは、または組み合わせて、いくつかの実施形態では、第2のラテラルフローアッセイストリップは、捕捉抗体抗DIGを含有する。いくつかの実施形態では、第2のDET ECT R領域または表面位置（例えば、反応チャンバまたは加熱領域内）は、第2の標的核酸配列に特

異的なガイド核酸（例えば、sgRNA）を含む、固定化されたプログラム可能ヌクレアーゼ（例えば、Cas複合体）を含む。いくつかの実施形態では、第2のDETECTR領域または表面位置は、第2の検出部分（例えば、DIG）で標識された第2の固定化レポーターをさらに含む。したがって、いくつかの実施形態では、第2の標的核酸配列が結合すると、第2の固定化レポーターが切断され、溶液中に放出される。いくつかの実施形態では、第2の検出部分は溶液中に放出され、第2のレポーターの残りは表面に固定されたままである。

【0300】

いくつかの実施形態では、第1及び第2の切断されたレポーターを含む溶液は、増幅領域から、第1のラテラルフローアッセイストリップ及び第2のラテラルフローアッセイストリップを含むラテラルフロー領域に移される。いくつかの実施形態では、チェイス緩衝液または希釈剤が希釈剤投入に導入され、陰圧ポートに陰圧が加えられて、第1及び第2の切断されたレポーターを含む溶液がラテラルフロー領域のラテラルフローアッセイストリップに接触し、レポーターは、抗ビオチン-AuNPなどのコンジュゲート分子に結合する。いくつかの実施形態では、第1の検出部分（例えば、FITC）で標識された第1のレポーターを有するAuNP-レポーターコンジュゲートは、第1のラテラルフローアッセイストリップの第1の捕捉抗体（例えば、抗FITC）を含む第1の検出領域またはスポットに選択的に結合し、かようにサンプル中の最初の標的核酸配列の存在を示している。いくつかの実施形態では、第2の検出部分（例えば、DIG）で標識された第2のレポーターの大部分を有するAuNP-レポーターコンジュゲートは、ラテラルフローアッセイストリップの第2の捕捉抗体（例えば、抗DIG）を含む第2の検出領域またはスポットに選択的に結合し、かようにサンプル中の第2の標的核酸配列の存在を示す。このようにして、いくつかの実施形態では、多重化サンプル中に存在する2つ以上の標的核酸配列の並行検出が可能になる。

【0301】

いくつかの実施形態では、増幅領域は、約200µLの液体（例えば、サンプル溶液及び試薬（複数可））を保持するように構成される。いくつかの実施形態では、各ラテラルフローアッセイストリップは、約80µLの液体（例えば、サンプル溶液及び／またはチェイス緩衝液）を保持するように構成されている。いくつかの実施形態では、デバイスは、1つを超えるラテラルフローアッセイストリップを含み得る。例えば、デバイスは、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはそれより多いラテラルフローアッセイストリップを含み得る。いくつかの実施形態では、1つ以上のラテラルフローアッセイストリップは、標的配列の代わりに、またはそれに加えて、対照配列を検出するように構成される。例えば、6つのラテラルフローアッセイストリップを含むデバイスは、1つ以上の標的配列（例えば、5つの異なる標的配列）を検出するように構成された5つのラテラルフローアッセイストリップと、対照配列を検出するように構成された1つのラテラルフローアッセイストリップとを含み得る。

【0302】

本明細書に記載されているのは、図121Aから121Bに示されているように、プログラム可能ヌクレアーゼアッセイに基づく多重ラテラルフローアッセイのための様々な方法及びデバイスである。図121Aから121Bは、2つ以上の標的核酸配列を並行して検出するためのポイントオブケアデバイスの非限定的な例を示す。いくつかの実施形態では、サンプルは、1つまたは複数の標的核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、サンプルは、サンプル投入チャンバ（12101）（本明細書ではサンプル境界面とも呼ばれる）に導入される。サンプル投入チャンバ（12101）は、サンプルを含むスワブを受け取るように構成され得る。いくつかの実施形態では、サンプル投入チャンバ（12101）は、スワブからサンプルを回収するための溶液／緩衝液（例えば、溶解緩衝液）を含み得る。いくつかの実施形態では、サンプル境界面は、本明細書に記載されるように、サンプルを濃縮、濾過、溶解、または別の方法で調製するように構成され得る。いくつかの実施形態では、陽圧がサンプル投入チャンバ（12101）に加えられて、サンプル溶液

を、サンプル投入チャンバ（１２１０１）から、本明細書に記載の１つ以上の乾燥または凍結乾燥プログラム可能ヌクレアーゼ（例えば、DETECTR）試薬（１２１０９）（例えば、ガラスビーズに固定化）を含む反応チャンバ（１２１０８）（例えば、加熱領域内）に移動させる。いくつかの実施形態では、サンプル溶液を反応チャンバに装填するために、陽圧源（例えば、圧縮ガスタンク、１２１０３）によって陽圧を加えることができる。いくつかの実施形態では、正圧源（１２１０３）に結合された圧力弁（１２１０４）によって圧力が調節される。いくつかの実施形態では、陽圧の印加（例えば、圧縮ガスタンクを含む陽圧源１２１０３を突き刺すようにアクチュエータを操作することによる）は、サンプル溶液及び乾燥または凍結乾燥試薬（複数可）（１２１０９）を、反応チャンバの蛇行性の増幅領域（１２１０８）に移動させる。いくつかの実施形態では、増幅領域は、本明細書に記載されるように螺旋であってもよい。いくつかの実施形態では、増幅領域（１２１０８）において１つまたは複数の標的核酸の増幅が行われる。増幅領域（１２１０８）を加熱して（例えば、５５℃で２０分以内）、本明細書に記載の１つまたは複数の標的核酸を増幅することができる。いくつかの実施形態では、十分な正圧の適用により、増幅領域と検出領域、例えばラテラルフローアッセイ領域（１２１０６）との間の圧力弁（１２１０５）が開く。いくつかの実施形態では、増幅領域（１２１０８）とラテラルフローストリップ（１２１０７）を含むラテラルフローアッセイ領域（１２１０６）との間の弁（１２１０５）は、弁（１２１０５）に接続されたボタンを押すことによって開くことができる。加熱には、液相化学的加熱、固相化学的加熱、及び電気加熱（抵抗／ジュール加熱、誘導加熱、ペルチェヒートポンプなどを含むがこれらに限定されない）が含まれ得る。いくつかの実施形態では、希釈剤またはチェイス緩衝液を、希釈剤投入（１２１０２）を介してシステムに導入することができる。いくつかの実施形態では、増幅領域（１２１０８）とラテラルフローアッセイ領域（１２１０６）との間の弁（１２１０５）を開くと、サンプルが増幅領域（１２１０８）からラテラルフローアッセイ領域（１２１０６）に移される。いくつかの実施形態では、サンプルは、増幅領域（１２１０８）からラテラルフローアッセイ領域（１２１０６）に移動するときに希釈剤と混合される。いくつかの実施形態では、チェイス緩衝液は、サンプルを著しく希釈することなく、サンプルを増幅領域（１２１０８）からラテラルフローアッセイ領域（１２１０６）に押し出す。

10

20

30

40

50

【０３０３】

いくつかの実施形態では、１つまたは複数のプログラム可能ヌクレアーゼ試薬（複数可）は、表面（例えば、ガラスビーズ）に固定化されたガイド核酸を含む。いくつかの実施形態では、ガイド核酸は、表面に固定化されたプログラム可能ヌクレアーゼ（例えば、Cas複合体）プローブの一部である。いくつかの実施形態では、ガイド核酸は、サンプル中の標的核酸に特異的に結合するように設計され得る。いくつかの実施形態では、表面上の異なる位置及び／または１つまたは複数のゾーンの異なる表面に対応する異なるガイド核酸が存在し、それぞれの異なるガイド核酸は、サンプル中に存在してもしなくてもよい異なる標的核酸配列に対して相補的である。いくつかの実施形態では、ガイド核酸を含むプログラム可能ヌクレアーゼプローブに加えて、各表面位置は、別個の官能基を有する１つまたは複数のレポーターで官能化され得る。いくつかの実施形態では、レポーターは、プログラム可能ヌクレアーゼプローブによって切断されるのに十分に近接する。いくつかの実施形態では、実施例１３に記載されるように、レポーターは、特定のsgRNAと、ガイド核酸が特異的に結合するように設計された標的核酸との間の結合時に切断され、溶液中に放出される。いくつかの実施形態では、レポーターは、検出部分（例えば、標識）で官能化される。

【０３０４】

いくつかの実施形態では、デバイスは、増幅領域の下流に配置された検出領域内に１つまたは複数のラテラルフローアッセイストリップを含み得る。各ラテラルフローアッセイストリップには、１つまたは複数の検出領域またはスポットが含まれており、各検出領域またはスポットには、異なる種類の捕捉抗体が含まれている。いくつかの実施形態では、各ラテラルフローアッセイストリップは、異なるタイプの捕捉抗体を含み得る。いくつか

の実施形態では、各捕捉抗体タイプは、レポーターの特定の標識タイプに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、第1のラテラルフローアッセイストリップは、第1の捕捉抗体（例えば、抗FITC）を含有する。いくつかの実施形態では、第1の表面（例えば、ビーズ）は、第1の標的核酸配列に特異的なガイド核酸（例えば、sgRNA）を含む固定されたプログラム可能ヌクレアーゼ（例えば、Cas複合体）を含む。いくつかの実施形態では、第1の表面は、第1の検出部分（例えば、FITC）で標識された第1の固定化レポーターをさらに含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているように、第1の標的核酸配列が結合すると、第1の固定化レポーターが切断され、溶液中に放出される。あるいは、または組み合わせて、いくつかの実施形態では、第2のラテラルフローアッセイストリップは、第2の捕捉抗体（例えば、抗DIG）を含有する。いくつかの実施形態では、第2の表面（例えば、ビーズ）は、第2の標的核酸配列に特異的なガイド核酸を含む第2の固定化プログラム可能ヌクレアーゼを含有する。いくつかの実施形態では、第2の表面は、第2の検出部分（例えば、DIG）で標識された第2の固定化レポーターをさらに含む。したがって、いくつかの実施形態では、第2の標的核酸配列が結合すると、第2の固定化レポーターが切断され、溶液中に放出される。

10

【0305】

いくつかの実施形態では、第1及び第2の切断されたレポーターを含む溶液は、増幅領域から、第1のラテラルフローアッセイストリップ及び第2のラテラルフローアッセイストリップを含むラテラルフロー領域に移される。いくつかの実施形態では、チェイス緩衝液または希釈剤が希釈剤投入口またはリザーバーに導入され、負圧ポートに負圧が加えられてラテラルフロー領域に接触する。増幅が起こる前に、増幅領域からラテラルフロー領域へのサンプル溶液の流れを調節するために、増幅領域とラテラルフロー領域との間に圧力弁を配置することができる。圧力弁の作動により、第1及び第2の切断されたレポーターを含む溶液が、ラテラルフロー領域のラテラルフローアッセイストリップに接触できるようになり、レポーターは、抗ビオチン-AuNPなどのコンジュゲート分子に結合する。いくつかの実施形態では、第1の検出部分（例えば、FITC）で標識された第1のレポーターを有するAuNP-レポーターコンジュゲートは、第1のラテラルフローアッセイストリップの第1の捕捉抗体（例えば、抗FITC）を含む第1の検出領域またはスポットに選択的に結合し、このようにサンプル中の第1の標的核酸配列の存在を示している。いくつかの実施形態では、第2の検出部分（例えば、DIG）で標識された第2のレポーターの大部分を有するAuNP-レポーターコンジュゲートは、ラテラルフローアッセイストリップの第2の捕捉抗体（例えば、抗DIG）を含む第2の検出領域またはスポットに選択的に結合し、このようにサンプル中の第2の標的核酸配列の存在を示す。このようにして、いくつかの実施形態では、多重化サンプル中に存在する2つ以上の標的核酸配列の並行検出が可能になる。

20

30

【0306】

いくつかの実施形態では、増幅領域は、約200 µLの液体（例えば、サンプル溶液及び試薬（複数可））を保持するように構成される。いくつかの実施形態では、各ラテラルフローアッセイストリップは、約80 µLの液体（例えば、サンプル溶液及び／またはチェイス緩衝液）を保持するように構成されている。いくつかの実施形態では、デバイスは、1つを超えるラテラルフローアッセイストリップを含み得る。例えば、デバイスは、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはそれより多いラテラルフローアッセイストリップを含み得る。いくつかの実施形態では、1つ以上のラテラルフローアッセイストリップは、標的配列の代わりに、またはそれに加えて、対照配列を検出するように構成される。例えば、6つのラテラルフローアッセイストリップを含むデバイスは、1つ以上の標的配列（例えば、5つの異なる標的配列）を検出するように構成された5つのラテラルフローアッセイストリップと、対照配列を検出するように構成された1つのラテラルフローアッセイストリップとを含み得る。

40

【0307】

本明細書に記載されるのは、図122に示される、DETECTRアッセイに基づく多

50

重ラテラルフローアッセイのための様々な方法及びデバイスである。図 1 2 2 は、図 1 2 0 の実施形態と実質的に同様だが、負圧の代わりに正圧を利用して流体の流れを駆動するラテラルフローアッセイを含むポイントオブケアデバイスの実施形態を示す。いくつかの実施形態では、デバイスは、サンプルを受け取る投入ポート（1 2 2 0 1）を含んでもよい。いくつかの実施形態では、投入ポートは、サンプルを含む（例えば、サンプル溶液及び／またはその中に配置されたスワブを含む）ルアーロックシリンジとインターフェースするように構成され得る。いくつかの実施形態では、投入ポート（1 2 2 0 1）は、サンプルが受け取られるまで投入ポート（1 2 2 0 1）を密閉するように構成されたボールチェック弁（1 2 2 0 2）を含んでもよい。いくつかの実施形態では、デバイスは凍結乾燥試薬（1 2 2 0 3）を含んでもよい。いくつかの実施形態では、凍結乾燥試薬（1 2 2 0 3）は、サンプルが受け取られる前に、密閉されたサンプル境界面チャンバ内に保管され得る。いくつかの実施形態では、デバイスは、ガス（1 2 2 0 4 及び 1 2 2 0 7）に対して透過性であり、デバイスを通る液体の移動を可能にし、そこからの置換ガスの放出を容易にするように構成された疎水性フィルタを含み得る。いくつかの実施形態では、デバイスは蛇行チャネル領域（1 2 2 0 5）を含んでもよい。いくつかの実施形態では、蛇行チャネル領域（1 2 2 0 5）が加熱される。いくつかの実施形態では、蛇行チャネル領域（1 2 2 0 5）は、加熱領域内に 1 つ以上の反応ゾーン（1 2 2 0 6）を含み得る。いくつかの実施形態では、反応ゾーン（1 2 2 0 6）は、1 つまたは複数の DETECTR アッセイを実行するように構成され得る。いくつかの実施形態では、反応ゾーン（1 2 2 0 6）は、増幅酵素または試薬を含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥試薬（1 2 2 0 3）は、サンプル境界面へのサンプルの導入時に再構成され、再構成に続いて、サンプルと共に反応チャンバに移され得る 1 つ以上の増幅酵素または試薬を含む。いくつかの実施形態では、サンプル境界面は、本明細書に記載されるように、サンプルを濃縮、濾過、溶解、または別の方法で調製するように構成され得る。いくつかの実施形態では、反応ゾーン（1 2 2 0 6）は、化学物質の存在下で色を変える視覚アッセイを含む。いくつかの実施形態では、蛇行チャネル領域（1 2 2 0 5）は核酸増幅領域である。あるいは、または組み合わせ、蛇行チャネル領域は、1 つまたは複数のプログラム可能ヌクレアーゼに基づく検出アッセイを実行するように構成され得る。いくつかの実施形態では、弁は、検出領域（1 2 2 0 9）を加熱領域（1 2 2 0 5）から分離することができる。いくつかの実施形態では、デバイスは、十分な正圧下で破壊し、破壊されると 2 つの領域間の流体移動を可能にする（逆に、正圧を加える前に領域間の流体移動を防止する）圧力分解弁（1 2 2 0 8）を含んでもよい。いくつかの実施形態では、圧力分解弁（1 2 2 0 8）を壊してサンプル流体を加熱／反応領域 1 2 2 0 5 から検出領域 1 2 2 0 9 まで移すために、希釈液またはチェイス緩衝液は、投入ポート（1 2 2 0 1）を介してデバイスに注入できる。いくつかの実施形態では、デバイスは、投入ポート（1 2 2 0 1）で正のガス圧を受けることができる。いくつかの実施形態では、圧力分解弁（1 2 2 0 8）を破壊することにより、蛇行チャネル領域（1 2 2 0 5）からラテラルフローアッセイ領域（1 2 2 0 9）への液体の通過が可能になる。

10

20

30

40

50

【0 3 0 8】

本明細書では、図 1 2 3 に示されるハンドヘルド分析デバイスのための様々な方法及びデバイスが説明される。図 1 2 3 は、投入ポート（1 2 3 0 2）、螺旋チャネル加熱または反応領域（1 2 3 0 3）、第 1 のアクチュエータ（1 2 3 0 1）、第 2 のアクチュエータ（1 2 3 0 4）、及びラテラルフローアッセイ領域（1 2 3 0 5）を含むハンドヘルドアッセイデバイスの実施形態を図示する。いくつかの実施形態では、核酸サンプルは、本明細書に記載の投入ポート（1 2 3 0 2）で送達され、サンプルは螺旋チャネル領域（1 2 3 0 3）を通過して流れる。いくつかの実施形態では、サンプル境界面 1 2 3 0 2 は、反応領域 1 2 3 0 3 に移送する前に、本明細書に記載のようにサンプルを濃縮、濾過、または別の方法で調製するように構成されてもよい。いくつかの実施形態では、第 1 のアクチュエータ（1 2 3 0 1）は機械エネルギーを貯蔵する。いくつかの実施形態では、貯蔵された機械的エネルギーは、加圧ガスとして貯蔵される。いくつかの実施形態では、蓄積さ

れた機械的エネルギーは圧縮ばねに蓄積される。いくつかの実施形態では、第1のアクチュエータ（12301）を作動させると、蓄積された機械エネルギーが放出される。いくつかの実施形態では、蓄積された機械的エネルギーを解放することにより、流体がサンプル境界面12302から螺旋チャネル領域（12303）を通して押し出される。いくつかの実施形態では、蓄積された機械的エネルギーを解放することにより、螺旋チャネル領域（12303）を通して流体が引き寄せられる。いくつかの実施形態では、螺旋チャネル領域は、増幅酵素及び試薬を含み得る。いくつかの実施形態では、サンプル境界面は、本明細書に記載されるように、サンプルと共に螺旋チャネル領域に移すことができる増幅酵素及び試薬を含み得る。いくつかの実施形態では、核酸サンプルは、本明細書に記載の螺旋チャネル領域（12303）で増幅される。いくつかの実施形態では、螺旋チャネル領域が加熱される。いくつかの実施形態では、第2のアクチュエータ（12304）は機械エネルギーを貯蔵する。いくつかの実施形態では、貯蔵された機械的エネルギーは、加圧ガスとして貯蔵される。いくつかの実施形態では、第2のアクチュエータ（12304）を作動させると、蓄積された機械エネルギーが放出される。いくつかの実施形態では、保存された機械的エネルギーを放出することにより、サンプルが検出（例えば、ラテラルフローアッセイ）領域（12305）を通して押し出される。いくつかの実施形態では、保存された機械的エネルギーを放出することにより、サンプルがラテラルフローアッセイ領域（12305）を通して引き出される。検出領域は、本明細書に記載の1つ以上のラテラルフローアッセイストリップを含み得る。

10

20

30

40

50

【0309】

本明細書では、図124に示されるハンドヘルド分析デバイスのための様々な方法及びデバイスが説明される。図124は、アクチュエータトリガー（12404、12405）、アクチュエータ（12403）、加熱プレート（12401）、またはプラテン（12402）を含むハンドヘルドアッセイデバイスブレッドボードの実施形態を示しており、これらは例えば図123に記載されている流体とフロースキーム共に使用されるように構成され得る。いくつかの実施形態では、ハンドヘルドアッセイデバイスは、単回使用の使い捨てアッセイ構成要素を含み得る。いくつかの実施形態では、ハンドヘルドアッセイデバイスは、単回使用の使い捨てアッセイ構成要素（例えば、カートリッジ）を収容する再利用可能なハードウェアフレームワークを含み得る。いくつかの実施形態では、単回使用の使い捨てアッセイ構成要素は、プラテン（12402）によって保持される。いくつかの実施形態では、使い捨てアッセイ構成要素は、本明細書に記載の機械エネルギーを貯蔵するアクチュエータを含む。いくつかの実施形態では、アクチュエータは、アクチュエータトリガー（12404、12405）によって作動される。いくつかの実施形態では、使い捨てアッセイ構成要素は、加熱プレート（12401）によって加熱される。いくつかの実施形態では、トリガー、アクチュエータ、加熱プレート、プラテン、及び流体コンポーネント（ラテラルフローアッセイストリップなどを含む）を含むデバイス全体が、単一の使い捨てユニット内で（例えば、ハウジング内で）一緒に結合される。

【0310】

図125は、ハンドヘルドアッセイデバイスの流体チャネル（12501）の実施形態を図示する。本明細書に記載のデバイスのいずれも、図示のように螺旋流体チャネルを含んでもよい（例えば、加熱領域または反応領域は、螺旋流体チャネルを含んでもよい）。いくつかの実施形態では、流体チャネル（12501）は、形状が実質的に螺旋である。いくつかの実施形態では、流体チャネル（12501）はポート（12502）に連結される。いくつかの実施形態では、ポート（12502）は投入サンプルレシーバーである。いくつかの実施形態では、ポート（12502）は投入圧力レシーバーである。いくつかの実施形態では、ポート（12502）は投入希釈レシーバーである。いくつかの実施形態では、流体チャネル（12501）は、酵素または試薬を含み得る。いくつかの実施形態では、流体チャネル（12501）は増幅領域である。いくつかの実施形態では、流体チャネル（12501）は加熱される。いくつかの実施形態では、流体チャネル（12501）は、本明細書に記載の1つまたは複数のDETECTRアッセイ試薬を含み得る

。

【0311】

図126は、本明細書に記載のデバイスのいずれかで実施され得るハンドヘルドアッセイデバイスのラテラルフローアッセイ領域の実施形態を示す。いくつかの実施形態では、反応領域からラテラルフローアッセイ検出領域のラテラルフローアッセイストリップへの流体の実質的に等しい移動のために、チャンネル間の実質的に等しい流体抵抗を確保するために、各ラテラルフローストリップに至る経路の長さは、流体経路の長さ（12601）において実質的に等しい。流体経路の長さは、チャンネルの一端からチャンネルの他端まで移動する流体がたどる経路の長さとして定義される。

【0312】

図127Aから127Bは、図123の流体デバイスと共に作動する図124のブレードボードデバイスを示す。図127Aでは、ばねベースのアクチュエータ12703が装填され、カートリッジは、サンプル境界面へのサンプルの添加の準備ができています。図127Bでは、ばねベースのアクチュエータが部分的に解放され、サンプルがサンプル境界面から螺旋反応領域に引き込まれる。ばねは、増幅中に及び／またはプログラム可能ヌクレアーゼベースの検出反応の間にこの位置にとどまるように構成されている。

【0313】

図128Aは、概念の証拠のテスト用に図123のデバイスに配置された化学的加熱パウチを示す。いくつかの実施形態では、化学的加熱パウチは、酢酸ナトリウム及び金属ボタンを含む溶液を含み、金属ボタンを押すと、発熱性の結晶化反応が開始する。使い捨てのサンプルチャンバ（12801）は、サンプルの添加を可能にするために露出された。使い捨てのサンプルチャンバは、加熱されたパウチ（12802と12803）の間に入れ子になっていた。2つのパウチの間に入れ子になった温度プローブ（12804）を使用して、外部温度を測定した。第2の温度プローブ（12805）を使用して、サンプルチャンバ内の流体温度を測定した。図128Bは、化学的加熱パウチ（12806）で測定され、第2の温度プローブ（12807）で測定された温度を時間の関数として示している。パウチの温度は液体の温度よりも数度高かった。いくつかの実施形態では、流体の温度は、約35分間、53℃の温度をほぼ維持した。いくつかの実施形態では、流体の温度は、約30分間、55℃の温度をほぼ維持した。

【0314】

図129Aから129は、ラテラルフローアッセイ領域の追加の例示の実施形態を示す。いくつかの実施形態では、加熱されたチャンバからのサンプル流体は、例えばシリンジの真空によって生成される吸引によってラテラルフローアッセイ領域に移送され得る。いくつかの実施形態では、ラテラルフローアッセイストリップは、図129Aに示されるように連続した形状で配置され得る。いくつかの実施形態では、ラテラルフローアッセイストリップは、図129Aに示されるようにラジアルの形状で配置され得る。いくつかの実施形態では、ラテラルフローアッセイストリップは、図126に示されるように並行の形状で配置され得る。いくつかの実施形態では、ラテラルフローストリップを使用して、本明細書に記載のプログラム可能ヌクレアーゼ媒介レポーター切断を捕捉することができる。

【0315】

図130は、DETECTR反応を試験するためのブレードボードデバイスの実施形態を描写する。ブレードボードは、反応チャンバとラテラルフローストリップを含む3Dプリントされた使い捨てチップを保持する。この実施形態は、化学的加熱及び電気加熱によるDETECTR反応の試験に適合する。いくつかの実施形態では、デバイスは、流体駆動装置（13001）を含み得る。いくつかの実施形態では、デバイスは、化学的加熱要素（13002）を含んでもよい。いくつかの実施形態では、化学的加熱要素（13002）は、酢酸ナトリウム溶液及び金属ディスクを含むパウチを含んでもよく、金属ディスクを押すと、酢酸ナトリウム溶液中での結晶化が引き起こされる。いくつかの実施形態では、加熱チャンバの温度は、少なくとも約50℃から少なくとも約60℃まで上げられる

10

20

30

40

50

。いくつかの実施形態では、デバイスは、ポリアミド抵抗加熱器を含んでもよい。いくつかの実施形態では、加熱チャンバの温度は、少なくとも約54℃から少なくとも約56℃まで上げられる。いくつかの実施形態では、デバイスは、クランプ（13003）を含み得る。いくつかの実施形態では、デバイスは、ラテラルフローストリップ（13004）を含んでもよい。いくつかの実施形態では、デバイスは、電熱要素（13005）を含むことができる。いくつかの実施形態では、デバイスは、ポリアミド抵抗加熱器を含んでもよい。

【0316】

本明細書では、図131Aから131Bに示されるハンドヘルドアッセイデバイスのための様々な方法及びデバイスが説明される。図131A、DETECTR分析は、電気加熱を使用してハンドヘルドデバイスの実施形態で実行された二重アッセイの成功した増幅を確認した。2000コピーのHeLaRNAと20,000コピーの合成SARS-CoV-2RNAを使用して、2プレックスRT-LAMPアッセイを組み立てた。実験は、アッセイ温度62℃で30分間行った。増幅産物をチップから回収し、Tecanプレートリーダーを使用してDETECTRアッセイを実行し、結果を収集した。増幅されていないマスターミックスとサンプルの一部を氷上で保存し、DETECTR反応の陰性対照として使用した。得られたDETECTR曲線は、電気加熱を使用して螺旋ブレードボードデバイスで強力な増幅が発生したことを確認する。図131Bでは、DETECTR分析が、化学的加熱を使用したハンドヘルドデバイスの実施形態での二重アッセイの増幅の成功を確認した。2000コピーのHeLaRNAと20,000コピーの合成SARS-CoV-2RNAを使用して、2プレックスRT-LAMPアッセイを組み立てた。実験は、アッセイ温度55℃で60分間行った。増幅産物をチップから回収し、Tecanプレートリーダーを使用してDETECTRTMアッセイを実行し、結果を収集した。増幅されていないマスターミックスとサンプルの一部を氷上で保存し、DETECTR反応の陰性対照として使用した。得られたDETECTR曲線は、化学的加熱を使用して螺旋ブレードボードデバイスで強力な増幅が発生したことを確認した。

【0317】

図132は、図122に示されるデバイスと同様の使い捨てチップを有する図130のブレードボードデバイスで実行されたラテラルフロー読み出しによるDETECTR反応を示す。使い捨てチップには、RT-LAMPで増幅されたSARS-CoV-2 N遺伝子を含む200μLのDETECTRマスターミックスが搭載された。使い捨てのチップは、ブレードボードデバイス上で電気ヒーターを使用して20分間インキュベートされた。サンプル投入ポートに適用される「チェイス」緩衝液は、DETECTR反応を希釈してラテラルフローストリップに移動する。結果を写真に撮る前に、4分間ストリップにDETECTR反応を吸収させた。デバイス上でインキュベートする前に反応物の一部を取り出し、「デバイス外」の陰性対照として使用した。テストには、Milenia Hybrid Detectラテラルフローストリップを使用した。このストリップは、コントロールバンドを下の位置（13201）に配置し、SARS-CoV-2 N遺伝子バンドをコントロール（13202）の遠位に配置した。

【0318】

本明細書に開示されるのは、診断用途のためのタンパク質及び製剤を最適化するための方法である。CRISPR診断に理想的なCasタンパク質は、高速で堅牢、かつ高感度である。高速タンパク質により、診断アッセイのターンアラウンドタイムを短縮できる。堅牢な酵素は、ワンポットDETECTRアッセイなど、他の分子プロセスと組み合わせたときに成功する可能性が高くなる。高感度酵素は、少量の増幅産物からの検出、またはプレ増幅を排除して標的核酸の直接検出を行うときの検出限界を下げることもできる。図133は、診断用途のためにタンパク質を評価、特徴付け、及び最適化するために使用されるプロセスの流れ図を示す。タンパク質は、熱安定性、様々なアッセイ緩衝液との適合性、及び感度に基づいて評価できる。図134は、Labcyte Echoを使用するプロセスのワークフローを示す概略図を図示する。Labcyteエコーを使用すると、

手動または半自動セットアップと比較して、酵素の評価と特性評価を4.5倍高速化できる。

【0319】

プログラム可能ヌクレアーゼシステム（Casタンパク質とガイド核酸の組み合わせなど）の最初の最適化には、様々な緩衝液及び35℃から60℃の温度での候補システムの能力のスクリーニングが含まれていた。スクリーニング用に選択された緩衝液には、DETECTRアッセイで使用される緩衝液と他のCas活性緩衝液が含まれていた。緩衝液は、様々な塩の種類、塩濃度、対イオンの種類、及びポリメラーゼの能力にとって重要な様々な添加剤を含むことができる。

【0320】

図135は、3つのCas酵素候補試験の結果を示す。Cas酵素のトランス切断アッセイの結果は、酵素能力間で観察された違いを示している。例えば、Cas M. 1382はCas緩衝液#2で強力に機能し、AMP緩衝液#1でほとんど活性がなかった。Cas緩衝液#3は、高レベルの Mg^{+2} であり、バックグラウンドシグナルの上昇が非標的対照で観察された。Cas M. 1346は、様々な緩衝液で強い能力を示した。この酵素の反応速度曲線は、この酵素が高速かつ高感度であることを示唆しており、複数の温度で初期シグナルが大幅に増加したが、酵素は急速に変性し、40℃を超える温度では持続的な活性を示さなかった。Cas M. 1740は、Cas M. 1346と比較してより遅い活性を示した。Cas M. 1740は50℃の高温で堅牢で継続的な活性を示したが、55℃ではそうではなく、このことは、Cas M. 1740が熱安定性Casタンパク質であり、直接検出のための様々なアッセイ設計と互換性があるか、他のシグナル増幅プロセスと結合しているときであることを示唆している。

【0321】

図136は、異なる温度及び緩衝液での3つのCas酵素候補の能力を示す。

【0322】

図137は、35℃にて、さらなる3つの緩衝液でCas M. 1740を使用して実施したテストの結果を示す。Cas M. 1740は、一部のポリメラーゼ緩衝液と多くの酵素活性緩衝液で強力に活性であった。結果は、特定の緩衝液を使用することにより、酵素の能力が最適化または強化される可能性があることを示している。

【0323】

図138は、35℃での一本鎖オリゴまたは合成dsDNAの検出限界を調査した実験結果を示す。一部のシステムは、機能しているものの、Cas M. 1714などの堅牢な検出限界を含んでいなかった。いくつかは、制御システムCas M. 26と同様の能力を発揮するか、それを上回る可能性があった。

【0324】

図139は、Cas M. 1740についてタンパク質が機能することが証明された35℃及び最高温度の両方での検出限界を評価した実験結果を示す。35℃と50℃の両方で、酵素の能力は類似しており、5 pMの標的を検出できた。

【0325】

図140は、タンパク質の能力に対する添加剤及びアッセイ製剤の効果を調査した実験結果を示す。添加剤には、凍結乾燥（例えば、トレハロース）、タンパク質の能力の安定化（例えば、BSA）、及び水分含有量とクラウディング反応の低減（例えば、PEG）に使用されるものが含まれていた。アッセイ製剤は、ワンポットDETECTR及びツーポットDETECTR反応で使用される緩衝液、酵素、プライマー、及びdNTP濃度で構成されていた。ある場合には、添加剤の効果がほとんどないか、またはまったくない場合があり（例えば、Cas M. 1382及びCas M. 1698）、ある場合には、添加剤が酵素の能力を向上させる（例えば、Cas M. 1434）。一部の酵素は、多かれ少なかれアッセイ製剤に耐性があった。例えば、Cas M. 1698は2ポットDETECTRアッセイ製剤で良好に機能し、1ポットDETECTRアッセイ製剤では活性が低下した。対照的に、添加剤を使用しない場合、Cas M. 1382はCas M. 1698と

10

20

30

40

50

同様の能力を示し、ワンポット D E T E C T R アッセイ製剤ではほぼ完全に阻害された。これは、C a s M . 1 3 8 2 が様々なアッセイ条件でより堅牢である可能性があることを示唆している。

【0326】

図141、図142、及び図143は、一塩基変異に対するC a s タンパク質の感受性を調べた実験の結果を示している。変異に対する感受性が高いタンパク質は、ウイルス株の検出や疾患対立遺伝子の体細胞ジェノタイピングなどのジェノタイピングアプリケーションに役立つ場合がある。一方、変異に対する感受性が低いタンパク質は、堅牢な検出が最も重要なアッセイに役立つ場合がある。各タンパク質の一塩基変異の感受性を評価するために、標的部位に沿ったすべての位置とP A M 領域の4つの潜在的な変異すべてを含む一連の合成 d s D N A 標的分子を合成した。各タンパク質は、以前に決定された最適な条件でスクリーニングされる。一塩基変異に強い感受性を持つタンパク質では、D E T E C T R アッセイからの高いシグナルは、g R N A のヌクレオチドと一致するヌクレオチドについてのみ観察された。単一ヌクレオチド変異に対する感受性が低いタンパク質の場合、ヌクレオチドが g R N A のものと一致するかどうかに関係なく、もう1つのヌクレオチドでD E T E C T R アッセイからの高いシグナルが観察された。図141は、強い一塩基変異感受性を示したC a s M . 1 2 4 0 7 0 の結果を示す。図142はC a s M . 0 8 の結果を示し、これは感度が標的部位に依存することを示している。図143は、同じ標的部位を有するC a s M . 1 2 4 0 7 0 及びC a s M . 0 8 の結果を示し、異なるタンパク質が同じ標的部位に対して異なる感受性を有することを示している。

【0327】

図144Aから144Bは、感度、特異度、または熱安定性に関して最高の能力を有するタンパク質のトランス切断の動力学を調べる実験の結果を示す。R N P 複合体を調製し、標的D N A またはR N A と共にシステムに最適な温度で30分間インキュベートした。様々な濃度の消光蛍光レポーターをシステムに添加し、プレートリーダーを使用して経時的に蛍光を測定した。結果は、各タンパク質のマシンと温度にわたって正規化された。ミカエリス・メンテン速度論が、各システムについて分析された。結果は、C a s エフェクター間の触媒効率の顕著な違いを示した。結果は、最大の触媒効率を持つシステムが検出限界が最も低い傾向があることを示唆している。

【0328】

図145は、様々なC a s 酵素の能力結果をまとめたものである。

【0329】

本明細書で使用される「サンプル境界面」、「サンプル投入」、「投入ポート」、「投入」、「ポート」という用語は、一般に、サンプルを受け取るように構成されたデバイスの一部を指す。

【0330】

本明細書で使用される「加熱領域 (h e a t i n g r e g i o n)」、「加熱領域 (h e a t e d r e g i o n)」、「加熱チャンバ」、「熱量」、「加熱ゾーン」、「加熱表面」、「加熱エリア」などの用語は、一般に、加熱ユニットと熱的に連絡しているデバイスの一部を指す。

【0331】

本明細書で使用される「ヒーター」、「加熱ユニット」、「加熱要素」、「熱源」などの用語は、一般に、熱を生成するように構成され、デバイスの一部と熱的に連通する要素を指す。

【0332】

本明細書で使用される用語「試薬ミックス」、「試薬マスターミックス」、「試薬」などは、一般に、試薬ミックスが処方される反応に関与する1つまたは複数の化学物質を含む処方物を指す。

【0333】

本明細書で使用される「非サイクル温度プロファイル」という用語は、一般に、温度プ

ロファイルが初期温度、目標温度、及び最終温度を有するという点で、周期的または正弦波である温度プロファイルを指す。

【0334】

本明細書で使用される用語「捕捉プローブ」、「捕捉分子」などは、一般に、標的分子に選択的に結合し、洗い流すことができる他の分子にのみ非特異的に結合する分子を指す。

【0335】

本明細書で使用される「収集管」という用語は、一般に、サンプルを収集し、デバイスのサンプル境界面にサンプルを送達するために使用される区画を指す。いくつかの実施形態では、収集管は携帯可能であり得る。いくつかの実施形態では、収集管は、シリンジである。

