

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7085999号

(P7085999)

(45)発行日 令和4年6月17日(2022.6.17)

(24)登録日 令和4年6月9日(2022.6.9)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/10 (2006.01)

C 1 2 N 15/10 2 3 0 Z

C 1 2 P 19/34 (2006.01)

C 1 2 P 19/34 A Z N A

C 1 2 Q 1/6853(2018.01)

C 1 2 Q 1/6853 Z

C 1 2 Q 1/6851(2018.01)

C 1 2 Q 1/6851 Z

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10

請求項の数 24 (全94頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-543210(P2018-543210)

(86)(22)出願日 平成29年2月16日(2017.2.16)

(65)公表番号 特表2019-506872(P2019-506872 A)

(43)公表日 平成31年3月14日(2019.3.14)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/018086

(87)国際公開番号 WO2017/143006

(87)国際公開日 平成29年8月24日(2017.8.24)

審査請求日 令和2年2月13日(2020.2.13)

(31)優先権主張番号 62/299,206

(32)優先日 平成28年2月24日(2016.2.24)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/429,149

(32)優先日 平成28年12月2日(2016.12.2)

最終頁に続く

(73)特許権者 507044516

プレジデント アンド フェローズ オブ

ハーバード カレッジ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2

1 3 8 , ケンブリッジ , クインシー

ストリート 1 7

(74)代理人 100079108

弁理士 稲葉 良幸

(74)代理人 100109346

弁理士 大貫 敏史

(74)代理人 100117189

弁理士 江口 昭彦

(74)代理人 100134120

弁理士 内藤 和彦

(72)発明者 キシ, ジョスリン, ヨシコ

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 分子プログラミングツール

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

プライマー交換反応方法であって、

(a) 第 1 触媒ヘアピン分子であって、(i) 不對 3 ' トーホールドドメイン、(i i) 前記第 1 触媒ヘアピン分子の 3 ' サブドメインと前記第 1 触媒ヘアピン分子の 5 ' サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメインであって、重合を終結させる分子又は修飾を含む対ステムドメイン、及び(i i i) 結合ドメインを含む第 1 触媒ヘアピン分子、

(b) 第 2 触媒ヘアピン分子であって、(i) 不對 3 ' トーホールドドメイン、(i i) 前記第 2 触媒ヘアピン分子の 3 ' サブドメインと前記第 2 触媒ヘアピン分子の 5 ' サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメインであって、重合を終結させる分子又は修飾を含む対ステムドメイン、及び(i i i) ループドメインを含み、前記第 2 触媒ヘアピン分子の不對 3 ' トーホールドドメインが、前記第 1 触媒ヘアピン分子の 5 ' サブドメインと相補的である、第 2 触媒ヘアピン分子、

(c) 前記第 1 触媒ヘアピン分子の不對 3 ' トーホールドドメインと相補的なプライマー、

(d) 鎖置換活性を有するポリメラーゼ、並びに

(e) デオキシリボヌクレオチド三リン酸(d N T P)

を反応バッファー中で合わせることより、反応混合物を形成した後；

一本鎖核酸を生成するのに十分な時間にわたって、核酸重合、鎖置換及びアニーリングをもちたす条件下で前記反応混合物をインキュベートすること

を含む、方法。

【請求項 2】

第 1 触媒ヘアピン分子の結合ドメインがループドメイン又は安定した対ドメインである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

安定した対ドメインが少なくとも 10 ヌクレオチドの長さを有する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記第 2 触媒ヘアピン分子の不对 3' トーホールドドメイン内に位置するヌクレオチドと相補的である第 2 プライマーを更に含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 5】

(f) 第 3 触媒ヘアピン分子であって、(i) 不对 3' トーホールドドメイン、(ii) 前記第 3 触媒ヘアピン分子の 3' サブドメインと前記第 3 触媒ヘアピン分子の 5' サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメインであって、重合を終結させる分子又は修飾を含む対ステムドメイン、及び (iii) ループドメインを含み、前記第 3 触媒ヘアピン分子の不对 3' トーホールドドメインが、前記第 2 触媒ヘアピン分子の 5' サブドメインと相補的である、第 3 触媒ヘアピン分子を更に含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記第 3 触媒ヘアピン分子の不对 3' トーホールドドメイン内に位置するヌクレオチドとヌクレオチドを含む第 3 プライマーを更に含む、請求項 5 に記載の方法。

20

【請求項 7】

複数の触媒ヘアピン分子をさらに含み、前記複数のうちの各触媒ヘアピン分子が、(i) 不对 3' トーホールドドメイン、(ii) 前記複数のうちの 1 つの触媒ヘアピン分子の 3' サブドメインと、前記複数のうちの 1 つの触媒ヘアピン分子の 5' サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメインであって、重合を終結させる分子又は修飾を含む対ステムドメイン、及び (iii) ループドメインを含み、ここで、前記複数のうちの各触媒ヘアピン分子の不对 3' トーホールドドメインが、前記複数のうちの 1 つの他の触媒ヘアピン分子の 5' サブドメインと相補的である、請求項 5 又は 6 に記載の方法。

【請求項 8】

複数のプライマーをさらに含み、各プライマーは、前記複数のうちの 1 つの触媒ヘアピン分子の不对 3' トーホールドドメインと相補的である、請求項 7 に記載の方法。

30

【請求項 9】

一本鎖核酸を生成する方法であって、

(a) 第 1 触媒ヘアピン分子であって、(i) 不对 3' トーホールドドメイン、(ii) 前記第 1 触媒ヘアピン分子の 3' サブドメインと前記第 1 触媒ヘアピン分子の 5' サブドメイン同士の分子間ヌクレオチド塩基対により形成される、対ステムドメインであって、重合を終結させる分子又は修飾を含む対ステムドメイン、及び (iii) ループドメインを含む第 1 触媒ヘアピン分子、

(b) 複数の異なる触媒ヘアピン分子であって、前記複数のうちの各触媒ヘアピン分子が、(i) 不对 3' トーホールドドメイン、(ii) 前記複数のうちの 1 つの触媒ヘアピン分子の 3' サブドメインと前記複数のうちの 1 つの触媒ヘアピン分子の 5' サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメインであって、重合を終結させる分子又は修飾を含む対ステムドメイン、及び (iii) ループドメインを含み、前記複数のうちの各触媒ヘアピン分子の前記不对 3' トーホールドドメインが、前記複数のうちの 1 つの他の触媒ヘアピン分子の 5' サブドメインと相補的である、複数の異なる触媒ヘアピン分子、

40

(c) 前記第 1 触媒ヘアピン分子の不对 3' トーホールドドメインと相補的な第 1 プライマー、

(d) 鎖置換活性を有するポリメラーゼ、並びに

50

(e) デオキシリボヌクレオチド三リン酸 (d N T P)

を反応バッファー中で合わせることにより、反応混合物を形成した後；

前記第 1 プライマーよりも長い一本鎖核酸を生成するのに十分な時間にわたって、核酸重合、鎖置換及びアニーリングをもたらす条件下で前記反応混合物をインキュベートすることを含む方法。

【請求項 1 0】

ポリメラーゼが、p h i 2 9 DNAポリメラーゼ、B s t DNAポリメラーゼ又はB s u DNAポリメラーゼである、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 1】

生成された一本鎖核酸が、自己相補性のドメインを含み、そして前記方法が、核酸ステープル鎖の存在下で、一本鎖核酸及び核酸ステープル鎖のドメイン同士のヌクレオチド塩基対によって、一本鎖核酸の折り畳みが達成される条件下で、前記反応混合物をインキュベートすることをさらに含む、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 1 2】

前記方法が、核酸ステープル鎖の存在下で、前記一本鎖核酸及び前記核酸ステープル鎖のドメイン同士のヌクレオチド塩基対によって前記一本鎖核酸の折り畳みが達成される条件下で、前記反応混合物をインキュベートすることをさらに含む、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3】

鎖置換反応により一本鎖核酸を生成するためのキットであって、

20

(a) 第 1 触媒ヘアピン分子であって、(i) 不對 3 ' トーホールドドメイン、(i i) 前記第 1 触媒ヘアピン分子の 3 ' サブドメインと前記第 1 触媒ヘアピン分子の 5 ' サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメインであって、重合を終結させる分子又は修飾を含む対ステムドメイン、及び(i i i) 結合ドメインを含む第 1 触媒ヘアピン分子；

(b) 第 2 触媒ヘアピン分子であって、(i) 不對 3 ' トーホールドドメイン、(i i) 前記第 2 触媒ヘアピン分子の 3 ' サブドメインと前記第 2 触媒ヘアピン分子の 5 ' サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメインであって、重合を終結させる分子又は修飾を含む対ステムドメイン、及び(i i i) ループドメインを含み、前記第 2 触媒ヘアピン分子の不對 3 ' トーホールドドメインが、前記第 1 触媒ヘアピン分子の 5 ' サブドメインと相補的である、第 2 触媒ヘアピン分子；

30

(c) 第 1 触媒ヘアピン分子の不對 3 ' トーホールドドメインと相補的であるプライマー；

(d) 鎖置換活性を有するポリメラーゼ；並びに

(e) デオキシリボヌクレオチド三リン酸 (d N T P)、

を含む、キット。

【請求項 1 4】

(a) の前記結合ドメインが、ループドメインである、請求項 1 3 に記載のキット。

【請求項 1 5】

前記第 2 触媒ヘアピン分子の不對 3 ' トーホールドドメイン内に位置するヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを含む第 2 プライマーをさらに含む、請求項 1 3 又は 1 4 に記載のキット。

40

【請求項 1 6】

(e) 第 3 触媒ヘアピン分子であって、(i) 不對 3 ' トーホールドドメイン、(i i) 前記第 3 触媒ヘアピン分子の 3 ' サブドメイン、前記第 3 触媒ヘアピン分子の 5 ' サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメインであって、重合を終結させる分子又は修飾を含む対ステムドメイン、及び(i i i) ループドメインをさらに含み、前記第 3 触媒ヘアピン分子の不對 3 ' トーホールドドメインは、前記第 3 触媒ヘアピン分子の 5 ' サブドメインと相補的である、請求項 1 5 に記載のキット。

【請求項 1 7】

前記第 3 触媒ヘアピン分子の不對 3 ' トーホールドドメインと相補的な第 3 プライマーをさ

50

らに含む、請求項 1 6 に記載のキット。

【請求項 1 8】

複数の触媒ヘアピン分子をさらに含み、前記複数のうちの各触媒ヘアピン分子は、(i) 不對 3 ' トーホールドドメイン、(i i) 前記複数のうち 1 つの触媒ヘアピン分子の 3 ' サブドメインと、前記複数のうち 1 つの触媒ヘアピン分子の 5 ' サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメインであって、重合を終結させる分子又は修飾を含む対ステムドメイン、及び(i i i) ループドメインを含み、ここで、前記複数のうちの各触媒ヘアピン分子の前記不對 3 ' トーホールドドメインが、前記複数のうち 1 つの他の触媒ヘアピン分子の 5 ' サブドメインと相補的である、請求項 6 に記載のキット。

10

【請求項 1 9】

複数のプライマーをさらに含み、各プライマーは、前記複数のうち 1 つの触媒ヘアピン分子の不對 3 ' トーホールドドメインと相補的である、請求項 8 に記載のキット。

【請求項 2 0】

前記プライマーが、検出可能な分子と連結される、請求項 1 3 ~ 1 9 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 2 1】

請求項 1 3 ~ 2 0 のいずれか一項に記載のキットを含む細胞。

【請求項 2 2】

標的分子を検出する方法であって、

20

標的分子、鎖置換ポリメラーゼ、及びデオキシリボヌクレオチド三リン酸 (d N T P) を含有する反応バッファー中で、

(a) 触媒ヘアピン分子であって、(i) 不對 3 ' トーホールドドメイン、(i i) 前記触媒ヘアピン分子の 3 ' サブドメインと前記触媒ヘアピン分子の 5 ' サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメインであって、重合を終結させる分子又は修飾を含む対ステムドメイン、及び(i i i) 結合ドメインを含み、(a) (i) 及び(a) (i i) の前記ドメインが、タンDEM反復配列を形成する、触媒ヘアピン分子；
(b) 少なくとも 1 つの他の触媒ヘアピン分子であって、(i) 不對 3 ' トーホールドドメイン、(i i) 前記少なくとも 1 つの他の触媒ヘアピン分子の 3 ' サブドメインと前記少なくとも 1 つの他の触媒ヘアピン分子の 5 ' サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメインであって、重合を終結させる分子又は修飾を含む対ステムドメイン、及び(i i i) 結合ドメインを含み、(b) (i) 及び(b) (i i) の前記ドメインは、シグナル配列により分断されるタンDEM反復配列を形成し、(b) (i) の前記不對 3 ' トーホールドドメインは、前記標的分子と結合することができるプロテクター鎖と可逆的に結合している、少なくとも 1 つの他の触媒ヘアピン分子、並びに

30

(c) (a) の前記触媒ヘアピン分子の不對 3 ' トーホールドドメインと相補的で、且つ(b) の前記少なくとも 1 つの他の触媒ヘアピン分子の不對 3 ' トーホールドドメインと相補的であるドメインを含む核酸プライマー

を合わせることにより、反応混合物を形成し；

前記核酸プライマーよりも長く、且つ前記シグナル配列の少なくとも 1 つを含む一本鎖核酸を生成するのに十分な時間にわたって、核酸重合、鎖置換及びアニーリングを達成する条件下で、前記反応混合物をインキュベートすることを含む方法。

40

【請求項 2 3】

分子事象間の時間を計測する方法であって、

(a) 第 1 触媒ヘアピン分子であって、(i) 不對 3 ' トーホールドドメイン、(i i) 前記第 1 触媒ヘアピン分子の 3 ' サブドメインと前記第 1 触媒ヘアピン分子の 5 ' サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメインであって、重合を終結させる分子又は修飾を含む対ステムドメイン、及び(i i i) ループドメインを含む第 1 触媒ヘアピン分子、

(b) 複数の異なる触媒ヘアピン分子であって、前記複数のうちの各触媒ヘアピン分子が

50

、(i) 不対 3' トーホールドドメイン、(i i) 前記複数のうちの触媒ヘアピン分子の 3' サブドメインと触媒ヘアピン分子の 5' サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメインであって、重合を終結させる分子又は修飾を含む対ステムドメイン、及び(i i i) ループドメインを含み、各触媒ヘアピン分子の前記不対 3' トーホールドドメインが、前記複数のうち 1 つの他の触媒ヘアピン分子の前記 5' サブドメインと相補的である、複数の異なる触媒ヘアピン分子、

(c) 前記第 1 触媒ヘアピン分子の不対 3' トーホールドドメインと相補的第 1 プライマー、

(d) 鎖置換活性を有するポリメラーゼ、並びに

(e) デオキシリボヌクレオチド三リン酸(d N T P) を反応バッファー中で合わせるこ
とにより、反応混合物を形成し；

10

第 1 分子事象に前記反応混合物を曝露し；

一本鎖核酸を生成するのに十分な時間にわたって、核酸重合、鎖置換及びアニーリングを達成する条件下で前記反応混合物をインキュベートした後；

第 2 分子事象に前記反応混合物を曝露し、

生成される前記一本鎖核酸の長さに基づいて、前記第 1 分子事象と前記第 2 分子事象との間の時間間隔を決定することを含む方法。

【請求項 2 4】

標的生体分子間の距離を記録する方法であって、

(a) 第 1 触媒ヘアピン分子であって、(i) 不対 3' トーホールドドメイン、(i i) 前記第 1 触媒ヘアピン分子の 3' サブドメインと前記第 1 触媒ヘアピン分子の 5' サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメインであって、重合を終結させる分子又は修飾を含む対ステムドメイン、及び(i i i) ループドメインを含み、前記第 1 触媒ヘアピン分子の不対 3' トーホールドドメインは、第 1 の標的生体分子と連結している、第 1 触媒ヘアピン分子；

20

(b) 第 2 触媒ヘアピン分子であって、(i) 不対 3' トーホールドドメイン、(i i) 前記第 2 触媒ヘアピン分子の 3' サブドメインと前記第 2 触媒ヘアピン分子の 5' サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメインであって、重合を終結させる分子又は修飾を含む対ステムドメイン、及び(i i i) ループドメインを含み、前記第 2 触媒ヘアピン分子の不対 3' トーホールドドメインが、第 2 の標的生体分子と連結しており、前記第 1 触媒ヘアピン分子の 5' サブドメインが、前記第 1 触媒ヘアピン分子の 5' サブドメインと相補的である、第 2 触媒ヘアピン分子；