【実施例】

【0336】

以下の実施例は、本発明の各種実施形態を例示するためのものであり、いかなる形でも本発明を限定することを意味しない。本実施例は、本明細書に記載の方法も含め、好ましい実施形態を現時点で表すもので、例示的なものであり、本発明の範囲を限定する意図はない。特許請求の範囲によって定義される本発明の精神内に包含されるその中の変更及び他の用途は、当業者に想起されるであろう。

【0337】

実施例1：DETECTR反応を使用したHERC2遺伝子の電気化学的検出

DETECTRは、SARS-CoV-2などの病原体を検出するための強力な技術であることが以前に実証されている(Broughton et al., 2020)。電気化学的検出は、蛍光ベースのアッセイよりもおよそ2桁低い検出限界を示すことが実証されている(Lou et al., 2015)。この実施例では、電気化学プローブがDETECTRアッセイに組み込まれている。

【0338】

次の電気化学プローブ：5'-2XXTTATTXX-3'、式中2=5'-6-FAM、X=フェロセン_dT、及び3=3'-ビオチンTEGを使用した。さらに、DropSens μ STAT、ECL機器とDropSensスクリーン印刷カーボン電極を使用して、プローブによりサイクリックボルタンメトリーと短形波ボルタンメトリーの両方が使用された。DETECTR反応の最初と最後の時点の間のシグナルの違いが観察された。50 fMの検出。蛍光アッセイで観察されたものよりもはるかに低いHERC2標的が達成された。図13：電気化学レポーターとのHERC2 DETECTR反応の酸化曲線を示す。エラーバーは、各測定からの3つのトレースを使用して、同じ溶液の2つの測定値の標準偏差を表す。シグナルの40 nAの差が観察され、50 fMのHERC2標的の存在が示された。図14は、電気化学レポーターとのHERC2 DETECTR反応の還元曲線を示す。エラーバーは、各測定からの3つのトレースを使用して、同じ溶液の2つの測定値の標準偏差を表す。シグナルの30 nAの差は、反応の33分後に50 nMのHERC2が存在することを示す。図15：24 μ M電気化学レポーターを使用して、HERC2 DETECTR反応の前後に得られたサイクリックボルタモグラムを示す。各トレースは、同じ溶液の3回のスキンの平均であり、エラーバーは標準偏差を表し、2つのボルタモグラム間の識別可能な差は、24 μ Mのレポーターの存在を示す。

【0339】

実施例2：SARS-CoV-2電気化学DETECTORの反応

次の電気化学プローブ、5'-2XXTTATTXX-3'、式中2=5'-6-FAM、X=フェロセン_dT、及び3=3'-ビオチンTEGは、SARS-CoV-2のゲノムの一部であるDNA配列と共に使用された。短形波ボルタンメトリー測定は、DropSens μ STAT ECL機器とDropSensスクリーン印刷カーボン電極を使用して実行された。500 fMの標的を使用して、DETECTR反応の最初と最後の時点の間のシグナルの違いが検出された。図16は、電気化学レポーターとのSARS-CoV

ー 2 D E T E C T R 反応の酸化曲線を示す。エラーバーは、各測定値からの 3 つのトレースの標準偏差を表す。詳細な実験条件は以下の通りである。D E T E C T R 混合物は、図 1 8 に従って調製された。希釈した株レポーター 1 / 1 0 (1 μ L レポーターと 9 μ L ヌクレアーゼ不含有水) を使用して、2 4 0 μ M のストックを作成した。D E T E C T R マスターミックスを 3 7 $^{\circ}$ C で 3 0 分間インキュベートし、レポーターを加えた後、反応混合物を 1 5 2 μ L のマスターミックスと 8 μ L の標的 (1 倍の T E または 1 0 p M のストック濃度の遺伝子断片) の 2 つのアリコートに分割した。最終目標濃度は 5 0 0 f M であった。測定用の 5 5 μ L のアリコートを $t = 0$ において除去した後、電気化学測定の前に、残りを 3 7 $^{\circ}$ C のヒートブロックで 2 0 分間インキュベートした。図 1 9 によるパラメータを用いた短形波ボルタンメトリーを使用した。測定ごとに 1 滴の 5 0 μ L の溶液を使用した。使用前に、各電極を 1 m L の 1 倍の T E ですすぎ、圧縮空気で乾燥させた。

10

【 0 3 4 0 】

データ分析は以下のように行った。最初の 2 つのスキャンは、通常、電圧印加によってクリアされる電極上の破片からの異常なシグナルがあるため、破棄された。残りの 3 回のスキャンは、サンプルごとに平均化され、標準偏差と分散係数が計算される。次に、ベースライン補正のために平均電流トレースを P e a k F i t ソフトウェアにインポートした。次に、修正されたトレースがエクスポートされ、元の C V 値を使用してエラーの標準偏差が計算された。使用したレポーターのアリコートは、複数の凍結融解サイクルを経験したことに留意されたい。元のパラメーターセットを使用した測定のデータはノイズが多く、完全には分析されていなかった。このピークの位置は、ピークが約 0 . 1 5 V で観察された以前の実験とは異なった。レポーターのアリコートが複数の凍結融解サイクルを経験したため、劣化した可能性があることに留意されたい。対照として、相対シグナルを決定するための L A M P 緩衝液も実行した。L A M P 緩衝液は、以前の实验中に既にマグネシウムで活性化されており、その後再凍結されている)。L A M P 緩衝液は、希釈せずにそのまま実行した。図 1 7 に見られるように、L A M P 緩衝液からのシグナルは、D E T E C T R 反応からのシグナルよりもはるかに高かった。また、 $t = 0$ での陰性対照からのシグナルが他の D E T E C T R 反応からのシグナルよりも高かった。ただし、この測定は、元のパラメータを使用した最初の測定の後、そのサンプルと電極で 2 回目の測定であった。結論として、S A R S - C o V - 2 電気化学 D E T E C T R は、S A R S - C o V - 2 ウイルスの検出可能な結果を可能にした。

20

30

【 0 3 4 1 】

実施例 3 : C a s 1 3 に対するビオチン修飾 g R N A の機能の評価

この実験の目的は、溶液中及び表面に固定化された C a s 1 3 a のビオチン化 g R N A 官能性を評価することであった。この実験では、ビオチン修飾 g R N A (m o d 0 2 3) の 3 回の複製実行と、非ビオチン修飾 g R N A (R 0 0 0 3) の 3 回の複製実行が行われた。m o d 0 2 3 レポーターと R 0 0 0 3 対照の両方に対して、「標的対照なし」または N T C の実行を 3 回繰り返した。手順は次のように実行された。

【 0 3 4 2 】

(1) g R N A を 2 0 μ M に希釈した。

【 0 3 4 3 】

(2) g R N A を用いた C a s 1 2 M 0 8 複合体形成反応を準備した。試験複合体と対照複合体を、1 0 0 p M の最終濃度に希釈した。複合化反応は、2 つの条件で実行され、それぞれ 3 つの複製が行われ、g R N A あたり 6 つの反応が生じた。ミックス複合化の詳細のための図 1 6 を参照されたい。

40

【 0 3 4 4 】

(3) サンプルを 3 7 $^{\circ}$ C で 3 0 分間インキュベートした。

【 0 3 4 5 】

(4) レポーター基質を添加した。

【 0 3 4 6 】

(5) 次のステップまで氷上で反応を維持した。

50

【0347】

(6) 13 μ L の 1 倍の M B u f f e r 1 を 3 8 4 ウェルプレートのウェルに加えた。

【0348】

(7) 複合化反応液を 5 μ L 添加した。

【0349】

(8) ポストアンプフッドで、2 μ L の 1 nM 標的 (それぞれ) を氷上の 3 8 4 ウェルプレートに移し、保持した。

【0350】

(9) 光学的に透明なシール付きのプレートで密閉した。

【0351】

(10) 2000 r c f で 30 秒間スピンドウンする。

【0352】

(11) 37 C で 30 分間、ゲイン設定を拡張したプレートリーダーで読み取る。

【0353】

図 3 2 A 及び 3 2 B は、ビオチン修飾レポーターである m o d 0 2 3 及び非ビオチン修飾レポーターである R 0 0 3 の溶液の結果をそれぞれ示す。ビオチン修飾 g R N A は、溶液中の非ビオチン修飾 g R N A と同様の能力を有することが示された。図 3 2 C は、ビオチンで修飾され、表面に固定化された g R N A の結果を示す。図 3 2 D は、ビオチンで修飾されていないが、C と同じ方法で表面に堆積された g R N A の結果を示す。図 3 2 E は、図 3 2 A 及び 3 2 B と同様で、未修飾で溶液中の g R N A の結果を示す。これらの結果を総合すると、ビオチン修飾と表面固定化により機能性が維持され、D E T E C T R アッセイの能力に悪影響がないことが示された。

【0354】

実施例 4 : ストレプトアビジンスライドでのレポーターインキュベーション時間の最適化

この実験の目的は、30 分のインキュベーション時間が強いシグナルアッセイシグナルを生成するのに十分かどうかを確認することであった。2 つの濃度を実行した。使用される手順は次のとおりである。

【0355】

1. 1 倍洗浄緩衝液中の 1 μ M 及び 5 μ M での R E P 0 7 2 r e p 1 0 6 の希釈物を調製した。1 倍の W a s h B u f f e r は 25 mM の T r i s 、150 mM の N a C l 、p H 7 . 2 、0 . 1 % の B S A 、及び 0 . 0 5 % の T w e e n (登録商標) - 20 洗剤で構成されている。

【0356】

2. 新鮮なストレプトアビジンスライドのウェルは、疎水性ペンを使用して、図 3 3 、及び図 3 4 A 及び図 3 4 B に示されるようにマークされた。

【0357】

3. 各希釈液 3 μ L を、ストレプトアビジンでコーティングしたスライドにスポットした (3 連) 。

【0358】

4. スライドを室温で 30 分間インキュベートし、遮光した。

【0359】

5. 各スポットから 3 μ L の希釈液を取り出した。

【0360】

6. 5 μ L の 1 倍の洗浄緩衝液を各スポットに加え、上下に 3 回混合した。この洗浄ステップを 3 回繰り返した。

【0361】

7. 50 μ L の 1 倍の洗浄緩衝液を加え、5 分間インキュベートした。

【0362】

8. 次に、スライドをキムワイプ上でフリックしてすべての溶液を除去し、キムワイプ

10

20

30

40

50

に対して4つの側面すべてを軽くたたき、端をきれいにした。

【0363】

9. 次に、スライドをGelDocで画像化した（SYBR Blue設定、ゲイン設定を調整した自動露出）。

【0364】

図33は、試験レポーターRep072及び陰性対照Rep106の結果を示す。5 μ MでのRep072の複製は最も強いシグナルを示し、1 μ M濃度でのRep072の3つの複製は次に強いシグナルを示す。陰性対照レポーター、rep106は、5 μ Mと1 μ Mの両方の濃度で同じ低いシグナル（まったくシグナルなしで）を示す。この結果は、5 μ Mと1 μ Mの両方の濃度で30分のインキュベーション時間でのFAMビオチン化レポーターの特異的結合を示している。図34Aから34Bは、図34Aにおける5mM、図34Bでの2.5mMレポーターによる同様の結果を示す。図34A及び34Bの一番上の行は、明るい蛍光を示すスポットを示し、図34A及び34Bの一番下の行は、同様に低い蛍光を示すスポットを示す。

【0365】

実施例5：固定化のためのクエンチャーベースのレポーター試験

蛍光クエンチャーベースのレポーターは、固定化されたDETECTRアッセイで試験された。ストレプトアビジン官能化プレートとビオチン標識レポーターを使用した。図36は、この実験で使用されたレポーターの配列及び他の詳細を示す。次の手順が使用された。

【0366】

1. レポーターrep072、rep104、rep105、rep117、及びrep118のストックを、リーダープレートへの結合のために調製した。レポーターの結合の詳細は、図37Aに見ることができる。

【0367】

2. 次に、ビオチンTEGで5'修飾されたmod018配列を使用して、複合体形成反応を調製した。配列mod018の詳細については、図36を参照されたい。複雑な混合物の詳細は、図37Bに見ることができる。

【0368】

3. 複合体形成反応を37℃で30分間インキュベートした。

【0369】

4. RNPとレポーターの希釈のグリッドは、（50：50比率）それぞれ2つの反応に十分な材料を使用して調製した。

【0370】

5. 次いで96ウェルのストレプトアビジンコーティングプレートのウェルを100 μ Lの1倍のMBuffer1で2回、事前にすすいだ。

【0371】

6. 次いで25 μ Lの複合体と25 μ Lのレポーターミックスを加えた。

【0372】

7. ホイルシールでプレートを密封した。

【0373】

8. 次いで、断続的に振とうしながら（Thermomixerで2分ごとに1000rpm15秒）、25℃で30分間結合を行った。

【0374】

9. その後、プレートを短時間スピンドウンした。

【0375】

10. 上清を取り除いた。

【0376】

11. 100 μ Lの1倍のMBuffer-1で1回洗浄。1倍のMBuffer-1は20mMのイミダゾール7.5、25mMのKCl、5mMのMgCl₂、10 μ g／

10

20

30

40

50

mLのBSA、0.01%のIgepal Ca-630、及び5%のグリセロールで構成されている。

【0377】

12. 100 μ Lの1倍のMBuffer-3で1回洗浄。1倍のMBuffer-3は、20mMのHEPES、pH7.5、2mMのKOAc、5mMのMgOAc、1%のグリセロール、及び0.00016%のTriton-X100で構成されている。

【0378】

13. 各ウェルに50 μ Lの1倍のMBuffer3を加えた。

【0379】

14. 1倍のMBuffer3a.の中の標的／標的なしの体積の5 μ Lを追加。目標量＝反応あたり5 μ L (GF577 PCR産物1:10)

【0380】

15. ホイルシールでプレートで密封した。

【0381】

16. FAM強度を測定するプレートリーダーで断続的に振盪しながら、37℃で90分間インキュベートした。

【0382】

17. 軽くスピンドウンする。

【0383】

18. 20 μ Lの上清を384ウェルプレートのウェルに移し、FAM蛍光強度を測定した(シングルリード)。

【0384】

結果を図27Aから27Eに示す。予想どおり、陽性対照は、反応の過程で結合が増加したことを示す正の勾配を示す。これは、図27Bに見られるように、結合及びトランス切断時にFAM色素が溶液中に放出されるためである。rep104では、切断点はFAMとビオチンの間にあるが、すべてのレポーターのビオチンはストレプトアビジン表面への結合点である。図27Cは、対照、rep105の標的結合動力学プロットをプロットする。Rep105は、ビオチン-FAM-T16-FQで構成されている。この場合、FAM色素とクエンチャーの間の領域が結合時に切断され、クエンチャーが放出されるため、ストレプトアビジンでコーティングされた表面が蛍光を発する。図27Dは、対照、rep117の標的結合動力学のプロットをプロットした。Rep117は、ビオチン-FAM-T20-FQで構成されている。この実施形態では、レポーターはFAM色素とクエンチャーとの間で切断され、したがって、結合及びトランス切断の際に溶液中でクエンチャーを放出することが可能になる。これにより、順次表面が蛍光を発する。図27Eは、対照、rep118の標的結合動力学のプロットをプロットする。Rep118はFAM-T20-ビオチン-FQで構成されている。この実施形態では、ビオチンとFAMとの間の核酸領域が結合するとトランス切断され、FAMが溶液中に放出されるため、溶液は蛍光を発する。

【0385】

実施例6：固定化の最適化－複合体形成ステップ

この実験の目的は、gRNAとレポーターの両方をプレートに結合することで、CASSタンパク質-gRNA複合体とレポーターを結合するのと同じくらいDETECTRアッセイが有効になるかどうかを判断することであった。これにより、gRNAとCASSタンパク質の前複合体で表面を機能化する必要がなくなり、製造プロセスが容易になる。さらに、より厳密な洗浄を可能にすることで、より高い特異度を実現できる。以下の手順を使用した。

【0386】

1. 実験は図38Aに示されるように設計された。

【0387】

2. レポーターrep117のストック溶液を、図38Bに示す条件に従ってプレート

に結合させた。

【0388】

3. mod018 (5' ビオチン-TEG R1763 SARS-CoV-2 N-遺伝子) 及び R1763 CDC-N2-Wuhan の複合体化反応は、次いで図39Aに示す条件に従って調製された。

【0389】

4. 図39Bに従って、2組の完全な複合体混合物を、それぞれについて、及び Cas12M08 を含まない2つの混合物について作製した。

【0390】

5. 37℃で30分間、複合体形成反応をインキュベートした。

10

【0391】

6. 96ウェルのストレプトアビジンコーティングプレートのウェルを50µLの1倍のMBuffer1で事前に2回洗浄

【0392】

7. 各ウェルに25µLのレポーターを追加した。

【0393】

8. 25µLの複合体をA1からD2に、25µLの1倍のMB1をA3からD4に、25µLのcRNAミックスA5からD6を追加した。

【0394】

9. ホイルシールでプレートを密封した。

20

【0395】

10. サーマミキサーで断続的に振とうしながら、25℃で30分間、1000rpmで2分ごとに15秒、結合反応を行った

【0396】

11. ストレプトアビジンプレートを軽く回転させる。

【0397】

12. 上澄みを取り除く。

【0398】

13. 100µLの1倍のMBuffer-1で2回洗浄。

【0399】

14. 100µLの1倍のMBuffer-3で1回洗浄。

30

【0400】

15. ウェルA1からD2に50µLの1倍のMBuffer3を加えた。

【0401】

16. 25µLの1倍のMB3と25µLの複合体を「溶液の中」のウェルA3からD4に追加した。

【0402】

17. 47.5µLの1倍のMB3及び2.5µLのCas12M08 (50uL MM) を各「prot after」ウェルA5からD6に追加した。

【0403】

18. 1:10希釈精製LAMP製品の5µLを(+)対象ウェルに追加。

40

【0404】

19. 光学的に透明なシール付きのプレートで密閉した。

【0405】

20. プレートリーダーで読み取る-FAM、37℃、90分。

【0406】

この実験の結果は、図29Aから29Fに示されており、CASタンパク質を標的に付加し、それでも複合体形成及びシグナルを達成することが可能であることを示している。図29Aから29Cは、試験の第1の複製の結果を示す。図29Dから29Fは、試験の第2の複製の結果を示す。図29A及び29Dは、ビオチン化レポーター及びビオチン化

50

R N A と C A S タンパク質との複合体の両方が固定化された結果を示す。ここで、活性緩衝液と標的が次いで追加された。図 2 9 B 及び 2 9 E は、ビオチン化レポーターが固定化され、g R N A 及び C A S タンパク質を含む他のすべての反応成分が溶液中に導入された結果を示す。図 2 9 C 及び 2 9 F は、ビオチン化レポーター及びビオチン化 g R N A が固定化され、次いで緩衝液、C A S タンパク質及び標的が添加された結果を示す。これらの結果において、g R N A 及びレポーターのみが図 2 9 F に示されるように固定化されているとき、C A S タンパク質及び g R N A の複合体形成ならびに結合によるレポーターシグナルを検出できることが観察される。

【0407】

実施例 7：固定化された標的識別の実証

10

この実験の目的は、D E T E C T R 反応の固定化レポーターの標的識別を実証することであった。この実験で使用された実験計画は、図 4 0 A に示されている。以下の手順を使用した。

【0408】

1. 図 4 0 A に示すように実験は計画された。実験には、m o d 0 1 8、m o d 0 2 5、及び m o d 0 2 4 を含む 3 つの g R N A が含まれていた。2 つの標的と 2 つのコントロールが使用された。2 つの標的は、N 遺伝子と R N a s e P であった。2 つのコントロールは、(1) 他のすべての反応成分を含む標的なし、及び (2) 水であった。

【0409】

2. 後にプレートに結合するレポーター r e p 1 1 7 のストック溶液を、図 4 0 B に示すように調製した。

20

【0410】

3. 3 つの g R N A、m o d 0 1 8、m o d 0 2 4、及び m o d 0 2 5 とレポーターの複合化反応を準備した。

【0411】

(1) ビオチン-TEG R 1 7 6 3 S A R S - C o V - 2 N 遺伝子。

【0412】

(2) 5' ビオチン-TE G R 7 7 7 マンモス。

【0413】

(3) それぞれ、5' ビオチン-TEG R 1 9 6 5 R N a s e P。反応条件を図 4 1 A に示す。

30

【0414】

4. 96 ウェルのストレプトアビジンコーティングプレートのウェルを 50 μ L の 1 倍の M B u f f e r 1 で事前に 2 回洗浄。

【0415】

5. 各ウェルに 25 μ L のレポーターを追加した。

【0416】

6. 25 μ L の複合体混合物をウェルに追加した。

【0417】

7. ホイルシールでプレートを密封した。

40

【0418】

8. サーマミキサーで断続的に振盪しながら、25 $^{\circ}$ C で 30 分間 (1000 r p m で 2 分ごとに 15 秒)、結合反応を行った

【0419】

9. F A S T R プロトコルを次のように実行する。

【0420】

a. 使用したプライマー。

【0421】

I. S A R S - C o V - 2 : M 2 0 6 2 C D C N 2 - F W D / M 2 0 6 3 C D C N 2 - R E V。

50

【0422】

II. RNase P: POP7 8F / 6R. 反応条件については図41Bを参照されたい。

【0423】

II. a. MBS96ウェルプレートのウェルに4 μ Lのマスターミックスをピペットで入れる。

【0424】

b. ツイストRNA希釈液1 μ Lを追加。

【0425】

c. 1000コピー / μ L、すなわち42.2 μ LのH2O6400c / μ Lのうちの7.8 μ L。 10

【0426】

d. プレートをホイルシールで165°C、1.5秒間密封する。

【0427】

e. 図42に示す条件に従って、MBS NEXTGENPCRサーモサイクラーで以下のPCRプロトコルを実行した。.

【0428】

f. サーモサイクラーからプレートを取り外した。

【0429】

g. 2000rpmで30秒間スピンドウンする。 20

【0430】

h. 使用状態になるまで氷上で保管する。

【0431】

10. ストレプトアビジンプレートを軽く回転させる。

【0432】

11. 上澄みを取り除く。

【0433】

12. 100 μ Lの1倍のMBuffer-1で2回洗浄。

【0434】

13. 100 μ Lの1倍のMBuffer-3で1回洗浄。 30

【0435】

14. 50 μ Lの1倍のMB3、15mMのMg²⁺を添加。

【0436】

15. FASTRから4 μ Lの標的を標的ウェルに追加した。

【0437】

16. 光学的に透明なシール付きのプレートで密閉した。

【0438】

17. プレートリーダーで読み取る-FAM、37°C、90分。

【0439】

結果を図31Aから31Cに示す。図31Aは、N遺伝子標的に対する特異度を示すレポーターmod018の結果を提示する。図31Bは、RNaseP標的に対する特異度を示すレポーターmod025の結果を提示する。図31Cは、mod024についての結果を示しており、標的が存在しなかったため、予測されたようにシグナルを示さなかった。 40

【0440】

実施例8: ワンポットRT-LAMPの機能試験

この実験の目的は、RT-LAMPとCas12M08酵素ベースのDETECTRマスターミックスの両方で構成されるワンポット反応の機能をテストすることであった。両方のマスターミックスと一緒に1つのマスターミックスに共凍結乾燥した。反応は、最適な反応温度の違いにより機能的に互換性がないため、個別に評価された。RT-LAMP 50

マスターミックスは、液体コントロールのような反応特性を示す。R T - L A M P アッセイの結果を図 9 9 A に、C a s 1 2 M 0 8 アッセイの結果を図 9 9 B に示す。図 1 0 0 に示す結果は、R T - L A M P 及び C a s 1 2 M 0 8 D E T E C T R マスターミックスで構成され、1 つのマスターミックスに共凍結乾燥され、再構成された「ワンポット」反応を示している。図 1 0 0 に示す結果は、反応曲線に基づく活性を示す。

【 0 4 4 1 】

実施例 9 : C a s 1 4 a 1 D E T E C T R

この実験の目的は、R T - L A M P アッセイが必要とする温度よりも高い温度で機能する C a s 1 4 a 1 を調査することであった。この実施例では、温度は 5 5 °C まで上昇した。図 1 0 1 に示す結果は、C a s 1 4 a 1 が凍結乾燥され、対照に匹敵する活性で再構成されることができたことを示している。

10

【 0 4 4 2 】

実施例 1 0 : ワンポット C a s 1 2 M 0 8 ベースの D E T E C T R アッセイの機能試験

この実験の目的は、R T - L A M P と D E T E C T R 反応試薬の両方を一緒に含むプール及び凍結乾燥マスターミックスの能力を調査することであった。さらに、この研究は、事前凍結乾燥混合物が、凍結乾燥前の 2 週間安定していることを示した。C a s 1 2 M 0 8 は R T - L A M P 増幅条件と互換性がないため、一緒に凍結乾燥された R T - L A M P と C a s 1 2 M 0 8 ベースの D E T E C T R のマスターミックスは、機能的に個別にテストされた。これらのデータは、凍結乾燥前に 4 °C で 2 週間保存されたマスターミックスに匹敵する、強力な R T - L A M P 及び C a s 1 2 M 0 8 ベースの D E T E C T R 活性を示している。結果が図 1 0 2 A と 1 0 2 B に示される。

20

【 0 4 4 3 】

実施例 1 1 : 少量の凍結乾燥反応

この実施例の前に、凍結乾燥サンプル量が 2 5 0 µ L で示され、ガラスバイアルで実行された。この実施例では、8 ウェルプラスチックストリップチューブで 2 5 µ L のサンプルを凍結乾燥した場合のデータを示す。さらに、事前凍結乾燥（4 °C で 3 週間）と値は同等であり、図 1 0 3 に見られるようにマスターミックスの安定性を示している。1 5 % のトレハロースを含む反応試薬の凍結乾燥マスターミックスの示差走査熱量測定の結果を図 1 0 4 に示す。1 0 9 . 8 9 °C の半値中点が観測された。これらの結果を総合すると、反応試薬のマスターミックスは、少量の凍結乾燥プロセス全体で安定していることがわかる。

30

【 0 4 4 4 】

実施例 1 2 : ハンドヘルドマイクロ流体デバイスのワンポット D E T E C T R

この実験では、ハンドヘルドマイクロ流体デバイスでのワンポット D E T E C T R アッセイの能力を評価した。ここで、ワンポットとは、試薬の 1 つのマスターミックスとして凍結乾燥された R T - L A M P 試薬と D E T E C T R 試薬の両方を指す。ハンドヘルドのマイクロ流体デバイスで実行される機能には、サンプルの取得、サンプルからの R N A 抽出、サンプルと C R I S P R 反応物との混合、混合物をウェルに移し、混合物を反応温度まで加熱することが含まれる。デバイス内で混合物を加熱し、蛍光を経時的に連続的にモニターした。図 1 0 6 は、3 つの異なるデータ取得設定でプロットされた結果を表示する。一連の四角形は、ディテクタを飽和させなかった設定を示しているため、アッセイの全期間にわたってシグナルのダイナミックレンジ全体が表示された。このデータから、D E T E C T R アッセイは、小型のハンドヘルドマイクロ流体デバイスで実行した場合に機能することが判明した。

40

【 0 4 4 5 】

実施例 1 3 : D E T E C T R ベースのラテラルフローアッセイストリップ

この実施例の目的は、図 1 0 7 A から 1 0 7 B に示されるように、平行読み出しのためのラテラルフローアッセイ（L F A）ストリップを使用する、D E T E C T R（商標）ベースの多重化アッセイを実証することである。D E T E C T R（商標）アッセイを実行するには、表面（1 0 7 0 0）をプログラム可能ヌクレアーゼプローブ（1 0 7 0 7）とレ

50

ポータープローブ（１０７０１）で固定する。この実施例では、表面はＬＦＡストリップとは別個のウェルの底である。レポータープローブ（１０７０１）は、表面リンカー（１０７０２）、切断可能な核酸配列（１０７０３）、標識（１０７０４）、及びストリップのフロー捕捉プローブ（１０７０５）に対する結合部分を含む。この実施例では、結合部分はビオチンである。標識及び結合部分は、第２のリンカー（１０７０６）によって核酸（１０７０３）に結合され、この実施例では、リンカーはデンドリマーまたはトレブラー分子である。プログラム可能ヌクレアーゼプローブ（１０７０７）は、表面リンカーと、順次ｓｇＲＮＡ（１０７０８）を含むプログラム可能ヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ酵素）を含む。ｓｇＲＮＡには、反復単位（またはヘアピン）と認識配列が含まれている。認識配列は、サンプルの標的核酸に対する相補体である。抗ビオチン標識金ナノ粒子は、図１０７Ｂに示すように、ＬＦＡストリップ（１０７１０）のサンプルパッド（１０７１１）に配置される。この実施例では、最初のステップは、表面（１０７００）を、標的核酸を含むサンプルと接触させることである。固定されたプログラム可能ヌクレアーゼプローブ（１０７０７）のｓｇＲＮＡ（１０７０８）に相補的な標的核酸が結合すると、近接して固定されたレポーター（１０７０１）がプログラム可能ヌクレアーゼによって切断され、レポーターの切断部分（１０７０９）が溶液に放出される。そのとき、サンプル中に存在した標的核酸に対応する切断されたレポーターを含むサンプル溶液を、ラテラルフローアッセイストリップ（１０７１０）のサンプルパッド（１０７１１）に接触させる。この実施例では、サンプルパッドは、その上にフロー捕捉プローブ（例えば、抗ビオチン標識金ナノ粒子）が配置されている。レポーターの放出された部分を含むサンプル溶液がサンプルパッドと接触すると、当該サンプル溶液はそのときサンプルパッドを横切って流れる（例えばウィッキングによって）。サンプル溶液中の切断されたレポーターは、溶液中での接触時に抗ビオチン金ナノ粒子フロー捕捉プローブと接触して結合する。次に、レポーターとナノ粒子の複合体は、ラテラルフローアッセイストリップの検出領域（１０７１２）を通る毛細管現象によって、残りの液体サンプルと共に下流に運ばれる。この実施例では、検出領域（１０７１２）は、６つの検出スポット（１０７１３）を含み得、各検出スポット（１０７１３）は、レポーターの色素（１０７０４）に特異的な異なる捕捉抗体タイプを含む。この実施例では、色素（１０７０４）はＦＩＴＣであり、固定捕捉プローブは検出スポット（１０７１３）に対して機能化された抗ＦＩＴＣ抗体であり、他の標的核酸に特異的な他のレポーターの中でＦＩＴＣ標識レポーターの特異的検出を可能にする。コントロールライン（１０７１４）が存在し、抗ＩｇＧで官能化されているため、ＦＩＴＣ標識レポーター断片（検出部分など）に結合していないすべてのフロー捕捉プローブが捕捉され、検出される。この実施例では、シグナルを増幅するために、複数の標識及び結合部分が検出部分の樹状リンカー（１０７０６）を介して存在していたことに留意すべきである。この実施例では、複数の検出スポット（１０７１３）が存在し、実施例１４で説明したように、多重化サンプルの並列検出の可能性を許容している。

10

20

30

40

50

【０４４６】

実施例１４：多重化ＤＥＴＥＣＴＲベースのラテラルフローアッセイストリップ

この実施例の目的は、図１０８に示すように、マルチプレックス「ホットポット」アッセイを利用したラテラルフローアッセイストリップのワークフローを示すことである。この実施例では、サンプル（１０８０１）は、標的核酸配列１及び２を含む。サンプル（１０８０１）は、Ｄ１からＤ５までの５つの位置のそれぞれに異なるｓｇＲＮＡが表面に固定化されているウェルの表面（１０８０２）に接触する。例えば、５つの異なるｓｇＲＮＡの各々は、図１０８に示されるように、Ｄ１からＤ５までの５つの異なる位置に固定化された５つの異なるプログラム可能ヌクレアーゼプローブ（例えば、図１０７を参照）の一部である。さらに、５つの異なるｓｇＲＮＡのそれぞれは、サンプル中の異なる標的核酸に特異的に結合するように設計されているため、サンプルの多重化が可能である。ｓｇＲＮＡを含む固定化されたプログラム可能ヌクレアーゼプローブに加えて、Ｄ１からＤ５までの各位置は、異なる官能基を持つレポータープローブで官能化されている。レポータープローブは、プログラム可能ヌクレアーゼプローブによって切断されるのに十分に近接

している。したがって、実施例 13 に記載されるように、レポーターは、s g R N A と、s g R N A が特異的に結合するように設計された標的核酸との間の結合時に切断され、溶液中に放出される。この実施例では、D 4 と D 5 にはそれぞれ、2 つの異なるラベルまたは捕捉抗体認識要素で標識されたレポーターが含まれている。サンプルがウェル（D 1 から D 5）と接触すると、レポーターのそれぞれの切断されたセクションがサンプル溶液に放出される（実施例 13 に記載）。次いで、放出されたレポーターを含むサンプル溶液をサンプルパッドと接触させ、この実施例ではラテラルフローアッセイに配置する。この実施例では、各検出スポットに異なる種類の捕捉抗体が含まれており、各捕捉抗体の種類はレポーターの特定の標識に特異的に結合する。この実施例では、検出スポット（10803）には捕捉抗体抗 F I T C が含まれているが、ウェル D 5 には、1）第 1 の標的核酸配列に特異的な s g R N A を含む固定化された C a s 複合体、及び 2）F I T C で標識付けされている固定化されたレポーター（10806）が含まれている。したがって、第 1 の標的核酸配列が対応する s g R N A と結合すると、対応する固定化レポーター（10806）と対応する核酸（例えば、図 107 の参照文字 10701 を参照）との間の結合が切断され、それによって、レポーターが溶液に放出される。対照的に、この例では、検出スポット（10804）には捕捉抗体抗 D I G が含まれているが、ウェル D 4 には、1）第 2 の標的核酸配列に特異的な s g R N A を含む固定化された C a s 複合体、及び 2）D I G で標識付けされているレポーター（10805）が含まれている。したがって、第 2 の標的核酸配列が対応する s g R N A と結合すると、対応する固定化レポーター（10805）と対応する核酸（例えば、図 107 の参照文字 10701 を参照）との間の結合が切断され、それによって、レポーターが溶液に放出される。次に、切断されたレポーター（10805 及び 10806）を含む溶液を、チェイス緩衝液と共に L F A ストリップのサンプルパッドに接触させる。ここで、レポーターは、サンプルパッドに配置されたフロー捕捉プローブ（例えば、抗ビオチン-A u N P）と結合してピックアップする。F I T C で標識されたレポーター（10806）を有する A u N P-レポーターコンジュゲートは、捕捉抗体抗 F I T C を含有する検出スポット（10803）に選択的に結合し、したがってサンプル中の第 1 の標的核酸配列の存在を示す。D I G で標識されたレポーター（10805）を有する A u N P-レポーターコンジュゲートは、捕捉抗体抗 D I G を含有する検出スポット（10804）に選択的に結合し、したがって、サンプルにおける第 2 の標的核酸配列の存在を示す。このようにして、多重化サンプル中に存在する 2 つ以上の標的核酸配列の並行検出が可能になる。いくつかの実施例では、所与の検出スポットでのレポーターの検出が特定の標的核酸と相関するように、検出スポットは所定の位置で互いに離間している。

10

20

30

40

50

【0447】

実施例 15：H R P 増強 D E T E C T R ベースのラテラルフローアッセイストリップ

この実施例の目的は、図 109 に示されるように、西洋ワサビペルオキシダーゼ（H R P）紙ベースの検出を実証することである。ここで「紙ベース」とは、ラテラルフローアッセイストリップを指す。実施例 7 及び 8 のように、標的（複数可）核酸配列を含有する青色の液体サンプルを表面に曝露し、その上で C R I S P R-C a s / g R N A プローブとレポータープローブは固定化されている。この実施例では、レポータープローブに H R P 分子が含まれている。標的とガイド R N A 間の特異的結合事象に続く C a s 酵素（例えば、プログラム可能ヌクレアーゼ）によるレポーターの切断時に、レポーターの切断された部分がサンプル溶液に放出される。この実施例では、レポートされた分子の放出されたセクションを有するサンプル溶液は、このとき、水和時に H₂O₂ を生成する過炭酸ナトリウムを含むサンプルパッドを含むラテラルフローアッセイストリップと接触する。H₂O₂ を形成するための過炭酸ナトリウムの再水和は、前の実施例 7 及び 8 で説明したように、サンプルがサンプルパッド及びラテラルフローアッセイを通して検出スポットに運ばれるときに起こる。この実施例には、ラテラルフローアッセイストリップは、青色から赤色への色の変化を活性化する化学基質 D A B 及び T M B が含まれており、H R P の存在を示し、順次標的核酸配列の「ヒット」を示す。H R P の化学触媒性質により、シグナル増

幅が可能になる。あるいは、サンプル溶液の色が青から赤に変化したときに、溶液中で読み出しを行うこともできる。

【0448】

実施例16：HRP増強多重化DETECTRベースのラテラルフローアッセイストリップ

この実施例の目的は、図110に示されるように、HRPシグナル増強多重化ラテラルフローアッセイを実証することである。固定化表面（11000）及びラテラルフローアッセイストリップ（11010）での検出は、シグナル伝達が金ナノ粒子散乱光によって行われないことを除いて、前の実施例に記載されているように行われる。代わりに、抗ビオチン標識AuNPは、HRP抗ビオチンDAB/TMBに取って代わられる。HRPは、LFAストリップに存在する過炭酸ナトリウムによって活性化され、反応緩衝液やチェイス緩衝液によって再水和される。このようにして、HRPは、PCRなどのサンプル増幅を必要としないように、十分に強いシグナルを可能にする。多重化検出は、実施例14に記載したのと同じ方法で達成される。