30

(c) 一方が、前記第 1 触媒ヘアピン分子の不対 3' トーホールドドメインと相補的であり、他方が、前記第 2 触媒ヘアピン分子の不対 3' トーホールドドメインと相補的である、2 つのプライマー；

(d) 複数の触媒ヘアピン分子であって、前記複数のうちの各触媒ヘアピン分子が、(i) 不対 3' トーホールドドメイン、(i i) 前記触媒ヘアピン分子の 3' サブドメインと前記触媒ヘアピン分子の 5' サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメインであって、重合を終結させる分子又は修飾を含む対ステムドメイン、及び(i i i) ループドメインを含み、前記複数の触媒ヘアピン分子各々の 5' サブドメインが、前記複数のうち 1 つの他の触媒ヘアピン分子の 5' サブドメインと相補的であり、前記複数の触媒ヘアピン分子の 1 つの不対 3' トーホールドドメインが、前記第 1 触媒ヘアピン分子の 5' サブドメインと相補的であり、前記複数のうち別の触媒ヘアピン分子の不対 3' トーホールドドメインは、前記第 2 触媒ヘアピン分子の 5' サブドメインと相補的である、複数の触媒ヘアピン分子；

40

(e) 鎖置換活性を有するポリメラーゼ；並びに

(f) デオキシリボヌクレオチド三リン酸(d N T P) ；

を反応バッファー中で合わせることにより、反応混合物を形成した後；

二本鎖核酸を生成するのに十分な時間にわたって、核酸重合、鎖置換及びアニーリングを達成する条件下で前記反応混合物をインキュベートすることを含む方法。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本願は、2016年2月17日に出願された米国仮特許出願第62/296,310号、2016年2月24日に出願された米国仮特許出願第62/299,206号、2016年12月2日に出願された米国仮特許出願第62/429,149号、及び2016年12月9日に出願された米国仮特許出願第62/432,017号の、35 U.S.C § 119(e)に対する優先権を主張するものであり、これらの特許出願は参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0002】

連邦政府による資金提供を受けた研究

本発明は、国立衛生研究所により賦与されたEB018659；国立科学財団により賦与された1317291、2014188、1540214、及び1334109；並びに米国国防省、海軍研究局により賦与されたN00014-14-1-0610、N00014-13-1-0593、及びN00014-16-1-2410の下で政府の支援を得て実施された。政府は、本発明に一部の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

背景

デオキシリボ核酸(DNA)の特性をコードする情報と、ワトソン・クリック(Watson-Crick)型塩基対相補性を比較的容易にプログラムできることによって、この20年の間に多様な用途で基質として使用されるDNAが得られた¹⁻⁹。さらに、DNAは、規定された2D及び3D形状のナノ構造に自己組織化するようにプログラムされて¹⁰⁻¹⁸、生体分子の正確な空間パターン形成¹⁹⁻²⁶、さらには、無機分子の造形²⁷も可能にする。これらの合成系は、生体分子の核磁気共鳴(NMR)構造決定のためのDNAナノ構造²⁸、細胞経路の条件付き調節^{22, 29, 30}、並びに薬物送達のためのビヒクルとしてのDNAナノ構造^{31, 32}の適用に関して進行中の研究により、合成生物学、材料科学、及び生物学的画像の分野で、それらの価値を既に示している。

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

概要

一部の態様では、分子地形の記録及び再構築を可能にする核酸ベースの分子ツールが本明細書に提供される。DNAは、ゲノム中の多様な分子機能についての情報をコードすることによって、生命をパターン形成する。DNAはまた、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)(Randall K Saiki, et al. Science, 239(4839):487-491, 1988)、ローリングサークル増幅(RCA)(Paul M Lizardi, et al. Nature genetics, 19(3):225-232, 1998)、及び鎖置換回路(Lulu Qian and Erik Winfree. Science, 332(6034):1196-1201, 2011; David Yu Zhang and Georg Seelig. Nature chemistry, 3(2):103-113, 2011)などの多数の合成反応ネットワークのためのテンプレート基質としても役立つ。本開示は、中でも、プライマー交換反応(PER)の概念を導入するが、これは、段階的に、一本鎖DNA(ssDNA)の等温合成をパターン形成するために、一部の実施形態では、触媒活性DNAヘアピン種を用いる。本明細書に提供されるデータは、プライマー交換反応カスケードを用いて、規定の経路に従ってDNAの新生鎖を成長させることができ、さらに、これを用いて、例えば、特定のプライマーシグナルを線上に増幅する合成テロメラーゼを構築することができることを示している。本明細書に提供される別のデータは、溶液中のRNAシグナルをプロセッシングし、これに回答するいくつかの機能性システム、例えば、無標識バイオセンサー、タイムレコーダ、論理回路、及び標的シグナルの検出を、独立のRNA配列について動作する機能性DNAザイムに変換するナノデバイスな

30

40

50

どの実現を明らかにしている。本開示の方法を用いて、等温インサイチュ環境で、任意の ssDNA を合成すると共に、例えば、分子デバイスの新たな作製のための基礎を提供することができる。

【0005】

従って、一部の態様は、中でも、高度に頑健な動的構築物をインサイチュで合成する上での基礎を提供する「プライマー交換」と呼ばれる動的DNA回路のための分子プリミティブを提供する。プライマー交換反応（PER）中に、鎖置換ポリメラーゼと、触媒として作用する部分的対分子（例えば、ヘアピン分子）を用いて、個別のヌクレオチド配列（ドメイン）が「成長」核酸鎖に付加される（合成される）（例えば、図1A～1Bを参照）。PERは、その触媒活性、モジュール性、頑健性、基本的燃料種（dNTP）、インサイチュ操作、及び単一分子転写物記録と共に、分子プログラミングのための新しいパラダイムを呈示する。任意のユーザ規定配列を有する一本鎖DNAの等温及び自律的合成のこの方法は、インサイチュ及びインピボのいずれの使用のためにも改変することができる。

10

【0006】

本開示の他の態様は、物理的支持を付与する走路の個々の部位として機能し、一部の事例では、成長核酸情報記録のための分子運動の方向及び経路を規定する核酸分子を用いて、化学エネルギー（例えば、DNAハイブリダイゼーションに関連するエンタルピー又は複合体からのDNA分子の放出に関連するエントロピー）を機械仕事に変換する分子（例えば、DNA）モータシステムを提供する（例えば、図23A～24Bを参照）。本明細書に記載するように、分子モータシステムは、一部の実施形態では、必要なとき及び場所でのみ、インサイチュで分子成分のプログラム可能な作製を可能にする。すなわち、分子は、反応が実施されるにつれて、活発に製造され得る。この技術は、分子レベルでの分子環境及び条件の検査を可能にする。また、この技術は、個々の走路部位分子との相互作用から生成された検査記録から分子地形の定量及び再構築も可能にする。特定の環境/地形において1つの走路部位分子から別の走路部位分子へと移動する分子モータとして機能する核酸の成長鎖は、「分子クロール」（例えば、図28A～28Bを参照）及び「分子ウォーカ」（例えば、図29A～29Bを参照）と呼ばれる。

20

【0007】

本開示の別の態様では、対核酸分子内の距離情報（記録と呼ぶ）を記録することによって標的分子間のナノスケール（又はマイクロスケール）の距離を記録する、自律的ボトムアップ（bottom-up）ツールを提供する。反応中に生成された核酸記録の長さは、測定される距離（例えば、生体分子間の距離）に直接対応する。さらに、各核酸記録は、その配列の一部としての標的分子のアイデンティティをコードすることができる。この分子定規システム（例えば、図33A～34を参照）は、固相又はインサイチュで、標的分子の溶液中の距離を記録することができる。

30

【0008】

従って、本開示の一部の態様は、プライマー交換反応（PER）システムを提供し、これは、（a）（i）不對3'トールドドメイン及び（ii）トールドドメインから5'側に位置する対ドメインを含む初期触媒分子；（b）不對3'トールドドメインと相補的な初期プライマー；並びに（c）鎖置換活性を有するポリメラーゼを含む。一部の実施形態では、初期触媒分子は、ヘアピン構造を有することから、3'トールドドメインとは反対側の末端（対ドメインから5'側）に位置するループドメインをさらに含む（例えば、図1Aを参照）。一部の実施形態では、このシステムは、デオキシリボヌクレオチド三リン酸（dNTP）をさらに含む。

40

【0009】

「ドメイン」は、ドメインが、不對（一本鎖ヌクレオチド）であるか、又は対（二本鎖ヌクレオチド塩基対）であるかによって、それぞれ、ヌクレオチド又はヌクレオチド塩基対の個別の連続した配列を指す。一部の実施形態では、ドメインは、分子内（同じ分子種）及び分子間（2つの個別の分子種間）相補性を定義する目的で、複数のサブドメインを有するものとして記載される。1つのドメイン（又は1つのサブドメイン）は、1つのドメ

50

インが、他のドメインのヌクレオチドと塩基対合（ワトソン・クリック型ヌクレオチド塩基対合）して、これら２つのドメインが、対（二本鎖）又は部分的対のドメイン分子種／構造を形成するヌクレオチドを含む場合、別のドメインと「相補的」である。相補的ドメインは、対構造を形成するために完全に（１００％）相補的である必要はないが、一部の実施形態では、完全な相補性が提供される。従って、特定のドメインと「相補的」なプライマーは、例えば、ポリメラーゼの存在下で重合を開始するのに十分な時間にわたって、そのドメインと結合する。例えば、図１Ａは、触媒ヘアピン分子のドメイン「１'」と結合するプライマー「１」を示す。同様に、図１Ｂは、触媒ヘアピン分子のドメイン「２'」と結合するプライマードメイン「２」を示す。

【００１０】

一部の実施形態において、ヘアピンループがない（ヌクレオチドの連続した区間により形成されていない）触媒分子は、「テンプレート鎖」と対合（ハイブリダイズ／結合）した「置換鎖」を含むデュプレックスとして記載されている。図２４（３番目の「デュプレックス」パネル）は、置換鎖「１」（上、短い方の鎖）とテンプレート鎖「１'＋１'」（下、長い方の鎖）の結合によって形成されたデュプレックス触媒分子の一例を示す。

【００１１】

本明細書に提供される触媒分子のいずれか１つは、トーホールドドメインとは反対側の分子の末端に位置する「結合ドメイン」を含み得ることを理解すべきである。結合ドメインは、例えば、図１Ａ～１Ｃに示すようなヘアピンループ（ループドメイン）であってもよいし、又は結合ドメインは、互いに共有結合架橋した相補的ヌクレオチド（例えば、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、若しくは１０個の共有結合架橋ヌクレオチド塩基対）を含んでもよい。一部の実施形態では、結合ドメインは、例えば、長さが少なくとも１０ヌクレオチド（例えば、ドメインが、ＰＥＲ条件の全体を通して対を維持するように）の単純に安定した対ドメインである。

【００１２】

本開示の一部の態様は、プライマー交換反応（ＰＥＲ）システムを提供し、これは、（ａ）（ｉ）不對３'トーホールドドメイン、（ｉｉ）分子の３'サブドメインと分子の５'サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対システムドメイン、及び（ｉｉ）ループドメインを含む初期触媒ヘアピン分子；（ｂ）不對３'トーホールドドメインと相補的な初期プライマー；並びに（ｃ）鎖置換活性を有するポリメラーゼを含む。ヘアピン分子は、一般に、分子内ヌクレオチド塩基対により形成され、これは、核酸の同じ連続した鎖のドメイン同士の結合を指す。例えば、図１Ａは、５'（上流）ドメイン「２」と３'（下流）ドメイン「２'」の結合により形成されるヘアピン分子を示す。５'ドメイン「２」は、デュプレックス触媒分子の置換鎖と同様に機能し、３'ドメイン「２'」は、デュプレックス触媒分子のテンプレート鎖と同様に機能することを理解すべきである。

【００１３】

本開示の他の態様は、プライマー交換反応（ＰＥＲ）システムを提供し、これは、（ａ）（ｉ）不對３'トーホールドドメイン及び（ｉｉ）置換鎖と、トーホールドドメインを含有するテンプレート鎖とのヌクレオチド塩基対により形成される、トーホールドドメインから５'側に位置する対ドメインを含む初期触媒分子；（ｂ）（ｉ）不對３'トーホールドドメイン及び（ｉｉ）置換鎖と、第２触媒分子のトーホールドドメインを含有するテンプレート鎖とのヌクレオチド塩基対により形成される、トーホールドドメインから５'側に位置する対ドメインを含む第２触媒分子（ここで、第２触媒分子の３'トーホールドドメインは、初期触媒分子の置換鎖と相補的である）；（ｃ）初期触媒分子の不對３'トーホールドドメインと相補的な初期プライマーを含む。一部の実施形態では、ＰＥＲシステムは、鎖置換活性を有するポリメラーゼをさらに含む。一部の実施形態では、ＰＥＲシステムは、ｄＮＴＰをさらに含む。

【００１４】

一部の実施形態では、ＰＥＲシステムは、（ａ）（ｉ）不對３'トーホールドドメイン、（ｉｉ）分子の５'サブドメインと分子の３'サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対

10

20

30

40

50

により形成される対ステムドメイン、及び (i i i) ループドメインを含む初期触媒ヘアピン分子； (b) (i) 不對 3 ' トーホールドドメイン、 (i i) 第 2 ヘアピン分子の 3 ' サブドメインと第 2 ヘアピン分子の 5 ' サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメイン、及び (i i i) ループドメインを含む第 2 触媒ヘアピン分子（ここで、第 2 ヘアピン分子の 3 ' トーホールドドメインは、初期ヘアピン分子の 5 ' サブドメインと相補的である）；並びに (c) 初期ヘアピン分子の不對 3 ' トーホールドドメインと相補的な初期プライマーを含む。

【 0 0 1 5 】

本開示のさらに他の態様は、プライマー交換反応 (P E R) 方法を提供し、この方法は、 (a) (i) 不對 3 ' トーホールドドメイン及び (i i) 置換鎖と、トーホールドドメインを含有するテンプレート鎖とのヌクレオチド塩基対により形成される、トーホールドドメインから 5 ' 側に位置する対ドメインを含む初期触媒分子、 (b) (i) 不對 3 ' トーホールドドメイン及び (i i) 置換鎖と、第 2 触媒分子のトーホールドドメインを含有するテンプレート鎖とのヌクレオチド塩基対により形成される、トーホールドドメインから 5 ' 側に位置する対ドメインを含む第 2 触媒分子（ここで、第 2 触媒分子の 3 ' トーホールドドメインは、初期触媒分子の置換鎖と相補的である）、 (c) 初期触媒分子の不對 3 ' トーホールドドメインと相補的なプライマー、 (d) 鎖置換活性を有するポリメラーゼ、並びに (e) デオキシリボヌクレオチド三リン酸 (d N T P) を反応バッファー中で合わせることで、反応混合物を形成した後；一本鎖核酸記録を生成するのに十分な時間にわたって、核酸重合、鎖置換及びアニーリングを達成する条件下で反応混合物をインキュベートすることを含む。

【 0 0 1 6 】

一部の実施形態では、 P E R 方法は、 (a) (i) 不對 3 ' トーホールドドメイン、 (i i) 分子の 3 ' サブドメインと分子の 5 ' サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメイン、及び (i i i) ヘアピンループドメインを含む初期触媒ヘアピン分子、 (b) (i) 不對 3 ' トーホールドドメイン、 (i i) 第 2 ヘアピン分子の 3 ' サブドメインと第 2 ヘアピン分子の 5 ' サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメイン、及び (i i i) ループドメインを含む第 2 触媒ヘアピン分子（ここで、第 2 ヘアピン分子の 3 ' トーホールドドメインは、初期ヘアピン分子の 5 ' サブドメインと相補的である）、 (c) 初期ヘアピン分子の不對 3 ' トーホールドドメインと相補的なプライマー、 (d) 鎖置換活性を有するポリメラーゼ、並びに (e) デオキシリボヌクレオチド三リン酸 (d N T P) を反応バッファー中で合わせることで、反応混合物を形成した後；一本鎖核酸記録を生成するのに十分な時間にわたって、核酸重合、鎖置換及びアニーリングを達成する条件下で反応混合物をインキュベートすることを含む。