10

【0449】

実施例17：捕捉オリゴプローブ特異度を有するCas13ベースのHRP増強DETECTR LFA

この実施例の目的は、図111に示されるように、DNAに対するCas13 RNA切断特異度、HRPシグナル増強、及び捕捉オリゴプローブ特異度を利用する多重化標的核酸検出を実証することである。この実施例では、サンプル（11100）は異なる標的核酸を含んでいる。次いで、サンプル（11100）を、実施例14に記載されるように、D1からD5の5つの位置で官能化されたウェルの表面（11101）に接触させる。ここでの違いは、Cas13酵素がCas複合体プローブに存在することである。Cas13はRNAを切断するが、DNAは切断しない。これにより、一方がDNAで構成され、他方がRNAで構成される核酸配列を含むレポーター（11102）の使用が可能になる。いくつかの実施形態では、標的核酸がsgRNAに結合すると、レポーターのRNAがCas13酵素によって切断され、RNAの一部、完全なDNA配列、及びFITC標識を含む断片が溶液中に放出される。このアクションは、5つの異なる標的核酸の各スポットD1からD5で並行して繰り返され、5つの異なるレポーター断片が生成される。次に、溶液をLFAストリップのサンプルパッドに接触させ、サンプルパッドにはHRP抗FITCが含まれている。次に、FITC標識レポーター断片は、HRP-抗FITCに結合して複合体（11103）を形成し、検出領域を横切って下流に運ばれ、複合体（11103）のオリゴの補数になるように設計された捕捉オリゴを含む検出スポットに特異的に結合する。このようにして、実施例14に記載の多重化サンプルの並列検出が可能である。

20

30

【0450】

実施例18：Cas14を利用するHRP増強DETECTR（商標）ベースのラテラルフローアッセイストリップ

この実施例の目的は、図109に示されるように、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）紙ベースの検出を実証することである。ここで「紙ベース」とは、ラテラルフローアッセイストリップを指す。実施例13及び14のように、標的（複数可）核酸配列を含有する青色の液体サンプルを表面に曝露し、その上でプログラム可能ヌクレアーゼプローブとレポータープローブは固定化されている。この実施例では、レポータープローブにHRP分子が含まれている。標的とガイド核酸間の特異的結合事象に続くCas14酵素によるレポーターの切断時に、レポーターの切断された部分がサンプル溶液に放出される。この実施例では、次にサンプル溶液を、水和時にH₂O₂を生成する過炭酸ナトリウムを含むサンプルパッドを含むラテラルフローアッセイストリップにさらす。H₂O₂を形成するための過炭酸ナトリウムの再水和は、前の実施例13及び14で説明したように、サンプルが領域を通してウィッキングされるときに起こる。基質がDAB、TMBなどを含んでいるので、「スポット」は青色から赤色に変化し、HRPの存在を示し、次いで標的核

40

50

酸配列に対する「ヒット」を示す。このようにして、HRPはシグナル増幅を可能にする。あるいは、図109に示すように、サンプル溶液の色が青から赤に変化したときに、溶液中で読み出しを行うこともできる。

【0451】

実施例19：HRP-T20-ビオチンDETECTR（商標）ベースのアッセイ

この実施例の目的は、HRP及びDETECTR（商標）ベースのアッセイを実証することであった。この実施例では、レポーターはCas複合体、または溶液中のDNase酵素によって切断された。切断されたレポーターは、HRP-T20-ビオチンに反応した。次いで、TMB及びH₂O₂を含有する反応体積に上澄み溶液を添加して、色のシグナルを発生させた。次いで、溶液の光学密度測定によって、切断されたレポーター-HRPコンジュゲートを検出した。光学密度測定値は、反応の最初から得られた。実験は、それぞれ2回の実行を含む2つのセットで実行され、各セットは1週間間隔で実行された。DNaseとDETECTR（商標）は、各セットの各実行で別々に使用された。DNaseの実行では、1nMのHRP標的オリゴを、黒丸のつながりを満たして使用した。結果が図112に示される。この実施例の重要性は、HRPとDETECTR（商標）の両方の複数のターンオーバーにより、PCRなどのサンプル増幅に代わるシグナル増幅が可能になることである。

10

【0452】

実施例20：DETECTRアッセイにおける増強された標的検出シグナルのためのガイドプーリング

20

単一の標的分子内の異なる領域に結合するように設計されたガイドRNAは、DETECTRアッセイからの標的検出シグナルを増強するための戦略としてプールされた。例えば、この戦略では、各DETECTR（商標）反応にはCRISPR-CasRNP複合体のプールが含まれており、それぞれが単一分子内の異なる領域を標的としていた。以下の段落で説明するように、この戦略は、数が増加した複合体／単一の標的を用いることで、標的検出の感度を向上させ、その結果、シグナルは、ポアソン分布（サブ1コピー／液滴）内で検出し、サンプル内の標的数の定量的評価を提供するのに十分な強度になっている。

【0453】

Cas12aヌクレアーゼを使用した標的検出に対するガイドプールの効果をテストするために、まず、Cas12a複合体ミックスを調製した。R1965（オフターゲットガイド）、R1767、R3164、R3178ガイドは、プールされたgRNA形式（R1767、R3164、またはR3178から選択された3つのガイドのうちの2つ以上のプール）または単一gRNA形式（R1767、R3164、R3178が個別に存在）におけるCas12a複合体ミックスに存在し、混合物を37℃で20分間インキュベートした。テンプレートRNA（GF184）の2倍希釈系列は、開始希釈濃度から作成された（0.1ng/μLでGF184の5.4μLをヌクレアーゼ不含有の水44.6μLに加えた）。その後、Cas12複合体、レポーター基質、フルオレセイン、緩衝液、及び希釈テンプレート（GF184またはオフターゲットテンプレートGF577）を含むDETECTRマスターミックスを、表2に示すように組み立てた。次に、DETECTR混合物をStilla Sapphireチップに搭載し、Naica Geodeに配置した。結晶は、各サンプルからの数千の液滴から作成された。増幅ステップは実行されなかった。Sapphireチップからのシグナルは赤チャンネルで測定された。DETECTRアッセイの結果は、個々のガイド形式を使用したDETECTR Cas12aベースのアッセイと比較して、プールされたガイド形式を使用したGF184標的のCas12aベースの検出の強化を示した。例えば、DETECTRアッセイは、図114に示されるように、R1767及びR3178をそれぞれ個別のガイド形式で含むチャンバ2またはチャンバ4からのシグナルと比較して、2つのガイドR1767及びR3178のプールを含むチャンバ5からの増強されたシグナルを示した。同様に、DETECTRアッセイは、2つのガイド（R1767及びR3178）のプールを含むチャンバ

30

40

50

5からのシグナルと比較して、また図114に示すようにR1767、R3164、及びR3178をそれぞれ個別のガイド形式で含む、チャンバ2、チャンバ3、またはチャンバ4からのシグナルと比較して、3つのガイド（R1767、R3164、及びR3178）のプールを含むチャンバ9からの増強されたシグナルを示した。

【0454】

表2は、条件、チャンバあたりのコピー数、液滴の数、及びチャンバごとのコピー／液滴を示す。

チャンバ	条件	コピー／チャンバ	液滴の数	コピー／液滴
1	オフターゲットガイド(1965)	2.5×10^7	29336	852
2	単一 R1767	2.5×10^7	26838	931
3	単一 R3164	2.5×10^7	29590	845
4	単一 R3178	2.5×10^7	27769	900
5	2x プール (R1767, R3178)	2.5×10^7	27929	895
6	2x プール (R1767, R3178)	1.25×10^7	28787	434
7	2x プール (R1767, R3178)	6.125×10^6	27503	223
8	2x プール (R1767, R3178)	0	28814	0
9	3x プール (R1767, R3164, R3178)	2.5×10^7	27881	897
10	3x プール (R1767, R3164, R3178)	1.25×10^7	29523	423
11	3x プール (R1767, R3164, R3178)	6.125×10^6	28957	211
12	3x プール (R1767, R3164, R3178)	0	29087	0

【0455】

Cas13aヌクレアーゼの場合でも、ガイドプーリングによる標的検出に対する感度の向上が観察された。これらのアッセイでは、Cas13a複合体混合物が調製され、それにおいて、R002（オフターゲットガイド）、R4517、R4519、R4530ガイドが、プールされたgRNAフォーマット（3つのガイドR4517、R4519、及びR4530の2つ以上のプール）または単一gRNA形式（R4517、R4519、及びR4530が個別に存在する）に存在し、混合物を37℃で20分間インキュベートした。次いでCas13a複合体、FAM-U5レポーター基質、緩衝液、及び希釈テンプレートSC2 RNA（またはオフターゲットテンプレート5S-87）を含むDETECTRマスターミックスを、表3に示すように組み立てた。次に、DETECTR混合物をStilla Sapphireチップに搭載し、Naica（登録商標）Geodeシステムに配置した。各サンプルの液滴から結晶が生成され、37℃でインキュベ

トされた（増幅ステップは実行されなかった）。S a p p h i r eチップからのシグナルはC y 5チャンネルで測定された。D E T E C T Rアッセイの結果は、単一ガイド形式を使用したS C 2標的RNAのC a s 1 3 aベースの検出と比較して、プールされたガイド形式を使用したS C 2標的RNAのC a s 1 3 aベースの検出が強化されたことを示した。例えば、D E T E C T Rアッセイは、図115に示されるように、 1×10^6 コピーの濃度のテンプレートと、それぞれ個別のガイド形式のガイドR 4 5 1 7、R 4 5 1 9、及びR 4 5 3 0とを含有するチャンバ2、チャンバ4、またはチャンバ6からのシグナルと比較して、 1×10^6 コピーの濃度のテンプレートと3つのガイドR 4 5 1 7、R 4 5 1 9、及びR 4 5 3 0のプールを含むチャンバ8からの増強されたシグナル（飽和－表示なし）を示した。同様に、図115に示されるように、D E T E C T Rアッセイは、 1×10^6 コピーの濃度のテンプレートを含むし、またそれぞれ個別のガイド形式のR 1 7 6 7、R 3 1 6 4、及びR 3 1 7 8を含有するチャンバ2、チャンバ6、またはチャンバ4からのシグナルと比較して、 1×10^5 コピーの濃度のテンプレートと、3つのガイド（R 1 7 6 7、R 3 1 6 4、及びR 3 1 7 8）のプールとを含有するチャンバ9からの増強されたシグナルを示した。

10

【0456】

表3は、条件、チャンバあたりのコピー数、チャンバあたりの液滴の数、及びチャンバごとのコピー／液滴を示す。

チャンバ	条件	コピー／チャンバ	液滴の数	コピー／液滴
1	オフターゲット ガイド(R002)	1×10^6	19960	50
2	単一R4517	1×10^6	18102	55
3	単一R4517	0	19146	0
4	単一R4519	1×10^6	18289	55
5	単一R4519	0	23324	0
6	単一R4530	1×10^6	25402	39
7	単一R4530	0	26285	0
8	3 プール	1×10^6	飽和	約40
9	3 プール	1×10^5	23209	4.3
10	3 プール	1×10^4	24064	0.41
11	3 プール	0	21137	0
12	3 プール	1×10^6	24885	40

20

30

40

【0457】

次に、プールされたガイド形式と単一のガイド形式のいずれかでガイドRNAを含むC a s 1 3 aデジタル液滴D E T E C T Rアッセイにおける標的検出の感度をアッセイした。D E T E C T R反応マスターミックスは、各gRNA（R 4 6 3 7、R 4 6 3 8、R 4 6 6 7、R 4 6 7 6、R 4 6 8 4、R 4 6 8 9、R 4 6 9 1、またはR 4 7 8 5（RNAse P））に対して調製され、gRNA、C a s 1 3 aヌクレアーゼ、及びレポーター基質に加えて含まれていた。複合化後、 $2 \mu\text{L}$ の各RNPをプールされたgRNA形式（7つのgRNAのプール、すなわち、R 4 6 3 7、R 4 6 3 8、R 4 6 7 6、R 4 6 8 9、R 4 6 9 1、R 4 6 6 7、及びR 4 6 8 4）で組み合わせるか、単一gRNA形式のままにした。（この場合、R 4 6 6 7、R 4 6 8 4、及びR 4 7 8 5（RNAse Pは個別に

50

存在)。テンプレートRNA (Twist SC2、ATCC SC2、及び5s-87オフターゲット)を希釈して、一連のテンプレート濃度を取得した。テンプレートRNA (Twist SC2、ATCC SC2、及び5s-87オフターゲットテンプレートRNA)の検出に向けられたDETECTR反応は、表4に示すように、Cas13a-gRNA RNPを前のステップからの希釈テンプレートRNAと組み合わせることによって組み立てられた。集められたDETECTR反応は、Stilla Sapphireチップ上のチャンバにロードされた。チップはNaica (登録商標) Geodeシステムに配置され、液滴生成プログラムを使用して結晶が生成され、検出された標的を含む液滴を明らかにするために画像化された。

【0458】

プールされたガイド (R4637、R4638、R4667、R4676、R4684、R4689、R4691)を含むDETECTRアッセイによる標的検出の感度を、単一ガイドR4684、R4667、R4785 (RNasePガイド)を個別の形式で含むDETECTRアッセイによる標的検出の感度と比較した。これらの陽性液滴の数をカウントすることによって実行される相対定量は、図116に示すように、プールされたガイドRNAを含むサンプルが、個々の形式のガイドRNAを含むサンプルよりも、開始ターゲットRNAのコピーあたりの増幅産物を含む結晶を多く生成することを示した。例えば、チャンバ1からの陽性の液滴の数は、チャンバ2と3の液滴の数よりも多く、チャンバ5からの液滴の数は、図116に示されるように、チャンバ6及び7内の液滴の数よりも多い。図117に示すように、チップからの標的検出シグナル強度の測定はまた、プールされたガイド (R4637、R4638、R4667、R4676、R4684、R4689、R4691)を含むDETECTRアッセイによる開始ターゲットRNAのコピーあたりのターゲット検出の感度が、単一ガイドR4684、R4667、R4785 (RNasePガイド)を個々の形式で含むDETECTRアッセイによるターゲット検出の感度よりも高かったことを確認した。例えば、図117で、チャンバ1 (7ガイドプールとTwist SC2テンプレートRNAを含む、からのシグナル強度は、チャンバ2及び3 (Twist SC2 RNA存在下でのそれぞれ個別の形式でR4684、及びR4667 gRNAを含む)のシグナル強度よりも高く、チャンバ5 (7ガイドプールとATCC SC2テンプレートRNAを含む)からのシグナル強度は、チャンバ6及び7 (ATCC SC2 RNAの存在下、それぞれ個別の形式でのR4684、及びR4667を含む)のシグナル強度よりも高い。同様に、図117において、チャンバ5 (7ガイドプールとATCC SC2テンプレートRNAを含む)からのシグナル強度は、チャンバ6 (個々の形式のgRNA R4684とATCC SC2 RNAを含む)のシグナル強度、チャンバ8 (ATCC SC2テンプレートRNAを有する個々の形式の対照RNaseP gRNAを含む)、及びチャンバ12 (テンプレートRNAを含まない7つのプールされたgRNAを含む)からのシグナル強度よりも高い。

【0459】

図118に示すように、チャンバ5 (7つのガイドプール及びATCC SC2テンプレートRNAを含む)で観察される増幅された標的 (開始標的RNAのコピーあたり)を含む液滴の数の相対的な定量化は、チャンバ6 (個々の形式のgRNA R4684及びATCC SC2 RNAを含む)、チャンバ8 (ATCC SC2テンプレートRNAを含む個々の形式の対照RNaseP gRNAを含む)で観察された液滴の数、及びチャンバ12 (テンプレートRNAを含まないで、プールされた7つのgRNAを含む)で観察される液滴の数よりも多くなった。図119のベンチトップアッセイ形式でアッセイを行ったとき、プールされたガイド (R4637、R4638、R4667、R4676、R4684、R4689、R4691)を含むDETECTRアッセイによる標的検出の感度を、単一ガイドR4684、R4667、R4785 (RNasePガイド)を個別の形式で含むDETECTRアッセイによる標的検出の感度と比較した。ベンチトップアッセイの結果は、プールされたガイド (R4637、R4638、R4667、R4676、R4684、R4689、R4691)を含むサンプルが、単一のガイドR46

10

20

30

40

50

84、R4667、またはR4785（RNAsePガイド）を図119に示すように個々の形式で含むサンプルにおける標的検出の感度ほど高くないことを示した。

【0460】

表4は、チャンバごとのガイドプールとテンプレートを示している。

チャンバ	ガイド	テンプレート
1	7プール	5000 コピーの Twist SC2
2	R4684	5000 コピーの Twist SC2
3	R4667	5000 コピーの Twist SC2
4	R4785(RNaseP)	5000 コピーの Twist SC2
5	7プール	5000 コピーの ATCC SC2
6	R4684	5000 コピーの ATCC SC2
7	R4667	5000 コピーの ATCC SC2
8	R4785(RNaseP)	5000 コピーの ATCC SC2
9	7プール	5000 コピーの 5s-87
10	R4684	5000 コピーの 5s-87
11	R4667	5000 コピーの 5s-87
12	7プール	NTC

10

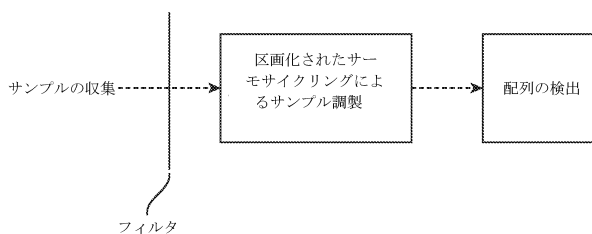
20

【0461】

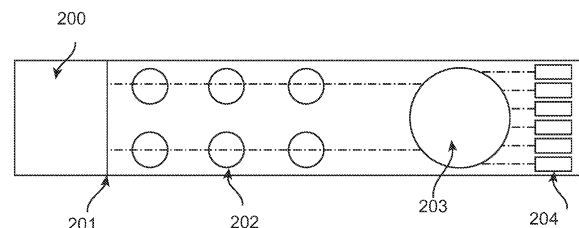
本発明の好ましい実施形態を本明細書に示し、かつ記載したが、このような実施形態が単なる例として提供されたことは、当業者には明らかであろう。ここで、当業者は、多数の変化形、変更、及び置換を本発明から逸脱することなく想定するであろう。本明細書に記載される本発明の実施形態に対する様々な代替手段が、用いられ得ることを理解されたい。以下の特許請求の範囲が本発明の範囲を定義し、これらの特許請求の範囲に含まれる方法及び構造、ならびにそれらの等価物が、それにより包含されることが意図される。

【図面】

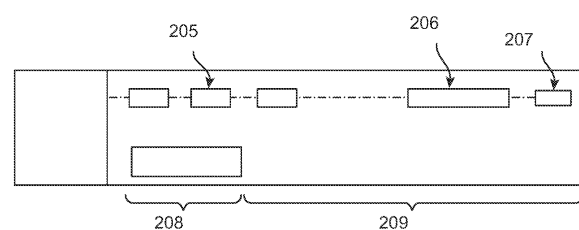
【図1】



【図2】



A

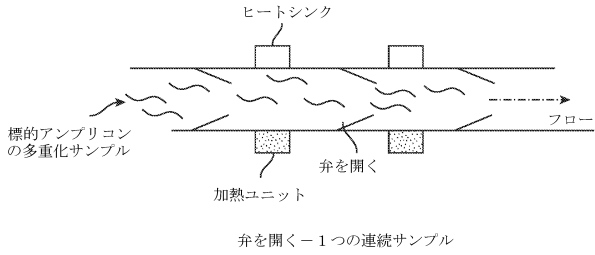


B

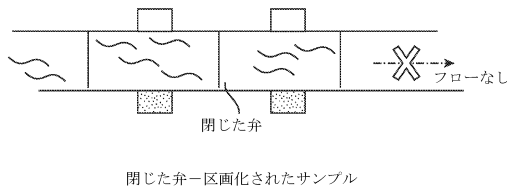
40

50

【図 3】

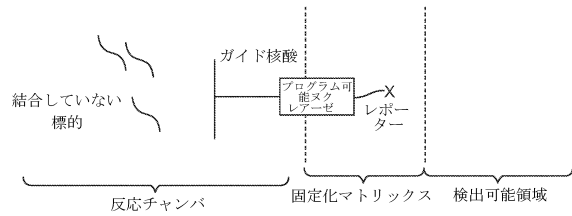


A

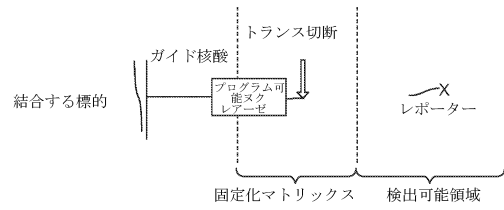


B

【図 4】

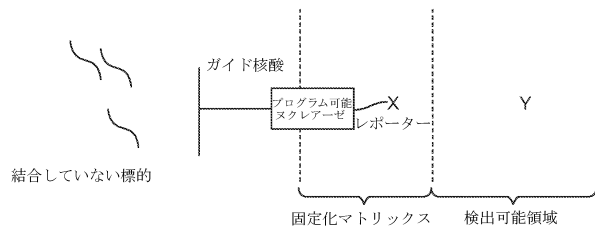


A

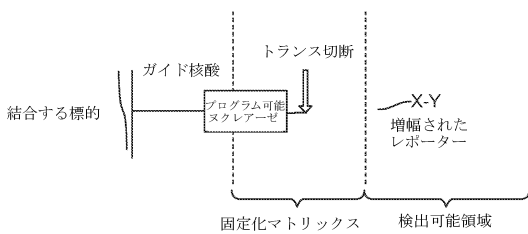


B

【図 5】

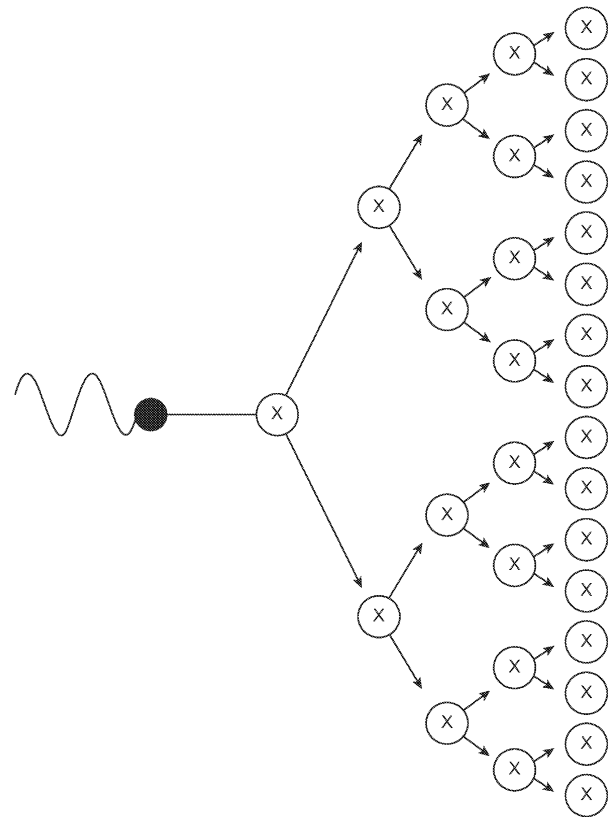


A



B

【図 6】

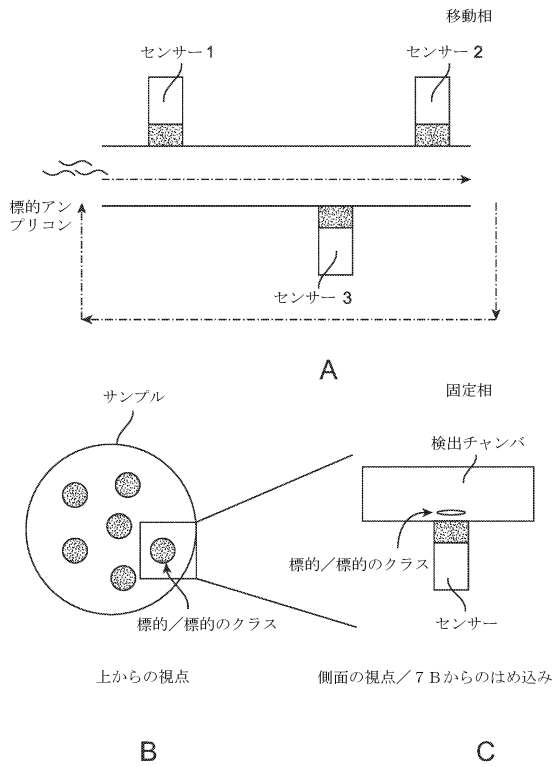


30

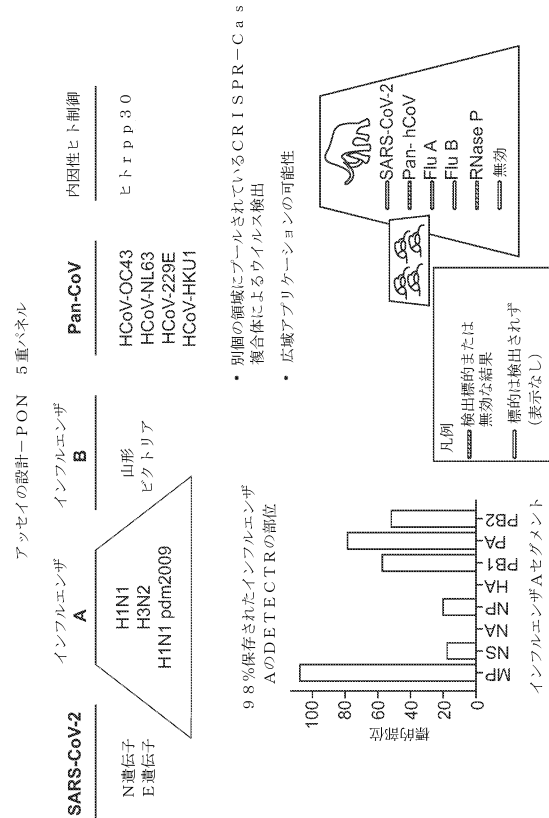
40

50

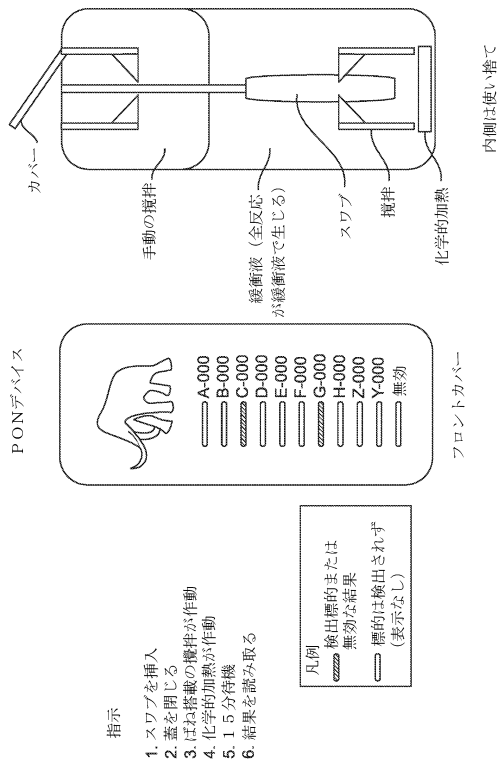
【圖 7】



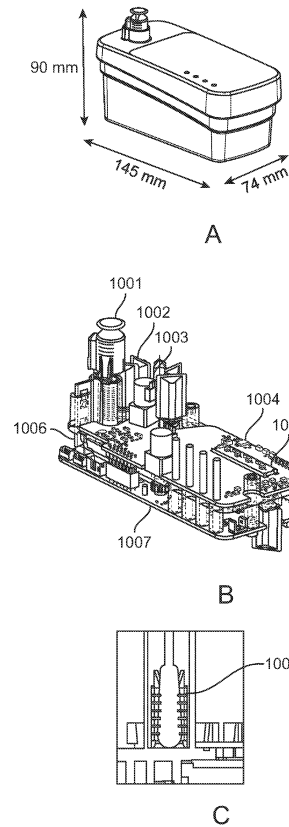
【圖 8】



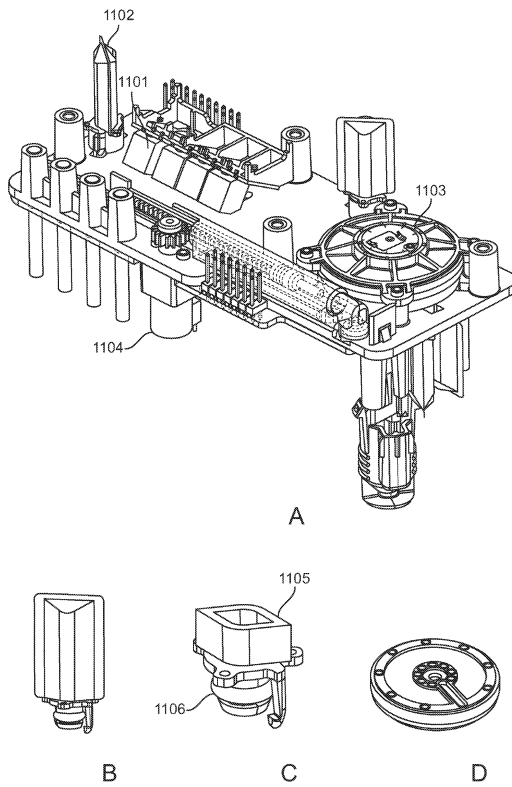
【図 9】



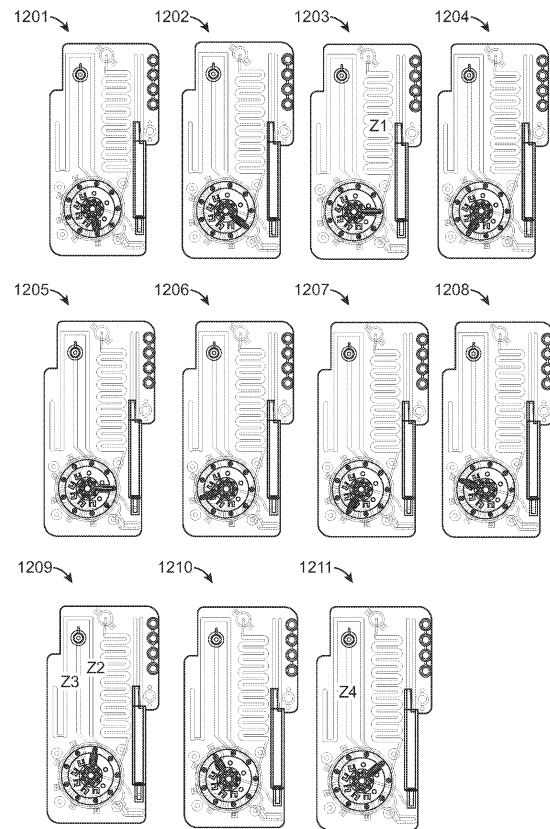
【図 10】



【図 1 1】



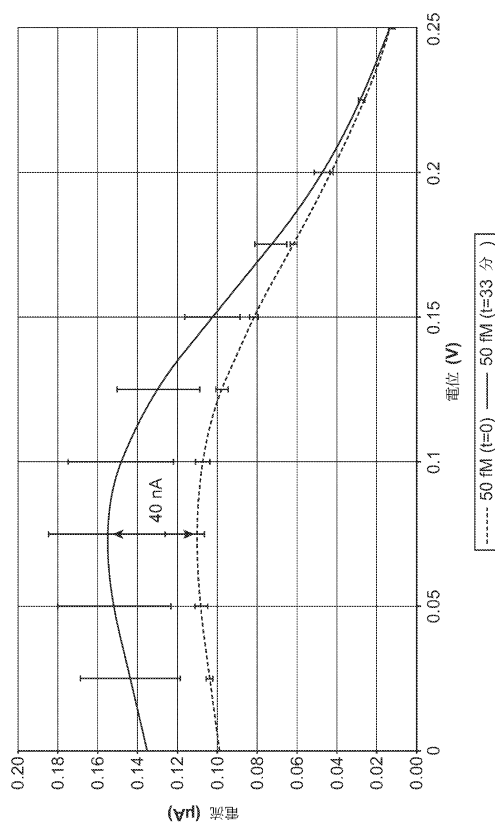
【図 1 2】



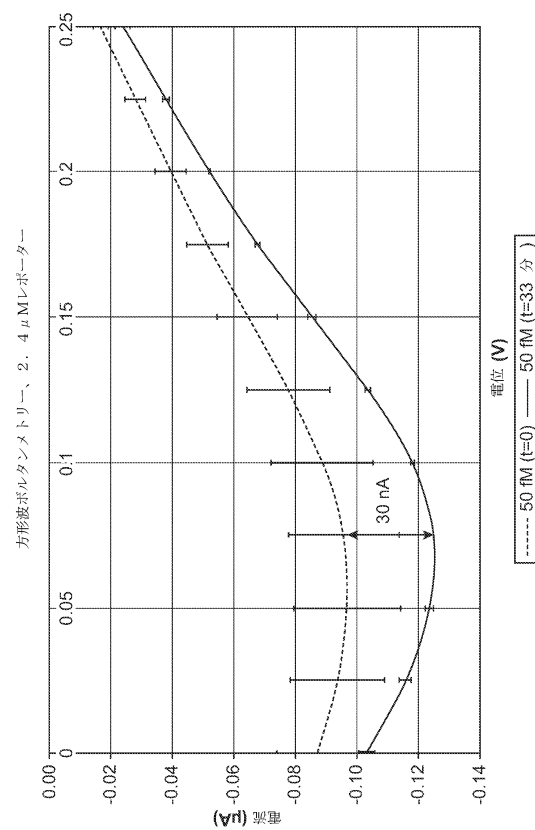
10

20

【図 1 3】



【図 1 4】

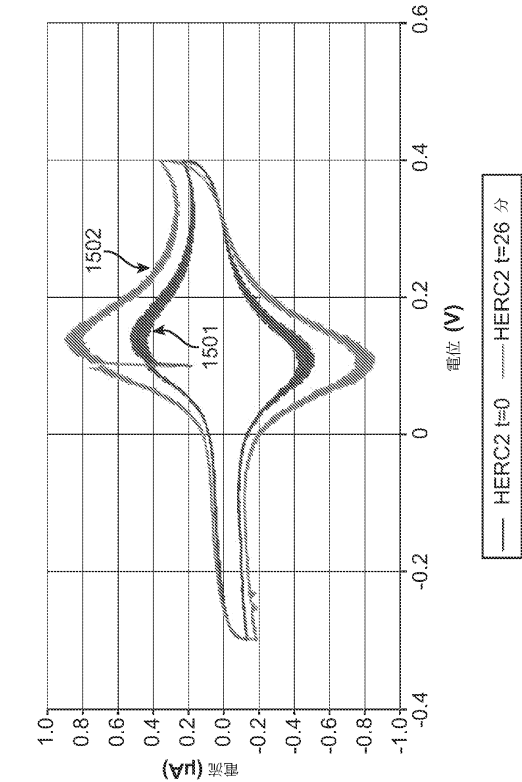


30

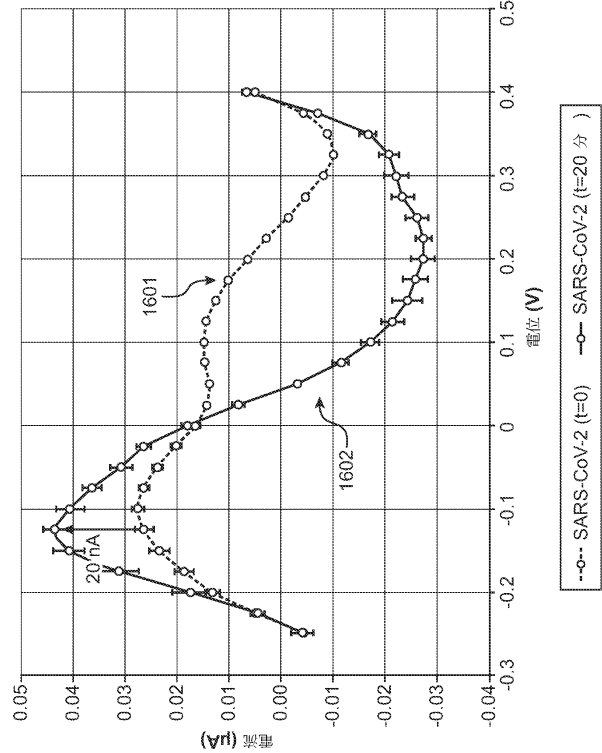
40

50

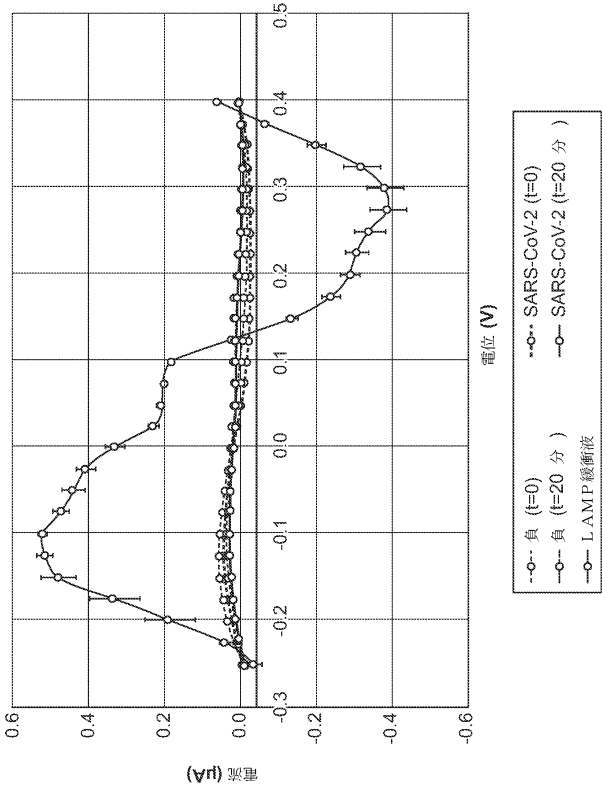
【図 1 5】



【図 1 6】



【図 1 7】



【図 1 8】

R1763 (N遺伝子) を含む複合化マスタミックス				
A	B	C	D	E
1	総反応数 = 3			
2	過大な体積 = 1.2			
3	crRNAの濃度 (μM) = 20			
4	試薬	MMの体積 (μL)		
5	スクレーパーゼ不含有水	75.00	270.00	
6	5倍のMBuffer 3	19.00	68.40	
7	crRNA	0.20	0.72	反応あたりの最終 μM
8	5 μM Cas12M08	0.80	2.88	反応あたりの最終 μM
9	合計	95	342	
10				
11	37℃でインキュベートした後に加える			
12	レポート		3.4545454545	2.4 μM最終濃度