【 0 0 1 7 】

一部の実施形態では、 P E R 方法は、 (a) 鎖置換活性を有するポリメラーゼ及びデオキシリボヌクレオチド三リン酸 (d N T P) の存在下で、インプットプライマーを触媒分子と接触させるが、ここで、触媒分子は、 (i) 不對 3 ' トーホールドドメイン及び (i i) 置換鎖と、トーホールドドメインを含有するテンプレート鎖とのヌクレオチド塩基対により形成される、トーホールドドメインから 5 ' 側に位置する対ドメインを含み、ここで、インプットプライマーは、ヘアピン分子の 3 ' トーホールドドメインと相補的であり； (b) 触媒分子の対ドメインを介してプライマーを伸長することにより、置換鎖を置換して、伸長アウトプットプライマーを形成し； (c) 置換鎖とテンプレート鎖同士のヌクレオチド塩基対によって、ヘアピン分子からの延長アウトプットプライマーを置換し； (d) 鎖置換活性を有するポリメラーゼ及び d N T P の存在下で、 (c) の置換された延長アウトプットプライマーを第 2 触媒分子と接触させることを含み、ここで、第 2 触媒分子は、 (i) 不對 3 ' トーホールドドメイン及び (i i) 置換鎖と、第 2 触媒分子のトーホールドドメインを含有するテンプレート鎖とのヌクレオチド塩基対により形成される、トーホールドドメインから 5 ' 側に位置する対ドメインを含み、また、延長アウトプットプライマーは、

第2触媒分子の3'トールドドメインと相補的である。一部の実施形態では、触媒分子は、触媒ヘアピン分子である。

【0018】

さらに、(a)(i)不對3'トールドドメイン、(ii)分子の3'サブドメインと分子の5'サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメイン、及び(iii)結合ドメインを含む触媒ヘアピン分子(ここで、(a)(i)及び(a)(ii)のドメインは、タンデム反復配列を形成する)、(b)(i)3'トールドドメイン、(ii)分子の3'サブドメインと分子の5'サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメイン、及び(iii)結合ドメインを含む少なくとも1つの他の触媒ヘアピン分子(ここで、(b)(i)及び(b)(ii)のドメインは、シグナル配列により分断されたタンデム反復配列を形成し、(b)(i)の3'トールドドメインは、プロテクター鎖と不可逆的に結合している)、並びに(c)(a)の触媒ヘアピン分子の3'トールドドメインと相補的、且つ(b)の触媒ヘアピン分子の3'トールドドメインと相補的であるドメインを含む核酸プライマーを含む、組成物も本発明に提供される。2つの核酸は、それらが、PER条件下で、互いに結合し、互いから解離することができれば、互いに「不可逆的に結合した」とみなされる。「タンデム反復配列」の一例を図21A~21Bに示す(a*-a*を参照)。「シグナル配列によって分断されたタンデム反復配列」の一例も図21A~21Bに示す(a*-S*-a*を参照)。シグナル配列は、一部の実施形態において、タンデム反復ドメイン中のヌクレオチドの順序とは異なる順序で配列される少なくとも1ヌクレオチド、又は少なくとも2ヌクレオチド(例えば、1~20ヌクレオチド、又は少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9若しくは10ヌクレオチド)であってもよい。一部の実施形態では、プロテクター鎖は、(b)の少なくとも1つの他の触媒ヘアピン分子の3'トールドドメインと、任意選択で、ループドメインを介して連結される(例えば、図42Aを参照)。

【0019】

本開示の一部の態様は、一本鎖核酸を生成する方法を提供し、この方法は、(a)(i)不對3'トールドドメイン及び(ii)置換鎖と、トールドドメインを含有するテンプレート鎖とのヌクレオチド塩基対により形成される、トールドドメインから5'側に位置する対ドメインを含む初期触媒分子、(b)ヘアピン分子各々が、(i)不對3'トールドドメイン及び(ii)置換鎖と、トールドドメインを含有するテンプレート鎖とのヌクレオチド塩基対により形成される、トールドドメインから5'側に位置する対ドメインを含む、複数の異なる触媒分子(ここで、各触媒分子の3'トールドドメインは、複数のうちの1つの他の触媒分子の置換鎖と相補的である)；(c)初期触媒分子の3'トールドドメインと相補的な初期プライマー、(d)鎖置換活性を有するポリメラーゼ、並びに(e)デオキシリボヌクレオチド三リン酸(dNTP)を反応バッファー中で合わせることで、反応混合物を形成した後；初期プライマーよりも長い一本鎖核酸記録を生成するのに十分な時間にわたって、核酸重合、鎖置換及びアニーリングを達成する条件下で反応混合物をインキュベートすることを含む。

【0020】

一部の実施形態では、一本鎖核酸を生成する方法は、(a)(i)不對3'トールドドメイン、(ii)分子の3'サブドメインと分子の5'サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメイン、及び(iii)ヘアピンループドメインを含む初期ヘアピン分子、(b)ヘアピン分子各々が、(i)不對3'トールドドメイン、(ii)複数のうちの1ヘアピン分子の3'サブドメインと、複数のうちの1ヘアピン分子の5'サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメイン、及び(iii)ループドメインを含む、複数の異なるヘアピン分子(ここで、各ヘアピン分子の3'トールドドメインは、複数のうちの1つの他のヘアピン分子の5'サブドメインと相補的である)；(c)初期ヘアピン分子の3'トールドドメインと相補的な初期プライマー、(d)鎖置換活性を有するポリメラーゼ、並びに(e)デオキシリボヌクレオチド三リン酸(dNTP)を反応バッファー中で合わせることで、反応混合

物を形成した後；初期プライマーよりも長い一本鎖核酸記録を生成するのに十分な時間にわたって、核酸重合、鎖置換及びアニーリングを達成する条件下で反応混合物をインキュベートすることを含む。

【0021】

本開示の他の態様は、分子事象の間の時間を計測する方法を提供し、この方法は、(a) (i) 不對3' トーホールドドメイン及び(ii) 置換鎖と、トーホールドドメインを含有するテンプレート鎖とのヌクレオチド塩基対により形成される、トーホールドドメインから5' 側に位置する対ドメインを含む初期触媒分子、(b) 触媒分子各々が、(i) 不對3' トーホールドドメイン及び(ii) 置換鎖と、トーホールドドメインを含有するテンプレート鎖とのヌクレオチド塩基対により形成される、トーホールドドメインから5' 側に位置する対ドメインを含む、複数の異なる触媒分子(ここで、各触媒分子の3' トーホールドドメインは、複数のうちの1つの他の触媒分子の置換鎖と相補的である)、(c) 初期触媒分子の不對3' トーホールドドメインと相補的な初期プライマー、(d) 鎖置換活性を有するポリメラーゼ、並びに(e) デオキシリボヌクレオチド三リン酸(dNTP)を反応バッファー中で合わせることににより、反応混合物を形成し；第1の分子事象に反応混合物を曝露し；一本鎖核酸記録を生成するのに十分な時間にわたって、核酸重合、鎖置換及びアニーリングを達成する条件下で反応混合物をインキュベートした後；第2の分子事象に反応混合物を曝露することを含む。

10

【0022】

一部の実施形態では、分子事象同士の時間を計測する方法は、(a) (i) 不對3' トーホールドドメイン、(ii) 分子の3' サブドメインと分子の5' サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメイン、及び(iii) ヘアピンループドメインを含む初期触媒ヘアピン分子、(b) ヘアピン分子各々が、(i) 不對3' トーホールドドメイン、(ii) ヘアピン分子の3' サブドメインと、ヘアピン分子の5' サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメイン、及び(iii) ループドメインを含む、複数の異なる触媒ヘアピン分子(ここで、各ヘアピン分子の3' トーホールドドメインは、複数のうちの1つの他のヘアピン分子の5' サブドメインと相補的である)；(c) 初期ヘアピン分子の不對3' トーホールドドメインと相補的な初期プライマー、(d) 鎖置換活性を有するポリメラーゼ、並びに(e) デオキシリボヌクレオチド三リン酸(dNTP)を反応バッファー中で合わせることににより、反応混合物を形成した後；第1の分子事象に反応混合物を曝露し；一本鎖核酸記録を生成するのに十分な時間にわたって、核酸重合、鎖置換及びアニーリングを達成する条件下で反応混合物をインキュベートした後；第2の分子事象に反応混合物を曝露することを含む。

20

30

【0023】

本開示のまた別の態様は、分子モータシステムを提供し、これは、(a) (i) 不對3' トーホールドドメイン及び(ii) 置換鎖と、トーホールドドメインを含有するテンプレート鎖とのヌクレオチド塩基対により形成される、トーホールドドメインから5' 側に位置する対ドメインを含む初期核酸分子；(b) (i) 不對3' トーホールドドメイン及び(ii) 置換鎖と、トーホールドドメインを含有するテンプレート鎖とのヌクレオチド塩基対により形成される、トーホールドドメインから5' 側に位置する対ドメインを含む第2核酸分子(ここで、第2核酸分子の不對3' トーホールドドメインは、初期核酸分子の置換鎖と相補的である)；並びに(c) 初期核酸分子の不對3' トーホールドドメイン内に位置するヌクレオチドと相補的なプライマーを含む。

40

【0024】

本開示のさらに別の態様は、分子記録システムを提供し、これは、(a) (i) 不對3' トーホールドドメイン、(ii) 分子の3' サブドメインと分子の5' サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメイン、及び(iii) ループドメインを含む初期ヘアピン分子(ここで、初期ヘアピン分子は、標的生体分子と連結している)；(b) (i) 不對3' トーホールドドメイン、(ii) 分子の3' サブドメインと分子の5' サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメイン

50

、及び (i i i) ループドメインを含む第 2 ヘアピン分子 (ここで、第 2 ヘアピン分子は、標的生体分子と連結しており、また、初期ヘアピン分子の 5' サブドメインは、第 2 ヘアピン分子の 5' サブドメインと相補的である) ; (c) 一方は、初期ヘアピン分子の不對 3' トーホールドドメインと相補的であり、他方は、第 2 ヘアピン分子の不對 3' トーホールドドメインと相補的である、2 つのプライマー ; (d) 分子各々が、(i) 不對 3' トーホールドドメイン、(i i) 分子の 3' サブドメインと分子の 5' サブドメイン同士分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメイン、及び (i i i) ループドメインを含む、複数の触媒ヘアピン分子 (ここで、複数の各ヘアピン分子の 5' サブドメインは、複数のうちの 1 つの他のヘアピン分子の 5' サブドメインと相補的であり、複数のうち 1 つのヘアピン分子の 3' トーホールドドメインは、初期ヘアピン分子の 5' サブドメインと相補的であり、また、複数のうちもう 1 つのヘアピン分子の 3' トーホールドドメインは、第 2 ヘアピン分子の 5' サブドメインと相補的である) ; 並びに (e) 鎖置換活性を有するポリメラーゼを含む。

10

【 0 0 2 5 】

本開示のさらに別の態様は、標的生体分子間の距離を記録する方法を提供し、この方法は、反応バッファー中で、(a) (i) 不對 3' トーホールドドメイン、(i i) 分子の 3' サブドメインと分子の 5' サブドメイン同士分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメイン、及び (i i i) ループドメインを含む初期ヘアピン分子 (ここで、初期ヘアピン分子は、標的生体分子と連結している) ; (b) (i) 不對 3' トーホールドドメイン、(i i) 分子の 3' サブドメインと分子の 5' サブドメイン同士分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメイン、及び (i i i) ループドメインを含む第 2 ヘアピン分子 (ここで、第 2 ヘアピン分子は、標的生体分子と連結しており、また、初期ヘアピン分子の 5' サブドメインは、第 2 ヘアピン分子の 5' サブドメインと相補的である) ; (c) 一方は、初期ヘアピン分子の不對 3' トーホールドドメインと相補的であり、他方は、第 2 ヘアピン分子の不對 3' トーホールドドメインと相補的である、2 つのプライマー ; (d) 分子各々が、(i) 不對 3' トーホールドドメイン、(i i) 分子の 3' サブドメインと分子の 5' サブドメイン同士分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメイン、及び (i i i) ループドメインを含む、複数のヘアピン分子 (ここで、複数のヘアピン分子各々の 5' サブドメインは、複数のうちの 1 つの他のヘアピン分子の 5' サブドメインと相補的であり、複数のうち 1 つのヘアピン分子の 3' トーホールドドメインは、初期ヘアピン分子の 5' サブドメインと相補的であり、複数のうちもう 1 つのヘアピン分子の 3' トーホールドドメインは、第 2 ヘアピン分子の 5' サブドメインと相補的である) ; 並びに (e) 鎖置換活性を有するポリメラーゼ、及びデオキシリボヌクレオチド三リン酸 (d N T P) を含ませることにより、反応混合物を形成した後 ; 二本鎖核酸記録を生成するのに十分な時間にわたって、核酸重合、鎖置換及びアニーリングを達成する条件下で反応混合物をインキュベートすることを含む。

20

30

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 6 】

【 図 1 A 】プライマー交換反応 (P E R)、又は多段階 P E R の単一ステップ (サイクル) の一例の図を示す。ヘアピンは触媒として作用して、1 ドメインを有するプライマー上に 2 ドメインを付加する。

40

【 図 1 B 】 P E R、又は多段階 P E R の単一ステップを示す。

【 図 1 C 】プライマー交換反応 (P E R) の一例の別の図を示す : (i) 触媒ヘアピンを用いて、形態 a b の転写物を生成する、プライマー交換反応。(i i) 停止配列として G - C 対を使用するヘアピンを用いた反応インプリメンテーションの一例。ここには、他の停止配列を記載する。(i i i) プライマー交換反応サイクル。初めに、プライマー a が、触媒ヘアピンに結合する (ステップ 1)。次に、b ドメインを、それが停止配列に達するまで、鎖置換ポリメラーゼと共に a に連結する (ステップ 2)。分岐移動により、合成された b ドメインを置換する (ステップ 3)。a b 転写物が、ヘアピンから解離し、ヘアピンが再利用される (ステップ 4)。(i v) 単一プライマー交換反応についての反応時

50

間シリーズ及びヘアピン濃度勾配を示すPAGE変性ゲル。いずれの実験についても、プライマー濃度は、 100 nM に固定し、反応物を $10\text{ }\mu\text{M}$ のdATP、dTTP、及びdCTPと一緒に37でインキュベートした。レーン11及び13は、同一条件に対応する。

【図2A】PERカスケード例の図を示す。(i)プライマー配列の自律的な段階的成長のためにいくつかのPERヘアピンと他の試薬を組み合わせる概略図。(ii)ヘアピンA、B、C、D、及びEによりパターン形成された5つの伸長ステップの反応概略図。(iii)存在するヘアピン種の異なるサブセットによる差別的延長を明らかにする変性ゲル。反応物は、濃度 100 nM のプライマー、 10 nM のヘアピン、各々 $10\text{ }\mu\text{M}$ のdATP、dTTP、及びdCTPと一緒に37で4時間インキュベートした。(iv)折り紙構造のための40ステープル鎖の並列合成の概略図、並びに折り紙境界が重なって凝集したこれらの構造のうちの3つのAFMイメージ。

10

【図2B】状態遷移図の例を示す。ヘアピンは触媒として作用して、1及び2ドメインを有するプライマー上に3ドメインを付加する。

【図3A】PERが、規定経路に従って鎖を伸長したことを明らかにするイメージを示す。

【図3B】PERが、規定経路に従って鎖を伸長したことを明らかにするイメージを示す。

【図4】PERを用いて、合成テロメラーゼを構築することができることを明らかにするイメージを示す。1つのヘアピンを用いて、特定の 10ヌクレオチド 配列をコピーするシステムをインプリメントした。レーン(A)は、ヘアピンを含まないプライマーを示し、レーン(B)～(D)は、様々な濃度のヘアピンを用いた結果を示す。反応物は、37で4時間インキュベートした。

20

【図5】多段階PERを説明するイメージを示す。

【図6】PERをツールとして用いることができるいくつかの適用例を示し、トリガーされた複合体ナノ構造の組織化(パネル1)、時間を計測する分子時計及びシグナルを経時的に制御するタイマー(パネル2)、並びにシグナルに経時的に応答して差別化し、これを記録するシステム(パネル3)を含む。

【図7】複合体ナノ構造のトリガー組織化のためにPERを用いることができるいくつかの適用例を示す。上のパネルは、固定長さの長い鎖のトリガー組織化を示す。中央のパネルは、任意の2D及び3D形状に折り畳まれる長い鎖を示す。下のパネルは、樹状骨格構造の組織化を示し、これも、様々な形状に折り畳むことができる。

30

【図8】長いスカフォールド鎖の組織化をスケールアップするための2つのアプローチ例を示す。図8Aは、触媒ヘアピンの数の増加を示し、図8Bは、各ヘアピン内のコピー領域の長さの増加を示す。

【図9】PERを用いて、核酸ナノ構造の組織化をトリガーするための3つのアプローチ例を示す。図9Aは、トリガーされた従来のDNA折り紙ナノ構造の組織化の一例を示す。図9Bは、トリガーされた一本鎖タイルナノ構造の組織化の一例を示す。図9Cは、トリガーされた一本鎖DNA折り紙ナノ構造の組織化の一例を示す。