10

20

30

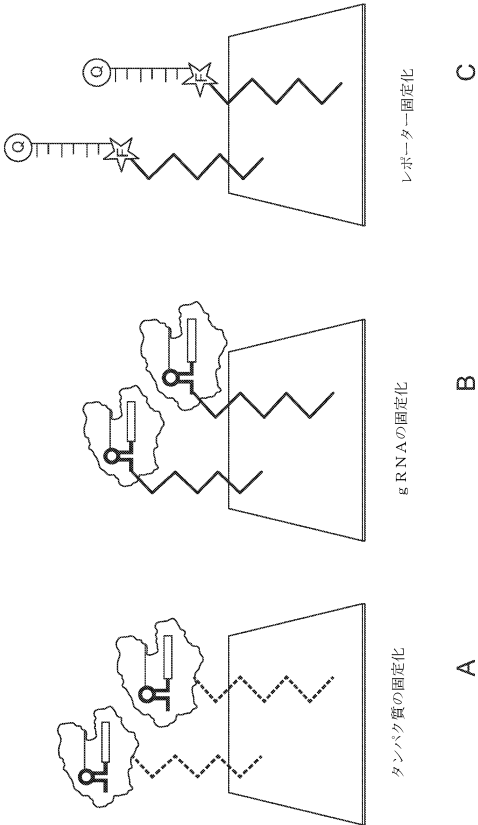
40

50

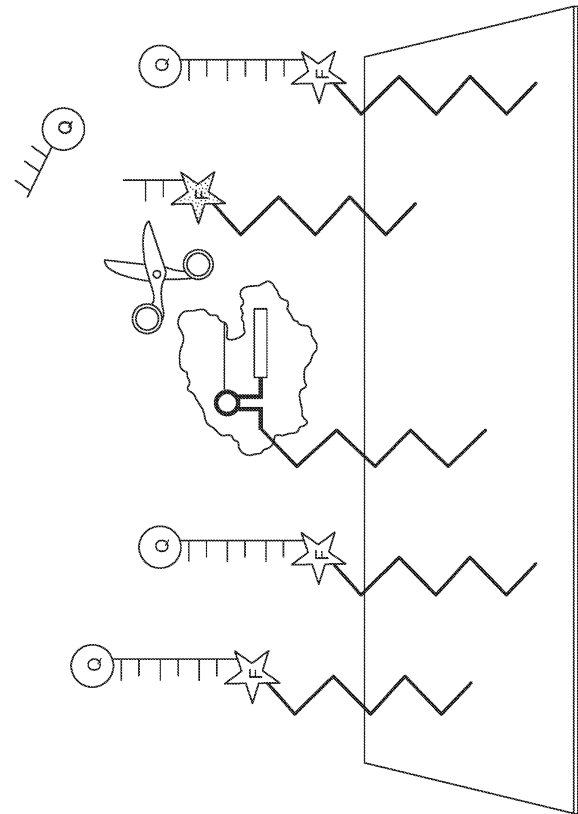
【図 19】

A		B		C		D	E	F
1	試行 1 ~ 10					試行 11 ~ 続き		
2	矩形波ボルタンメトリー (SWV)			(SWV)		矩形波ボルタンメトリー (SWV)		
3	前治療のパラメータ			前治療のパラメータ				
4	Econd		0 V		Econd		0 V	
5	tcond		0 s		tcond		0 s	
6	Edep		0 V		Edep		0 V	
7	tdep		0 s		tdep		0 s	
8	tequil		0 s		tequil		0 s	
9	測定パラメータ			測定パラメータ				
10	Estep		0.01 V		Estep		0.025 V	
11	Eamp		0.002 V		Eamp		0.002 V	
12	Freq		25 Hz		Freq		25 Hz	
13	nscans		5		nscans		5	
14	Ebegin		-0.25 V		Ebegin		-0.25 V	
15	Eend		0.4 V		Eend		0.4 V	
16	電流		0 -		電流		0 -	

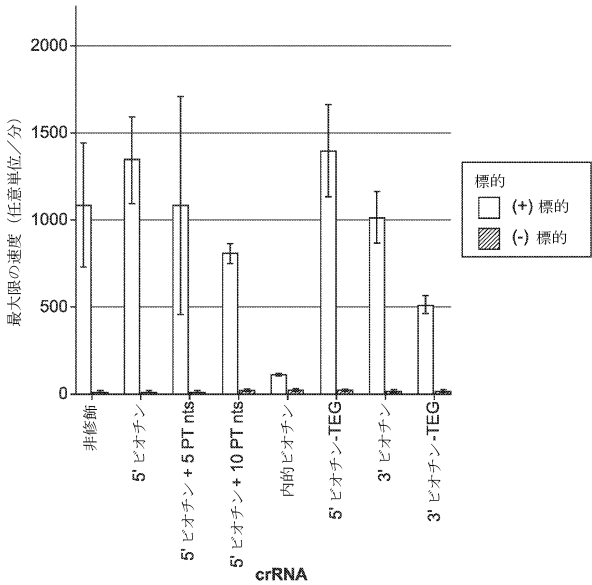
【図 20】



【図 21】



【図 22】



10

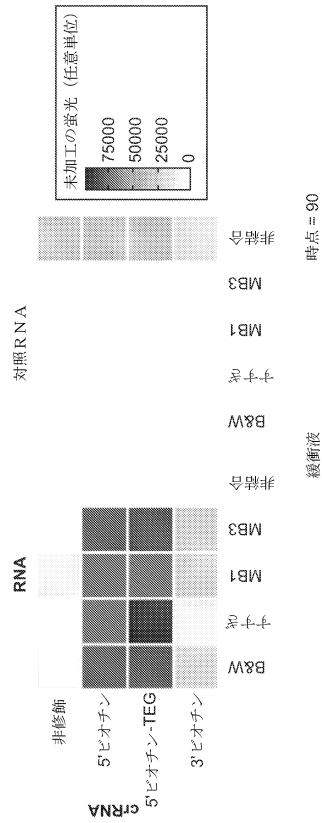
20

30

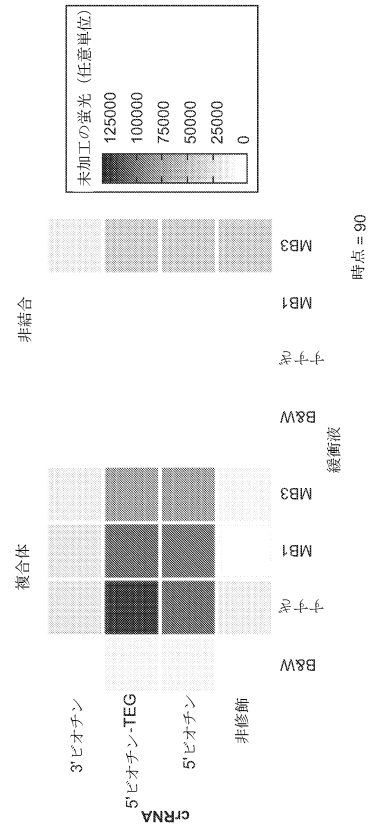
40

50

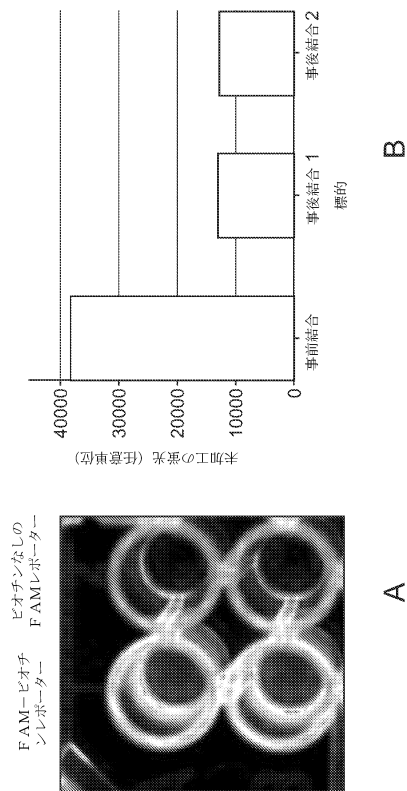
【図 2 3】



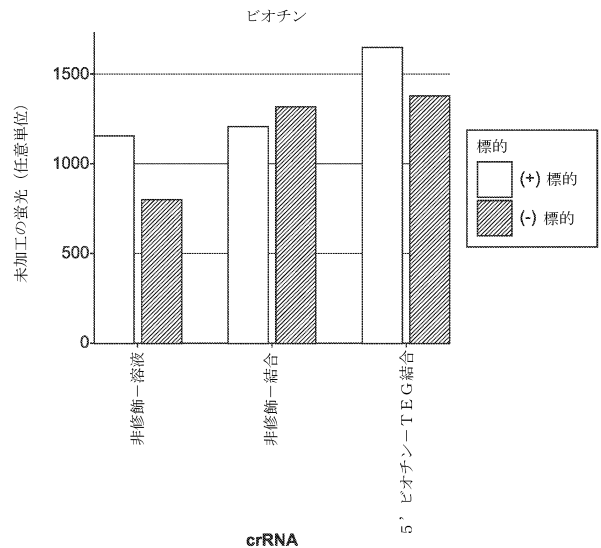
【図 2 4】



【図 2 5】



【図 2 6】



10

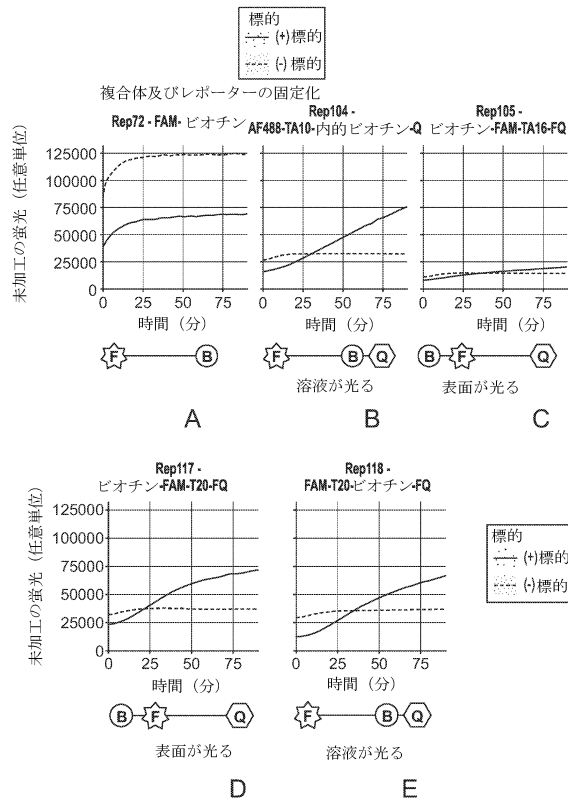
20

30

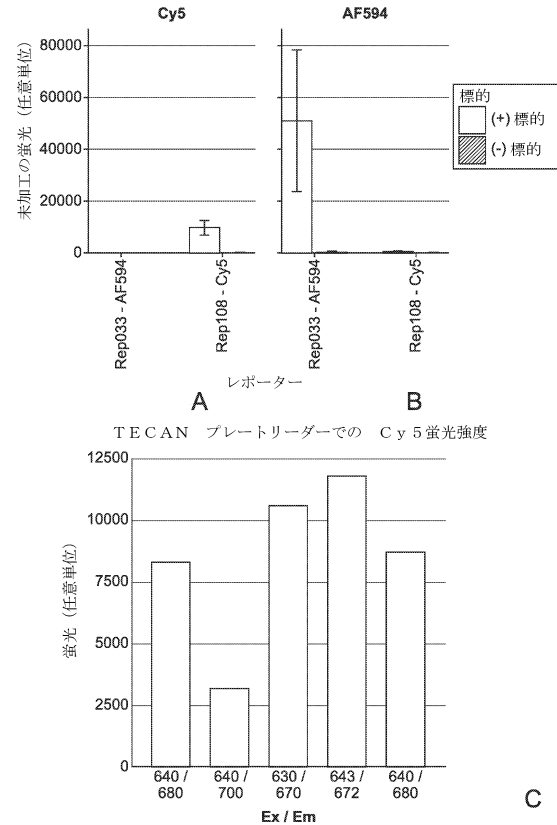
40

50

【図 27】



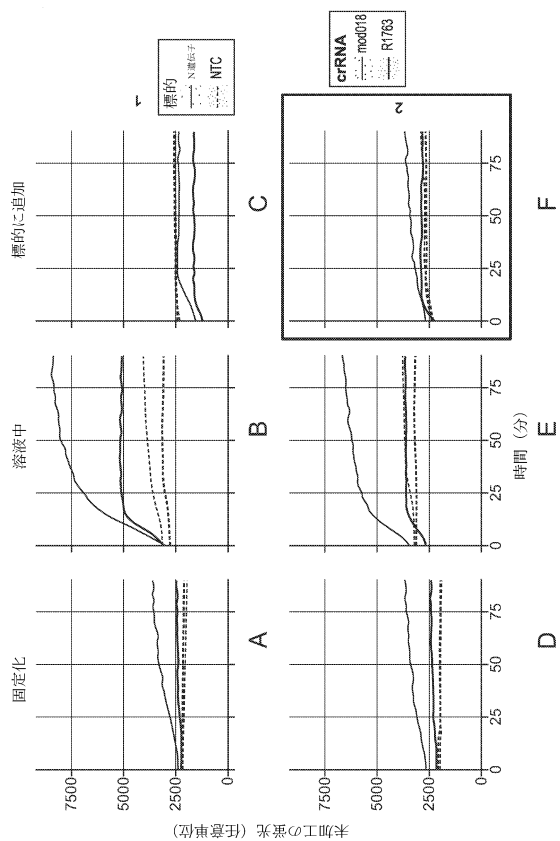
【図 28】



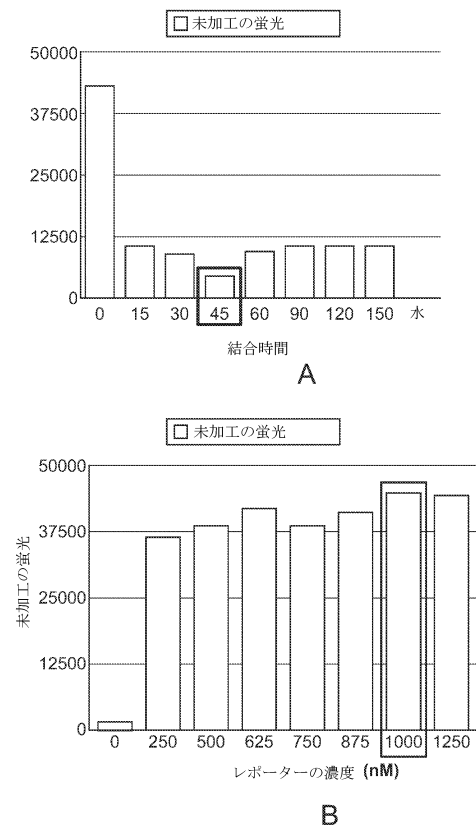
10

20

【図 29】



【図 30】

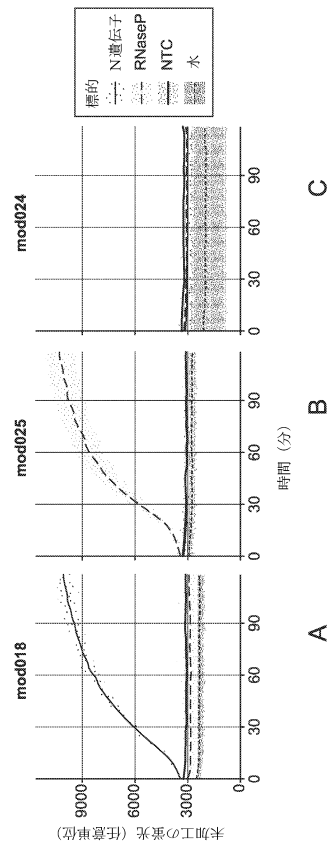


30

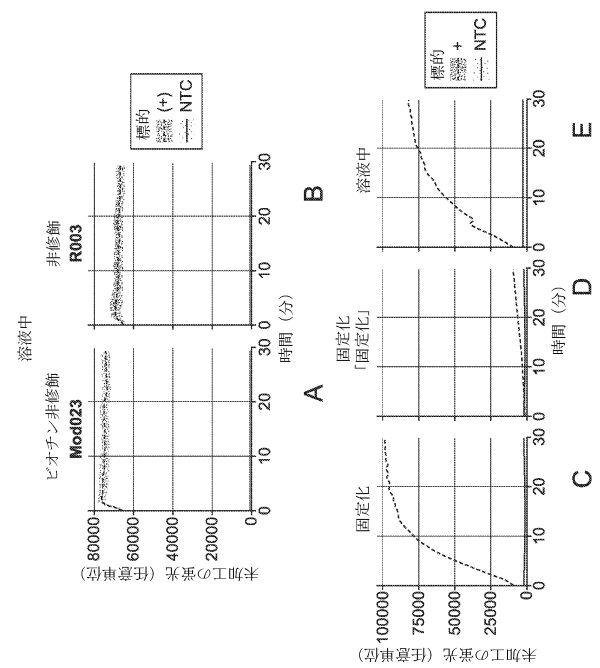
40

50

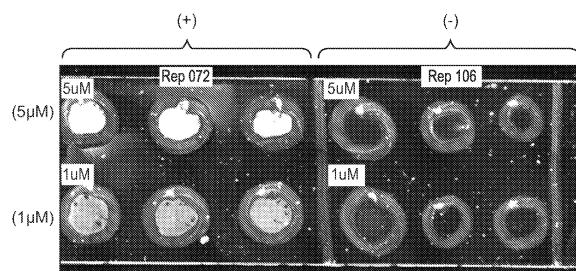
【図 3 1】



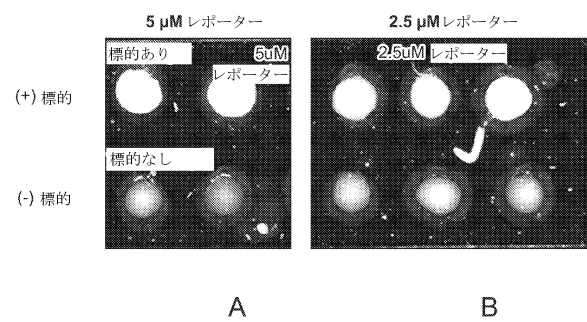
【図 3 2】



【図 3 3】



【図 3 4】



10

20

30

40

50

【図 3 9】

複合化ミックス 1					
	A	B	C	D	E
1	各 gRNA の反応 =	8			
2	crRNA の濃度 (μM) =	20			
3	レポーター基質 (μM) =	100	rep33		
4	試薬	体積 (μL)	MM 体積 (μL)		
5	ヌクレアーゼ不含有水	16.88	162.00		
6	5 倍の MBuffer1	5.00	48.00		
7	crRNA	0.63	6.00	500	反応あたりの最終 nM
8	5 μM pCas12M08	2.50	24.00	500	反応あたりの最終 nM
9	合計	25	240		

A

無 Cas12M08					
	A	B	C	D	E
1	各 gRNA の反応 =	4			
2	crRNA の濃度 (μM) =	20			
3	レポーター基質 (μM) =	100	rep33		
4	試薬	体積 (μL)	MM 体積 (μL)		
5	ヌクレアーゼ不含有水	19.38	93.00		
6	5 倍の MBuffer1	5.00	24.00		
7	crRNA	0.63	3.00	500	反応あたりの最終 nM
8	5 μM pCas12M08	0.00	0.00	0	反応あたりの最終 nM
9	合計	25	120		

B

【図 4 1】

	A	B	C	D	E
1	各 gRNA の反応 =	8			
2	crRNA の濃度 (μM) =	20			
3	レポーター基質 (μM) =	100	rep33		
4	試薬	体積 (μL)	MM 体積 (μL)		
5	ヌクレアーゼ不含有水	16.88	162.00		
6	Hi Mg2+ 5xmb3	5.00	48.00		
7	crRNA	0.63	6.00	500	反応あたりの最終 nM
8	5 M pCas12M08	2.50	24.00	500	反応あたりの最終 nM
9	合計	25	240		

A

各 1 セットのプライマーのみ MM を作成					
	A	B	C	D	E
1		rxns = 8			
2		過大な体積 = 1.2			
3		プライマーのストック (μM) = 50			
4	試薬	体積 (μL)	MM 体積 (μL)		
5	ヌクレアーゼ不含有水	2.442	23.4432		
6	10 倍 KlenTag Buffer	0.5	4.8	3.5 mM MgCl2	
7	プライマー	0.5	4.8	5 μM 最終	
8	10 mM dNTP	0.1	0.96	0.2 mM 最終	
9	WarmStart RTx (NEB)	0.125	1.2		
10	SpeedStar	0.333	3.1968		既用ポリメラーゼ
11	RNA テンプレート	1		0.1 ng/txn	ストック 0.1 ng/μL
12	合計	5	38.4		または 1000 cop/μL

B

【図 4 0】

	A	B	C	D	E	F	G
1	mod018	mod018	mod025	mod025	mod024	mod024	(FASTR - N 遺伝子)
2	mod018	mod018	mod025	mod025	mod024	mod024	(FASTR - RNase P)
3	mod018	mod018	mod025	mod025	mod024	mod024	(FASTR - NTC)
4	mod018	mod018	mod025	mod025	mod024	mod024	(水)
5			(固定)				

A

レポーター結合					
	A	B	C	D	E
1	総反応数 =	24			
2	crRNA の濃度 (μM) =	20			
3	試薬	体積 (μL)	MM 体積 (μL)		
4	ヌクレアーゼ不含有水	19.88	572.40		
5	5 倍の MBuffer1	5.00	144.00		
6	100 μM レポーター	0.13	3.60	500	反応あたりの最終 nM
7	合計	25	720		