【図10】PERを用いた樹状組織化のメカニズムの一例を示す。図10Aは、1つのヘアピンに加え、一本鎖燃料(核酸)を用いた、指数関数的成長速度論を有するトリガーされたデンドリマーの合成を示す。図10Bは、樹状構造の一例を示す。図10Cは、ステープル鎖(短いオリゴヌクレオチド)を用いて、特定の2D及び3D形状に折り畳まれる樹状骨格を示す。

40

【図11】時間を計測するための分子時計として、また、シグナルを経時的に制御するためのタイマーとして、PERを用いることができるいくつかの適用例を示す。上のパネルは、経過する時間を計測するための分子時計として用いられるPERの概略図を示す。中央のパネルは、プログラム可能な時間的駆動のための分子タイマーとして用いられるPERの概略図を示す。下のパネルは、多重化時間的記録及び駆動のために使用されるPERの概略図を示す。

【図12】シグナル検出モジュールの例を示す。図12Aは、条件付き状態遷移についての概要を示す。図12Bは、不可逆的プライマー交換ステップを含む検出を示す。図12

50

Cは、特定の光波長でヘアピンを活性化及び不活性化する可逆的架橋反応⁵⁷を示す。図12Dは、シグナルの非存在下でヘアピン上の結合部位を閉塞するプロテクター鎖を用いて検出されるmRNAシグナルを示す。一部の事例では、このインプットは、ssDNA又は別の一本鎖核酸であってもよい。一部の実施形態では、このトリガーシグナルは、個別のPER反応により合成される鎖である。図12Eは、PCRによりトーホールド領域を付加することによって達成される二本鎖DNA(dssDNA)の検出を示す⁴⁵。図12Fは、小分子及びタンパク質標的を認識して、ヘアピンをブロック解除するアプタマーを示す。

【図13】分子時計の例を示す。図13Aは、テロメア化状態への遷移をトリガーするインプットと、これを停止する第2のインプットを示す。図13Bは、図12A~12Fに示すように、状態遷移毎に用いられる1つのヘアピンを示す。図13Cは、2つのインプットの間に経過した時間を示すアウトプットの長さを示す。

10

【図14】分子タイマーの例を示す。図14Aは、遅延回路を用いるタイマーを示し、これによって、プライマーは、駆動の前に固定数の状態遷移を経る。図14Bは、状態遷移毎に1つのヘアピンを示す。図14Cは、アウトプット曲線を示す。

【図15】PERを用いて、タンパク質合成のパルスを記録する例を示す。図15Aは、トーホールドスイッチ作動の時間的制御のための基本原理を提供する、アウトプット1及びアウトプット2の間にプログラムされた遅延を示す。図15Bは、分子インプリメンテーションの一例を示す。図15Cは、トーホールドスイッチを作動させ、後に停止するようにプログラムされた回路により生成されるアウトプット配列を示す。図15Dは、アウトプットのトレースを示す。

20

【図16】PER論理の例を示す。論理演算AND(図16A~16C)、OR(図16D~16F)及びNOT(図16G~16I)は、PER反応グラフを用いてインプリメントすることができる。

【図17】PERを用いた論理計算の例を示す。図17Aは、デジタル論理回路の一例を示す。図17Bは、6つの状態を含むシステムを示す。図17Cは、シグナル検出(図12A~12F)及び回路に組み込まれた論理(図16A~16I)モジュールを含む分子インプリメンテーションを示す。

【図18】シグナルに応答して差別化し、シグナルを経時的に記録するシステムをインプリメントするために、PERを用いることができる2つの適用例を示す。上のパネルは、発達性自己組織化の一例を示し、これにより、発達経路に従って様々な構造の成長がインサイチュで起こる。下のパネルは、経時的なシグナルの時間トレースを記録する分子ティックカーテープの一例を示す。

30

【図19】PERを用いた発達性自己組織化の例を示す。図19Aは、経時的に遭遇したシグナル(A~E)に基づいて状態差別化を経るプライマーを示す。図19Bは、形状の合成をインサイチュでトリガーする差別化状態を示す。図19Cは、図12A~12Fに示すようにインプリメントされた状態遷移を示す。

【図20】PERを用いた分子ティックカーテープの例を示す。図20Aは、クロックの役割を果たす1つの遷移、次にシグナルタイプに従い1つの遷移を有するテロメア化回路を示す。図20Bは、シグナル履歴がその中にコードされた、図20Cの転写物を生成するシグナルトレースを示す。図20Dは、1つの構造的に活性のテロメア化ヘアピンと各シグナルの検出器を必要とするシステムを示す。

40

【図21】1シグナルヘアピンシステムを示す。(図21A)プライマー上にドメインをコピーするヘアピンを用いて、連続的にドメインを転写物配列に付加することにより反応の時間を計測する。(図21B)転写物記録上で、反復ドメインaの前に2つの追加塩基(Sドメイン)をコピーするヘアピンは、シグナルの役割を果たす。(図21C)仮定のシグナル濃度曲線。(図21D)時間依存的シグナル濃度に応じて、反復aドメイン内に挿入されるシグナルドメインSを含有する転写物の概略図。

【図22】アダプタータグ付けの一例を示す。記録によって、初期プライマー配列から転写物が生成された後、2つのスプリント配列を用いて、アダプター配列を転写物のいずれ

50

かの末端に導入し、連結させる。

【図23】実験B及びCからのシグナル濃度の統計学的推定を示す。(図23A)実験Bは、500 pMの一定シグナル濃度を使用した(上)が、実験Cは、階段シグナル関数を使用し、1時間後200 pMで一定になった。(図23B)179の総シグナルを有する300の転写物(実験B、上)及び127の総シグナルを有する1,000の転写物(実験C、下)に基づく2つの実験のシグナル濃度の推定。実線は、事後分布の平均(バーンイン後の100サンプルに基づく)を示し、灰色部分は、2つの推定値の95%信用域を示す。実験Bの事後分布の時間平均値が500 pMと等しくなるように、両方の実験を正規化した。

【図24】単一の触媒ヘアピン分子(左側パネル)、テザリングされた触媒ヘアピン分子(中央のパネル)及びデュプレックス触媒分子(右側パネル)を示す。

【図25】分子標的検出のためのPERシステムの一例を示す。

【図26】PERナノデバイスの例を示す。(図26A)miRNAを検出して、独立した遺伝子を阻害する、ナノデバイスの概略図。(図26B)4文字コード合成の停止配列として用いられる、合成ヌクレオチド、iso-dG及びiso-dC。(図26C)ナノデバイスのシステムセットアップ及び反応図。発癌性miR-19a配列は、A、B、及びCヘアピンによる10~23 DNAザイム配列(DZ-TWT)の合成を介して、Twist遺伝子(TWT)の断片の切断をトリガーする。(図26D)付加されたDNAザイム(DZ-TWT)によるmiRNA標的(miR-19a)の配列分解。新生プライマー鎖の結合部分は、配列上方の線により示され、DNAザイムの触媒ドメインは、点線で示される。(図26E)インキュベーション溶液中の異なるヘアピンを考慮して、miRNA及びTwist mRNA断片状態を確認するPAGE変性ゲル。反応物は、37で4時間インキュベートした。

【図27】PERを用いた無標識バイオセンサーの例を示す。(図27A)単一PERヘアピンで合成テロメラーゼをインプリメントするための概略図。(図27B)異なるヘアピン濃度下でのテロメア化を示すPAGE変性ゲル。プライマーは、所与のヘアピン濃度を用いて、37で4時間インキュベートした。(図27C)無標識バイオセンサーの概略図であり、ここで、miRNA標的は、蛍光テロメア鎖の合成を活性化する。(図27D)バイオセンサーのシステム構成要素及び反応図。ゲートドヘアピン(A)及びテロメラーゼヘアピン(B)は、miRNAシグナルの検出に反応して、ヒトテロメア配列TTAGGGの反復配列を濃縮するように設計されており、この配列にThioflavin(ThT)が挿入される。(図27E)10 nM miRNAシグナルの存在下で条件付きテロメア化を示すネイティブPAGEゲル。標的検出は、アンバーフィルタユニット(vis)を介したブルーライトトランスイルミネータを用いて視覚化することができ、反応物の蛍光も、Typhoonスキャナー(FAM)で視覚化した。

【図28】PERを用いた論理計算の例を示す。(図28A)RNAインプットを含む論理式を評価する演算の概略図。(図28B)miR-19a OR TWTゲート反応構成要素と、異なるRNAインプットに応答する転写物生成を示すPAGE変性ゲル。真のアウトプットは、点線で示される特定の長さの転写物を探すことによって読み取られる。(図28C)miR-19a AND TWT、(図28D)NOT miR-21、及び(図28E)(miR-19a OR TWT) AND (NOT miR-21)についての反応セットアップ及びPAGE変性ゲル結果も示す。

【図29】PERを用いた事象記録の例を示す。(図29A)時間依存的RNAシグナルに応答してPER転写物を生成する事象レコーダの概略図。(図29B)ゲートドヘアピンの活性化のためのトーホールド交換メカニズム。(図29C)レコーダのためのシステム構成要素及び反応図。4つのゲートドヘアピン(A、B、C、及びD)を用いて、2つのRNA標的-miR-19aとTwist mRNA(TWT)の断片を目撃した様々な順序に応じて、異なる配列の合成をプログラムする。(図29D)PAGE変性ゲルは、37で5時間の反応物中への、1及び3時間の時点で、様々なRNAシグナルの急上昇について記録された様々な長さの転写物を示す。更なる詳細については、方法のセ

10

20

30

40

50

クションを参照されたい。

【図 3 0】P E R をインピボでインプリメントする方法の一例を示す。インピボ P E R カスケードのための 2 つの戦略を図示する。(図 3 0 A) 第 1 の戦略では、形質転換又はトランスフェクションにより、構成要素を細胞に直接導入する。一部の細胞は、全ての構成要素を受容して、好適な P E R 合成を可能にするであろう。(図 3 0 B) 第 2 の戦略は、プラスミド又はゲノムのいずれかにヘアピン P E R 構成要素をコードし、ヘアピンが、R N A オリゴのリアルタイム合成をプログラムするための R N A 構築物として発現される。

【図 3 1】図 3 1 A は、分子クローラの基本的な操作メカニズムを示す。上の列は、単一部位での単位操作を描く。中央の列は、2 つの隣接する部位の間のクローリングの 1 ステップを描く。下の列は、3 部位走路の初期及び最終状態を描く。生成された記録は、複数のメカニズムにより放出され得る。ある鎖種の末端で矢印が指す丸は、ポリメラーゼによる伸長に対する保護のための修飾(例えば、逆方向 d T)を示す。図 3 1 B は、2 D 空間における分子クローラの運動を示す。基質上に固定されたプローブ部位は、単純化された一本線として描かれており、補助ドメインは、明瞭化のために省かれている。クローラは、様々な経路に従って空間の周りを移動することができ、複数種の記録を生成し、これは、産物の横に示す数の鎖によって示される。

10

【図 3 2】図 3 2 A は、分子ウォーカの基本的な操作メカニズムを示す。上の列は、単一部位での単位操作を描く。中央の列は、2 つの隣接する部位の間のウォーキングの 1 ステップを描く。下の列は、3 部位走路の初期及び最終状態を描く。生成された記録は、複数のメカニズムにより放出され得る。ある鎖種の末端で矢印が指す丸は、ポリメラーゼによる伸長に対する保護のための修飾(例えば、逆方向 d T)を示す。図 3 2 B は、2 D 空間における分子ウォーカの運動を示す。基質に固定されたプローブ部位は、単純化された一本線として描かれており、補助ドメインは、明瞭化のために省かれている。ウォーカは、様々な経路に従って空間の周りを移動することができ、複数種の記録を生成し、これは、産物の横に示す数の鎖によって示される。

20

【図 3 3】図 3 3 A は、分子標的を検査して、部位の数を反映する記録を生成する分子モータを示す。図 3 3 B は、結合価を計数するために生物系に適用される分子モータを示す。長さ分布は、標的の結合価を反映している。図 3 3 C は、モデルシステムとしての核孔複合体と、参照データとしての超解像画像を示す。左側のパネルは、広視野を示し、中央のパネルは、6 つのサブユニットを含む単一の核孔複合体を示す。右側のパネルは、ヒストグラムと、線形化円強度投影処理の適合状態を示し、これは、サブユニット間の約 3 0 n m の距離を明らかにする。スケールバー、3 0 0 n m (左側パネル) 及び 3 0 n m (中央パネル)。図 3 3 D は、各部位でコードされたユニークな情報と共に、ユニークな情報をコピー、記録及び報告するクローラを示す。図 3 3 E は、所与の分子地形を検査するいくつかの分子モータを示し、各々が異なる経路に従い、空間情報を反映するユニークな記録を生成する。集合的分析によって、分子地形の再構築が可能になる。

30

【図 3 4】図 3 4 A は、D N A 分子内で記録された距離を示す。D N A 記録の影の付いた末端は、標的のユニークなバーコードを示す。図 3 4 B は、分子定規システムを用いた D N A 記録生成の 1 ラウンドを示す。

【図 3 5】図 3 5 A は、D N A 標的の配置とともに変化する記録のサイズを示す。図 3 5 B は、4 つの距離、d 1 ; d 2 ; d 3 又は d 4 の 1 つと対応する、生成された 2 8 の異なる記録と一緒に、D N A ナノ構造上の N P C 模倣物を示す。

40

【図 3 6】図 3 6 A ~ 3 6 H は、分子定規システムの詳細なメカニズムを示す。

【図 3 7 A】図 3 7 A は、二本鎖 D N A ロッドの 2 つの末端の間の距離を記録する分子定規の一例を示す。

【図 3 7 B】図 3 7 B は、二本鎖 D N A ロッドの 2 つの末端の間の距離を記録する分子定規の一例を示す。

【図 3 7 C】図 3 7 C は、二本鎖 D N A ロッドの 2 つの末端の間の距離を記録する分子定規の一例を示す。

【図 3 8 A】図 3 8 A は、分子距離を記録する実験の結果を示す。

50

【図 3 8 B】図 3 8 B は、分子距離を記録する実験の結果を示す。

【図 3 9 A】図 3 9 A ~ 3 9 B は、実施例 2 1 に記載する分子定規距離記録実験（図 3 8 A）からのバンドの定量を示し、それらを距離（DNAヌクレオチド）の関数としてプロットする（図 3 9 A）。ピークは、予測された距離と一致する。

【図 3 9 B】図 3 8 B で説明した分子定規距離記録実験からのバンドを定量し、それらを距離（ナノメートル）の関数としてプロットする。ピークは、予測された距離と一致する。最も短い距離の DNA ロッド（5.4 nm）だけが、その距離と一致する単一記録を生成するため、このプロットにはグラフ化していないことに留意されたい。

【図 4 0】タンパク質「フィンガープリント」法の一例を示す。

【図 4 1】図 4 1 A ~ 4 1 D は、4 構成要素分子記録システムの一例を示す。

【図 4 2】図 4 2 A ~ 4 2 D は、3 構成要素分子記録システムの一例を示す。

【図 4 3】分子モータシステムの運動に関するデータを示す。図 4 3 A は、DNA ナノ構造プラットフォーム上で試験した走路設計の概略図（上のパネル）と、モータが記録反応を終えた後の走路の分子詳細（下のパネル）を示す。図 4 3 B は、検索及び PCR 増幅後に、生成された記録が、変性ゲル電気泳動の下で、予測された長さ範囲（118 nt）で現れることを実証する。図 4 3 C は、走路部位及びモータの原子間力顕微鏡法（AFM）による視覚化を示す。モータを付加する前（左側パネル）、灰色をしたプローブ部位は、点として現れており；各プローブは、2 つの緩い一本鎖ループ（典型的には 3 T）により固定されているため、AFM チップの走査により、走路位置の不鮮明な画像が得られる。2 つの黒い点は、参照点である。記録反応後（右側パネル）、この時点で、走路部位は、モータにより連結され、互いに保持されて、三脚のような特徴として現れる。各折り紙長方形のサイズは、大まかに 80 nm x 100 nm である。

【図 4 4 A】別の分子クロールメカニズムを示す。2 つのプライマー結合部位、ドメイン「a」及び「b」を含むプローブを描く。

【図 4 4 B】別の分子クロールメカニズムを示す。プローブと結合して、置換ポリメラーゼにより延長する、ヘアピンプローブに対して過剰の自由プライマーを示す。

【図 4 4 C】別の分子クロールメカニズムを示す。更なる重合を遅くする、又は停止するために用いられるいくつかの方法（プローブ上のメチル化 RNA 塩基、「b*」と「b」の間の末端ヌクレオチドでのミスマッチ、プローブ上の iso-dC ヌクレオチド、並びに各「a*」プライマーの 5' 末端上の対応する iso-dG ヌクレオチドなど）を示す。