B

【図 4 2】

サイクリング条件			
	A	B	C
1	温度	時間 (秒)	サイクル
2	98C	60	1
3	98C	1	45
4	65C	3	

10

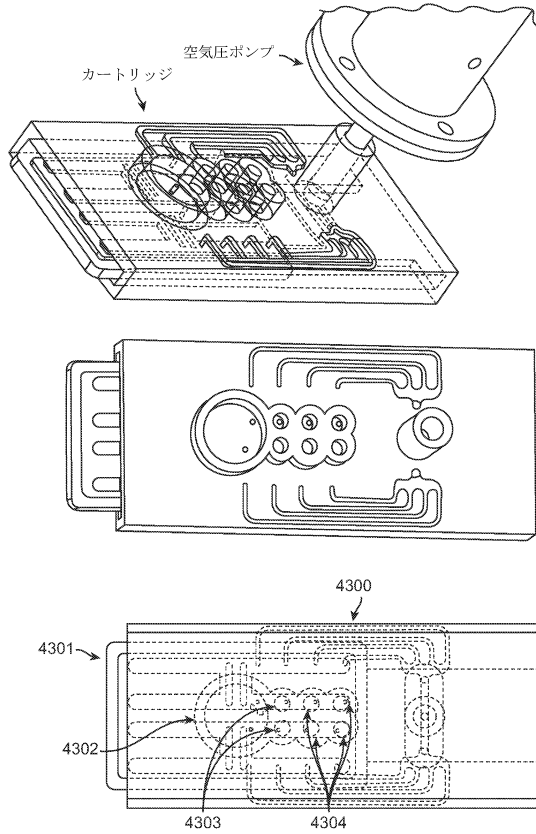
20

30

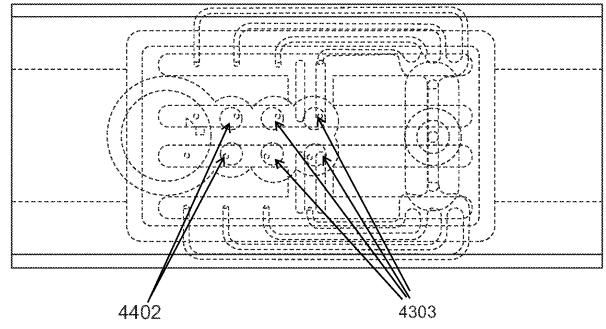
40

50

【図 4 3】



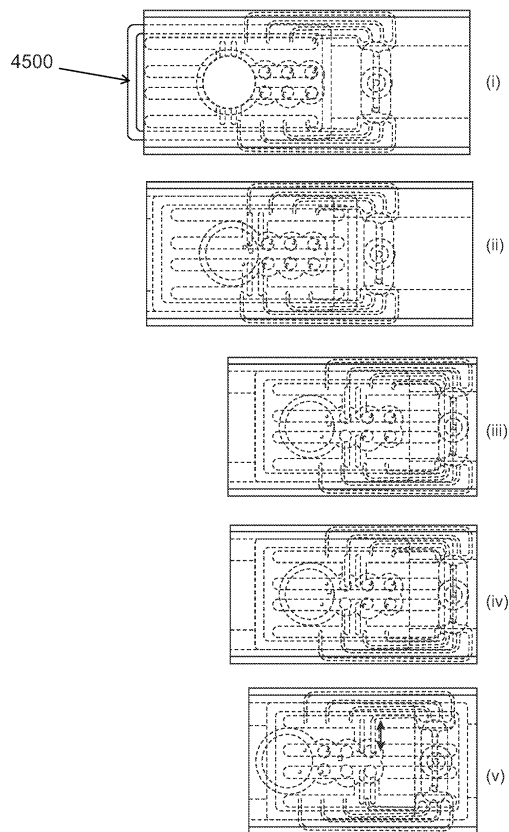
【図 4 4】



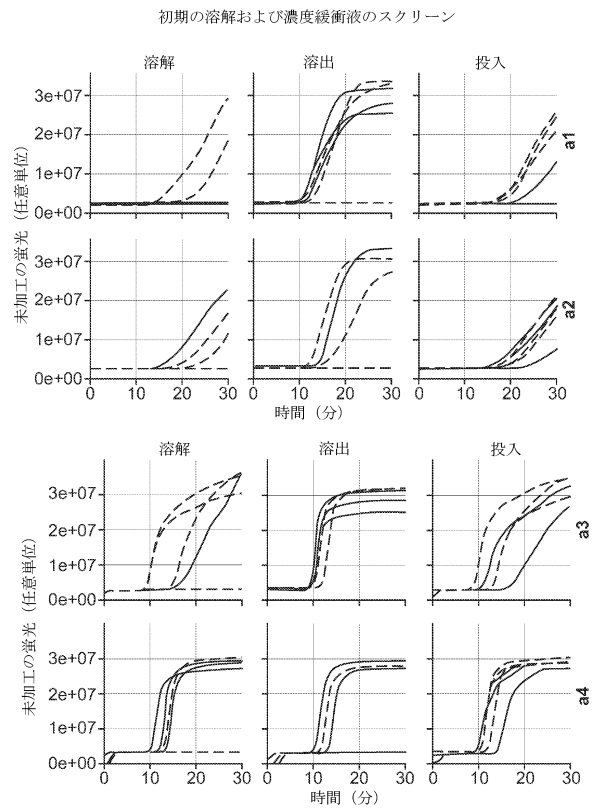
10

20

【図 4 5】



【図 4 6 - 1】

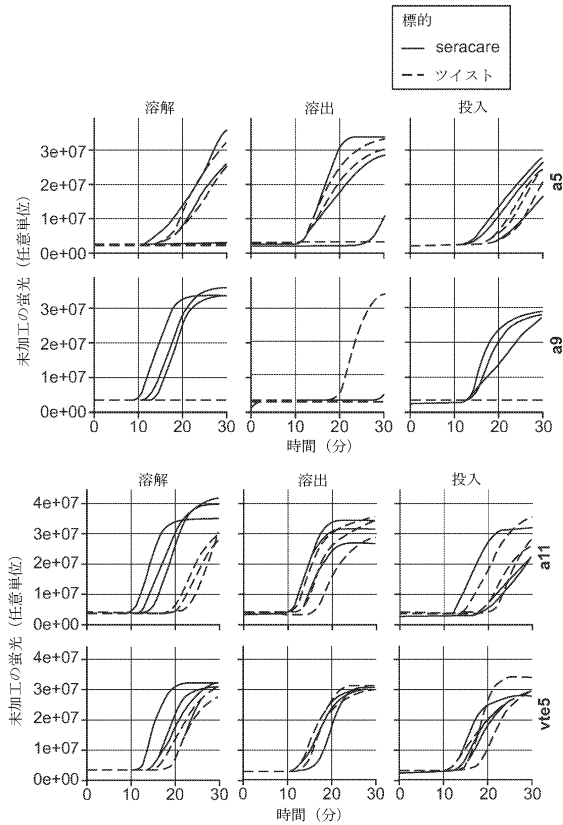


30

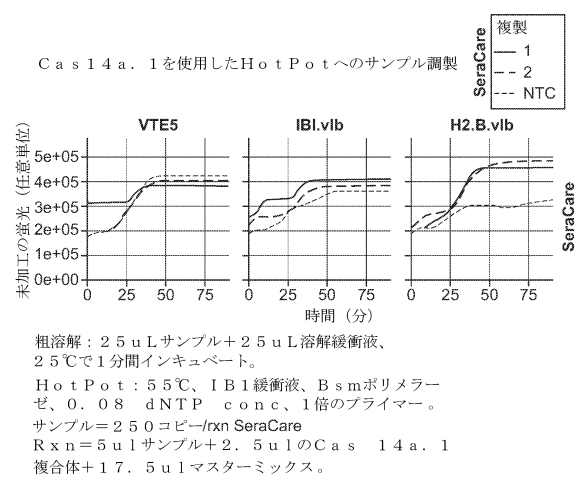
40

50

【図 46-2】



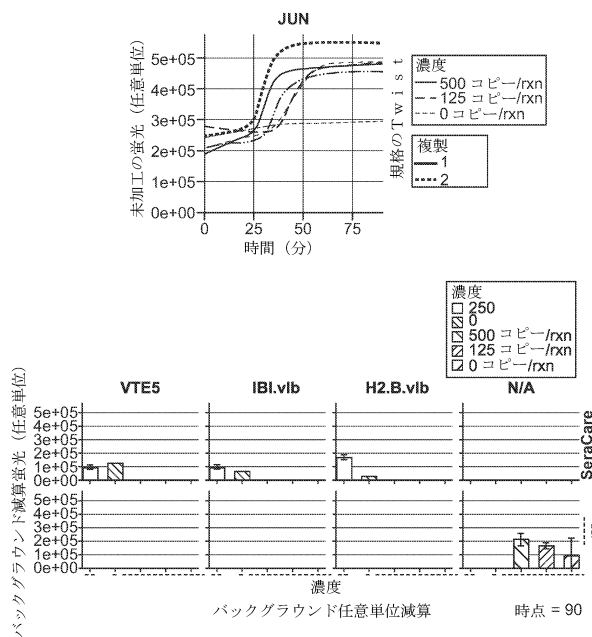
【図 47-1】



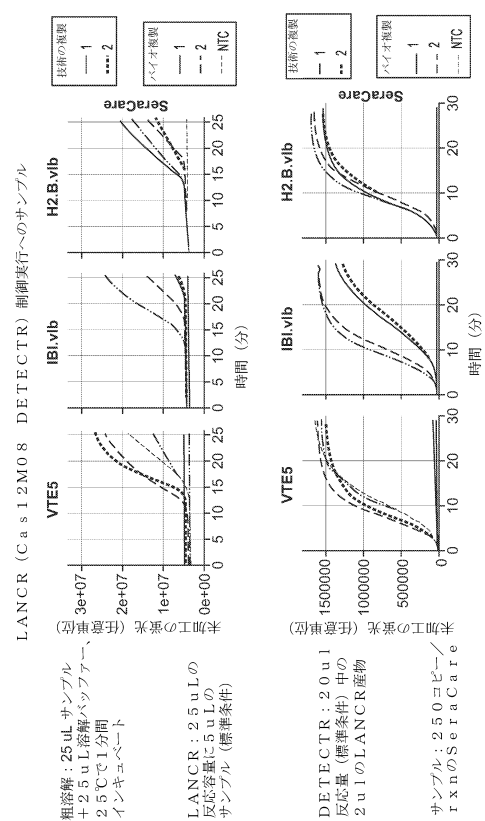
10

20

【図 47-2】



【図 48-1】

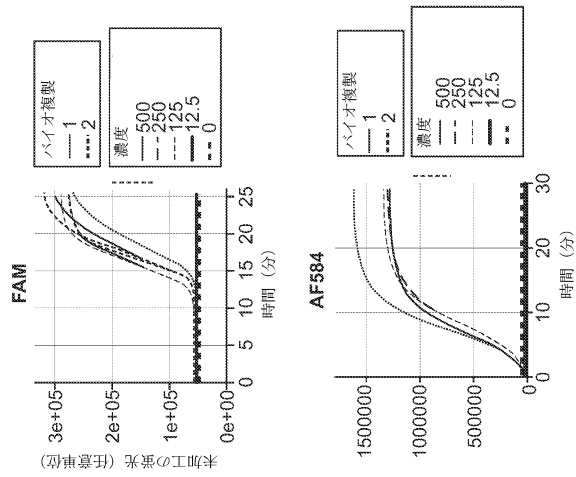


30

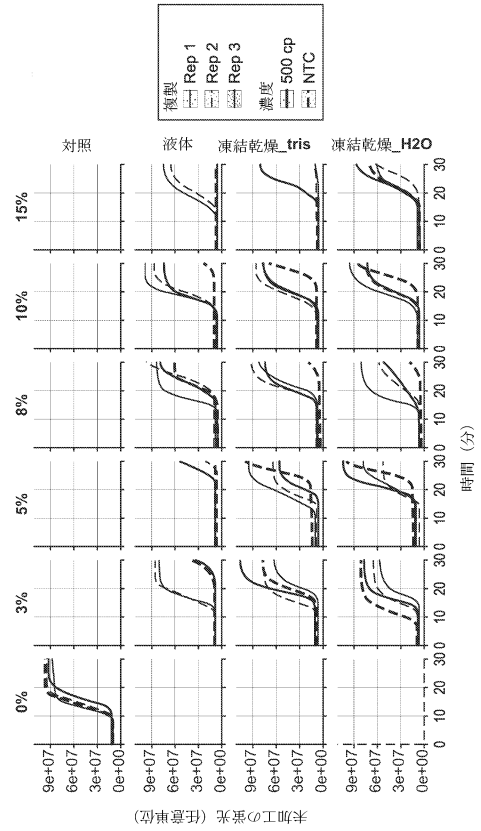
40

50

【図 4 8 - 2】



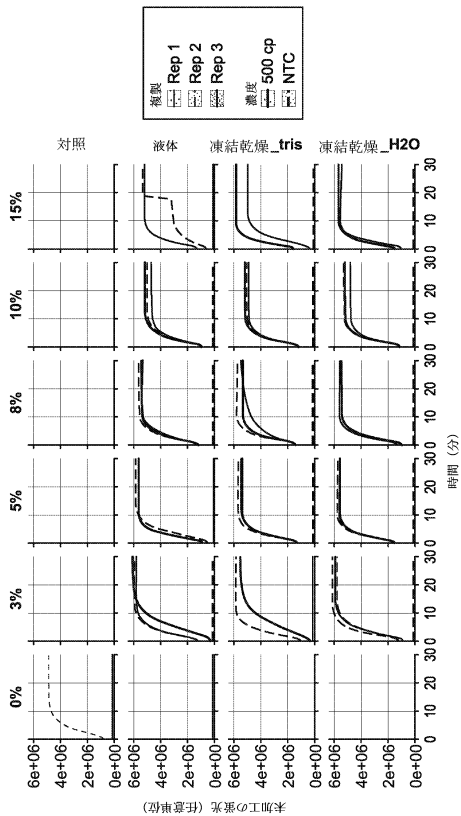
【図 4 9 A】



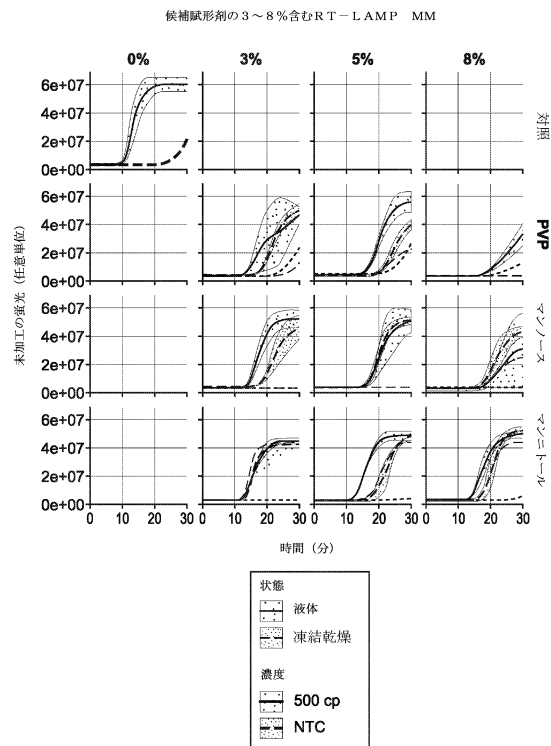
10

20

【図 4 9 B】



【図 5 0 A】

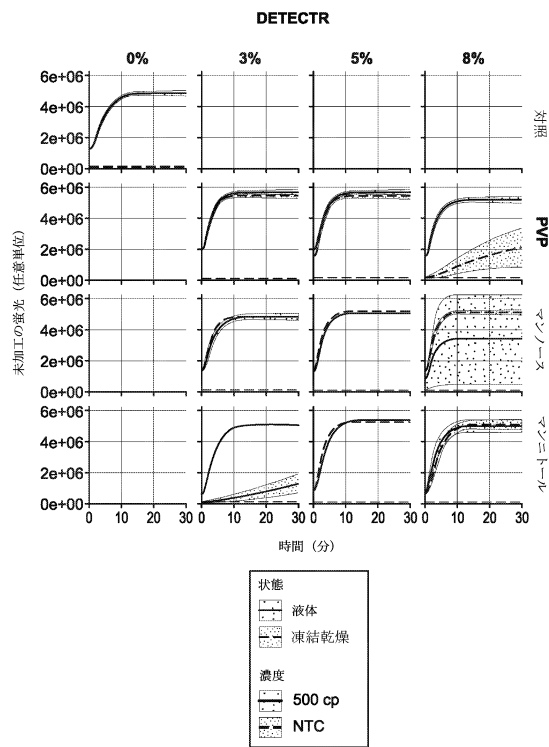


30

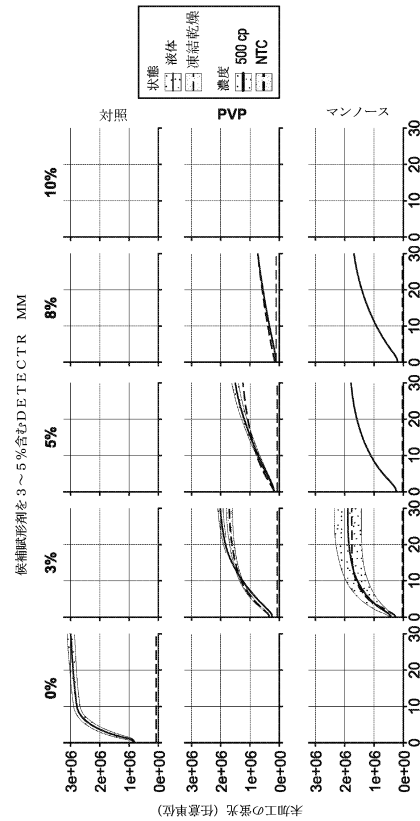
40

50

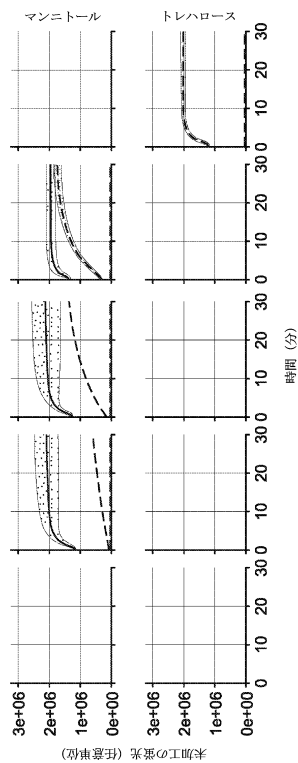
【図 5 0 B】



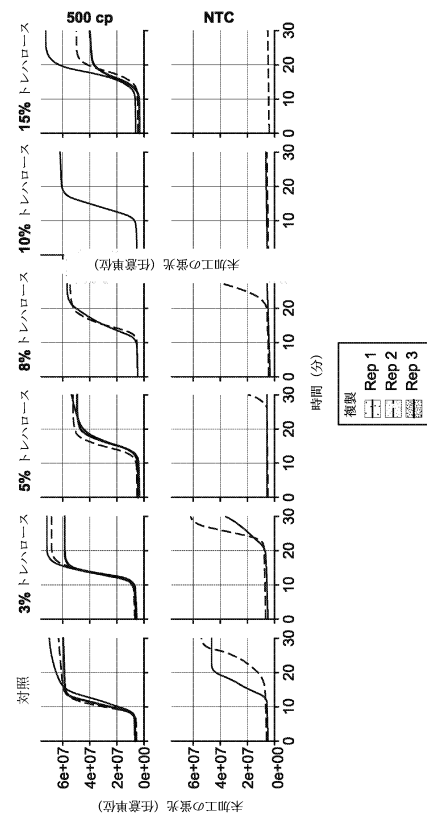
【図 5 1 A】



【図 5 1 B】



【図 5 2】



10

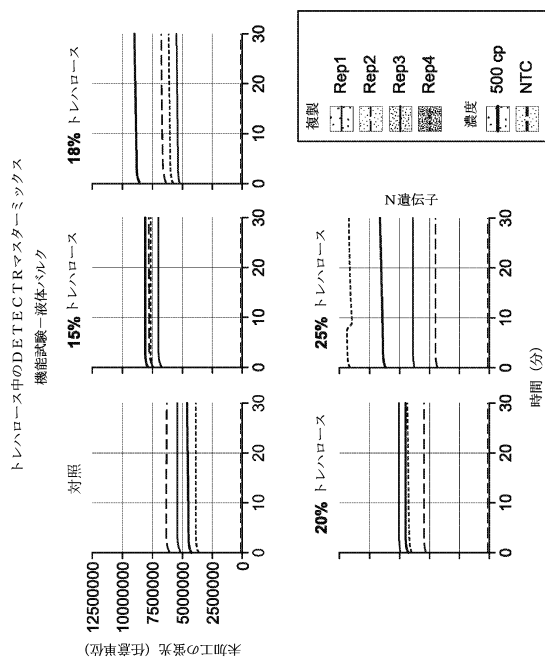
20

30

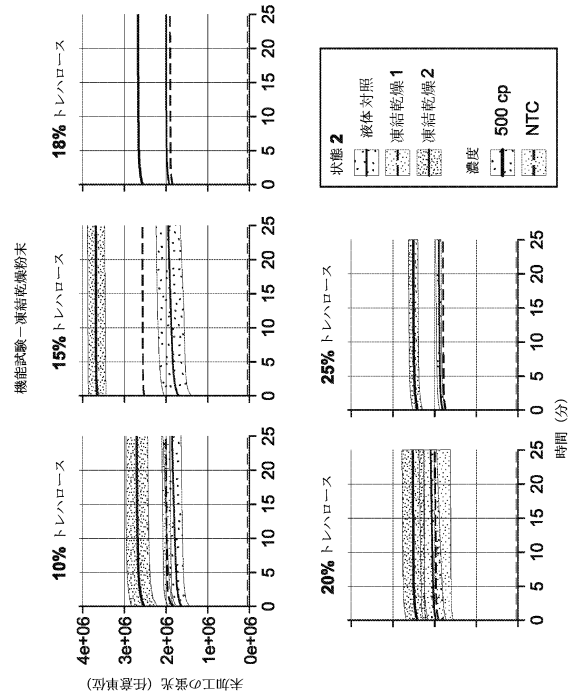
40

50

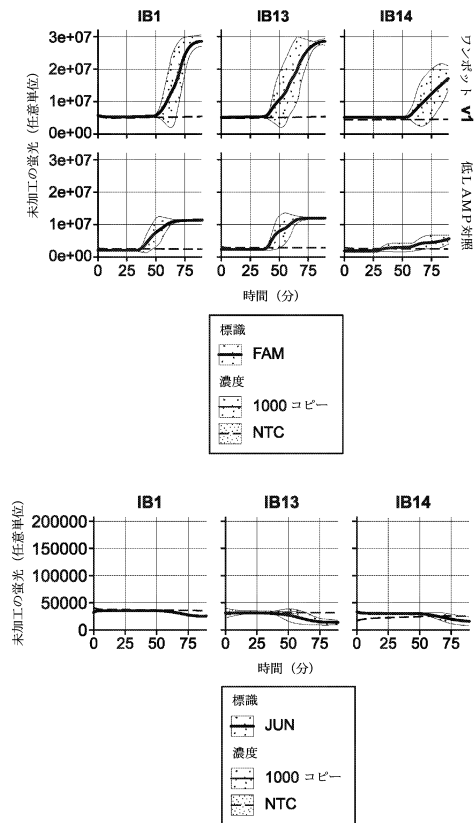
【図 5 3 A】



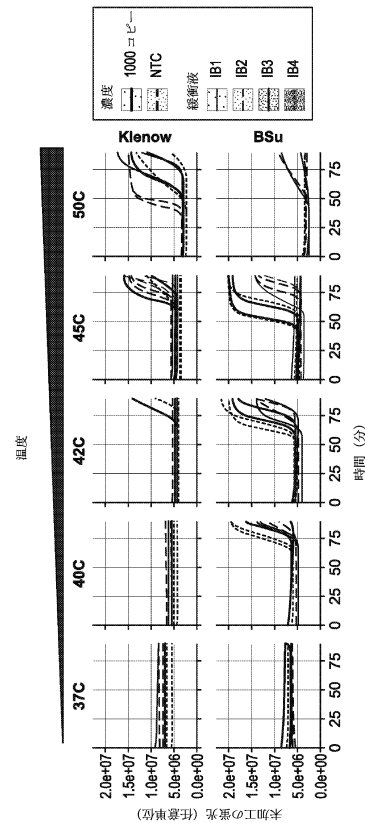
【図 5 3 B】



【図 5 4】



【図 5 5】



10

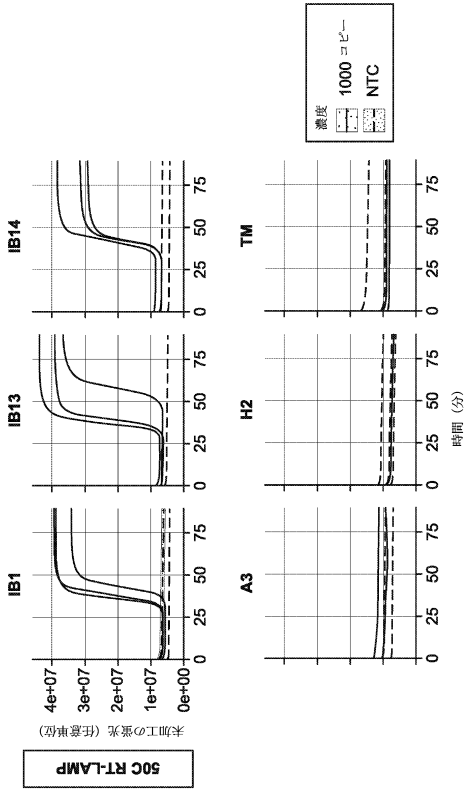
20

30

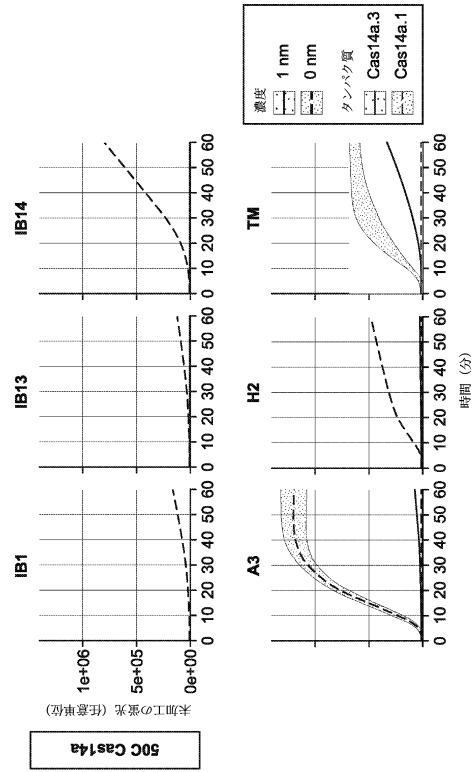
40

50

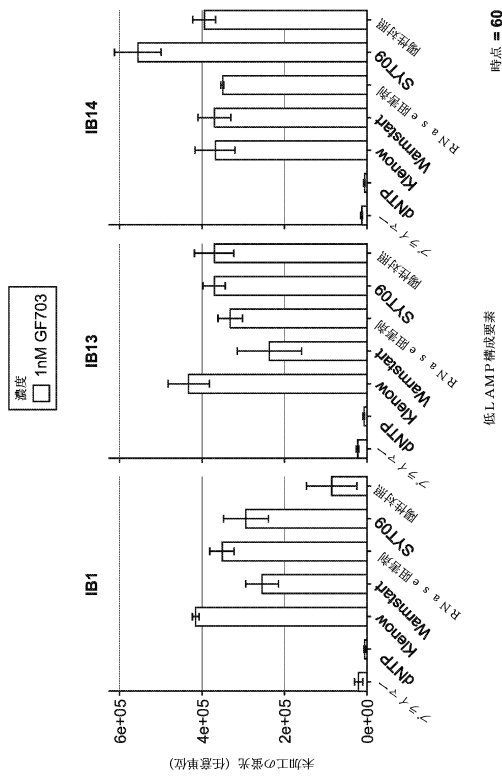
【図 5 6 A】



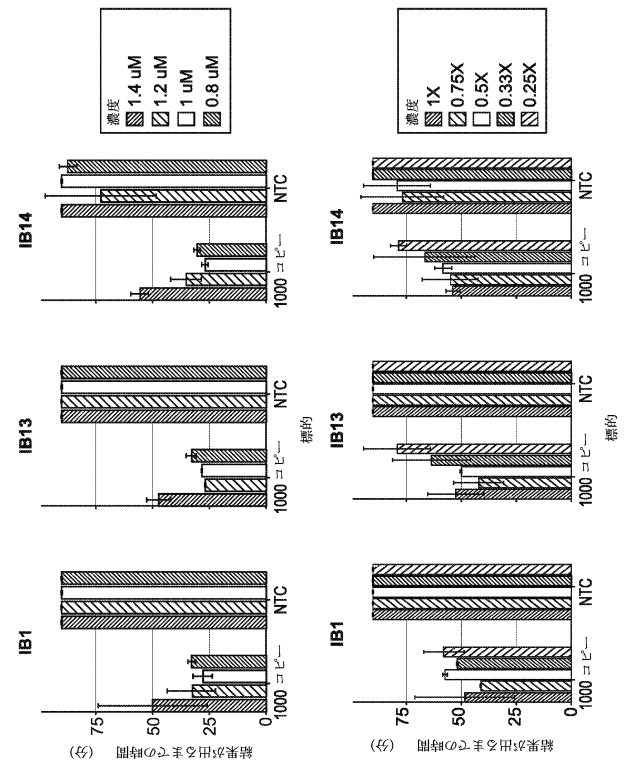
【図 5 6 B】



【図 5 7】



【図 5 8】



10

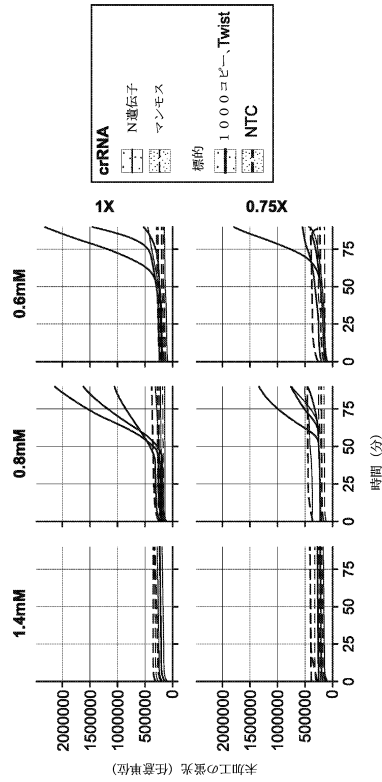
20

30

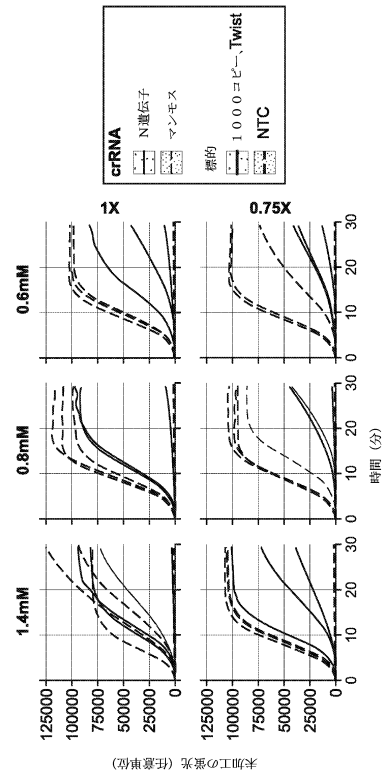
40

50

【図 59 A】



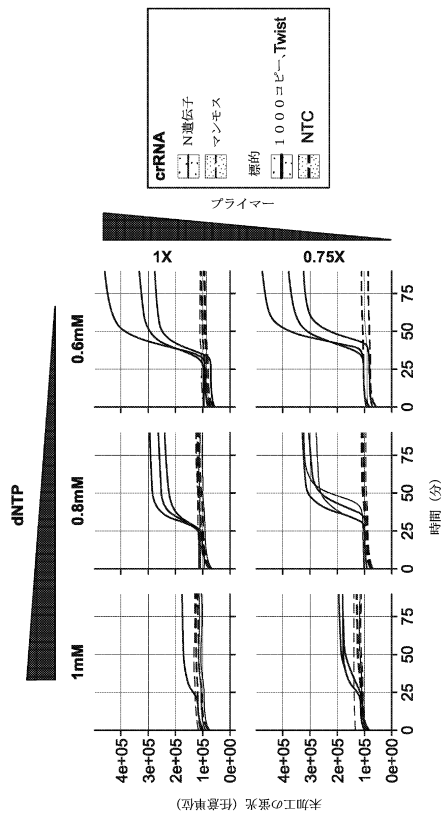
【図 59 B】



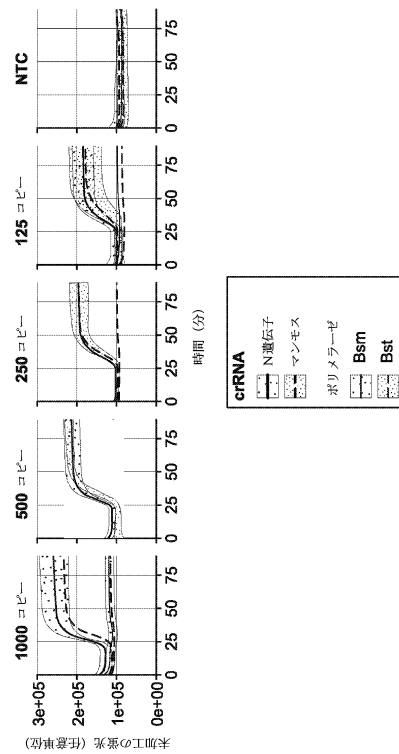
10

20

【図 60】



【図 61】

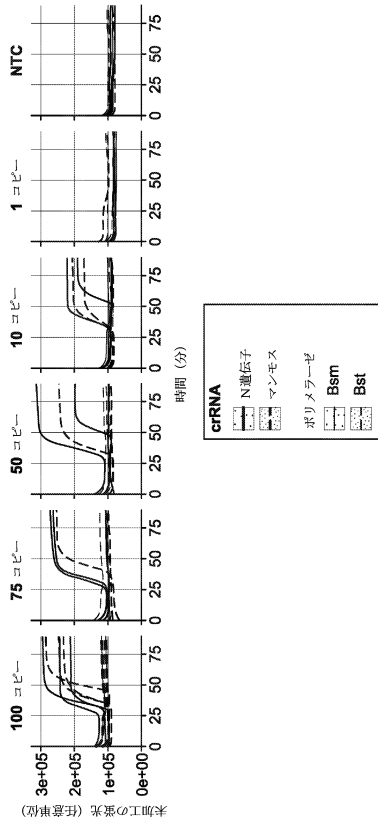


30

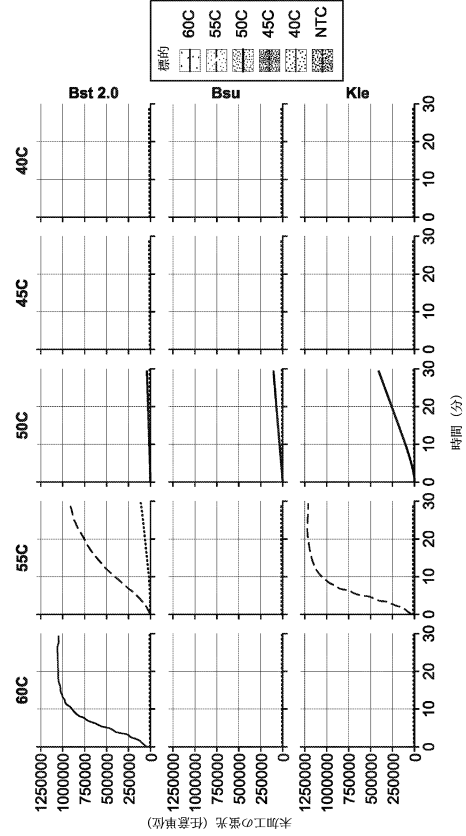
40

50

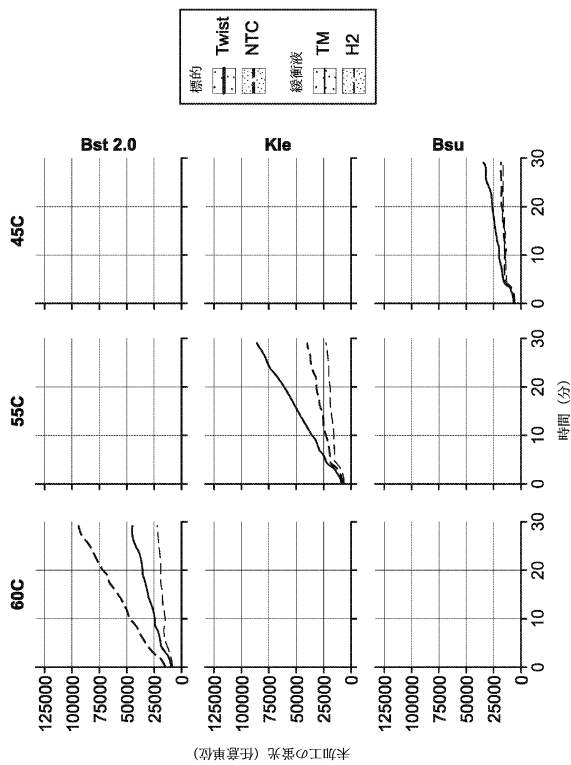
【図 6 2】



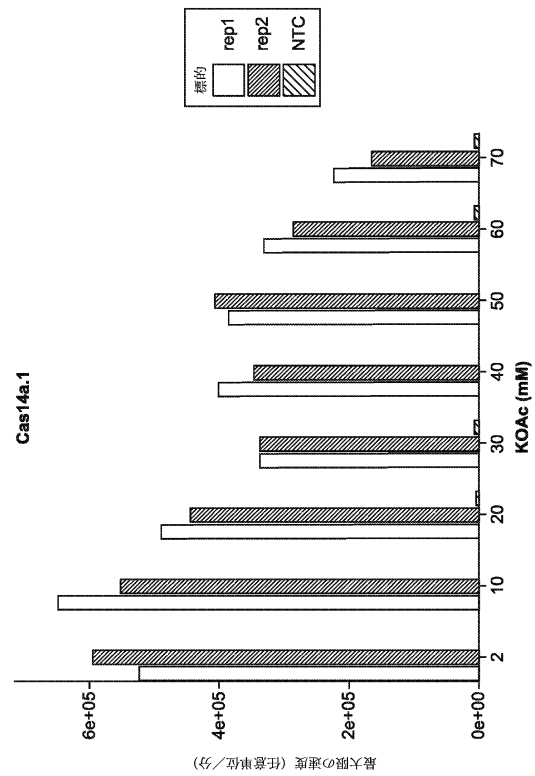
【図 6 3】



【図 6 4】



【図 6 5】



10

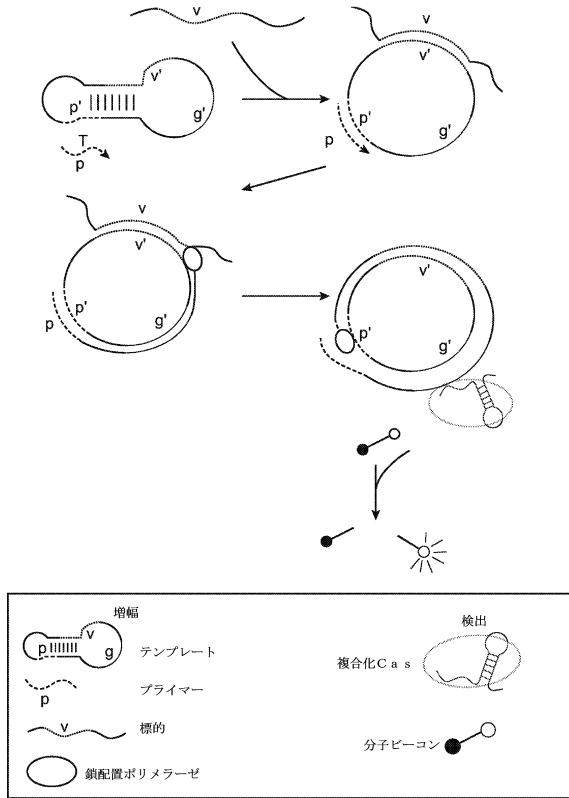
20

30

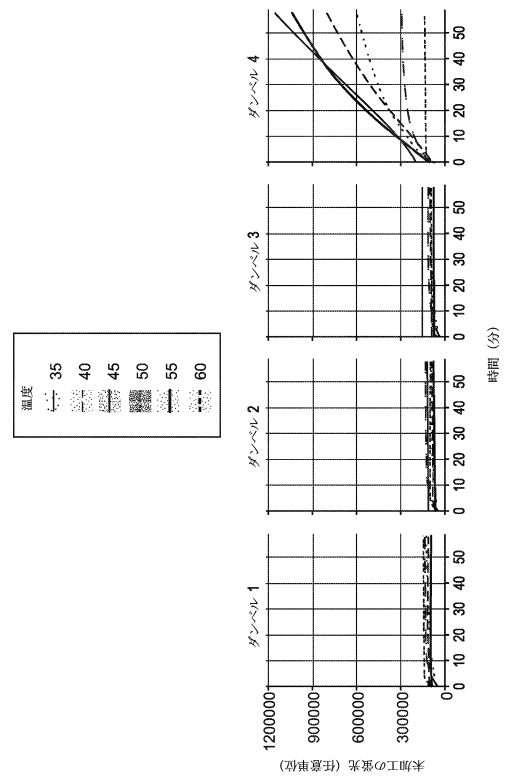
40

50

【図 7 0】



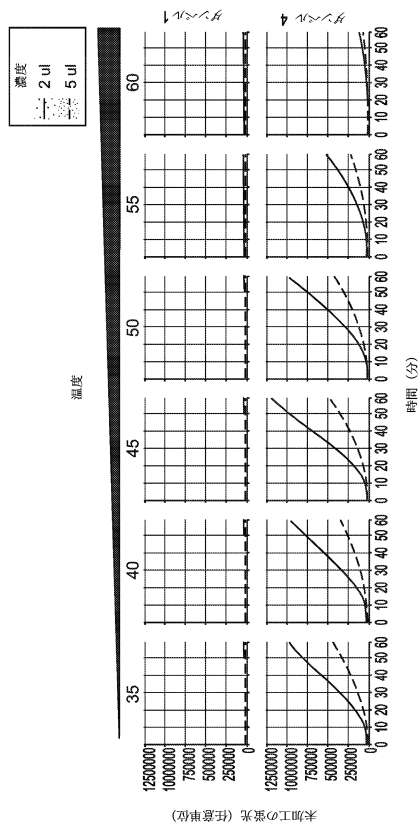
【図 7 1】



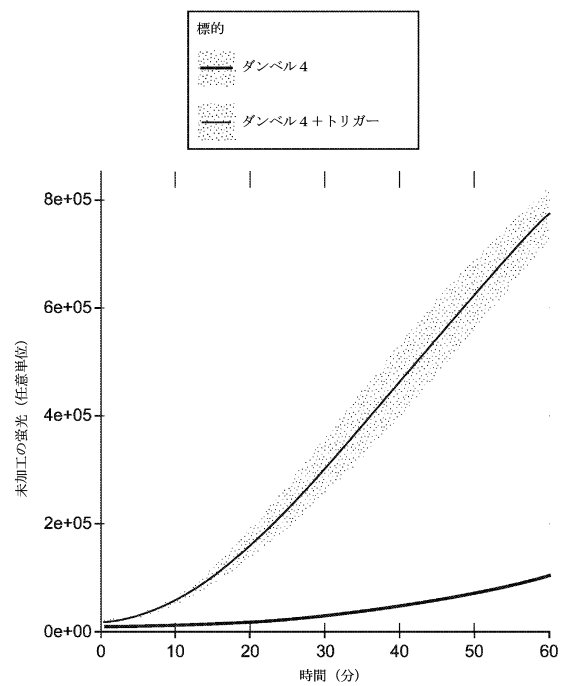
10

20

【図 7 2】



【図 7 3】

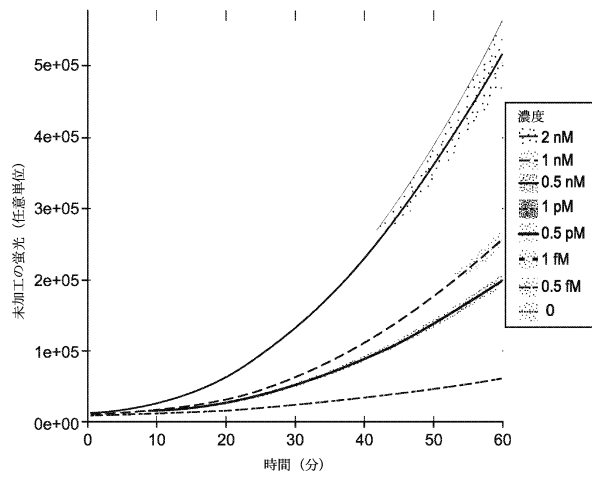


30

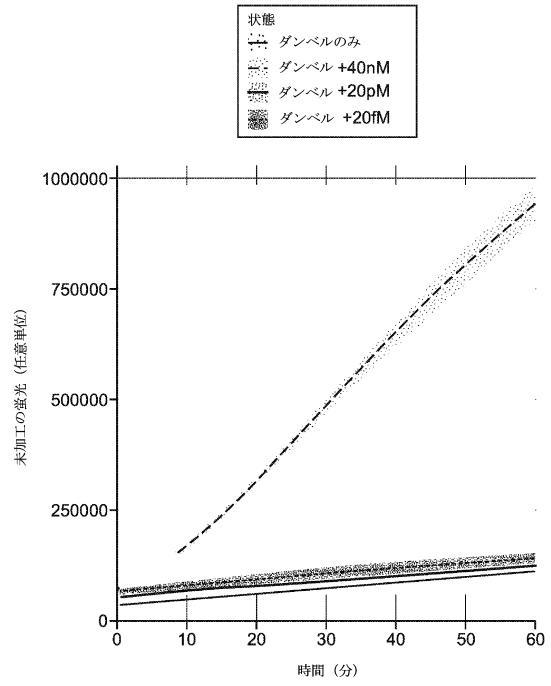
40

50

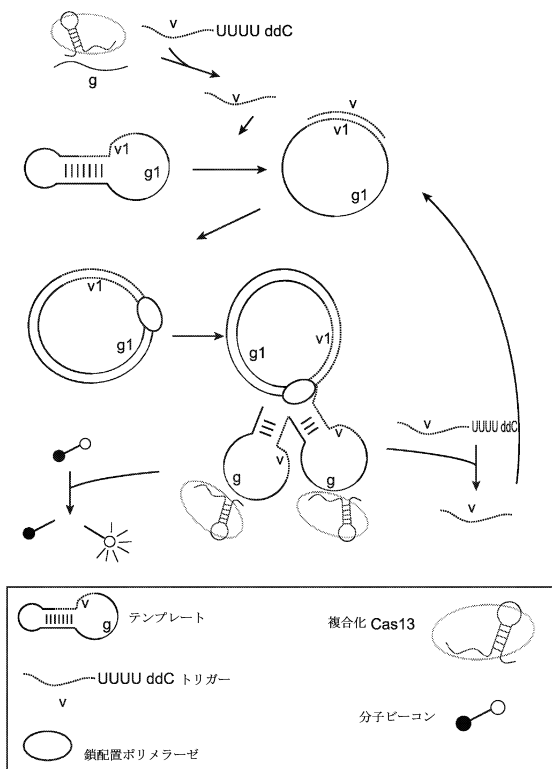
【図 7 4】



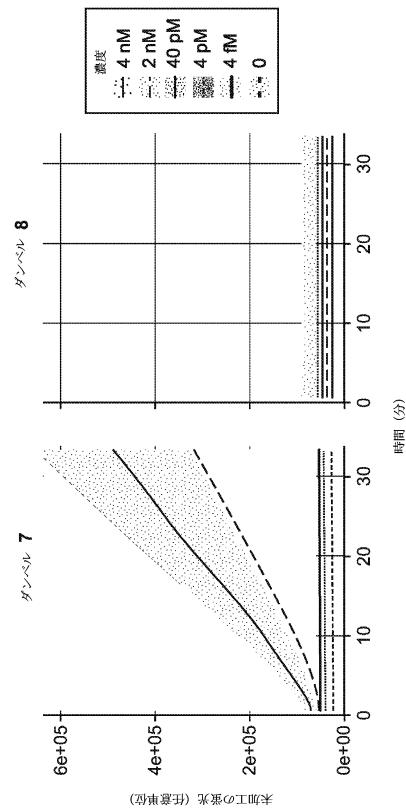
【図 7 5】



【図 7 6】



【図 7 7】



10

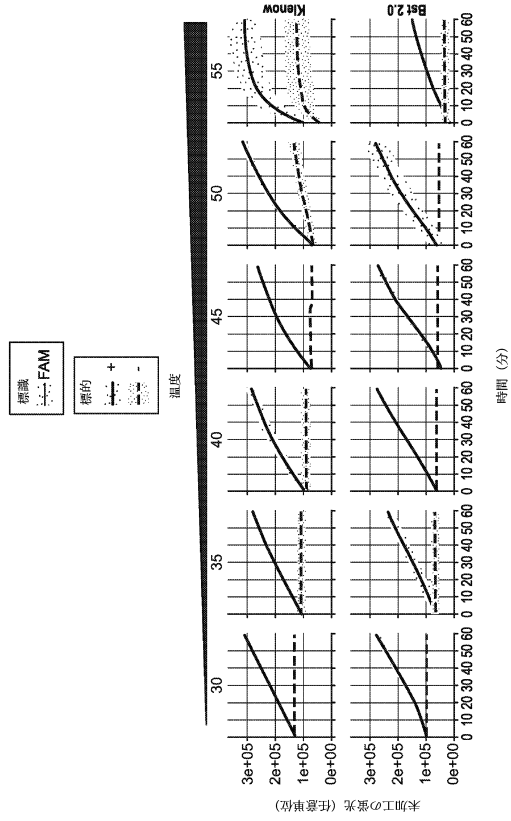
20

30

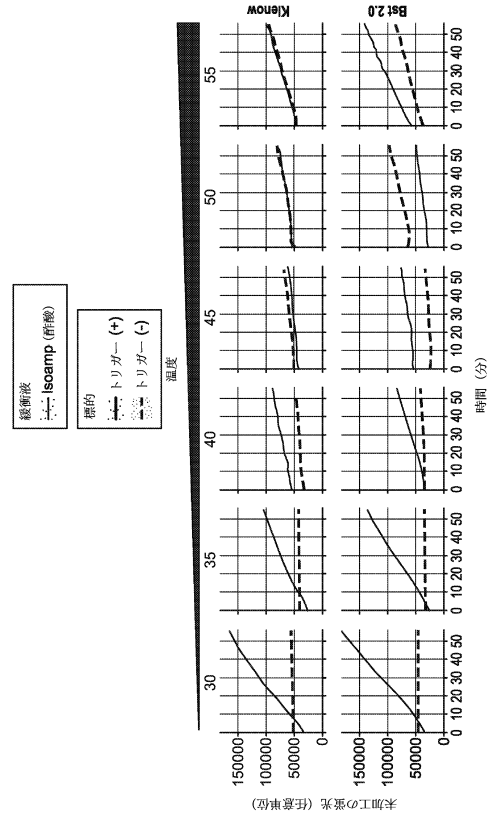
40

50

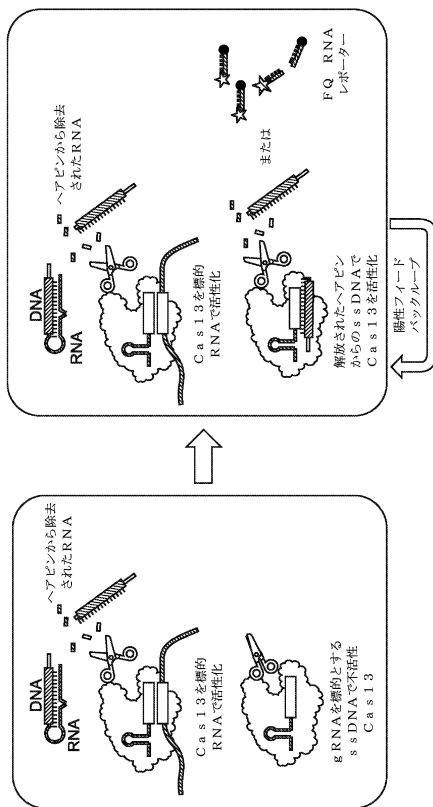
【図 7 8】



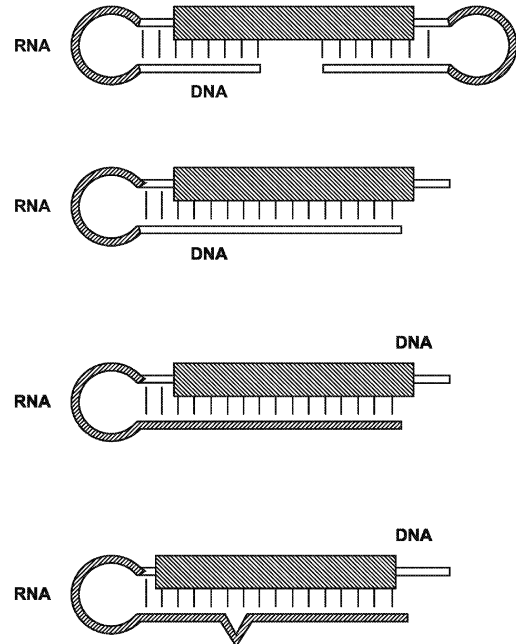
【図 7 9】



【図 8 0】



【図 8 1】



10

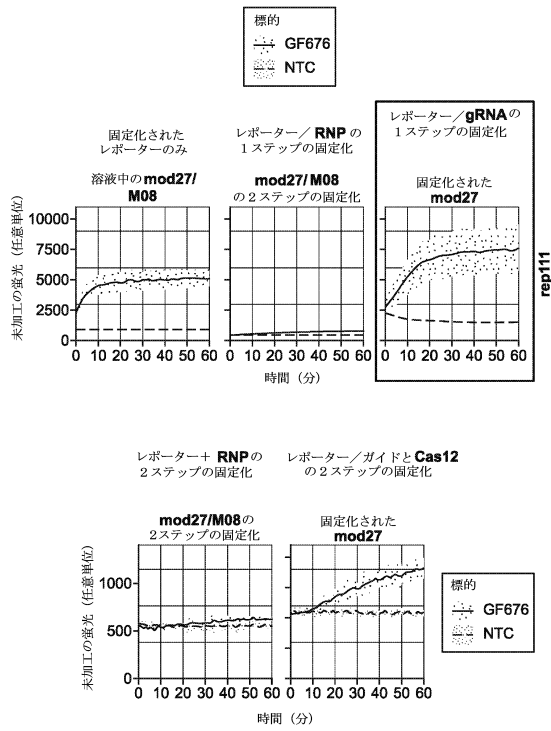
20

30

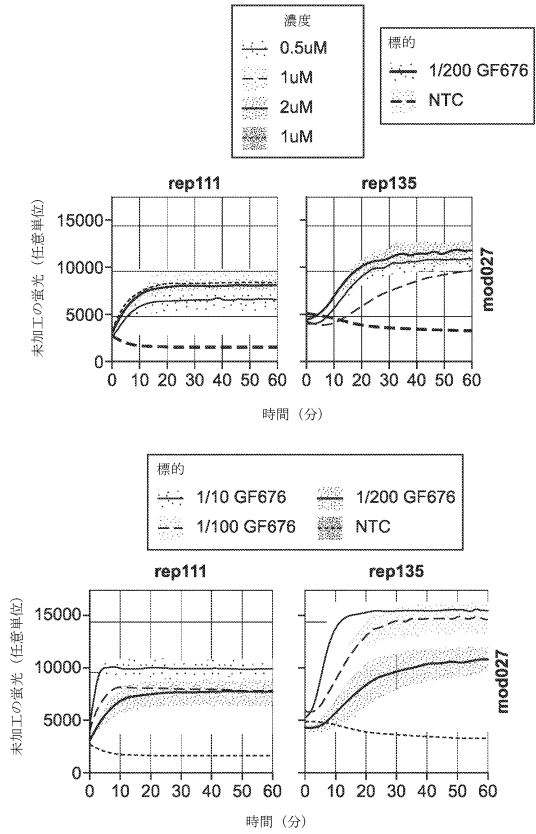
40

50

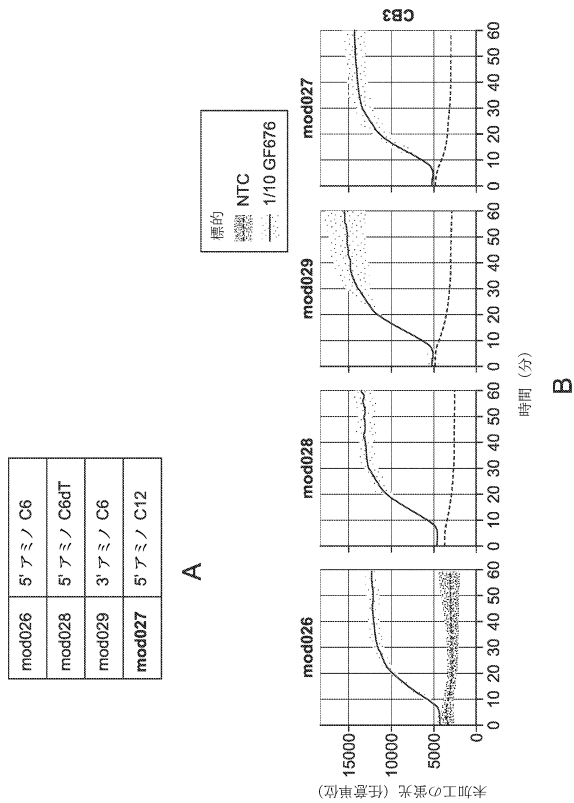
【図 8 5】



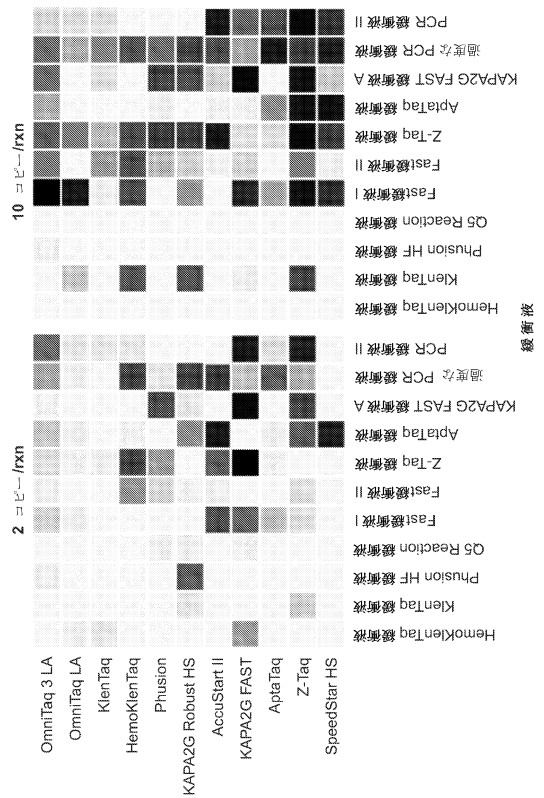
【図 8 6】



【図 8 7】



【図 8 8】



10

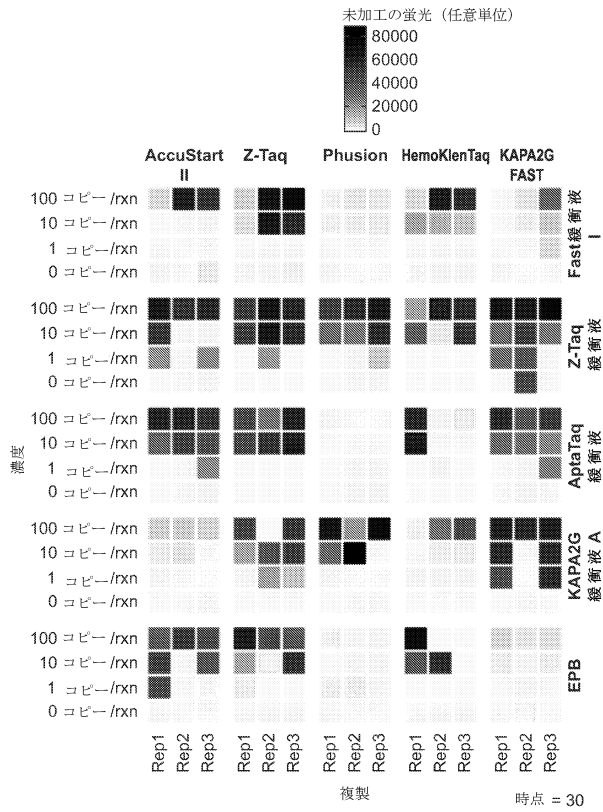
20

30

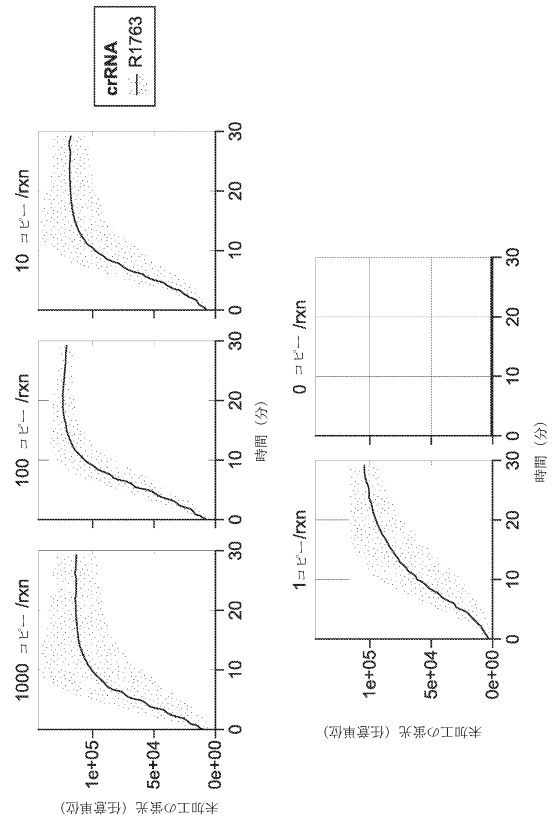
40

50

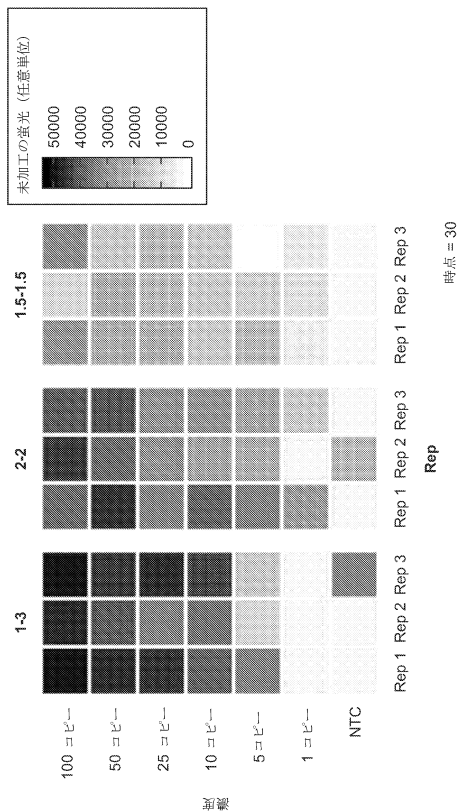
【図 89】



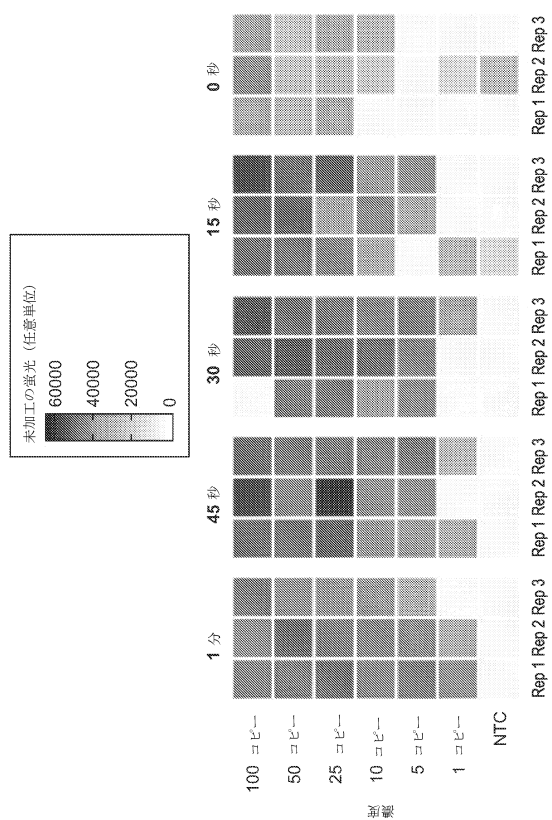
【図 90】



【図 91】



【図 92】



10

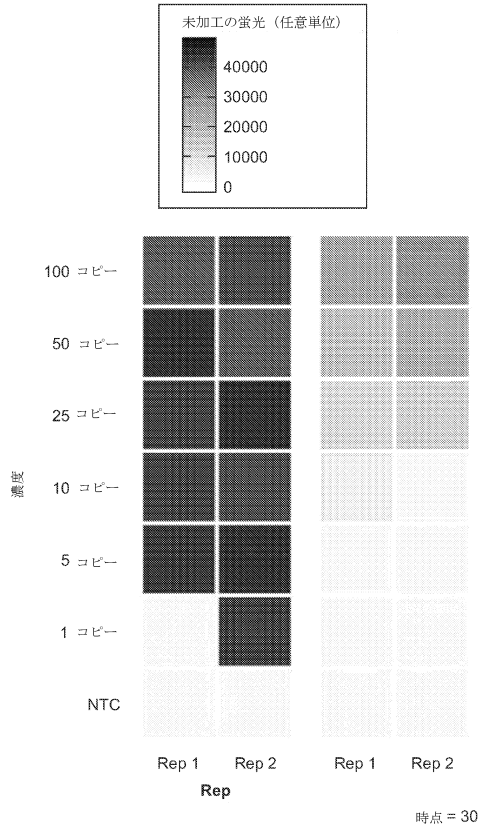
20

30

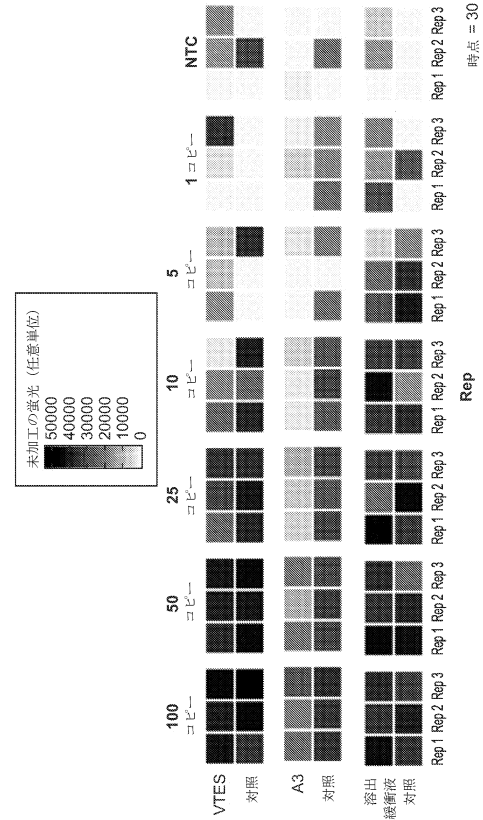
40

50

【図 9 3】



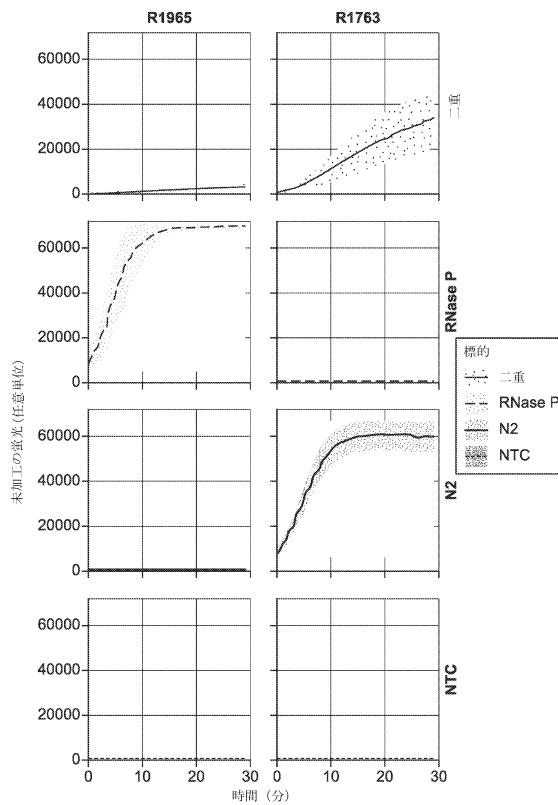
【図 9 4】



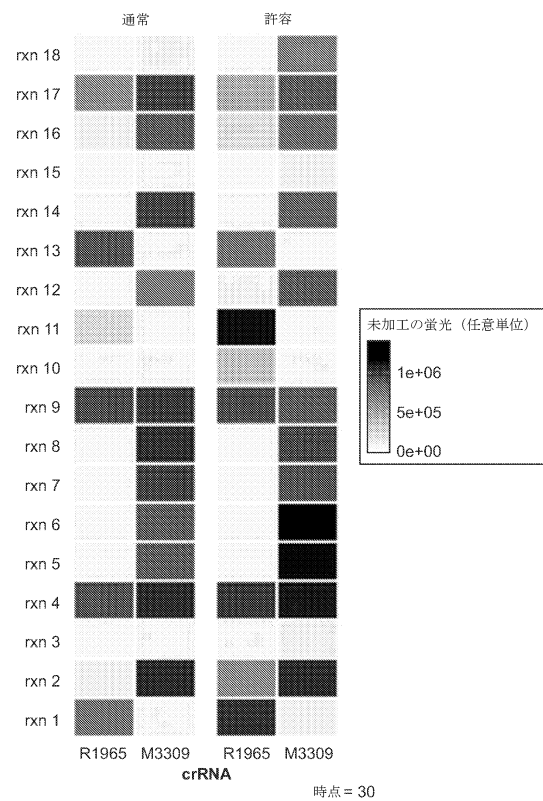
10

20

【図 9 5】



【図 9 6】

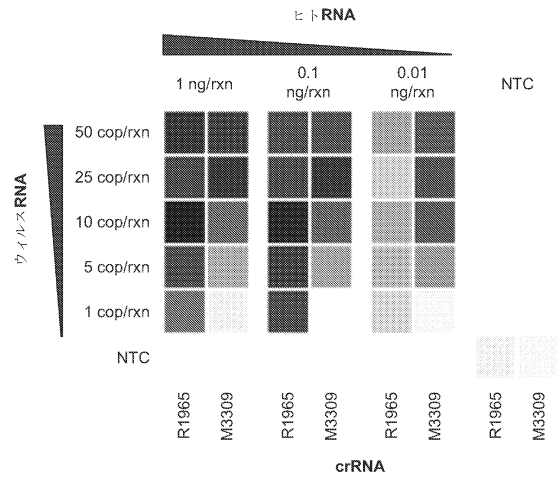


30

40

50

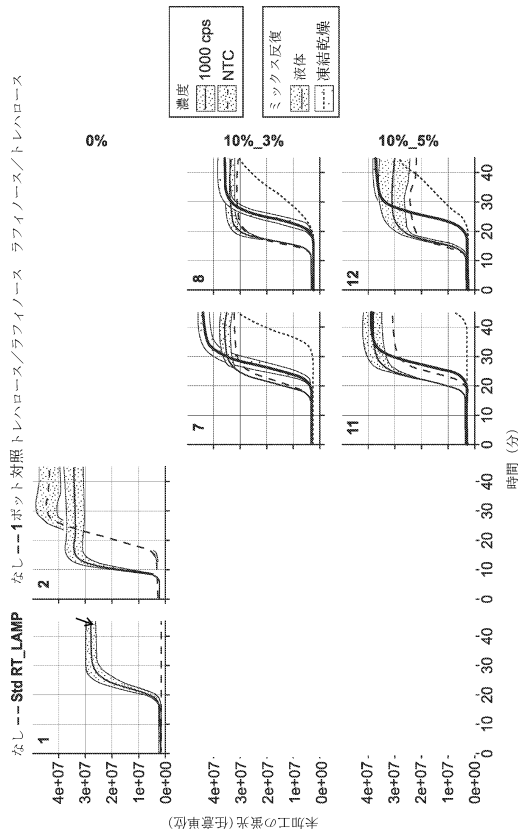
【図 9 7】



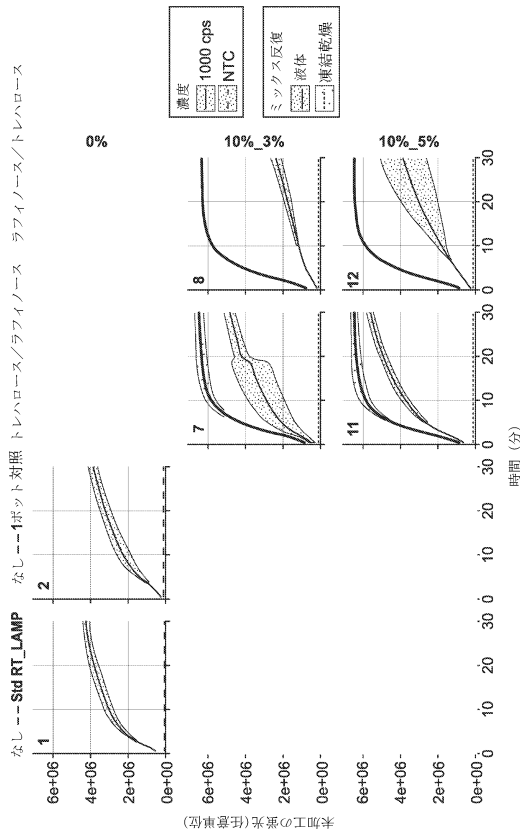
【図 9 8】

マンモスの名前	配列	目的	注記
M2062	TTTCAACATTCGCCGAAA	PCRプライマー	SARS-CoV-2のCDC N2 アッセイ
M2063	CCCGACATTCGGAAGAA	PCRプライマー	SARS-CoV-2のCDC N2 アッセイ
R1763	UAAUUCUACUAAAGUGUAGAUCCCCAGGCUUCAGCGUUC	Cast12 gRNA	M2062 / M2063 に適合
M3637	CTCCGCTGATATGGCTCTTC	PCRプライマー	ヒト RNase P POP7
M3638	AGAGTCCTTTGGGCTTCC	PCRプライマー	ヒト RNase P POP7
R1965	UAAUUCUACUAAAGUGUAGAUUACACAGGCUUCGCGCCGAG	Cast12 gRNA	M3637 / M3638 に適合
M3257	AGGTCCTGGAATATTTGCTGAACAG	PCRプライマー	SARS-CoV-2. orf1ab
M3258	TCAGAGTGGGGAGAGAAAATTGATCG	PCRプライマー	SARS-CoV-2. orf1ab
R3185	UAAUUCUACUAAAGUGUAGAUCAUCACAGGCUUCGCGUUC	Cast12 gRNA	M3257 / M3258 に適合

【図 9 9 A】



【図 9 9 B】



10

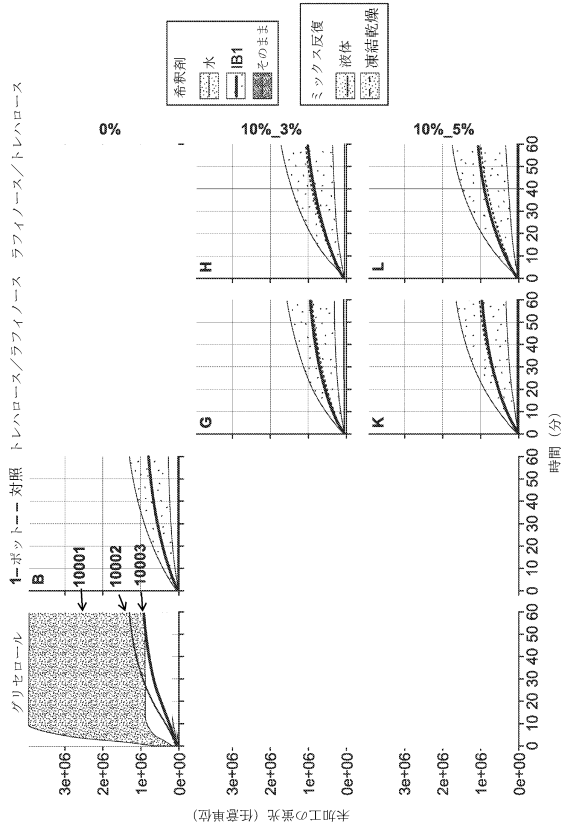
20

30

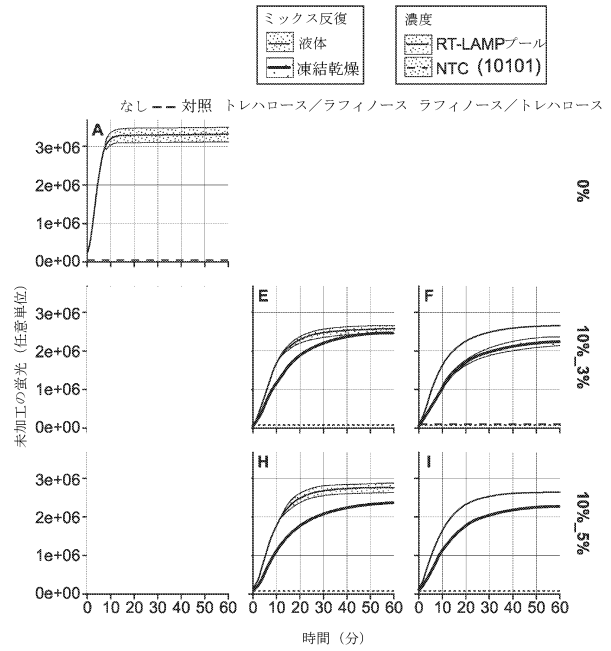
40

50

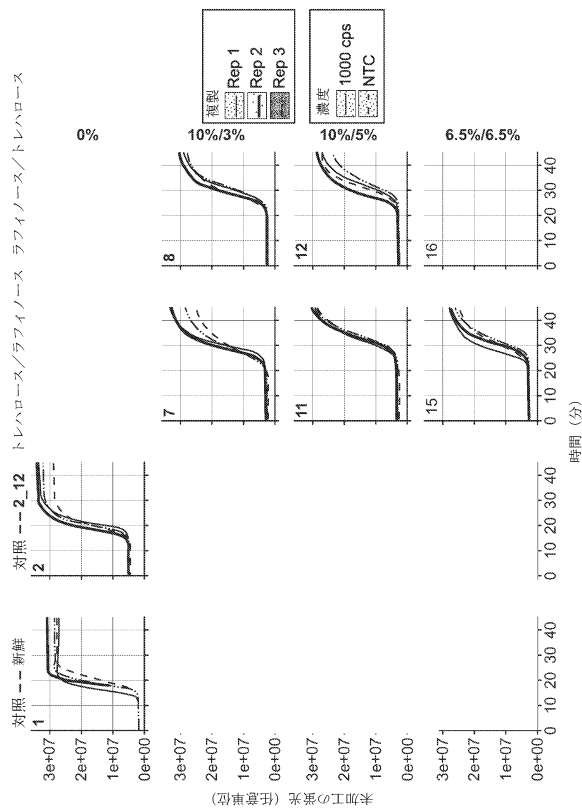
【図 100】



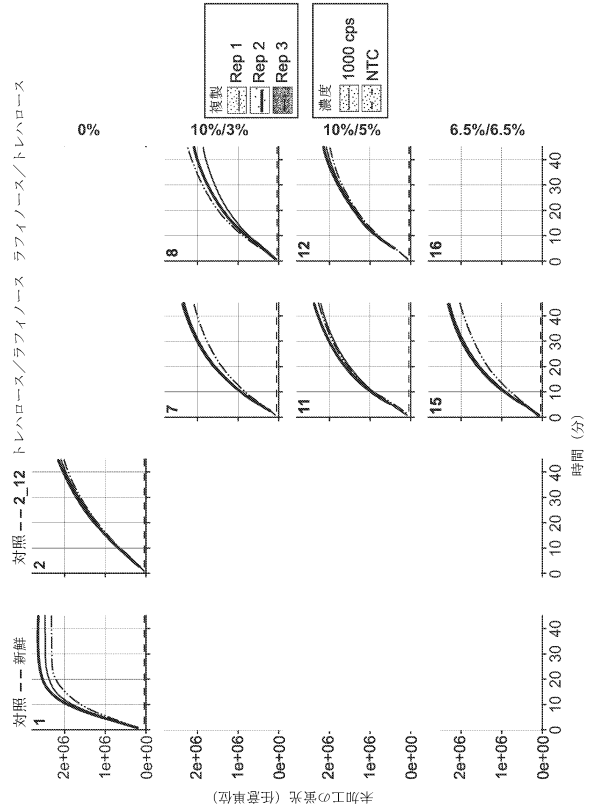
【図 101】



【図 102 A】



【図 102 B】



10

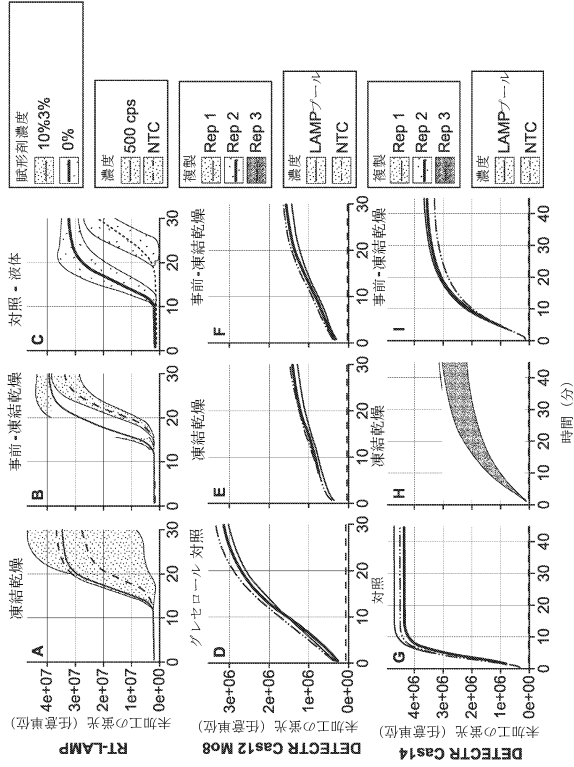
20

30

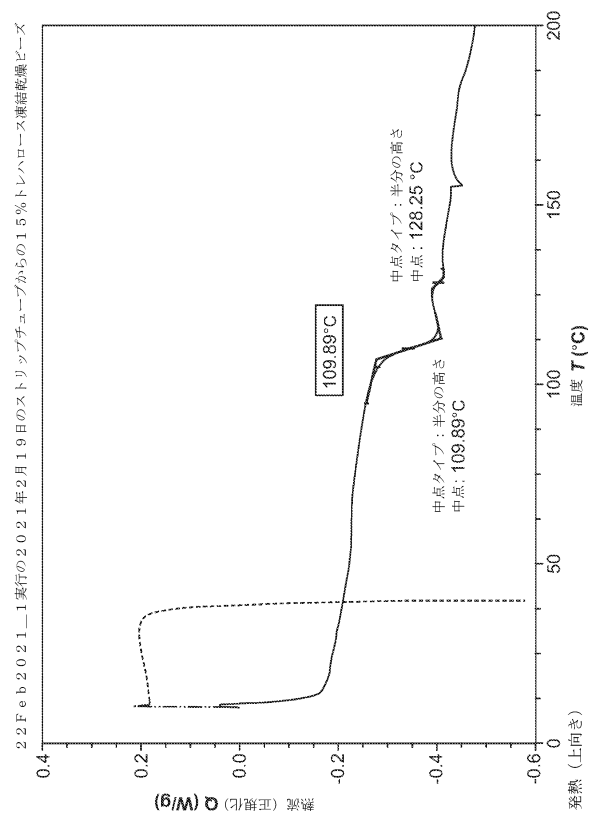
40

50

【図 103】



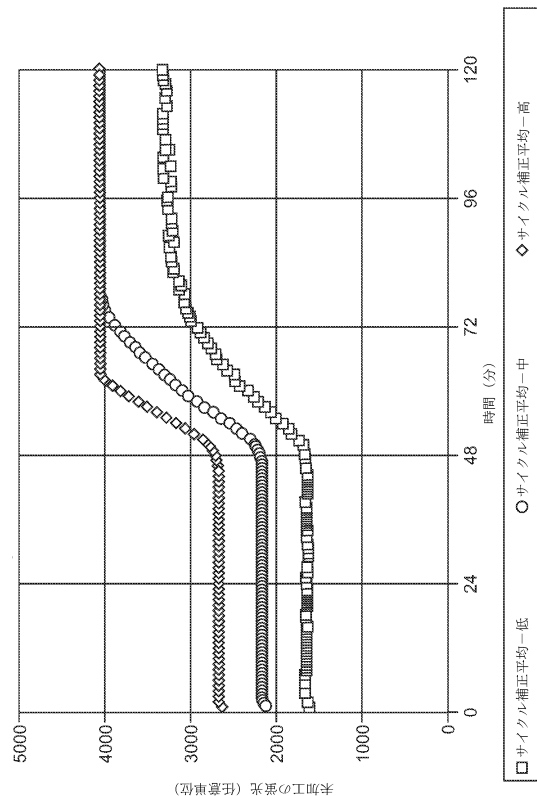
【図 104】



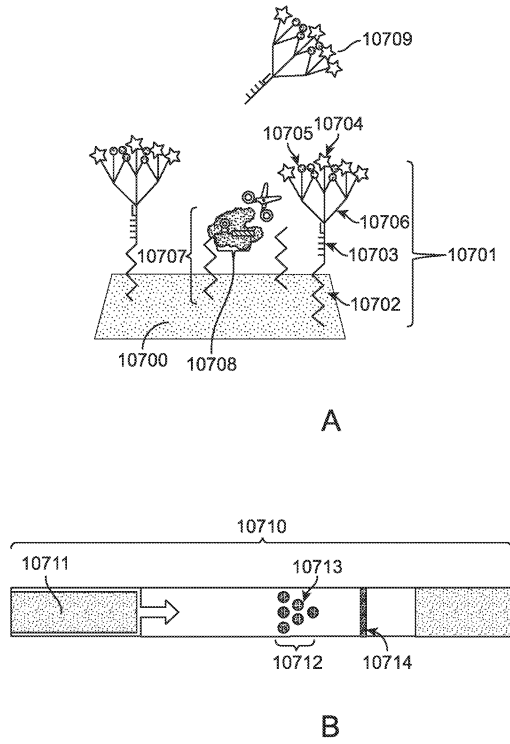
【図 105】

膜形剤	主要/副次的	機能	T _g (DSC)	T _{onset} (DSC)	事象
デキストラン硫酸ナトリウム ca 40,000	副次的	修飾助剤	-19.83	-20.35	ガラス転移
D-マンノース	副次的	凍結/凍結保護剤	-19.71	-40.09	ガラス転移
D-ソルビトール	主要	増量剤	-18.21	-42.99	ガラス転移
PVP 40	主要	凍結防止剤	-15.28	-20.42	ガラス転移
D-マンニトール	主要	高共晶MP	-22.26	-27.52	メルト、再結晶、メルト
β-シクロデキストリン	主要	優先除外	-1	-1	-1
フィコル 400	主要	合成ポリマー (ミックス)	-17.22	-20.83	ガラス転移
BSA	主要	疎水性安定剤	-20.28	-0.05	メルト
ポリソルベート 80	主要	界面活性剤、排除	-18.12	-0.45	メルト
10%トレハロース中の0.5%w/wポリソルベート	混合	界面活性剤+増量剤	-20.74	-29.99	ガラス転移
10%マンニトール中の0.5%w/wポリソルベート	混合	界面活性剤+増量剤	-21.11	-25.74, -1.97	メルト
アルギニン	主要	チャージ	-25.88	-43.85	ガラス転移
メレジロース	副次的	アミノ酸	-3.99	-23.1	メルト
ゼラチン	副次的	非還元三糖	-16.76	-23.1	ガラス転移
1%ゼラチン	副次的	修飾助剤	-3	-3	-3
フィコル 70	副次的	修飾助剤	-13.74	-0.46	メルト
ヒスタジン (ヒスタミン)	副次的	多糖類	-19.64	-18.91	ガラス転移
酢酸トリス	副次的	緩衝液	-21.09	-2.4	メルト
デキストラン-40	主要	修飾助剤	-14.81	-10.89	ガラス転移
デキストラン-70	主要	修飾助剤	-15.65	-10.57	ガラス転移
PEG-6000	主要	増量剤	-27.77	-47.33, -14.64	結晶化、メルト
ラフィノース 20%	主要	凍結/凍結保護剤	-19.6	-26.14	ガラス転移
スクロース	主要	凍結/凍結保護剤	N/A	-34	ガラス転移 (文獻)