【図 4 4 D】別の分子クロールメカニズムを示す。低濃度の自由「b」ドメイン鎖を時折結合することによる新たな連結バーコード鎖の停止を示し、これによって、ポリメラーゼは、新しい連結鎖をコピーして、それを全てのプローブから放出する。従って、プローブは、更なる使用のために再生される。

【図 4 4 E】別の分子クロールメカニズムを示す。最終結果：連結バーコードコピーの幾分ランダムなパッチワークを示す。

【図 4 4 F】別の分子クロールメカニズムを示す。表示のドメインを含むプローブ配列の例を示す。配列は、上から下に向かって、配列 2 ~ 4 に対応する。

【発明を実施するための形態】

【0027】

説明

本明細書に記載するツールは、分子構造及び可溶性シグナルの記録並びに分子構造のプログラムされた組織化を可能にする。例えば、本開示は、（a）インサイチュで、又は治療薬／診断薬としてインピボで、トリガーされた複雑な構造の組織化を操作するために用いることができる一本鎖 DNA の等温及び自律的合成のための組成物及び方法、（b）経過した時間を計測するための分子時計及び時間遅延後のシグナルを制御するためのタイマー、並びに（c）環境シグナルに応じて差別化し、これらのシグナルを経時的に記録する環境応答性ナノマシンを提供する。本開示は、例えば、Cryo-EM イメージングのためのマーカのインサイチュ成長、汚染物質の長期環境監視、条件付き遺伝子調節、及びトリガーされたインサイチュでの毒素被包などの変革的適用のための基礎を提供する。

【 0 0 2 8 】

プライマー交換反応

本開示のこの態様の基本は、図 1 A ~ 1 B に描くプライマー交換反応 (P E R) である。短いプライマー配列から核酸を合成するためのこの酵素による方法は、等温、例えば、典型的には 37 °C で操作し、燃料として d N T P しが必要としない。反応物を合わせて、長い核酸配列を成長させる P E R カスケードを形成することができ、これらの合成反応物は、存在する多重化環境シグナルに応じて作製することができる。これによって、リアルタイムで合成される転写物への、具体的な m R N A 種の存在などのシグナル情報の空間・時間的記録が可能になる。さらに、一部の実施形態では、合成された転写物は、任意の配列を有し得るため、合成された鎖自体が、特定の条件に応答して細胞内でプログラムされた機能的挙動を果たす。

10

【 0 0 2 9 】

基本的なプライマー交換反応は、3つの大まかなステップで起こる。最初に、プライマー (ドメイン 1) は、伸長を促進する触媒分子 (例えば、ヘアピン分子) と可逆的に結合する。次に、鎖置換ポリメラーゼが、プライマーを延長して、停止配列 (又は重合を停止する他の分子) に到達するまで、触媒分子中のステム配列 (ドメイン 2') をコピーする。伸長が停止した後、分子の置換されたステム領域は、分子上のその反対鎖と再びハイブリダイズして、それが自発的に触媒分子から解離することができ、且つ、溶液中の別の同族触媒分子と自由に相互作用する程度まで、プライマー配列を置換することができる。このプライマー交換反応は、特定のプログラム可能な方法で、成長する鎖に配列を付加することができる。これらのモジュラー反応単位を他のこうした反応物と組み合わせて、特定の機能を有する分子プログラムを作製することができる。これらの反応物は全て、等温で動作し、溶液中の d N T P を動力源とする。プライマー交換反応物は、1つの分子 (例えば、ヘアピン) のアウトプットプライマー配列を備えることにより、容易に互いに連結することができ (触媒された反応物は、別のものに対するインプットプライマーとしての役割を果たす)、それらの反応関係は、図 2 (第 1 列) に示すように、状態遷移図の抽象概念で表すことができる。プライマーの状態は、その 3' 末端のドメインにより示され、図中、各々の有効辺は、単一のヘアピン種を用いて実現される。例えば、状態 1 及び状態 2 の間の辺は、2 ドメイン配列を有する 1 ドメインで終了する鎖の伸長を触媒するヘアピンの存在を示す。この抽象的概念は、システムの機能を表し、ヘアピン及びプライマードメインに直接編集することができる。

20

30

【 0 0 3 0 】

このプログラム可能性のモデルは、環境トリガーに応答して触媒分子を条件付きで露出させることにより、さらに明確にすることができ、これによって、プライマー交換反応物は、局所環境に動的に応答することができる。これは、例えば、以下に論じるように、シグナル記録及びプロセッシング適用を可能にする。

【 0 0 3 1 】

1つのヘアピン触媒反応物のアウトプットプライマー配列を、別のものに対するインプットプライマーとして機能させることにより、プライマー交換反応物 (P E R) を一緒に、反応カスケードに連結することが容易にできる (図 2 A)。図 2 A (i) は、5 ドメイン配列の合成のために使用される分子成分を示す。各ドメインを結び付けるために1つのヘアピンが用いられており、図 2 A (i i) に反応プロセスを示す。図 2 A (i i i) は、溶液中に存在する5つのヘアピンの様々なサブセットを用いて実施される合成反応の結果を示す。図 2 A (i v) は、80の異なる触媒ヘアピン分子と40のプライマーを用いた40のDNA折り紙ステーブル鎖の合成をワンポット反応で実施することができることを示す。スカフォールド鎖と組み合わせ、アニールすると、これらのステーブルは、DNA折り紙構造を形成し、これらの構造は、一緒に凝集して、長い構造を形成することができる。

40

【 0 0 3 2 】

一部の実施形態では、プライマー交換反応 (P E R) システムは、経路から外れた漏出反

50

応を数桁の規模で低減することによって、頑健なシステムに動力を供給する。P E R システムに動力を供給する鎖置換重合カスケードは、新しい情報を動的に合成し、活性化エネルギーは、漏出重合反応を開始する目的のために高い。これらの低漏出システムを用いて、一部の実施形態では、頑健且つスケラブルな分子システムを構築することができる。さらに、本明細書に記載される P E R システムは、溶液中の核酸鎖のセットに自由エネルギー地形を昇らせて、大空間のプログラム可能な挙動、並びに無酵素（例えば、ポリメラーゼ）系では熱力学的に不可能な操作の達成可能性を賦与することができる。エネルギーは、重合反応を介してシステムに導入され、P E R は、燃料として安価な d N T P により動力を連続的に供給される。一部の実施形態では、d N T P 濃度は、プライマー交換反応システムが、長時間にわたって動作する上で十分なものであり、濃度の調節又は d N T P の補充によって、この動作時間はさらに延長される。さらにまた、P E R システムは、鎖をインサイチュで合成する。例えば、固定細胞内部に局在化したプライマーは、適切な位置で直接重合することができるため、密集した細胞環境中に大きなオリゴヌクレオチドを送達する課題が解消される。この能力は、大きな構造をインサイチュで組織化する（成長させる）多くの可能性と共に、広範な適用の余地を切り開いた。さらには、P E R システムは、一部の実施形態において、1 分子解像を有し、溶液中のプライマー分子毎に 1 つの転写物を自動的に成長させる。各転写物は、状態遷移図グラフ中にそれが横断した状態の順序組織化を経時的に示し、これは、ゲル上で読み取ることができる進行の長さ情報と、シーケンシングによって取得することができるより正確な情報を含む。これらの転写物は、例えば、環境シグナルが溶液中に存在したときの転写物を経時的に記録するために、操作することができる。

10

20

【0033】

一部の実施形態において、個別の P E R 合成反応は、条件付きで活性になり（図 23A ~ 23D 及び図 26A ~ 26D）、考えられるプログラム可能な挙動の大きく且つ多様なセット、並びにインサイチュで環境シグナルを記録する機会を可能にするように、プログラムすることができる。図 23A ~ 23D は、発癌性 m i R N A 標的、m i R - 19a が、マウス細胞中でアポトーシスを促進することが判明した D N A ザイム、D Z - T W T の合成をどのようにしてトリガーすることができるかを示す。D N A ザイム挙動は、D Z - T W T 標的、T W T の断片の切断を視覚化することによって、確認される（図 23E）。図 26A ~ 26D は、同じ 2 つ標的、m i R - 19a 及び T W T が、溶液中で遭遇する順序を記録するために、どのようにしてプライマー交換反応を用いることができるかを示す。

30

【0034】

全体として、本明細書に記載されるプライマー交換反応は、分子プログラミングのための新規のパラダイムを、その触媒活性、モジュール性、頑健性、基礎燃料種（d N T P）、インサイチュ操作、及び 1 分子転写記録と共に提供する。

【0035】

プライマー交換組成物及びシステム

触媒核酸分子（「触媒分子」）は、一般に、不對（一本鎖）3' トーホールドドメインと、3' トーホールドドメイン（一部の実施形態では、これに直接隣接して）から 5' 側の対（二本鎖）ドメインを含む。「触媒ヘアピン分子」は、ループドメインも含む。プライマー交換反応の動態学は、例えば、触媒分子（例えば、触媒分子の 1 つ若しくは複数のドメイン）の長さ、組成及び濃度を変更することによって、制御することができる。

40

【0036】

触媒ヘアピン（例えば、例示的な例として図 1A を参照）は、ヘアピンループドメイン（ループ様構造）に連結したヘアピンステムドメイン（例えば、サブドメイン「2」とサブドメイン「2'」の分子内結合により形成された）に連結した 3' トーホールドドメイン（「1'」）を含む。ループドメインのない触媒分子の例を図 24 に示す（「デュプレックス」）。触媒分子（例えば、触媒ヘアピン分子）の長さは変動し得る。一部の実施形態では、触媒分子は、25 ~ 300 ヌクレオチド長である。例えば、触媒分子は、25 ~ 250、25 ~ 200、25 ~ 150、25 ~ 100、25 ~ 50、50 ~ 300、50 ~ 25

50

0、50～200、50～150又は50～100ヌクレオチド長であってよい。一部の実施形態では、触媒分子は、30～50、40～60、50～70、60～80、70～90、80～100、100～125、100～150又は100～200ヌクレオチド長であってよい。一部の実施形態では、触媒分子は、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99又は100ヌクレオチド長であってよい。触媒分子は、一部の実施形態において、300ヌクレオチドより長い、又は25ヌクレオチドより短い。

10

【0037】

「トーホールドドメイン」とは、触媒分子の3'末端に位置するヌクレオチドの不对配列を指し、プライマー（又はプライマーのプライマードメイン）のヌクレオチド配列と相補的である（且つ結合する）。トーホールドドメインの長さは、変動し得る。一部の実施形態では、トーホールドドメインは、5～40ヌクレオチド長である。例えば、トーホールドドメインは、2～35、2～30、2～25、2～20、2～15、2～10、5～35、5～30、5～25、5～20、5～15、5～10、10～40、10～35、10～30、10～25、10～20、10～15、15～40、15～35、15～30、15～25、15～20、20～40、20～35、20～30、20～25、25～40、25～35、25～30、30～40、30～35又は35～40ヌクレオチド長であってよい。一部の実施形態では、トーホールドドメインは、5、10、15、20、25、30、35又は40ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、トーホールドドメインは、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長である。トーホールドドメインは、一部の実施形態において、40ヌクレオチドより長い、又は5ヌクレオチドより短い。

20

【0038】

初期プライマー（又はプライマードメイン）は、触媒分子の3'不对（一本鎖）トーホールドドメインと結合して、プライマー交換反応を開始する。この反応（例示的な例として図1Aを参照）では、初期インプットプライマー（「1」）は、触媒分子のトーホールドドメイン（「1'」）と結合し、反応溶液中に存在する鎖置換ポリメラーゼによるプライマーの延長が、分岐移動プロセスによって、触媒分子のステムドメインのサブドメインの1つ（「2」）を置換する。全体的効果は、ヘアピンステムドメインのサブドメインの1つ（「2'」）が、延長された（新しく合成された）プライマードメインで置換されることである。

30

【0039】

触媒分子の「対ドメイン」又は「ステムドメイン」は、触媒分子の不对トーホールドドメイン（一部の実施形態では、これに直接隣接して）から5'側に位置するヌクレオチドの対配列（例えば、ワトソン・クリック型核酸塩基対）を指す。触媒分子の対ドメインは、置換鎖と、トーホールドドメインを含有するテンプレート鎖とのヌクレオチド塩基対により形成される。触媒ヘアピン分子の対ステムドメインは、触媒ヘアピン分子の2つのサブドメインの分子内塩基対（同じ分子内のヌクレオチド同士の塩基対）：例えば、触媒ヘアピンの5'末端に位置するサブドメインと結合（ハイブリダイズ）したトーホールドドメインから5'側に位置する内部/中央サブドメインにより形成される。対ドメインの長さは、変動し得る。一部の実施形態では、対ドメインは、5～40ヌクレオチド長である。例えば、対ドメインは、5～35、5～30、5～25、5～20、5～15、5～10、10～40、10～35、10～30、10～25、10～20、10～15、15～40、15～35、15～30、15～25、15～20、20～40、20～35、20～30、20～25、25～40、25～35、25～30、30～40、30～35又は35～40ヌクレオチド長であってよい。一部の実施形態では、対ドメインは、5、10、

40

50

15、20、25、30、35又は40ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、対ドメインは、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長である。対ドメインは、一部の実施形態において、40ヌクレオチドより長い、又は5ヌクレオチドより短い。

【0040】

対ドメインは、一般に、触媒分子の2つのサブドメインの分子内塩基対により形成されるが、この対ドメインは、少なくとも1つのミスマッチ対（例えば、AとC若しくはGの対、又はTとC若しくはGの対）を含有し得ることは理解すべきである。一部の実施形態では、ステムドメインは、1～5のミスマッチヌクレオチド塩基対を有する。例えば、対ドメインは、1、2、3、4又は5のミスマッチヌクレオチド塩基対を有し得る。

10

【0041】

一部の実施形態では、置換ポリメラーゼによるプライマー（プライマー結合部位に結合してる）の延長は、重合を終結させる触媒分子中の分子又は修飾の存在によって終結する。従って、一部の実施形態では、本開示の触媒分子は、重合を終結させる分子又は修飾を含む。重合を終結させる分子又は修飾（「ストッパー」）は、典型的には、対ドメインによって、重合がプライマーの延長を終結させるように、触媒分子の対ドメイン（例えば、ステムドメイン）内に位置する。ヘアピンの形状で配置された触媒分子の場合、重合を終結させる分子又は修飾は、対ステムドメインとループドメインとの間に位置してもよい。一部の実施形態では、重合を終結させる分子は、合成非DNAリンカー、例えば、Int Spacer 9 (iSp9) 又はSpacer 18 (Integrated DNA Technologies (IDT)) などのトリエチレングリコールスペーサである。ポリメラーゼによる重合を終結させる任意の非ネイティブリンカーを本明細書に記載のように使用してもよいことは理解すべきである。こうした分子及び修飾の他の非限定的な例として、三炭素結合 (/iSpC3/) (IDT)、ACRYDITE (商標) (IDT)、アデニル化、アジ化物、ジゴキシゲニン (NHSEステル)、コレステリル-TEG (IDT)、I-LINKER (商標) (IDT)、及び3-シアノビニルカルバゾール (CNVK) 並びにこれらの変異体が挙げられる。典型的には、しかし常にではないが、短いリンカー（例えば、iSp9）は、より高速の反応時間をもたらす。

20

【0042】

一部の実施形態では、重合を終結させる分子は、それぞれ、シトシン及びグアニンの化学変異体であるiso-dG及びiso-dC (IDT) などの単一又は対の非天然ヌクレオチド配列である。Iso-dCは、Iso-dGと塩基対合（水素結合）するが、dGとはしない。同様に、Iso-dGは、Iso-dCと塩基対合するが、dCとはしない。ヘアピンの反対側の対のストッパー位置にこれらのヌクレオチドを組み込めば、ポリメラーゼは、その位置に付加すべき溶液中の相補的ヌクレオチドを持たないため、停止される。

30

【0043】

一部の実施形態では、「ストッパー」修飾の性能の効率は、反応物中のdNTPの濃度を（例えば、200 µMから）100 µM、10 µM、1 µM、又はそれ以下まで低下させることによって向上する。

【0044】

重合を終結させる分子又は修飾の含有は、分子又は修飾が対ではないため、触媒分子の二本鎖ドメイン（例えば、ヘアピン構造のステムドメイン）中に「バルジ」を生成することが多い。従って、一部の実施形態では、触媒分子は、分子又は修飾の反対側に、単一のヌクレオチド（例えば、チミン）、少なくとも2つの同じヌクレオチド（例えば、チミン二量体 (TT) 若しくは三量体 (TTT)）、又は非天然修飾を含有するように設計される。