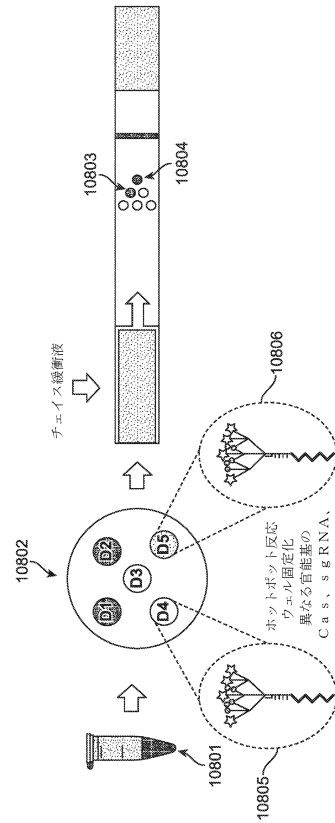
【図 106】



【図 107】



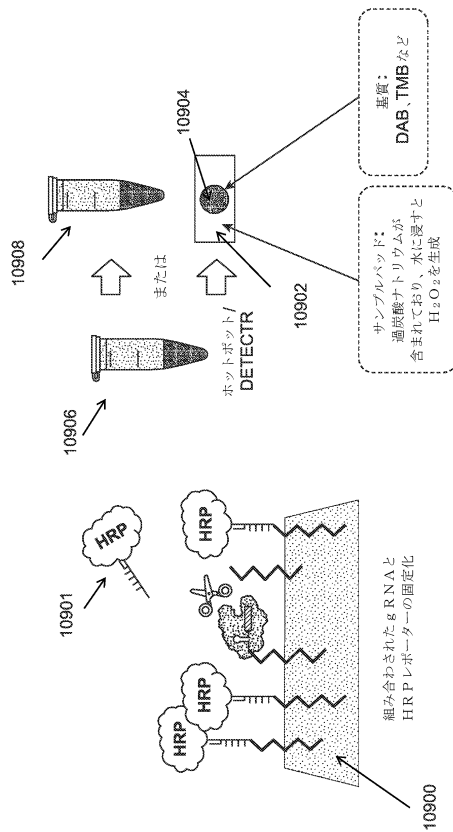
【図 108】



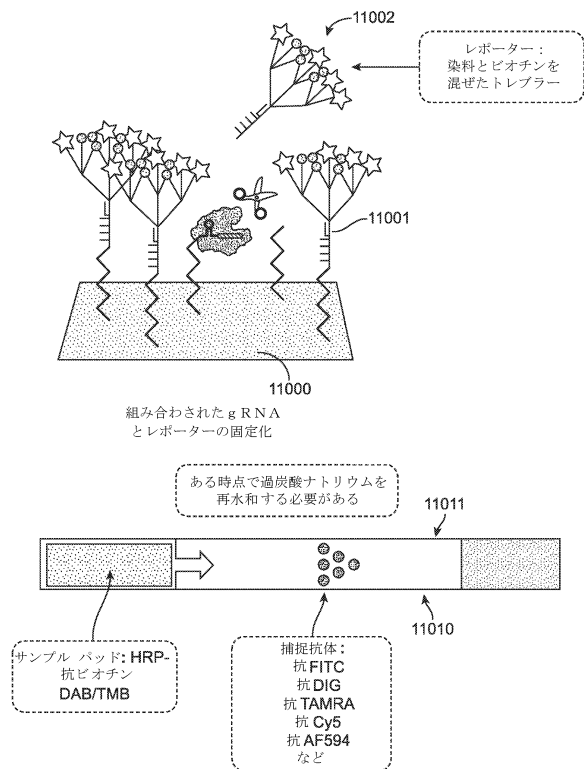
10

20

【図 109】



【図 110】

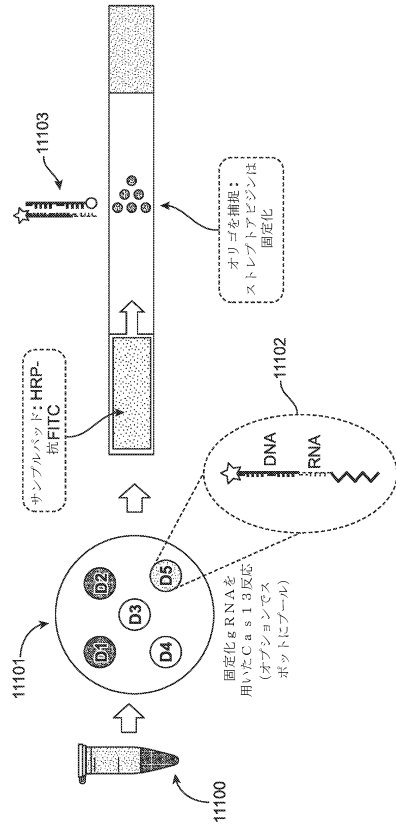


30

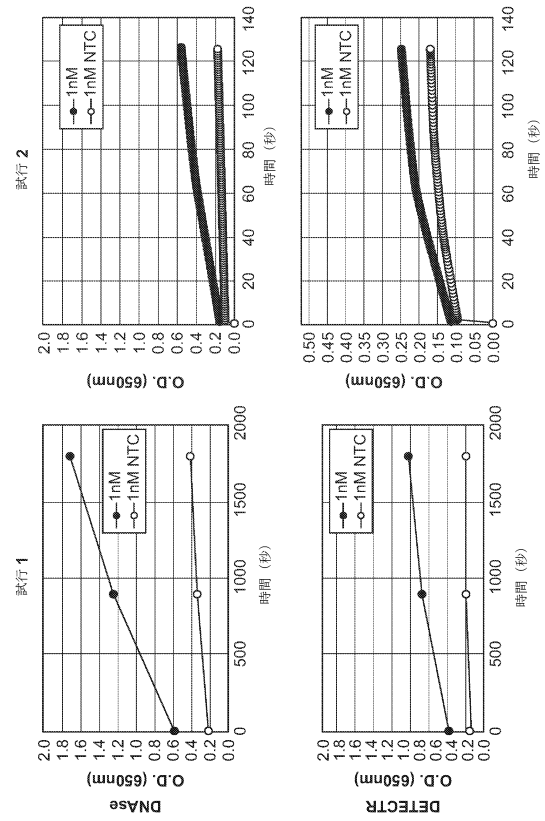
40

50

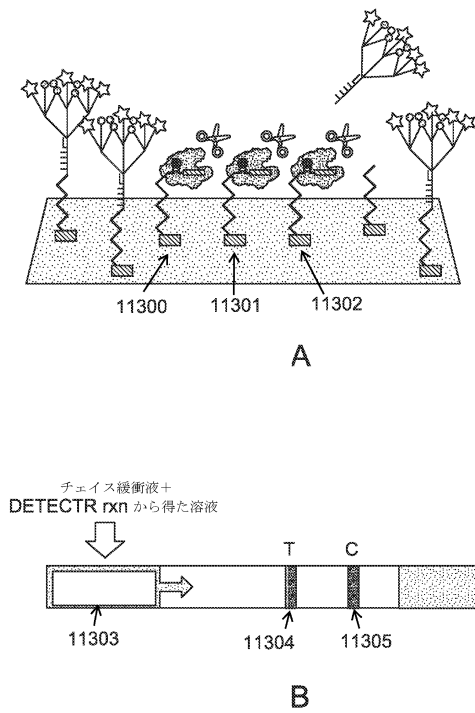
【図 1 1 1】



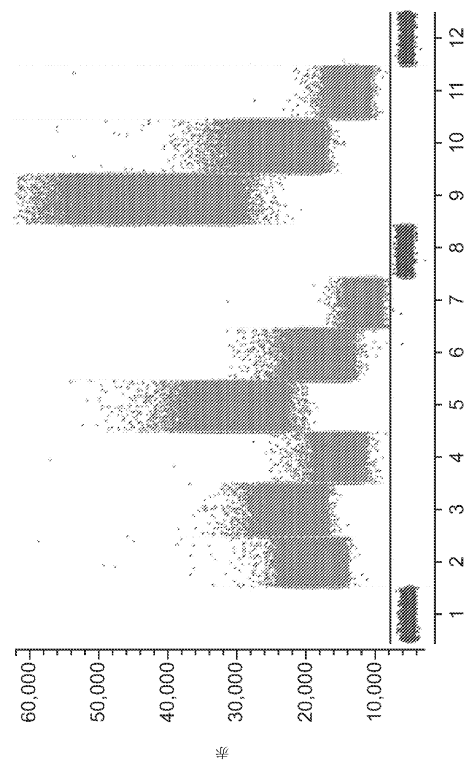
【図 1 1 2】



【図 1 1 3】



【図 1 1 4】



10

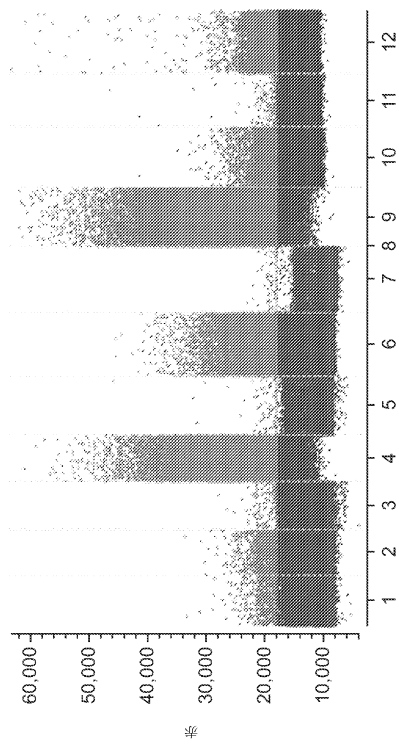
20

30

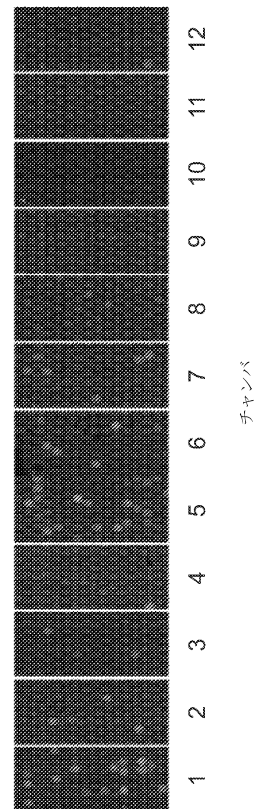
40

50

【図 1 1 5】



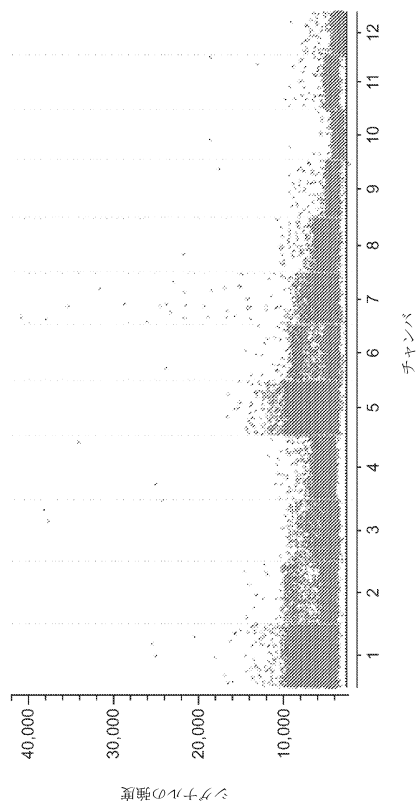
【図 1 1 6】



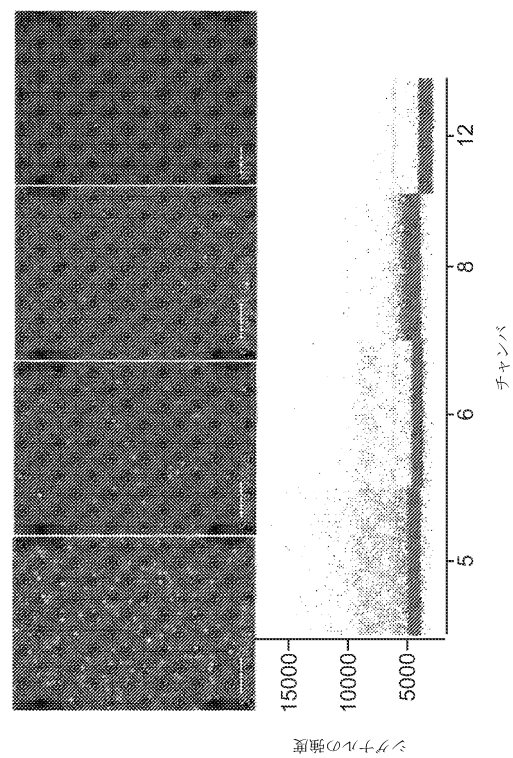
10

20

【図 1 1 7】



【図 1 1 8】

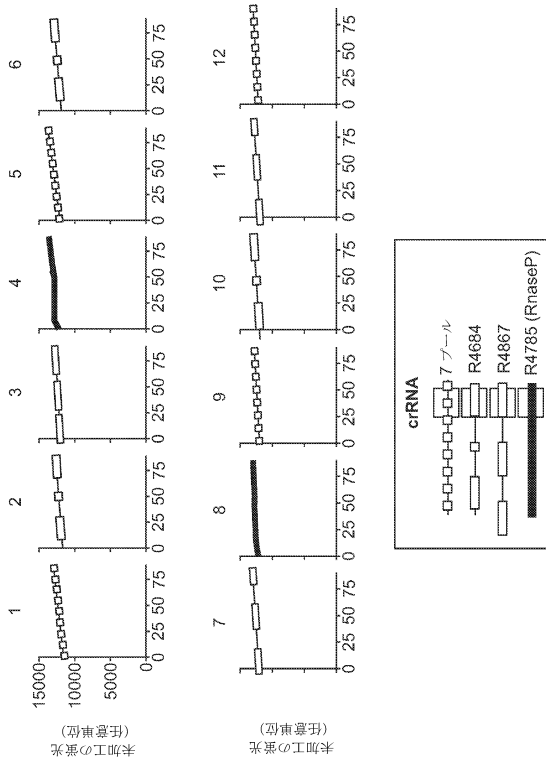


30

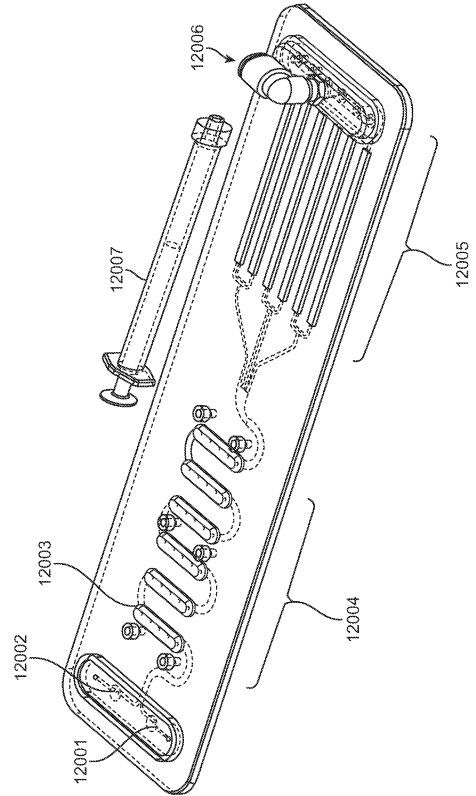
40

50

【図 1 1 9】



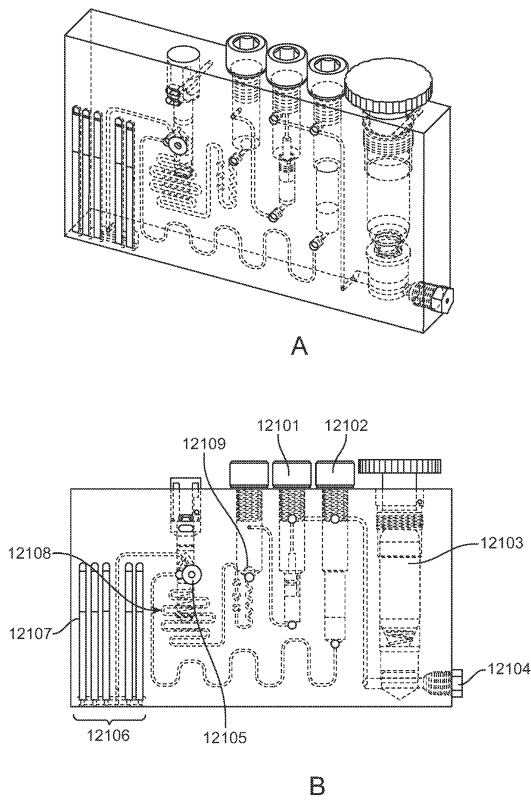
【図 1 2 0】



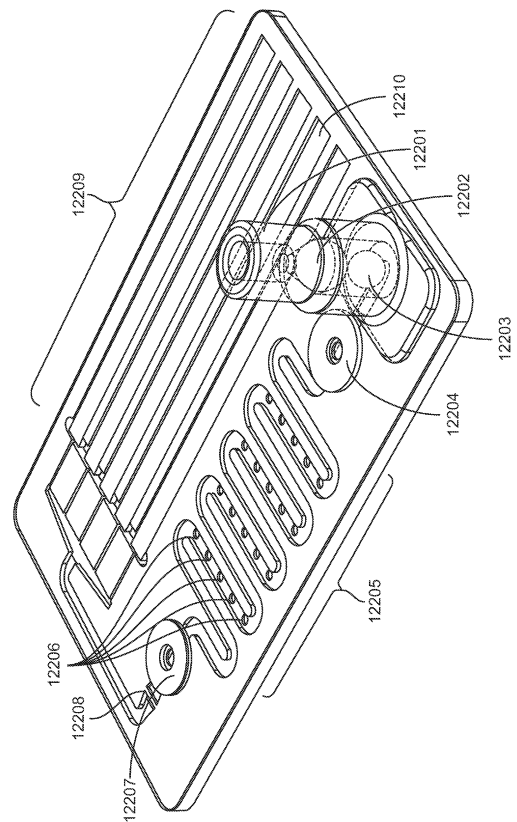
10

20

【図 1 2 1】



【図 1 2 2】

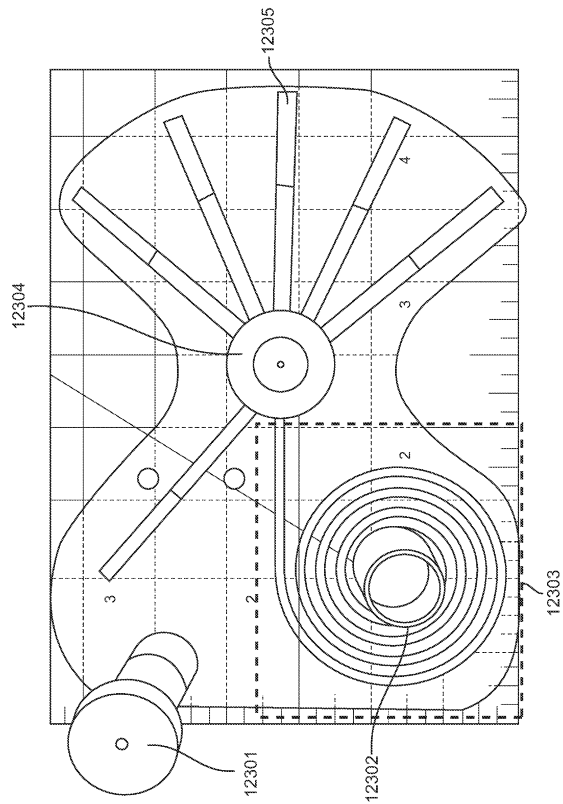


30

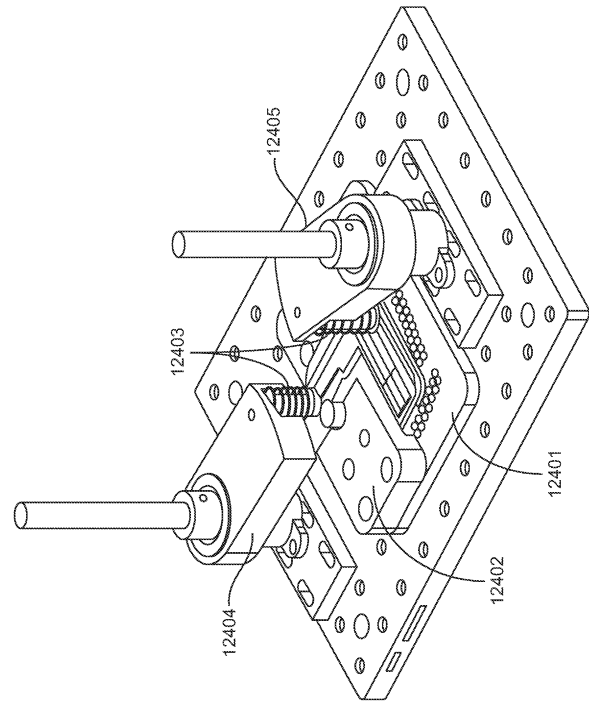
40

50

【図 1 2 3】



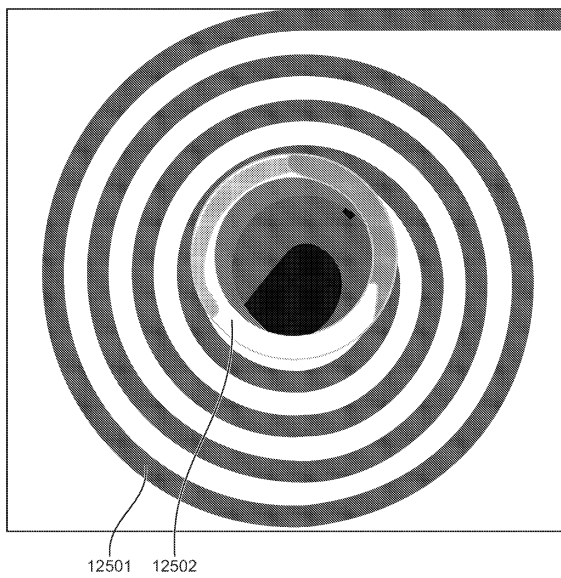
【図 1 2 4】



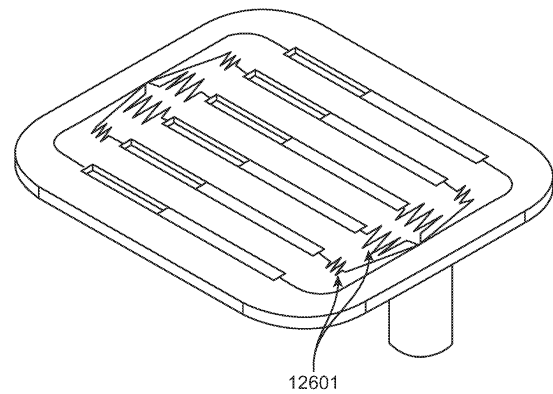
10

20

【図 1 2 5】



【図 1 2 6】

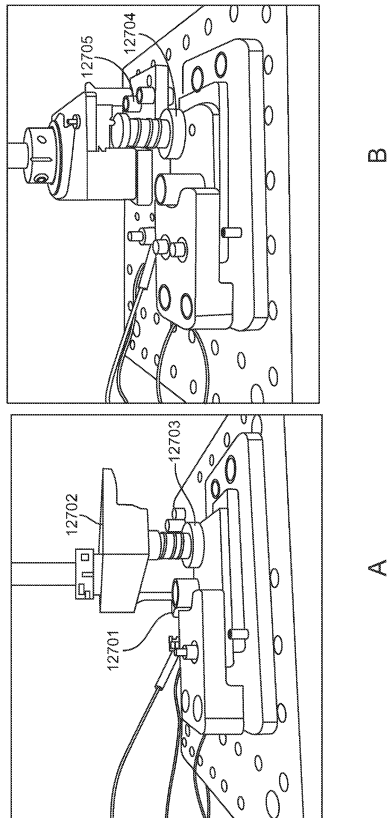


30

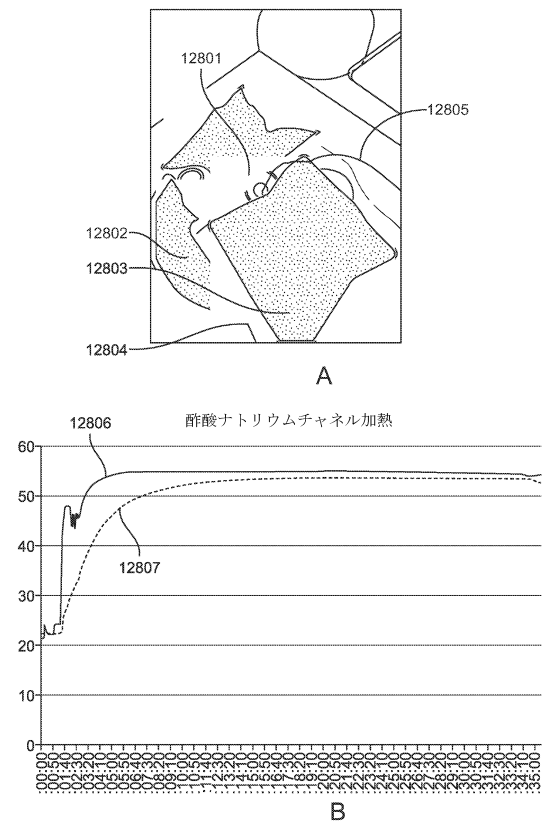
40

50

【図 1 2 7】



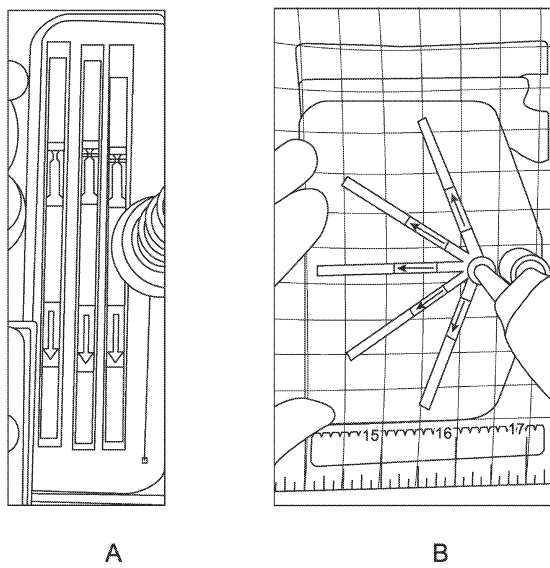
【図 1 2 8】



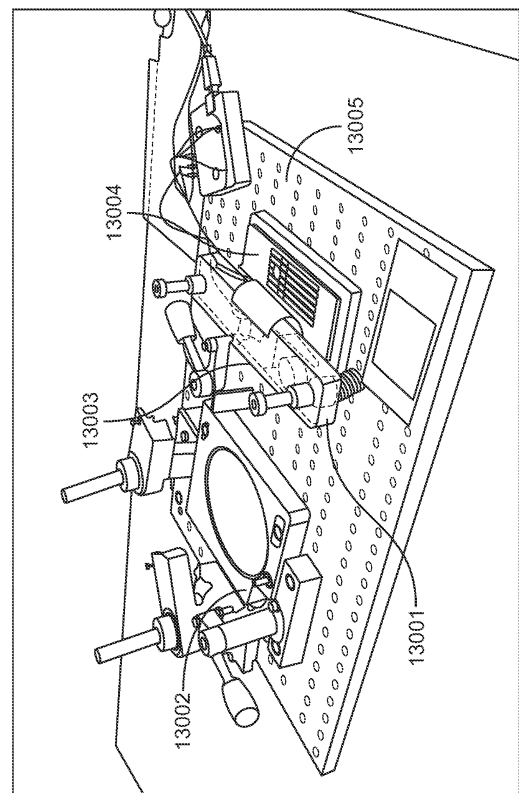
10

20

【図 1 2 9】



【図 1 3 0】

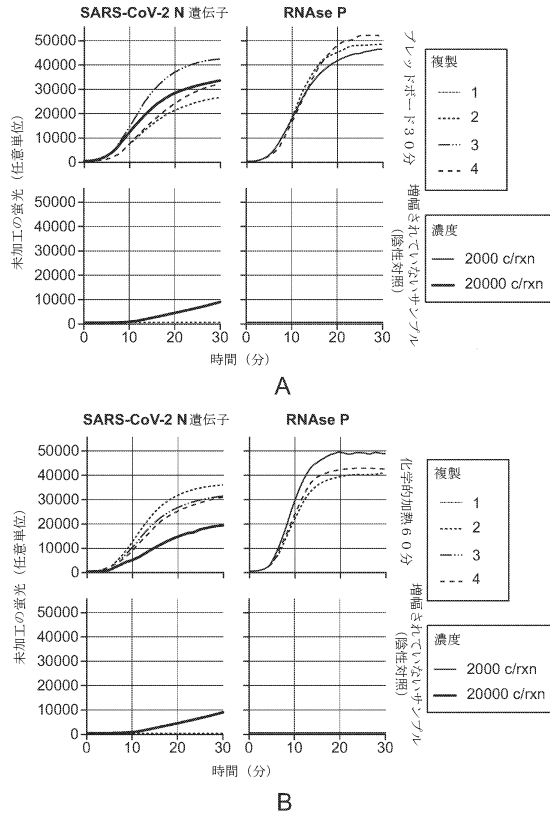


30

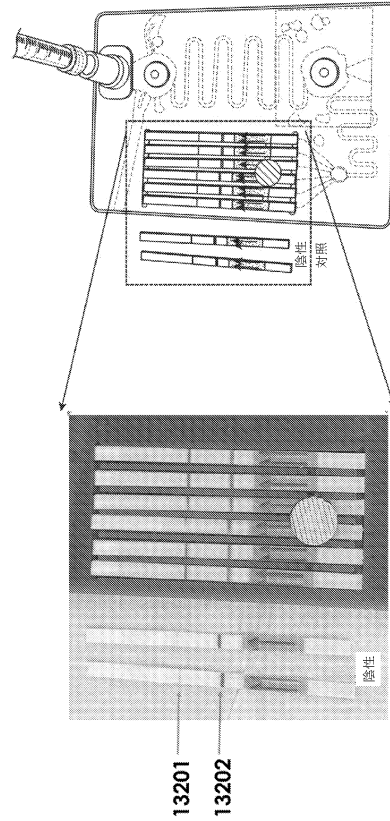
40

50

【図 1 3 1】



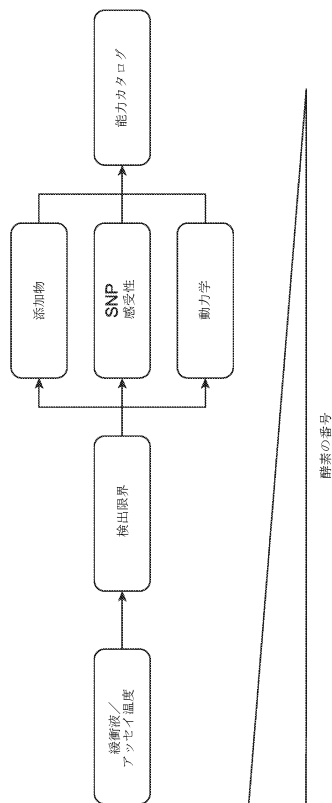
【図 1 3 2】



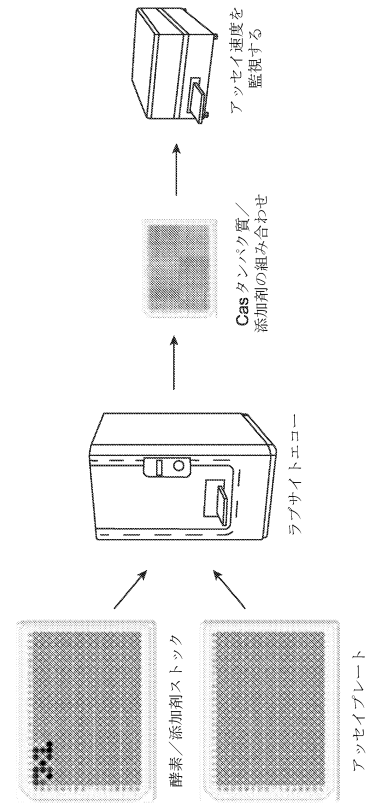
10

20

【図 1 3 3】



【図 1 3 4】

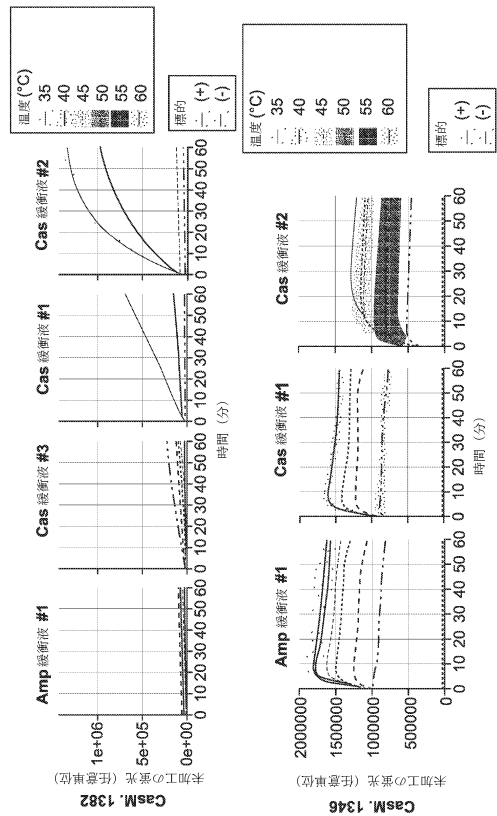


30

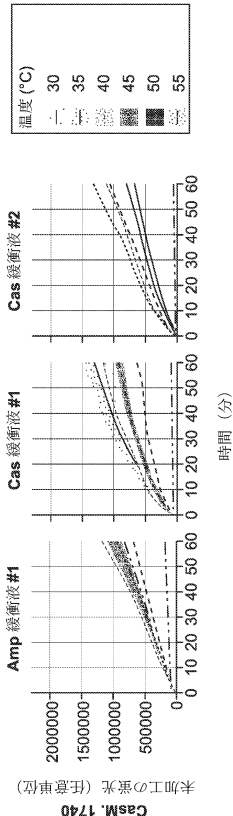
40

50

【図 1 3 5 - 1】



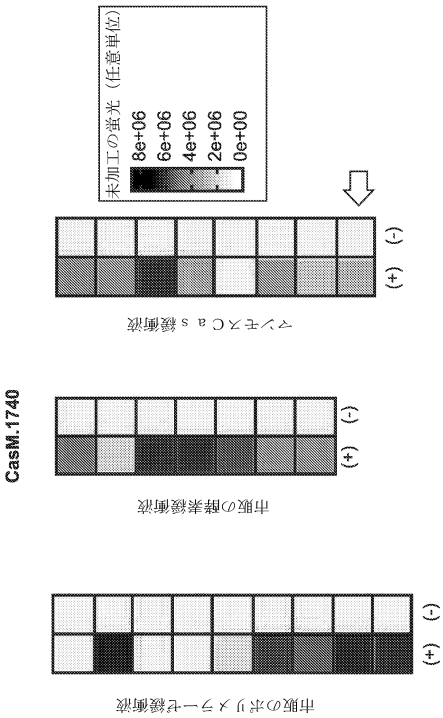
【図 1 3 5 - 2】



【図 1 3 6】

タンパク質	好適な緩衝液	温度	能力
CasM.1382	Cas 緩衝液 #2	35°C	+++
		40°C	++
		45°C	-
		50°C	-
		55°C	-
		60°C	-
CasM.1346	Amp 緩衝液 #1	35°C	++++
		40°C	++++
		45°C	+++
		50°C	++
		55°C	-
		60°C	-
CasM.1740	Cas 緩衝液 #2	30°C	++
		35°C	++
		40°C	++
		45°C	++
		50°C	++
		55°C	-