40

【0045】

触媒ヘアピンの「ループドメイン」は、ステムドメイン（に隣接して）の末端ループ様構造を形成するヌクレオチドの、主として不對の配列を指す。ループドメインの長さは、変動し得る。一部の実施形態では、ループドメインは、3～200ヌクレオチド長である。例えば、ループドメインは、3～175、3～150、3～125、3～100、3～75、3～50、3～25、4～175、4～150、4～125、4～100、4～75

50

、4～50、4～25、5～175、5～150、5～125、5～100、5～75、5～50又は5～25ヌクレオチド長であってよい。一部の実施形態では、ループドメインは、3～10、3～15、32～10、3～25、3～30、3～35、3～40、3～35、3～40、3～45、3～50、4～10、4～15、4～10、4～25、4～30、4～35、4～40、4～35、4～40、4～45又は4～50ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、ループドメインは、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、45、46、47、48、49又は50ヌクレオチド長である。ループドメインは、一部の実施形態において、300ヌクレオチドより長い。

10

【0046】

一部の実施形態では、触媒分子は、ヘアピンループドメインを含まない。例えば、触媒分子は、単純に、ステムドメイン（隣接するループドメインを含まない）と同様の、対ドメインと隣接する3'不対トーホールドドメインを含むデュプレックス（例えば、図24「デュプレックス」を参照）であってよい。ループドメインを含まない触媒分子は、1区間（例えば、10以上の）ヌクレオチド塩基対の間の架橋又はヌクレオチド塩基相補性によって、3'トーホールドドメインと反対側の末端で安定化してもよい。

【0047】

触媒ヘアピン以外に、プライマー交換反応システムは、インプットプライマー又はアウトプットプライマーと呼ばれるプライマーを含む。「プライマー」は、別の核酸と結合すると、ポリメラーゼの存在下で、重合の開始点となる核酸である。本明細書で使用される場合、プライマーは、典型的に、触媒分子のトーホールドドメインと相補的なヌクレオチド配列（ドメイン）を有する（例えば、図1A左上の分子「1」、を参照；また、図1B左上の分子「1+2」も参照されたい）。「インプットプライマー」は、触媒分子と結合して、プライマー交換反応を開始するプライマーである。「アウトプットプライマー」は、プライマー交換反応の各ステップの終了時に触媒分子から放出される延長産物である。アウトプットプライマーは、触媒分子からの解離後、プライマー交換反応の別の（次の）ステップでインプットプライマーの役割を果たし得る。

20

【0048】

プライマー交換反応の完全な「ステップ」を図1Aに示す。インプットプライマー（「1」）は、触媒分子のトーホールドドメイン（「1'」）と結合して、プライマー交換反応を開始する。ポリメラーゼ（例えば、鎖置換ポリメラーゼ）及びdNTPを含有する反応溶液中の触媒分子と結合すると、初期プライマーは、対ドメインを介して伸長され、対ドメイン中のサブドメイン（「2」）を置換する。置換されたサブドメイン（「2」）は、続いて、その相補的サブドメイン（「2'」）との結合（再アニーリング）について延長プライマー（「1+2」）と競合し、延長アウトプットプライマー「1+2」を置換する。これによって、プライマー交換反応のステップが完了する。その後、置換されたアウトプットプライマー「1+2」は、次の反応ステップで、引き続きインプットプライマーとして機能し得る。

30

【0049】

例えば、図1Bに示すように、プライマー交換反応の別のステップで、置換されたアウトプットプライマー「1+2」は、インプットプライマーとしての役割を果たし、そのプライマードメイン「2」を介して別の触媒分子のトーホールドドメイン「2'」に結合することにより、プライマー交換反応における別のステップを開始する。ポリメラーゼ及びdNTPを含有する反応溶液中の触媒分子と結合すると、インプットプライマー「1+2」は、対ドメインを介して伸長され、対ドメインのサブドメイン（「3」）を置換する。この置換されたサブドメイン（「3」）は、続いて、その相補的サブドメイン（「3'」）との結合（再アニーリング）について延長プライマー（「1+2+3」）と競合し、これにより、延長アウトプットプライマー「1+2+3」を置換する。これによって、プライマー

40

50

交換反応の別のステップが完了する。その後、置換されたアウトプットプライマー「1 + 2 + 3」は、次の反応ステップで、引き続きインプットプライマーとして機能し得る。

【0050】

一部の実施形態では、プライマー又はプライマードメイン（触媒分子のトーホールドドメインと結合するヌクレオチド配列）は、10～50ヌクレオチド長である。例えば、プライマー又はプライマードメインは、10～45、10～40、10～35、10～30、10～25、10～20、10～15、15～50、15～45、15～40、15～35、15～30、15～25、15～20、20～50、20～45、20～40、20～35、20～30、20～25、25～50、25～45、25～40、25～35、25～30、30～50、30～45、30～40、30～35、35～50、35～45、35～40、40～50、40～45又は45～50ヌクレオチド長であってよい。一部の実施形態では、プライマー又はプライマードメインは、10、15、20、25、30、35、40、45又は50ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、プライマー又はプライマードメインは、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長である。プライマー又はプライマードメインは、一部の実施形態において、50ヌクレオチドより長い、又は10ヌクレオチドより短い。プライマーの完全長は、少なくとも部分的に、付加（重合）配列の数及び長さに応じて変動し、これらが、反応物中に存在する触媒分子の数及び長さに左右されることは理解すべきである。

【0051】

本明細書に記載するプライマーは、検出可能な分子（例えば、蛍光又は化学発光シグナルなどの検出可能なシグナルを発する分子）に連結（で標識）してもよい。一部の実施形態では、標識は、蛍光色素である。蛍光色素又は他の蛍光／化学発光分子と連結したプライマーは、単純に「蛍光プライマー」と呼ばれる。本明細書で 사용할 ことができる蛍光色素の例として、限定はしないが、ヒドロキシクマリン、メトキシクマリン、Alexa Fluor、アミノクマリン、Cy2、FAM、Alexa fluor 405、Alexa fluor 488、Fluorescein FITC、Alexa fluor 430、Alexa fluor 532、HEX、Cy3、TRITC、Alexa fluor 546、Alexa fluor 555、R-phycoerythrin（PE）、Rhodamine Red-X、Tamara、Cy3.5 81、Rox、Alexa fluor 568、Red 613、Texas Red、Alexa fluor 594、Alexa fluor 633、Allophycocyanin、Alexa fluor 647、Cy5、Alexa fluor 660、Cy5.5、TruRed、Alexa fluor 680、Cy7及びCy7.5が挙げられる。検出可能なシグナルを発する他の蛍光色素及び分子は、本開示に包含される。

【0052】

一部の実施形態では、検出可能な分子は、プライマーではなく、むしろ触媒分子に連結される。

【0053】

一部の実施形態では、検出可能な分子は、例えば、図27Dに示すように、成長する核酸鎖に組み込まれる。従って、一部の実施形態では、検出可能な分子は、チオフラビン（Thioflavin）（ThT）であり、これは、ヒトテロメア配列TTAGGGの連結反復配列中に挿入される。他の検出可能な挿入分子は本明細書に包含される。

【0054】

一部の実施形態では、プライマーは、生体分子に連結される。生体分子としては、例えば、核酸（例えば、DNA又はRNA）及びタンパク質が挙げられる。生体分子は、治療、予防、診断又はイメージング用分子であってよい。一部の実施形態では、生体分子は、癌関連遺伝子若しくはタンパク質、又はFDA承認若しくは潜在的薬物標的などの疾患関連又は薬物関連生体分子である。一部の実施形態では、生体分子は、酵素、抗原、受容体、リガンド、膜タンパク質、分泌されたタンパク質、又は転写因子である。

【0055】

一部の実施形態では、触媒分子は、生体分子に連結される。

【0056】

プライマー交換反応は、ポリメラーゼの使用を必要とする。一部の実施形態では、ポリメラーゼは、DNA鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼ（鎖置換ポリメラーゼ）などのDNAポリメラーゼ（DNAP）である。「鎖置換」は、合成中に遭遇する下流のDNAを置換する能力を意味する。本明細書に記載されるように、使用することができるDNA鎖置換活性を有するポリメラーゼの例として、限定はしないが、phi29 DNAポリメラーゼ（例えば、NEB #M0269）、Bst DNAポリメラーゼ、ラージフラグメント（例えば、NEB #M0275）、又はBsu DNAポリメラーゼ、ラージフラグメント（例えば、NEB #M0330）が挙げられる。鎖置換活性を有する他のポリメラーゼを用いてもよい。一部の実施形態では、ポリメラーゼは、RNAポリメラーゼである。

【0057】

一部の実施形態では、ポリメラーゼは、phi29 DNAポリメラーゼである。こうした実施形態において、反応条件は、次の通りであってよい：精製済ウシ血清アルブミン（BSA）で補充した1×反応バッファー（例えば、50mM Tris-HCl、10mM MgCl₂、10mM (NH₄)₂SO₄、4mM DTT）、pH7.5、30 でインキュベート。

【0058】

一部の実施形態では、ポリメラーゼは、Bst DNAポリメラーゼ、ラージフラグメントである。こうした実施形態において、反応条件は、次の通りであってよい：1×反応バッファー（例えば、20mM Tris-HCl、10mM (NH₄)₂SO₄、10mM KCl、2mM MgSO₄、0.1%TRITON（登録商標）X-100）、pH8.8、65 でインキュベート。

【0059】

一部の実施形態では、ポリメラーゼは、Bsu DNAポリメラーゼである。こうした実施形態において、反応条件は、次の通りであってよい：1×反応バッファー（例えば、50mM NaCl、10mM Tris-HCl、10mM MgCl₂、1mM DTT）、pH7.9、37 でインキュベート。

【0060】

プライマー交換反応システム中のプライマー、触媒分子及びdNTPの濃度は、例えば、具体的な適用、及びその具体的な適用に要求される速度論に応じて変動し得る。

【0061】

プライマー交換反応中のプライマーの濃度は、例えば、10nM～1000nMであってよい。一部の実施形態では、プライマー交換反応中のプライマーの濃度は、10～20、10～30、10～40、10～50、10～60、10～70、10～80、10～90、10～100、10～125、10～150、10～200、25～50、25～75、25～100、25～150、25～200、50～75、50～100、50～150又は50～200nMである。一部の実施形態では、プライマー交換反応中のプライマーの濃度は、100～200、100～300、100～400、100～500、100～600、100～70、100～800、100～900又は100～1000nMである。一部の実施形態では、プライマー交換反応中のプライマーの濃度は、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195又は200nMである。一部の実施形態では、プライマー交換反応中のプライマーの濃度は、100、200、300、400、500、600、700、800、900又は1000nMである。プライマー交換反応中のプライマーの濃度は、10nM未満又は1000nM超であってもよい。

【0062】

プライマー交換反応中の触媒分子（例えば、触媒ヘアピン）の濃度は、例えば、5nM～1000nMであってよい。一部の実施形態では、プライマー交換反応中の触媒分子の濃度は、5～10、5～20、5～30、5～40、5～50、5～60、5～70、5～

10

20

30

40

50

80、5～90、5～100、5～125、5～150、5～200、10～50、10～75、10～100、10～150、10～200、25～75、25～100、25～125又は25～200 nMである。一部の実施形態では、プライマー交換反応物中の触媒分子の濃度は、10～200、10～300、10～400、10～500、10～600、10～70、10～800、10～900又は10～1000 nMである。一部の実施形態では、プライマー交換反応物中の触媒分子の濃度は、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195又は200 nMである。一部の実施形態では、プライマー交換反応物中の触媒分子の濃度は、10、20、30、40、50、60、70、80、90又は100 nMである。プライマー交換反応物中の触媒分子の濃度は、5 nM未満又は1000 nM超であってもよい。

10

【0063】

プライマー交換反応中のプライマーと触媒分子の比は、2：1～100：1であってよい。一部の実施形態では、プライマーと触媒分子の比は、2：1、3：1、4：1、5：1、6：1、7：1、8：1、9：1、10：1、11：1、12：1、13：1、14：1、15：1、16：1、17：1、18：1、19：1又は20：1である。一部の実施形態では、プライマーと触媒分子の比は、30：1、40：1、50：1、60：1、70：1、80：1又は90：1である。

20

【0064】

プライマー交換反応中の異なる触媒分子の数は、非限定的である。プライマー交換反応は、1～10¹⁰個の異なる触媒分子（各々、例えば、特定のトーホールドドメイン配列を有する）を含んでもよい。一部の実施形態では、プライマー交換反応は、1～10、1～10²、1～10³、1～10⁴、1～10⁵、1～10⁶、1～10⁷、1～10⁸、1～10⁹、1～10¹⁰個、又はそれ以上の異なる触媒分子を含む。一部の実施形態では、プライマー交換反応は、1～5、1～10、1～15、1～20、1～25、1～30、1～35、1～40、1～45、1～50、1～55、1～60、1～65、1～70、1～75、1～80、1～85、1～90、1～95、1～100、5～10、5～15、5～20、5～25、5～30、5～35、5～40、5～45、5～50、5～55、5～60、5～65、5～70、5～75、5～80、5～85、5～90、5～95、5～100、10～15、10～20、10～25、10～30、10～35、10～40、10～45、10～50、10～55、10～60、10～65、10～70、10～75、10～80、10～85、10～90、10～95又は10～100個の異なる触媒分子を含む。一部の実施形態では、プライマー交換反応は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、28、19、20、21、22、23、24又は25個の異なる触媒分子を含む。触媒分子は、例えば、トーホールドドメインが互いに異なっていれば、互いに異なる。

30

【0065】

プライマー交換反応の速度論は、例えば、温度、時間、バッファー／塩条件、及びデオキシリボヌクレオチド三リン酸（dNTP）濃度を变化させることにより制御され得る。ほとんどの酵素と同様、ポリメラーゼは、イオン強度、pH及び存在する金属イオンの種類（例えば、ナトリウムイオン対マグネシウムイオン）をはじめとする様々なバッファー条件に対して感受性である。従って、プライマー交換反応が実施される温度は、例えば、4～65（例えば、4、25、37、42又は65）の範囲で変動し得る。一部の実施形態では、プライマー交換反応が実施される温度は、4～25、4～30、4～35、4～40、4～45、4～50、4～55、4～60、10～25、10～30、10～35、10～40、10～45、10～50、10～55、10～60、25～30、25～35、25～40、25～45、25～50、25～55、25～

40

50

60、25 ~ 65、35 ~ 40、35 ~ 45、35 ~ 50、35 ~ 55、35 ~ 60、又は35 ~ 65である。一部の実施形態では、プライマー交換反応は室温で実施されるが、他の実施形態では、プライマー交換反応は、37で実施される。

【0066】

プライマー交換反応は、30分(min) ~ 24時間(hr)にわたって実施(インキュベート)してよい。一部の実施形態では、プライマー交換反応は、10分、35分、40分、45分、50分、55分、60分、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、18時間又は24時間にわたって実施される。

【0067】

デオキシリボヌクレオチド(dNTP)は、プライマー交換反応を駆動する「燃料」である。従って、一部の実施形態では、プライマー交換反応の速度論は、反応物中のdNTPの濃度に大きく依存する。プライマー交換反応物中のdNTPの濃度は、例えば、2 ~ 1000 µMであってよい。一部の実施形態では、プライマー交換反応物中のdNTPの濃度は、2 ~ 10 µM、2 ~ 15 µM、2 ~ 20 µM、2 ~ 25 µM、2 ~ 30 µM、2 ~ 35 µM、2 ~ 40 µM、2 ~ 45 µM、2 ~ 50 µM、2 ~ 55 µM、2 ~ 60 µM、2 ~ 65 µM、2 ~ 70 µM、2 ~ 75 µM、2 ~ 80 µM、2 ~ 85 µM、2 ~ 90 µM、2 ~ 95 µM、2 ~ 100 µM、2 ~ 110 µM、2 ~ 120 µM、2 ~ 130 µM、2 ~ 140 µM、2 ~ 150 µM、2 ~ 160 µM、2 ~ 170 µM、2 ~ 180 µM、2 ~ 190 µM、2 ~ 200 µM、2 ~ 250 µM、2 ~ 300 µM、2 ~ 350 µM、2 ~ 400 µM、2 ~ 450 µM、2 ~ 500 µM、2 ~ 600 µM、2 ~ 700 µM、2 ~ 800 µM、2 ~ 900 µM又は2 ~ 1000 µMである。例えば、プライマー交換反応物中のdNTP濃度は、2 µM、5 µM、10 µM、15 µM、20 µM、25 µM、30 µM、35 µM、40 µM、45 µM、50 µM、55 µM、60 µM、65 µM、70 µM、75 µM、80 µM、85 µM、90 µM、95 µM、100 µM、105 µM、110 µM、115 µM、120 µM、125 µM、130 µM、135 µM、140 µM、145 µM、150 µM、155 µM、160 µM、165 µM、170 µM、175 µM、180 µM、185 µM、190 µM、195 µM又は200 µMであってよい。一部の実施形態では、プライマー交換反応物中のdNTPの濃度は、10 ~ 200 µM、10 ~ 300 µM、10 ~ 400 µM、10 ~ 500 µM、10 ~ 600 µM、10 ~ 700 µM、10 ~ 800 µM、10 ~ 900 µM又は10 ~ 1000 µMである。

【0068】

一部の実施形態では、dNTP変異体を使用する。例えば、PERシステムは、ホットスタート/クリーンアンプ(hot start/clean amp) dNTP、ホスホロチオエートdNTP、又は蛍光dNTPを使用し得る。他のdNTP変異体を用いてもよい。一部の修飾dNTPは、通常の(非修飾)DNA-DNA結合より好ましくないため、その使用によってヘアピン戻し置換プロセスが増大し得る。同様に、一部の実施形態では、触媒分子に関して、合成プライマーよりも強力な結合を形成することにより、PERの速度を高めるために、様々なタイプの核酸(例えば、LNA、RNA又はメチルdC若しくはスーパーTIDT修飾などの散在修飾塩基)を含むヘアピンを用いてもよい。

【0069】

一部の実施形態では、触媒分子は、蛍光色素又はタンパク質などの生体分子に共有結合している。一部の実施形態では、触媒分子はビオチン修飾を含むことから、ビオチン-ストレプトアビジン結合によってこれらを表面にテザリングしてもよい。一部の実施形態では、合成分子は、1つのサブドメイン内にアジ化物修飾などの修飾を含むが、これにより、クリックケミストリーを介して、これらをアルキンなどの他の分子と共有結合させることができる。他の化学的及び生物学的結合は、本開示に包含される。

【0070】

本開示の核酸は、天然には存在しないことを理解すべきである。従って、核酸は、「改変

10

20

30

40

50

核酸」と呼ぶことができる。「改変核酸」は、天然には存在しない核酸（例えば、互いに共有結合し、また、いくつかの事例では、ホスホジエステル「骨格」と呼ばれるホスホジエステル結合を含む少なくとも2つのヌクレオチド）である。改変核酸は、組換え核酸及び合成核酸を包含する。「組換え核酸」は、核酸（例えば、単離された核酸、合成核酸又はそれらの組合せ）を連結することにより構築され、また、一部の実施形態では、生きた細胞内で複製することができる分子である。「合成核酸」は、増幅された、又は化学的に、若しくは他の手段で、合成された分子である。合成核酸は、化学的に修飾されているか、又は他の方法で修飾されているが、天然に存在する核酸分子と塩基対合する（また、例えば、一過性若しくは安定に「結合する」とも呼ばれる）ことができる。組換え及び合成核酸は、前述した分子のいずれかの複製から得られた分子も含む。

10

【0071】

概して、改変核酸は、天然に存在しないが、野生型ヌクレオチド配列を含む場合もある。一部の実施形態では、改変核酸は、異なる生物から得られた（例えば、異なる種から得られた）ヌクレオチド配列を含み得る。例えば、一部の実施形態では、改変核酸は、マウスヌクレオチド配列、細菌ヌクレオチド配列、ヒトヌクレオチド配列、ウイルスヌクレオチド配列、又はこれらの配列のいずれか2つ以上の組合せを含む。一部の実施形態では、改変核酸は、1つ又は複数のランダム塩基を含む。

【0072】

一部の実施形態では、本開示の改変核酸は、ホスホジエステル骨格以外の骨格を含んでもよい。例えば、改変核酸は、一部の実施形態において、ホスホロアミダイト、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、O-メチルホスホロアミダイト結合、ペプチド核酸又はこれらの結合のいずれか2つ以上の組合せを含んでもよい。改変核酸は、記載される通り、一本鎖（s s）若しくは二本鎖（d s）であってもよいし、又は改変核酸は、一本鎖及び二本鎖配列の部分を含むしてもよい。一部の実施形態では、改変核酸は、三本鎖配列、又はG-カルテット（G-quartet）、G-4構造（G-quadruplex）、及びi-モチーフなどの他の非ワトソン・クリック型塩基対の部分を含む。改変核酸は、例えば、DNA（例えば、ゲノムDNA、cDNA若しくはゲノムDNAとcDNAの組合せ）、RNA又はハイブリッド分子を含んでもよく、その場合、核酸は、デオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチド（例えば、人工若しくは天然）の任意の組合せ、並びにウラシル、アデニン、チミン、シトシン、グアニン、イノシシ、キサンチン、ヒポキサンチン、イソシトシン及びイソグアニンをはじめとする2つ以上の塩基の任意の組合せを含む。

20

30

【0073】

本開示の改変核酸は、標準的分子生物学方法を用いて生成することもできる（例えば、Green and Sambrook, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2012, Cold Spring Harbor Pressを参照）。一部の実施形態では、核酸は、GIBSON ASSEMBLY（登録商標）Cloning（例えば、Gibson, D.G. et al. Nature Methods, 343-345, 2009; and Gibson, D.G. et al. Nature Methods, 901-903, 2010を参照、これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる）を用いて生成される。GIBSON ASSEMBLY（登録商標）は、典型的に、シングルチューブ反応で3つの酵素活性：5'エキソヌクレアーゼ、DNAポリメラーゼの3'延長活性、及びDNAリガーゼ活性を使用する。5'エキソヌクレアーゼ活性は、5'末端配列を分解し直し、アニーリングのために相補的配列を露出させる。次に、ポリメラーゼ活性は、アニーリングされたドメインのギャップを充填する。続いて、DNAリガーゼが、切れ目を封止し、DNA断片を互いに共有結合する。結合する断片のオーバーラップ配列は、Golden Gate Assemblyで使用されるものよりはるかに長いことから、より高い割合で正しい集合体得られる。改変核酸を生成する他の方法は、当技術分野で公知であり、本開示に従って使用することができる。

40

【0074】

本明細書では、DNA折り紙「スカフォールド」及び「ステーブル」鎖について述べる。これらは、当技術分野で公知の用語である⁶⁰。スカフォールド鎖は、典型的に、長さが200ヌクレオチドを超える長い一本鎖核酸（例えば、DNA）である。ステーブル鎖は

50

、典型的に、長さが200ヌクレオチド以下の短い一本鎖核酸（オリゴヌクレオチド）である。200ヌクレオチド（これより長い、又は短い）の長さ自体は、DNA折り紙システムの構成要素を定義する上で重要ではなく、むしろ相対長さが一般に重要であることを理解すべきである。DNAスカフォールド鎖は、複数の短いステープル鎖よりも長いいため、短いステープル鎖を用いて（ヌクレオチド塩基相補性により）、長いスカフォールド鎖を任意の形状（例えば、2D又は3D構造）に折り畳む。

【0075】

プライマー交換方法及び適用

胚発生中に、環境シグナルと組み合わせた速度論的経路によって、器官及び脚などの複雑な機能性構造の組織化が起こる。速度論、シグナル伝達及び構造、並びに生物系における驚くべきレベルのプログラム可能性及び複雑性の間のこの密接な関係に、本開示は、少なくとも一部が基づくものである。今日まで、アニーリングプロトコルにより形成することができる構造の複雑さに一層近い環境シグナルに応じて形状を動的に形成することはほとんど不可能であった。本明細書に記載するプライマー交換技術は、この隔たりを克服する。PERをツールとして使用することができるいくつかの用途の例を図6、7、11及び18に描くと共に、以下に説明する。

【0076】

トリガーされた構造の成長及び折り畳み

一部の実施形態では、プライマー交換反応（PER）を用いて、長い固定長さ核酸鎖を合成する（図7A）。核酸鎖の長さは、反応物中の触媒分子の長さ及び数をはじめとするいくつかの要因に応じて変動する。触媒反応（プライマー結合、プライマーの鎖置換伸長及び分岐移動など；図1を参照）の各々が、成長する核酸鎖にドメインを付加する。全てのプライマー及び触媒分子成分は比較的小さいことから、完全に合成された核酸スカフォールドの直接送達が可能となり得る固定細胞におけるものなど、密集環境において鎖合成を実施することができる。

【0077】

規定された1D成長（組織化）の各ステップは、新しいプライマー配列を付加する（例えば、図2の下のパネル参照）ため、プライマー交換反応を用いて、任意の数のアニーリングプロトコルにより、相補的核酸ドメインに基づく折り畳まれた形状をプログラムすることができる（図7B）9、27、38、51～53。プライマー交換反応は等温で動作し、しかも、広範囲の温度及び塩条件の下で動作するように、その速度論を調整することができることから、この方法を用いて、複雑な構造の組織化をトリガーすることができる。これらの複雑な構造は、例えば、Cryo-EM（電子顕微鏡）及び他のタイプのイメージングのマーカとして、又はタンパク質及び他の生体分子のパターン形成のためのスカフォールドとして使用してもよい。

【0078】

スカフォールド鎖（例えば、長さが100ヌクレオチドを超える、長い一本鎖核酸）を特定の形状に折り畳むことによって、構造を組織化する以外に、プライマー交換反応は、指数関数的成長速度論を用いて構造を設計することにより、時間効率的に大型構造を構築するために使用することができる。例えば、大型構造は、樹状スカフォールディング骨格を組織化することによって生成され得る（図7C）。この骨格は、一部の実施形態では、様々な2D及び3D形状に折り畳むこともできる。例えば、図10A～10C（実施例5を参照）に描く分岐方法を用いて、類似サイズの構造を、骨格の全長と共にほぼ線形に変化する時間を伴う線形スカフォールド合成法よりもはるかに短時間で組織化することができる。これによって、インサイチュでの大型構造のはるかに時間効率的な構築が可能になる。

【0079】

分子時計及びタイマー

本開示のプライマー交換反応システムはまた、例えば、任意の分子事象（例えば、物理的又は化学的シグナルに対する曝露）間の時間を計測し、インサイチュでそれらをDNA中でコードする（「分子時計」として機能する）ことができる合成システムを作製するため

10

20

30

40

50

に使用することもできる。P E Rは、シグナルのネイティブ環境において、また、一部の実施形態では、複数のシグナルを同時に検出するための速度論、さらにはその可能性を妨害し得る蛍光タグ付け又はバーコード化を一切用いずに、シグナルを直接測定することができる。一部の実施形態では、P E Rシステムを用いて、感知された事象と事象の間の時間に、鎖の末端に塩基を絶えず付加することにより、時間を記録することができる。これらの鎖の長さの分布を、2つの分子シグナル間の時間量の指針として用いることができ、この分布は、例えば、変性ゲル上で直接読み取ることができる。反応速度は、ヘアピン濃度により制御することができるため、多くの異なる時間尺度（例えば、分から時間、又はそれより多くの尺度）にわたって時間を計測することが可能である。

【0080】

シグナルとシグナルの間の時間を計測する以外に、プライマー交換反応を用いて、一部の実施形態において、シグナルを経時的に測定することもできる（「分子タイマー」と呼ばれる）（図11）。一連の状態遷移をプログラムし、状態遷移の各々について触媒ヘアピンの濃度を変更することにより、タイマーを用いて、インプットシグナルの発生から特定の時間間隔で、アウトプットシグナルを放出させる（触媒ヘアピンからアウトプットプライマーが解離する）ことができる。このタイプの制御は、例えば、プログラム可能な材料及び合成遺伝子調節のために有用である。さらに、この時間の遅延は、複数の時間尺度にわたってプログラムすることができる。

【0081】

P E Rベースの分子時計及びタイマーシステムは、一部の実施形態では、複数のシグナルを一度に検出し、それに基づいて駆動するように、スケールアップ（多重化）してもよい。これらのシステムは、複雑な論理演算を実施し、いくつかの方法で遺伝子調節ネットワークに影響を与えるものであり、合成生物学者が入手可能な多種多様なツールに加えられる。さらに、生体分子についてインビトロで実験を実施する、例えば、それらの機能性を研究するために、シグナル及び遺伝子の時間制御を用いることもできる。

【0082】

環境応答性レコーダ

生物は、単細胞から発生し、専用の発達経路の横断を指令する分子シグナルによって、ゲノムプログラムから自己組織化する。これらの驚くほど効率的且つ頑健な発達経路に触発されて、合成発達性自己組織化が、本開示のプライマー交換反応システムにより達成され、これによって、様々な構造が、シグナル濃度の時間的及び空間的变化という結果として形成される。前述した構造合成フレームワーク及びシグナル検出及び作動能力を用いて、一部の実施形態では、発達性自己組織化がプログラムされ、これにより、構造は、それらが経時的に遭遇する様々な環境シグナルに応答して、成長すると共に、形状を変化させる。これらの構造は、規定の動態学的経路に従いながら、分子事象を動的に記録すると共に、イメージング、システム生物学、及び生物学的シグナル処理における適用のための特定の構造に組織化する。これらの反応は、等温で実施され、システムの所望の動作温度、速度、及びイオン濃度と適合するように、反応速度論を修正することができる。このアプローチを首尾よく実施すれば、様々な環境条件への適合能力と、ヒトの介入をほとんど、又は全く必要としない長期にわたる実行能力の両方によって、合成自己組織化の分野に多大なパラダイムシフトが導入される。本明細書に記載するように、プライマー交換反応システムを用いて、イメージング用のマーカとして構造の成長をパターン形成及び指令し、生体分子のパターン形成のためのスカフォールドを構築することができ、あるいはさらに、例えば、特定の標的分子の周囲に形成されて、それを捕捉する構造を合成することもできる。

【0083】

また、検出されたシグナルの核酸鎖へのP E Rコード化を延長して、長期間にわたり複数のシグナルを記録することができる「ティックータープ」をインプリメントすることもできる。反応ステップを通過する全ての分子の全履歴が転写物に記録され、しかも、これらの分子は、具体的且つ一貫した速度論的特性を有するため、これらのティックータープ転

10

20

30

40

50

写物を用いて、溶液中の任意のシグナルの正確な時間トレースを計算することができる。これらのシステムを用いて、インサイチュ及びインピボでシステムの動力学を追跡すると共に、任意量の時間にわたって任意のシグナルを記録することが可能な無比の技術を提供することができる。

【0084】

図41Aは、4つの構成要素：シグナルヘアピン（S_i）、シグナルヘアピンのプライマー結合部位a*をブロックするプロテクター鎖、プライマーa、及びクロックヘアピン（C₁）を含む標的鎖Xを検出する分子記録システムの一例を示す。「プロテクター鎖」は、標的と、シグナル配列を含む触媒分子の3'トーホールドドメインとの両方に結合する一本鎖核酸を指す。一部の実施形態では、プロテクター鎖は、3'トーホールドドメインよりも長い（例えば、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10ヌクレオチド超）。図41Bは、シグナルクロックの組込みが、クロックヘアピン（C₁）により実施される方法を示し、クロックヘアピン（C₁）は、aで終結するプライマー配列に追加のaドメインを連結するようにプログラムされている。このクロックは、実験全体を通して一定の濃度で含有されるため、成長するプライマー鎖へのaの組込みの速度は、経時的にほとんど一定のままである。これは、最終転写物中のaドメインの数及び位置が、図13に示す分子時計当てはめと同様に、分子事象間に経過した時間の量を反映することを意味する。図41Cに示すように、例えば、標的の存在下で、シグナルヘアピンは活性になる。これは、標的Xが、プロテクター鎖上の露出した一本鎖領域と結合して、トーホールド交換反応により、シグナルヘアピンからプロテクター鎖を置換するとき起こる。これは、ヘアピン上のプライマー結合部位a*を露出させることから、シグナルヘアピンは、ドメインaで終結するプライマー上に配列Sを付加し得る。配列Sは、この反応（シグナル組込み）がクロッキング反応（クロック組込み）の代わりに起こったことを示すために用いられる標的Xに特異的なバーコード配列を表す。トーホールド交換システムは、予測可能な平衡状態に達するため、所与の時点でのシグナル組込みの速度は、その時点での標的Xの濃度を反映する。従って、クロックに対するシグナル組込みの相対速度を用いて、実験時間にわたる標的Bの濃度曲線を当てはめることができる。例えば、図41Dに示すように、標的が存在しない場合、転写物中にシグナルバーコードはなく、従って、全ての組込みはクロックである。しかし、標的が存在する場合、シグナル組込み（S_a）が反復ドメインBの濃度に挿入され、それらの時間依存的頻度が当てはめられて、標的Bの時間依存的濃度を回復する。