【図 1 3 7】



10

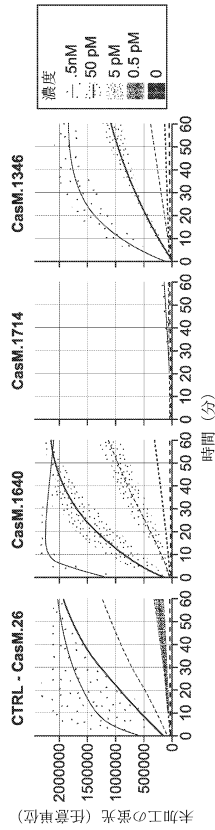
20

30

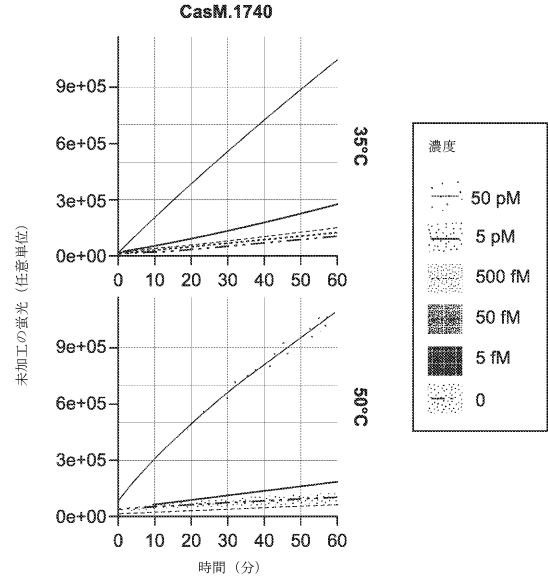
40

50

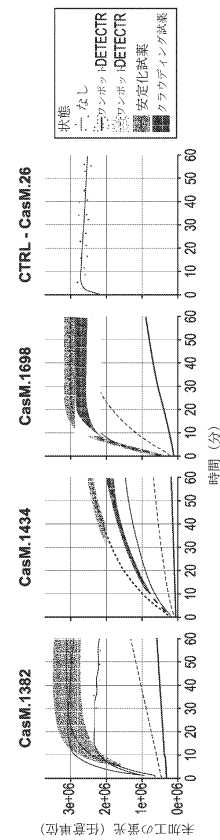
【図 138】



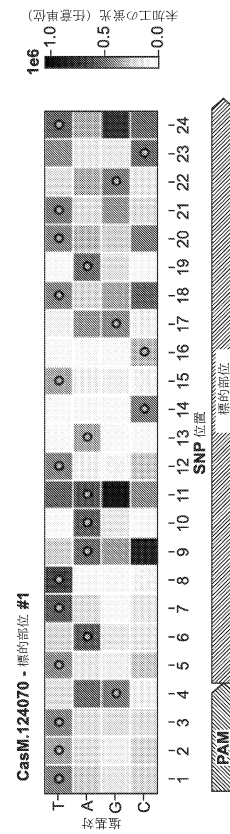
【図 139】



【図 140】



【図 141】



10

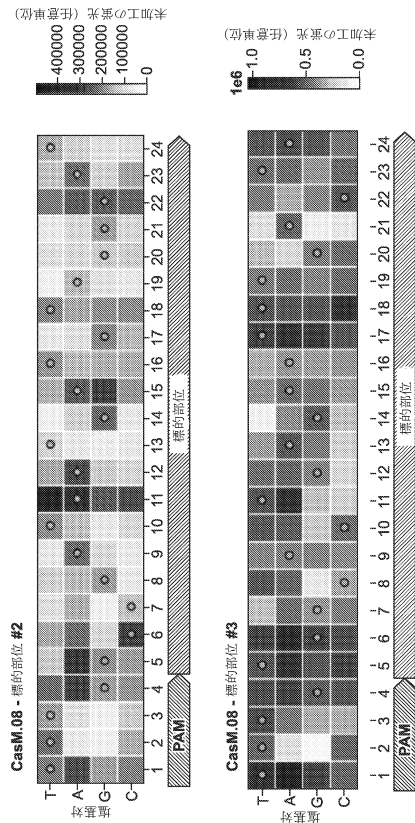
20

30

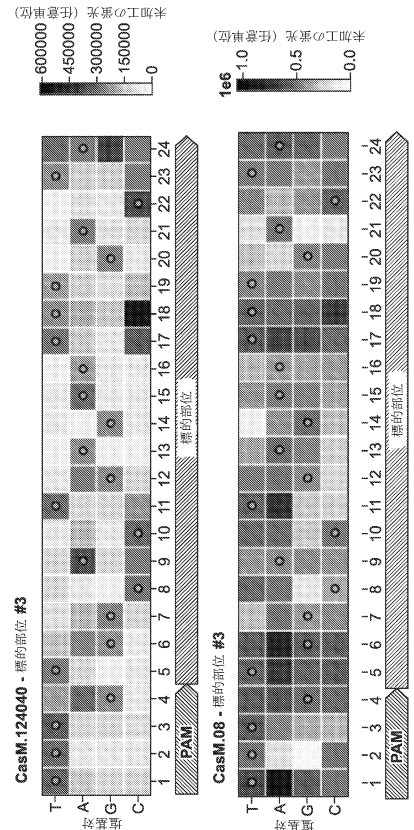
40

50

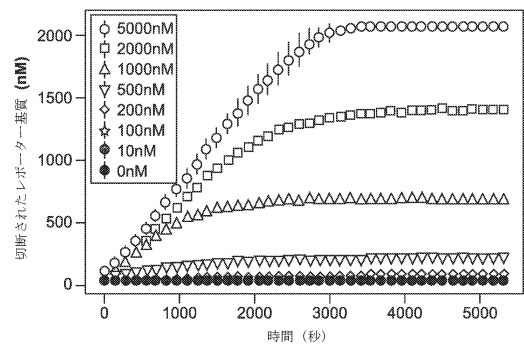
【図 1 4 2】



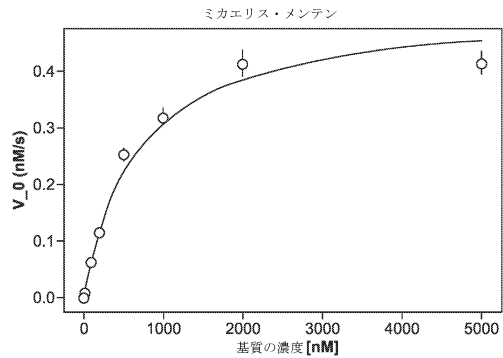
【図 1 4 3】



【図 1 4 4】



A



B

【図 1 4 5】

タンパク質名	最高動作温度 (°C)	検出限界 (pM)	検出限界 (コピー/rxn, 20 μL rxn)	K_{cat} / K_M (1/Ms)
Cas.M.08	40	30	3.61E+08	7.4E+05
CasM.21	45	30	3.61E+08	1.6E+06
Cas.M.26	40	0.05	6.02E+05	5.5E+07
CasM.1642	40	1	1.20E+07	
CasM.1640	40	0.05	6.02E+05	
CasM.1714	35	500	6.02E+09	
CasM.1346	50	1	1.20E+07	7.1E+06
CasM.1382	40	5	6.02E+07	
CasM.1434	35	5	6.02E+07	
CasM.1602	35	500	6.02E+09	
CasM.1696	35	500	6.02E+09	
CasM.1698	45	50	6.02E+08	
CasM.1740	50	5	6.02E+07	1.5E+07
CasM.1422	50	5	6.02E+07	
CasM.124070	55	10	1.20E+08	7.7E+06
CasM.295351	60	100	1.20E+09	1.1E+05
CasM.292901	50	500	6.02E+09	
CasM.280852	40	500	6.02E+09	6.3E+05
CasM.294601	50	500	6.02E+09	

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/035031

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A01H 3/00; B01L 3/00; C12N 15/11; C12N 15/74; C12Q 1/6809 (2021.01) CPC - B01L 2200/0605; B01L 2200/0689; B01L 2300/0816; B01L 2300/0883; B01L 2300/1822 (2021.08)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) see Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched see Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) see Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020/028729 A1 (MAMMOTH BIOSCIENCES, INC. et al) 06 February 2020 (06.02.2020) entire document	1, 8-11, 15-25, 33, 53, 56, 59, 60, 65-70, 72, 73, 76, 77, 80
---		---
Y		57, 58, 71, 78, 79, 81, 82
Y	US 2016/0068896 A1 (BEARINGER et al) 10 March 2016 (10.03.2016) entire document	57, 58
Y	WO 2020/037069 A1 (CAMP4 THERAPEUTICS CORPORATION) 20 February 2020 (20.02.2020) entire document	71
Y	US 2020/0132600 A1 (ILYTICA LLC et al) 30 April 2020 (30.04.2020) entire document	78
Y	US 2019/0048415 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN) 14 February 2019 (14.02.2019) entire document	79, 81, 82
A	US 2014/0154786 A1 (PROGRAM FOR APPROPRIATE TECHNOLOGY IN HEALTH) 05 June 2014 (05.06.2014) entire document	1, 8-11, 15-25, 33, 53, 56-60, 65-73, 76-82
A	US 2012/0129714 A1 (SPIZZ et al) 24 May 2012 (24.05.2012) entire document	1, 8-11, 15-25, 33, 53, 56-60, 65-73, 76-82
A	US 2020/0086324 A1 (VISBY MEDICAL, INC.) 19 March 2020 (19.03.2020) entire document	1, 8-11, 15-25, 33, 53, 56-60, 65-73, 76-82
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 October 2021		Date of mailing of the international search report NOV 12 2021
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Harry Kim Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

International application No.
PCT/US2021/035031

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 2020/257356 A2 (MAMMOTH BIOSCIENCES, INC. et al) 24 December 2020 (24.12.2020) entire document	1, 8-11, 15-25, 33, 53, 56-60, 65-73, 76-82

10

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2021/035031

Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)
	1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☐ forming part of the international application as filed: ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file. ☐ on paper or in the form of an image file. b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file. c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)). ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713). 2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished. 3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2021/035031

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 5, 34-38, 83, 84, 116-120, 160, 161, 176
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
See extra sheet(s).

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1, 8-11, 15-25, 33, 53, 56-60, 65-73, 76-82

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2021/035031

Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees need to be paid.

Group I+: claims 1-4, 6-33, 39-82, 85-115, 121-159, 162-175, and 177-187 are drawn to nucleic acid diagnostic devices, kits, and methods thereof.

The first invention of Group I+ is restricted to a device for detecting a target nucleic acid, where the device is selected to be a. a sample interface configured to receive a sample comprising a target nucleic acid; b. a heating region in fluid communication with the sample interface and configured to amplify the sample received via the sample interface; c. a detection region in fluid communication with the heating region; and d. a programmable nuclease probe disposed within the sample interface, the heating region, and/or the detection region; wherein a signal is produced via selective binding between the programmable nuclease probe and the target nucleic acid within the heating region, the sample interface, and/or the detection region; wherein the detection region is configured to detect the signal corresponding to a presence of the target nucleic acid; and wherein the presence or absence of the target nucleic acid is determined within a time of less than 30 minutes after the sample is received at the sample interface, and kits and methods comprising the same. It is believed that claims 1, 8-11, 15-25, 33, 53, 56-60, 65-73, and 76-82 read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they read on the device for detecting a target nucleic acid, where the device is selected to be a. a sample interface configured to receive a sample comprising a target nucleic acid; b. a heating region in fluid communication with the sample interface and configured to amplify the sample received via the sample interface; c. a detection region in fluid communication with the heating region; and d. a programmable nuclease probe disposed within the sample interface, the heating region, and/or the detection region; wherein a signal is produced via selective binding between the programmable nuclease probe and the target nucleic acid within the heating region, the sample interface, and/or the detection region; wherein the detection region is configured to detect the signal corresponding to a presence of the target nucleic acid; and wherein the presence or absence of the target nucleic acid is determined within a time of less than 30 minutes after the sample is received at the sample interface, and kits and methods comprising the same.

Applicant is invited to elect additional devices, kits and methods to be searched in a specific combination by paying additional fee for each set of election. An exemplary election would be a device for detecting a target nucleic acid, where the device is selected to be a. a sample interface configured to receive a sample comprising a target nucleic acid; b. a heating region in fluid communication with the sample interface and configured to amplify the sample received via the sample interface; c. a detection region in fluid communication with the heating region; and d. a programmable nuclease probe disposed within the sample interface, the heating region, and/or the detection region; wherein a signal is produced via selective binding between the programmable nuclease probe and the target nucleic acid within the heating region, the sample interface, and/or the detection region; wherein the detection region is configured to detect the signal corresponding to a presence of the target nucleic acid; and wherein the presence or absence of the target nucleic acid is determined within a time of less than 30 minutes after the sample is received at the sample interface, where the device further comprises a lyophilized reagent mix comprising amplification reagents, wherein the reagent mix is located in a region of the device that is in fluid communication with both the sample interface and the heating region, and kits and methods comprising the same. Additional devices, kits and methods will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that read on any additional elected inventions. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined.

The inventions listed in Groups I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1, because under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The Groups I+ formulas do not share a significant structural element responsible for detecting a target nucleic acid requiring the selection of alternative devices where "further comprising a reagent mix comprising amplification reagents," and "wherein the reagent mix is lyophilized," and "wherein the reagent mix is located in a region of the device that is in fluid communication with both the sample interface and the heating region," and "wherein the reagent mix is located within the sample interface, the heating region, the detection region, and/or a region between the sample interface and the heating region," and "wherein the heating region comprises amplification reagents," and "wherein the sample is amplified via Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)," and "wherein each channel of the heating region comprises one or more movable mechanisms," and "wherein the one or more movable mechanisms comprises i) a first movable mechanism between the sample interface and heating region for controlling transfer of the sample therebetween, and/or ii) a second movable mechanism between the heating region and the detecting region for controlling transfer of the sample therebetween," and "herein at least one channel of the heating region comprises two or more heating compartments configured to separate the sample into two or more sub-samples, wherein the two or more compartments are separated from each other via a movable mechanism of the one or more movable mechanisms."

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features of a device for detecting a target nucleic acid, comprising: a. a sample interface configured to receive a sample comprising a target nucleic acid; b. a heating region in fluid communication with the sample interface and configured to amplify the sample received via the sample interface; c. a detection region in fluid communication with the heating region; and d. a programmable nuclease probe disposed within the sample interface, the heating region, and/or the detection region; wherein a signal is produced via selective binding between the programmable nuclease probe and the target nucleic acid within the heating region, the sample interface, and/or the detection region; wherein the detection region is configured to detect the signal corresponding to a presence of the target nucleic acid; and wherein the presence or absence of the target nucleic acid is determined within a time of less than 30 minutes after the sample is received at the sample interface; a device for detecting a target nucleic acid in a sample, comprising: a. a sample interface for receiving the sample; b. a heating region in fluid communication with the sample interface, the heating region comprising: i. a programmable nuclease comprising a guide nucleic acid, and ii. a reporter, wherein the programmable nuclease is activated by selective binding between the guide nucleic acid and a target nucleic acid, wherein the reporter is configured to release a detection moiety upon cleavage by the activated programmable nuclease; c. a chemical heating element configured to heat to the heating region; d. a detection region in fluid communication with the heating region, wherein the detection region is configured to detect a signal produced by the released detection moiety; e. a first manual actuator configured to transfer the sample from the heating region to the detection region; and f. a reagent mix comprising amplification reagents, wherein the reagent mix is disposed within the sample interface, the heating region, the detection region, and/or between the sample interface and

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2021/035031

the heating region, wherein the device is configured to determine the presence or absence of the target nucleic acid within a time of less than 30 minutes via the produced signal; a microarray device for multiplexed detection of a plurality of target nucleic acids in a sample, comprising: a. a sample interface for receiving the sample; b. a reagent mix comprising amplification reagents; c. a heating region in fluid communication with the sample interface; and d. a detection region comprising a surface comprising a plurality of detection spots in a microarray format, wherein each of the plurality of detection spots comprise a reporter probe, wherein each reporter probe is configured to release a detection moiety via cleavage by an activated programmable nuclease, wherein each of the plurality of detection spots comprise a different programmable nuclease probe, and wherein the device is configured to determine the presence or absence of each of the plurality of target nucleic acids within a time of less than 30 minutes via the release of each detection moiety of each reporter at each of the plurality of detection spots; a kit for the detection of a target nucleic acid in a sample, the kit comprising: a. a swab; b. elution reagents; c. lysis reagents; d. a device comprising i. a sample interface for receiving the sample; ii. a heating region in fluid communication with the sample interface and configured to receive the sample, the heating region comprising a programmable nuclease comprising a guide nucleic acid and a reporter disposed within the heating region, wherein the programmable nuclease is activated by selective binding between the guide nucleic acid and the target nucleic acid, wherein the reporter is configured to release a detection moiety via the activated programmable nuclease; iii. a chemical heating element configured to provide heat to the heating region; iv. a detection region in fluid communication with the heating region and the sample interface, wherein the detection region is configured to detect a signal produced by the released detection moiety, thereby detecting the presence of the target nucleic acid; and v. a reagent mix comprising amplification reagents, wherein the reagent mix is disposed within the sample interface, the heating region, the detection region, and/or between the sample interface and the heating region, and wherein the device is configured to determine the presence or absence of the target nucleic acid within a time of less than 30 minutes via the released detection moiety; a method for the detection of a target nucleic acid in a sample, the method comprising: a. providing a device configured to determine a presence or absence of a target nucleic acid in less than 30 minutes after a sample is introduced into the device, the device comprising a sample interface, a heating region in fluid communication with the sample interface, and a detection region in fluid communication with the heating region; b. introducing the sample into the sample interface of the device; c. mixing the sample with a reagent mix comprising amplification reagents to generate a mixed sample solution; d. transferring the mixed sample solution from the sample interface to the heating region; e. amplifying the sample by heating the mixed sample solution in the heating region; f. performing a programmable nuclease-based assay, wherein selective binding between a guide nucleic acid and the target nucleic acid activates a programmable nuclease probe configured to cleave a reporter probe, thereby releasing a detection moiety into the sample solution when the target nucleic acid is present; g. transferring the mixed sample solution with the amplified sample from the heating region to the detection region; and h. determining the presence or absence of the target nucleic acid in the sample via capture of the released detection moiety in the detection region. However, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art.

Specifically, WO 2020/028729 A1 to Mammoth Biosciences, Inc. et al. discloses a device for detecting a target nucleic acid (a device for measuring a signal ... sample ... measuring the signal from the detection moiety produced by cleavage of the nucleic acid of the reporter, Para. [0003]), comprising: a. a sample interface configured to receive a sample comprising a target nucleic acid (detecting a presence or an absence of a target nucleic acid in a sample, Para. [0016]); (i) the housing may have an upper part which when in place exposes the sample pad to receive the sample, Para. [0383]); b. a heating region in fluid communication with the sample interface and configured to amplify the sample received via the sample interface (integrated heater, for example, a Peltier-type heater, or a thin-film planar heater, Para. [0324]; the amplifying comprises ... loop mediated amplification (LAMP), Para. [0027]); c. a detection region in fluid communication with the heating region (integrated heater, for example, a Peltier-type heater, or a thin-film planar heater, Para. [0324]; [s]amples from the amplification chamber are aspirated into each channel (iv.) and then dispensed and mixed into each DETECTR chamber (v.) by actuating the sliding valve and pipette pump, Para. [0359]); and d. a programmable nuclease probe disposed within the sample interface, the heating region, and/or the detection region (a second chamber, fluidically connected by a first pneumatic valve to the first chamber, wherein the second chamber comprises a programmable nuclease, Para. [0003]; second chamber is optically connected to a spectrophotometric measurement device or a fluorescence measurement device, Para. [0010]); wherein a signal is produced via selective binding between the programmable nuclease probe and the target nucleic acid within the heating region, the sample interface, and/or the detection region ((i) the conjugate binding molecule binds selectively to the detection moiety cleaved from the detector nucleic acid, Para. [0375]; a programmable nuclease; and ii) an immobilized reporter comprising a nucleic acid, an affinity molecule, and a detection moiety, Para. [0012]; The programmable nuclease can become activated after binding of a guide nucleic acid with a target nucleic acid, in which the activated programmable nuclease can cleave the target nucleic acid and can have trans cleavage activity, Para. [0252]; sample and pre-complexed programmable nuclease mix ... thin-film planar heater, Para. [0333]); wherein the detection region is configured to detect the signal corresponding to a presence of the target nucleic acid (detection region and after a predetermined amount of time after applying the reacted sample, a positive control marker can be visualized in the detection region. If the sample is positive for the target nucleic acid, a test marker for the detectable signal can also be visualized, Para. [0227]); and wherein the presence or absence of the target nucleic acid is determined within a time of less than 30 minutes after the sample is received at the sample interface (the first detectable signal can be detectable within from 15 minutes, Para. [0296]; determine the presence or absence of the target nucleic acid, Para. [0304]); a device for detecting a target nucleic acid in a sample (a device for measuring a signal ... sample ... measuring the signal from the detection moiety produced by cleavage of the nucleic acid of the reporter, Para. [0003]), comprising: a. a sample interface for receiving the sample (detecting a presence or an absence of a target nucleic acid in a sample, Para. [0016]); (i) the housing may have an upper part which when in place exposes the sample pad to receive the sample, Para. [0383]); b. a heating region in fluid communication with the sample interface (integrated heater, for example, a Peltier-type heater, or a thin-film planar heater, Para. [0324]; the amplifying comprises ... loop mediated amplification (LAMP), Para. [0027]; where the regions are in fluid communication with its adjacent regions, Para. [0367]); the heating region comprising: i. a programmable nuclease comprising a guide nucleic acid, and ii. a reporter (chambers comprising a programmable nuclease, a guide nucleic acid, and a reporter, Para. [0011]); wherein the programmable nuclease is activated by selective binding between the guide nucleic acid and a target nucleic acid ((i) the programmable nuclease can be a CRISPR-Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats - CRISPR associated) nucleoprotein complex with trans cleavage activity, which can be activated by binding of a guide nucleic acid with a target nucleic acid, Para. [0219]), wherein the reporter is configured to release a detection moiety upon cleavage by the activated programmable nuclease ([o]nce the detector nucleic acid is cleaved by the activated programmable nuclease, the detection moiety can be released or separated from the reporter and generates a detectable signal that is immobilized on a support medium, Para. [0219]); d. a detection region in fluid communication with the heating region (integrated heater, for example, a Peltier-type heater, or a thin-film planar heater, Para. [0324]; [s]amples from the amplification chamber are aspirated into each channel (iv.) and then dispensed and mixed into each DETECTR chamber (v.) by actuating the sliding valve and pipette pump, Para. [0359]), wherein the detection region is configured to detect a signal produced by the released detection moiety (detection region and after a predetermined amount of time after applying the reacted sample, a positive control marker can be visualized in the detection region. If the sample is positive for the target nucleic acid, a test marker for the detectable signal can also be visualized, Para. [0227]); e. a first manual actuator configured to transfer the sample from the heating region to the detection region ((i) the sample pad region can transfer the reacted reagents and sample into

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/035031

the other zones of the support medium. Transfer of the reacted reagents and sample may be by capillary action, diffusion, convection or active transport aided by a pump, Para. [0368]; the incubation chamber comprises a thin-film planar heater ...wherein the incubation and detection chambers are separate, Para. [0470]; and f. a reagent mix comprising amplification reagents (amplification reaction mix, Para. [0174]), wherein the reagent mix is disposed within the sample interface, the heating region, the detection region, and/or between the sample interface and the heating region (sample is aspirated from the "amplification reaction mix". In the right middle diagram, the valve is rotated clockwise to the "DETECT" position, Para. [0691]), wherein the device is configured to determine the presence or absence of the target nucleic acid within a time of less than 30 minutes via the produced signal (the first detectable signal can be detectable within from 15 minutes, Para. [0296]; determine the presence or absence of the target nucleic acid, Para. [0304]); a. a sample interface for receiving the sample (detecting a presence or an absence of a target nucleic acid in a sample, Para. [0016]; [i]the housing may have an upper part which when in place exposes the sample pad to receive the sample, Para. [0383]); b. a reagent mix comprising amplification reagents (amplification reaction mix, Para. [0174]); c. a heating region in fluid communication with the sample interface region (integrated heater, for example, a Peltier-type heater, or a thin-film planar heater, Para. [0324]; [s]amples from the amplification chamber are aspirated into each channel (iv.) and then dispensed and mixed into each DETECT chamber (v.) by actuating the sliding valve and pipette pump, Para. [0359]); and d. a detection region comprising a surface comprising a plurality of detection spots in a microarray format (signals from multiplexing can be quantified. For example, a method of quantification for a disease panel comprises assaying for a plurality of unique target nucleic acids in a plurality of aliquots from a sample, assaying for a control nucleic acid control in a second aliquot of the sample, and quantifying a plurality of signals of the plurality of unique target nucleic acids by measuring signals produced by cleavage of detector nucleic acids compared to the signal produced in the second aliquot, Para. [0290]), wherein each of the plurality of detection spots comprise a reporter probe, wherein each reporter probe is configured to release a detection moiety via cleavage by an activated programmable nuclease, wherein each of the plurality of detection spots comprise a different programmable nuclease probe ([i] the conjugate binding molecule binds selectively to the detection moiety cleaved from the detector nucleic acid, Para. [0375]; a programmable nuclease; and ii) an immobilized reporter comprising a nucleic acid, an affinity molecule, and a detection moiety, Para. [0012]; The programmable nuclease can become activated after binding of a guide nucleic acid with a target nucleic acid, in which the activated programmable nuclease can cleave the target nucleic acid and can have trans cleavage activity, Para. [0252]; sample and pre-complexed programmable nuclease mix ... thin-film planar heater, Para. [0333]), and wherein the device is configured to determine the presence or absence of each of the plurality of target nucleic acids within a time of less than 30 minutes via the release of each detection moiety of each reporter at each of the plurality of detection spots (the first detectable signal can be detectable within from 15 minutes, Para. [0296]; determine the presence or absence of the target nucleic acid, Para. [0304]; [o]nce the detector nucleic acid is cleaved by the activated programmable nuclease, the detection moiety can be released or separated from the reporter and generates a detectable signal that is immobilized on a support medium, Para. [0219]); a kit for the detection of a target nucleic acid in a sample (a kit for detecting a target nucleic acid, Para. [0392]; biological sample of interest, Para. [0393]), the kit comprising: a. a swab (a sample collection device (e.g. swab), Para. [0596]); b. elution reagents (buffers are compatible with the other reagents, samples, and support mediums as described herein for detection, Para. [0281]; rude sample preparation protocol includes elution of a sample from a sample collection device (e.g. swab) into a buffer that will induce dissociation of the sample into its macromolecule components, Para. [0596]); c. lysis reagents (chemical lysis buffers, Para. [0324]); d. a device (a device for measuring a signal ...sample ...measuring the signal from the detection moiety produced by cleavage of the nucleic acid of the reporter, Para. [0003]) comprising: i. a sample interface for receiving the sample (detecting a presence or an absence of a target nucleic acid in a sample, Para. [0016]; [i]the housing may have an upper part which when in place exposes the sample pad to receive the sample, Para. [0383]); ii. a heating region in fluidic communication with the sample interface and configured to receive the sample (integrated heater, for example, a Peltier-type heater, or a thin-film planar heater, Para. [0324]; the amplifying comprises ... loop mediated amplification (LAMP), Para. [0027]), the heating region comprising a programmable nuclease comprising a guide nucleic acid and a reporter disposed within the heating region (a second chamber, fluidically connected by a first pneumatic valve to the first chamber, wherein the second chamber comprises a programmable nuclease, Para. [0003]; second chamber is optically connected to a spectrophotometric measurement device or a fluorescence measurement device, Para. [0010]), wherein the programmable nuclease is activated by selective binding between the guide nucleic acid and the target nucleic acid ([i]the programmable nuclease can be a CRISPR-Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats - CRISPR associated) nucleoprotein complex with trans cleavage activity, which can be activated by binding of a guide nucleic acid with a target nucleic acid, Para. [0219]); wherein the reporter is configured to release a detection moiety via the activated programmable nuclease ([o]nce the detector nucleic acid is cleaved by the activated programmable nuclease, the detection moiety can be released or separated from the reporter and generates a detectable signal that is immobilized on a support medium, Para. [0219]); iv. a detection region in fluid communication with the heating region and the sample interface, wherein the detection region is configured to detect a signal produced by the released detection moiety, thereby detecting the presence of the target nucleic acid (signals from multiplexing can be quantified. For example, a method of quantification for a disease panel comprises assaying for a plurality of unique target nucleic acids in a plurality of aliquots from a sample, assaying for a control nucleic acid control in a second aliquot of the sample, and quantifying a plurality of signals of the plurality of unique target nucleic acids by measuring signals produced by cleavage of detector nucleic acids compared to the signal produced in the second aliquot, Para. [0290]); and v. a reagent mix comprising amplification reagents (amplification reaction mix, Para. [0174]), wherein the reagent mix is disposed within the sample interface, the heating region, the detection region, and/or between the sample interface and the heating region (integrated heater, for example, a Peltier-type heater, or a thin-film planar heater, Para. [0324]; [s]amples from the amplification chamber are aspirated into each channel (iv.) and then dispensed and mixed into each DETECT chamber (v.) by actuating the sliding valve and pipette pump, Para. [0359]), and wherein the device is configured to determine the presence or absence of the target nucleic acid within a time of less than 30 minutes via the released detection moiety (the first detectable signal can be detectable within from 15 minutes, Para. [0296]; determine the presence or absence of the target nucleic acid, Para. [0304]); a method for the detection of a target nucleic acid in a sample (a method for detecting a target nucleic acid, Para. [0251]), the method comprising: a. providing a device configured to determine a presence or absence of a target nucleic acid in less than 30 minutes after a sample is introduced into the device (the first detectable signal can be detectable within from 15 minutes, Para. [0296]; determine the presence or absence of the target nucleic acid, Para. [0304]; a device for measuring a signal ...sample ... measuring the signal from the detection moiety produced by cleavage of the nucleic acid of the reporter, Para. [0003]), the device comprising a sample interface (detecting a presence or an absence of a target nucleic acid in a sample, Para. [0016]; [i]the housing may have an upper part which when in place exposes the sample pad to receive the sample, Para. [0383]), a heating region in fluid communication with the sample interface, and a detection region in fluid communication with the heating region (integrated heater, for example, a Peltier-type heater, or a thin-film planar heater, Para. [0324]; the amplifying comprises ... loop mediated amplification (LAMP), Para. [0027]); b. introducing the sample into the sample interface of the device (A sample is depicted entering through P1, which is connected vertically below to V1. V1 is adjacent to V2, which is connected vertically above to P2 through which pre-complexed programmable nuclease mix is introduced, Para. [0431]); c. mixing the sample with a reagent mix comprising amplification reagents to generate a mixed sample solution (valve is rotated clockwise to the "amplification reaction mix" position and the 1 microliter of sample is dispensed and mixed, Para. [0175]); d. transferring the mixed sample solution from the sample interface to the heating region ([i]the sample pad region can transfer the reacted reagents and sample into the other zones of the support medium. Transfer of the reacted

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/035031

reagents and sample may be by capillary action, diffusion, convection or active transport aided by a pump, Para. [0368]; the incubation chamber comprises a thin-film planar heater ...wherein the incubation and detection chambers are separate, Para. [0470]; e. amplifying the sample by heating the mixed sample solution in the heating region (wherein the amplifying comprises isothermal amplification, Para. [0026]; valve is rotated clockwise to the "amplification reaction mix" position and the 1 microliter of sample is dispensed and mixed, Para. [0175]); f. performing a programmable nuclease-based assay, wherein selective binding between a guide nucleic acid and the target nucleic acid activates a programmable nuclease probe configured to cleave a reporter probe, thereby releasing a detection moiety into the sample solution when the target nucleic acid is present ([t]he conjugate binding molecule binds selectively to the detection moiety cleaved from the detector nucleic acid, Para. [0375]; a programmable nuclease; and ii) an immobilized reporter comprising a nucleic acid, an affinity molecule, and a detection moiety, Para. [0012]; The programmable nuclease can become activated after binding of a guide nucleic acid with a target nucleic acid, in which the activated programmable nuclease can cleave the target nucleic acid and can have trans cleavage activity, Para. [0252]; sample and pre-complexed programmable nuclease mix ... thin-film planar heater, Para. [0333]; o)nce the detector nucleic acid is cleaved by the activated programmable nuclease, the detection moiety can be released or separated from the reporter and generates a detectable signal that is immobilized on a support medium, Para. [0219]; g. transferring the mixed sample solution with the amplified sample from the heating region to the detection region ([t]he sample pad region can transfer the reacted reagents and sample into the other zones of the support medium. Transfer of the reacted reagents and sample may be by capillary action, diffusion, convection or active transport aided by a pump, Para. [0368]; the incubation chamber comprises a thin-film planar heater ...wherein the incubation and detection chambers are separate, Para. [0470]; and h. determining the presence or absence of the target nucleic acid in the sample via capture of the released detection moiety in the detection region (sample can be tested to detect the presence or absence of at least one target nucleic acid, Para. [0227]; the first detection signal is generated by binding of the detection moiety to the capture molecule in the detection region, where the first detection signal indicates that the sample contained the target nucleic acid. Sometimes the system is capable of detecting more than one type of target nucleic acid, wherein the system comprises more than one type of guide nucleic acid and more than one type of detector nucleic acid, Para. [0280]).

Further, US 2014/0154786 A1 to Program For Appropriate Technology In Health teaches c. a chemical heating element configured to heat to the heating region (An exemplary chemical heating element comprises a mixture of iron, water, cellulose, vermiculite, activated carbon and salt. When the iron in the heating element is exposed to oxygen in the air, it oxidizes, Para. [0047]).

Further, US 2012/0129714 A1 to Spizz et al. teaches a microarray device ([t]he microarray, Para. [0067]) for multiplexed detection of a plurality of target nucleic acids in a sample (quantitation with multiplexed detection of one or more targets, Para. [0016]; detecting in a sample at least one of a plurality of target nucleic acid molecules, Para. [0019]).

The inventions listed in Groups I+ therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical features.

フロントページの続き

(51)国際特許分類 **G 0 1 N 33/53 (2006.01)** **F I G O 1 N 33/53 M** テーマコード (参考)

(32)優先日 令和3年2月19日(2021.2.19)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 63/166,538

(32)優先日 令和3年3月26日(2021.3.26)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 63/181,130

(32)優先日 令和3年4月28日(2021.4.28)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T R I T O N

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100188433

弁理士 梅村 幸輔

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100214396

弁理士 塩田 真紀

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 チン ジーザス

アメリカ合衆国 9 4 0 0 5 カリフォルニア州 ブリスベン マリーナ ブールバード 1 0 0 0 ス
イト 6 0 0

(72)発明者 プロートン ジェームズ ポール

アメリカ合衆国 9 4 0 0 5 カリフォルニア州 ブリスベン マリーナ ブールバード 1 0 0 0 ス
イト 6 0 0

(72)発明者 ツァログル マリアーネフェリ

アメリカ合衆国 9 4 0 0 5 カリフォルニア州 ブリスベン マリーナ ブールバード 1 0 0 0 ス

	イート 600
(72)発明者	リー フィリップ ユー ファイ
	アメリカ合衆国 94005 カリフォルニア州 ブリスベン マリーナ ブールバード 1000 ス
	イート 600
(72)発明者	パトノ ティモシー ジェームズ
	アメリカ合衆国 94005 カリフォルニア州 ブリスベン マリーナ ブールバード 1000 ス
	イート 600
(72)発明者	チェン ジャニス シャー
	アメリカ合衆国 94005 カリフォルニア州 ブリスベン マリーナ ブールバード 1000 ス
	イート 600
(72)発明者	シャピロ サラ ジェーン
	アメリカ合衆国 94005 カリフォルニア州 ブリスベン マリーナ ブールバード 1000 ス
	イート 600
(72)発明者	コルドバ ジェームズ レイモンド
	アメリカ合衆国 94005 カリフォルニア州 ブリスベン マリーナ ブールバード 1000 ス
	イート 600
(72)発明者	イーストマン ブライアン ジェイ.
	アメリカ合衆国 94005 カリフォルニア州 ブリスベン マリーナ ブールバード 1000 ス
	イート 600
(72)発明者	ローミラー ドナルド アラン
	アメリカ合衆国 94005 カリフォルニア州 ブリスベン マリーナ ブールバード 1000 ス
	イート 600
(72)発明者	ファッシング クレア ルーズ
	アメリカ合衆国 94005 カリフォルニア州 ブリスベン マリーナ ブールバード 1000 ス
	イート 600
(72)発明者	ヘンドリクス カーリー ジェレンター
	アメリカ合衆国 94005 カリフォルニア州 ブリスベン マリーナ ブールバード 1000 ス
	イート 600
(72)発明者	クレインドラー リオル
	アメリカ合衆国 94005 カリフォルニア州 ブリスベン マリーナ ブールバード 1000 ス
	イート 600
(72)発明者	ドルザル ダニエル トーマス
	アメリカ合衆国 94005 カリフォルニア州 ブリスベン マリーナ ブールバード 1000 ス
	イート 600
(72)発明者	スプラット デビン
	アメリカ合衆国 94005 カリフォルニア州 ブリスベン マリーナ ブールバード 1000 ス
	イート 600
(72)発明者	レシンスキー ジェーコブ
	アメリカ合衆国 94005 カリフォルニア州 ブリスベン マリーナ ブールバード 1000 ス
	イート 600
(72)発明者	ベイク ジョシュア
	アメリカ合衆国 94005 カリフォルニア州 ブリスベン マリーナ ブールバード 1000 ス
	イート 600
(72)発明者	デラネイ レイチェル ヌーハ
	アメリカ合衆国 94005 カリフォルニア州 ブリスベン マリーナ ブールバード 1000 ス
	イート 600
(72)発明者	ジェイン ソナル
	アメリカ合衆国 94005 カリフォルニア州 ブリスベン マリーナ ブールバード 1000 ス
	イート 600
(72)発明者	ハベル ソフィア

アメリカ合衆国 94005 カリフォルニア州 ブリスベン マリーナ ブールバード 1000 ス
イト 600

(72)発明者 ヴェロスロフ マシュー

アメリカ合衆国 94005 カリフォルニア州 ブリスベン マリーナ ブールバード 1000 ス
イト 600

F ターム (参考) 2G058 BB02 BB09 BB23 CC08 EB01 GA01
4B029 AA07 BB01 BB02 BB06 BB11 BB13 BB20 CC01 HA05
4B063 QA01 QA13 QA18 QA19 QQ05 QQ06 QQ07 QQ08 QQ10 QQ28
QQ34 QQ42 QQ52 QR08 QR14 QR32 QR35 QR75 QR76 QR77 QS24
QS36 QX01

【要約の続き】