【0085】

図42Aは、3つの構成要素：プライマー結合部位a*を初めにブロックする構成に折り畳まれるシグナルヘアピン（S_i）、プライマーa、及びクロックヘアピン（C₁）を含む標的鎖Bを検出する分子記録システムの一例を示す。図42Bは、シグナルクロックの組込みが、クロックヘアピン（C₁）により実施される方法の一例を示し、クロックヘアピン（C₁）は、aで終結するプライマー配列に追加のaドメインを連結するようにプログラムされている。このクロックは、実験全体を通して一定の濃度で含有されるため、成長するプライマー鎖へのaの組込みの速度は、経時的にほぼ一定のままである。従って、最終転写物中のaドメインの数及び位置は、図13に示す分子時計当てはめと同様に、分子事象間に経過した時間の量を反映する。図42Cに示すように、例えば、標的の存在下で、シグナルヘアピンは活性になる。これは、標的Xが、シグナルヘアピン上の露出した一本鎖ループ領域と結合して、トーホールド交換反応により、プライマー結合部位a*をブロックしている鎖を置換するとき起こる。これによって、シグナルヘアピンは、ドメインaで終結するプライマー上に配列Sを付加し得る。配列Sは、この反応（シグナル組込み）がクロッキング反応（クロック組込み）の代わりに起こったことを示すために用いられる標的Xに特異的なバーコード配列を表す。トーホールド交換システムは、予測可能な平衡状態に達するため、所与の時点でのシグナル組込みの速度は、その時点での標的Xの濃度を反映する。従って、クロックに対するシグナル組込みの相対速度を用いて、実験時間にわたる標的Xの濃度曲線を当てはめることができる。例えば、図42Dに示すよう

10

20

30

40

50

に、標的が存在しない場合、転写物中にシグナルバーコードはなく、従って、全ての組込みはクロックである。しかし、標的が存在する場合、シグナル組込み (S a) が反復ドメインの濃度に挿入され、それらの時間依存的頻度がはめ込まれて、標的 X の時間依存的濃度を回復する。一般に、標的特異的シグナル配列バーコードを含む追加のシグナルヘアピンを、多くの異なる標的を経時的に多重化モニタリングするために使用することができる。ティックーターテープの 2 シグナルの例を図 20 に示す。

【0086】

更なる適用

トリガーされた cryo-EM マーカのインサイチュ合成。タンパク質に対して、トリガーされた大型の構造的に健全な DNA ナノ構造成長を、cryo-EM を用いた構造決定のためのマーカとして使用することができる。既知形状の非対称マーカを用いれば、タンパク質構造のクラス平均化及び 3D 再構築のプロセスが、より容易になるはずである。このアプローチは、例えば、そうでなければイメージングが困難なタンパク質の構造をマッピングする上で特に有用である。

【0087】

汚染物質の長期環境監視。プライマー交換反応は、dNTP を動力源とするため、長期間にわたって実施することができる。長期間にわたって溶液中の汚染物質を測定する分子レコーダは、環境に曝露されたチャンバーの側へのプライマー交換反応体のテザリングを介して、インプリメントすることができる。

【0088】

pH、温度メータの構築。pH 及び温度の変化は、ポリメラーゼ及び反応速度論に及ぼされる予測可能な作用であることから、PER システムを用いて、それらが曝露される温度又は pH の追跡を維持することができる。pH 及び温度は、ポリメラーゼ速度論に影響を与えるため、提案される光駆動性メカニズムなどの外部クロックを正確な時間トレースのために用いることができる。

【0089】

一過性材料のプログラムされた廃退。例えば、プログラム可能なタンパク質合成のパルスを用いて、プライマー交換システムは、特定の環境シグナルを検出して、溶液を重合する試薬をまず生成し、次に、設定した時間量の後、重合された基質を完全に破壊する試薬を生成することができる。

【0090】

予定通りの薬物送達。反応サイクルをインプリメントすることにより、プライマー交換反応を用いて作動時間の変動をプログラムすることができる。この循環状態は、特定のシグナルの定期的放出を活性化し、続いて、このシグナルは、トーホールドスイッチを介してタンパク質シグナルに変換される。プライマー交換反応及びトーホールドスイッチのモジュール性によって、システムのアウトプットは、特定の間隔の後、しかも特定の環境シグナルに応答して初めて生成される治療用タンパク質であってよい。

【0091】

環境制御のための条件付き遺伝子合成。RNA を用いてインプリメントされた、及び/又はゲノムにコードされたプライマー交換反応を用いて、機能性 RNA 調節物質又は mRNA 転写物の合成による遺伝子発現を記録及び調節することができる。一部の実施形態では、条件付き遺伝子合成のために PER を用いる。

【0092】

トリガーされたインサイチュ毒素被包。構造の成長は、プライマーによってトリガーされ、これは、環境シグナルの存在を条件とし得ることから、シグナル検出方法も提供され、これによって、特定の病原性マーカが検出されると、直ちに、毒素を取り囲み、それを不活性化する構造の成長がトリガーされる。

【0093】

インサイチュシグナル増幅。例えば、イメージング用のインサイチュシグナル増幅のために、長いテロメアコンカテマーの成長を用いてもよい。複数のテロメア形成反応を同時に

10

20

30

40

50

実施して、シグナル増幅を多重化してもよい。例えば、図 25 を参照。

【0094】

タンパク質検出、条件付きプライマー交換反応は、必要なプライマー結合部位を条件付きで露出させるアプタマー配列を用いることによって、アミノ酸以外のタンパク質を検出するために改変することもできる。合成は、挙動を記録及びプログラムするための多くの異なる分子実体と相互作用し得るため、これにより、広範囲の分子挙動が可能になる。

【0095】

インビボ適用

一部の実施形態では、PERカスケードをインビボでインプリメントすることによって、細胞内での核酸のプログラム可能な動的合成が可能になる。これらのシステムは、単細胞レベルで応答性となって、特定の細胞環境に従って合成される転写物の集団を形成し得る。これらの転写物は、時間とともに検出されるシグナルの記録であってもよいし、又は機能性RNA転写物であってもよく、これにより、細胞は、特定の細胞条件に対してプログラムされた応答を有する。

【0096】

一例として、真核細胞中のRNA PERを用いて、核局在化シグナル(NLS)配列などの局在化マーカをmRNA配列に動的に付加することができ、その後、mRNA配列は、核から出て、合成されたタンパク質を核内に向けて戻す。この空間プログラム可能性は、タンパク質の特定の活性化又は不活性化に有用となり得る。

【0097】

一般に、PERカスケードは、主に配列非依存性であるため、任意の配列を新たに合成するか、又は既存のオリゴヌクレオチドに付加することができる。各細胞型は、細胞プロセスに対する破壊を制限するために、鎖置換ポリメラーゼ、理想的には、細胞中に既に付与されたRNAポリメラーゼを必要とする。ヘアピンの停止配列をインプリメントするために用いられる任意のタンパク質を同様に組み込むべきである。一例は、原核生物及び真核生物に導入されていることから、より強い結合を有するように進化する可能性があるdcas9タンパク質の使用である。

【0098】

動的に合成されたアウトプット配列を用いて、蛍光リポータ遺伝子を活性化又は阻害することによって、リアルタイム合成をモニターすることができる。例えば、DNAザイムを合成して、GFPタンパク質のmRNAを切断してもよい。あるいは、ガイドRNAを合成してリポータ遺伝子を阻害することもできる。転写物中でコードされる配列情報を即時回収する必要があるければ、細胞内で生成された記録を後でシーケンシングして、時間的記録情報を抽出することができる。

【0099】

PERヘアピンは、触媒として作用することから、反応速度を数桁の範囲にわたりインビトロで調整することができる。細胞内では、濃度を制御するために、必要な合成速度に応じて、プラスミドのコピー数などの要因を調節することができる。一部の事例では、所望の細胞型について入手可能であれば、まず、PURExpress長さ分解能及び/又は細胞抽出物などのインビトロ転写/翻訳系において性能を評価され得る。

【0100】

一例として、合成鎖は、mRNAを切断し、状況特異的ガイドRNAを生成し、アンチセンス転写物を合成するか、又はsiRNA経路を活性化することによって、遺伝子を阻害することができる。また、各々の状況に合わせたドメインを有する要求に応じて新たなタンパク質を作出するために、mRNA転写物をモジュラー様式で合成又は延長してもよい。多種の調節核酸及びタンパク質を検出し、時間とともに記録することができる。

【0101】

配列を動的に合成し、様々な環境条件に応答することができる、高度にプログラム可能なインビボ合成プラットフォームを有することは、合成生物学に大きな用途がある。目的の標的に関する空間・時間的情報を明らかにするために、細胞の様々な部分に局在化したヘア

10

20

30

40

50

ピンを記録するプライマーを標的タンパク質に備えることができる。一般に、P E Rは、インピボで、動的及び応答性核酸合成の全く新しい方法をもたらし、その高度にプログラム可能な性質が、この技術の可能性を多くの異なる状況に適用可能にする

【0102】

分子モータ

また、分子レベルで分子環境を検査する分子モータシステムも本明細書に記載される。そのために、単位操作がローカルスケールで起こるべきであり、それに続く操作が、隣接する部位に沿って連続的に起こるべきである。単位相互作用は、明確な距離依存的挙動を有するべきである。単位ステップの反応速度は、クローラ及びテンプレートの様々な部分の長さ、並びに部位同士の距離に依存する。「分子クローラ」は、ヘビ様 (snake-like) 分子種であり、これは、第1走路部位から最終走路部位まで成長する際、全軌道にわたって走路の周りを動き回る (例えば、図31Aを参照)。クローラが部位間を移動する際、これは、部位からの情報をコピーし、情報をその成長する本体 (核酸) に記録する。「分子ウォーカ」は、部位の間を移動し、各ステップの後に前の部位を去る (例えば、図32Aを参照)。走路に沿って移動する間、ウォーカは、その本体を成長させ、走路部位からの情報をコピーし、これを保持する。

10

【0103】

1部位での単位操作のメカニズムを図31A及び32Aの上の列に示す。いずれのシステムでも、プライマー (インプットシグナル; 図31Aでは「a」、図32Aでは「1」) と、当該部位のそれらの相補的プライマー結合領域との結合により、反応が開始される。次のステップは、ポリメラーゼが、「ポリメラーゼストッパー」地点 (重合を終結させる分子) にヒットするまで、テンプレートに沿ったポリメラーゼによるプライマーの伸長である。新しく合成された部分にポリメラーゼを付加するために、システムにDNA塩基モノマー (dNTP) を供給する。停止地点は、例えば、以下の2つの方法のうちの1つによりコードすることができる。非ヌクレオチド化学スパーサ (例えば、トリエチレングリコールスパーサ) をストッパーとして付加してもよいし、又は塩基のサブセットをシステムで用い、除外された塩基をストッパーとして用いてもよい。重合を終結させる他の分子は本明細書の他所に記載されている。例えば、テンプレートにおいてA、T及びCの三文字コードを用いる場合、それらの補体塩基モノマーA、T及びGがシステムに供給され、G'がテンプレートの末端に埋め込まれる。システムは、補体塩基モノマー、Cを含まないため、ポリメラーゼは、新しい鎖を延長することができない。ポリメラーゼが、新しいドメインの合成を完了して、ストッパー地点に達すると、テンプレートから出る (解離する)。次に、新しく合成されたドメインは、テンプレートと同じ配列を有するため、ランダムウォーク分岐移動プロセスを経ることができる。元のテンプレートが、新しく合成されたドメインを置換すると、次の反応のための新たなプライマーが露出する。

20

30

【0104】

単位操作の後、いずれの分子モータシステムにおいても、第1部位は、次の部位のプライマーとして作用することができる新しく合成されたドメインを有する。分子モータ分子 (例えば、クローラ又はウォーカ) は、依然として第1部位に固定されている (分子中の関連部分の長さは、この条件を満たすように設計される) ため、新たなプライマーだけが近傍の部位に局部的に作用する。次の部位への移動のメカニズムは、2つのシステム同士で異なっている。分子クローラシステムにおいて、新たなプライマーが、相補性によって次の部位のプライマー結合領域と結合し、単位操作が反復される。その結果、クローラは、第2部位に沿って延長された本体を有する (図31Aの中央の列)。プライマー結合ドメイン (例えば、第2部位のドメインb*) は、走路の中央のクローラの自発的放出を阻止するために、プライマー延長に対して保護されなければならないことに留意すべきであり; こうした保護は、例えば、鎖の3'末端で逆転したdTなどの延長不可能な塩基を組み込むことによって達成される。

40

【0105】

分子ウォーカシステムにおいて、ウォーカ分子は、現時点及び次の部位の間で競合的分岐

50

移動を経る（図3 2 Aの中央の列）。第2部位が、第1部位の対応部分を置換すれば、ウォーカを第2部位に輸送することができる；プライマーの長さは、1プライマーとその補体（例えば、ドメイン1と1*の間）の結合が、ウォーカを前の部位から放出させるのに十分弱く、しかも、2つの連続したプライマーとその補体（例えば、ドメイン1 - 2と2* - 1*の間）の結合が、ウォーカを次の部位に保持する上で十分に強くなるように、設計すべきである。しかし、ウォーカは、前の部位のプライマー結合領域と相補的なドメインを依然として含有するため、ウォーカの運動は、可逆性（後戻りが可能）である。これは、例えば、迷路解決において、複数の部位の再訪が必要な場合の特徴となり得る。走路部位は、ウォーカが部位から出た後、元の形状を復元するため、再利用が可能になることに留意されたい。

10

【0106】

3つの隣接する部位に沿ってステップを反復した後（図2 8 A及び2 9 Aの下の方列）、ヘビ様クローラは、今や走路全体に及ぶが、ウォーカは最終部位に移動している。記録及び履歴の検索のための、クローラの放出は、複数の方法により実施することができる。一例では、反応の記録の終わりに、「リバースプライマー」を添加して、クローラの補体コピーを合成し、テンプレート走路からクローラを除去することができる。例えば、ヘビ様クローラの場合では、ドメイン「d*」を含むプライマー、またウォーカの場合には、ドメイン「5*」を含むプライマーが、そうしたリバースコピープロセスを開始することができる。別の例として、自律的にリバースコピープロセスを指令する特殊な種類の走路部位を最終部位の直後に埋め込むことができる。モータが接近したとき、リバースコピープロセスを開始するように、それぞれのケースで、ドメイン「d*」及び「5*」を含むプライマーを特殊な部位に組み込むことができる。また別の例として、モータの熱媒介性脱ハイブリダイゼーションに基づく、より単純なメカニズムを用いることができる。システム全体の熱は、プラットフォーム構造又は一部の補体を変性し得るが、例えば、特定のプライマーを用いたPCR増幅と組み合わせれば、標的シグナルの選択的検出が可能である。

20

【0107】

一部の実施形態では、本明細書に記載のプローブを繰り返し用いて、連結されたバーコードの可変長さの鎖を作製してもよく、これにより、ステムコード化テンプレートの複写、放出、及び下流結合の比較的低速のステップの同時操作を可能にすることができる。図4 4 Aに示すように、ドメイン「a」のプライマー結合部位に加えて、プローブは、プローブの3'末端に付加された別のプライマー結合部位（ドメイン「b」）を含む。また、一部の実施形態では、「ストッパーペア」は、非天然の塩基対iso-dC: iso-dG (Integrated DNA Technologies) であり、非延長プライマーは、最後の2つの塩基の間にホスホロチオエート結合を含有する。これらの修飾は、ヘアピンテンプレート「b - t」（ストッパーペア）をコピーした後、ポリメラーゼを停止して、延長プライマーが、一本鎖になりやすく、且つヘアピンが閉じるように、ヘアピンプローブと延長プライマーの平衡状態を偏らせる。ドメイン「t」は、ランダムバーコード又は他のプローブ特異的情報を表す。ヘアピンプローブに対して過剰量の自由プライマーは、初め、通常通りにプローブに結合し、ポリメラーゼを置換することによって延長される（図4 4 B）。APRにおいて回文ドメインをコピーする代わりに、新しいドメイン「b*」は、いずれか他のプローブの自由3'末端のドメイン「b」に結合することができる。

30

40

【0108】

一部の実施形態では、自己結合を制限又は防止するために、ドメインの長さ又は配列を調節する。「b*」が別のプローブに結合しているとき、示されるいくつかの方法（プローブ上のメチル化RNA塩基、「b*」と「b」の間の末端ヌクレオチドのミスマッチ、プローブ上のiso-dCヌクレオチド、及び各「a*」プライマーの5'末端上の対応するiso-dGヌクレオチドなど）のいずれか1つを用いて、それ以上の重合を遅らせるか、又は停止することができる。メチル化RNAヌクレオチドの場合、例えば、Bst (Integrated DNA Technologies) 又はBsm (Thermo Fisher) は、それ以上の延長が遅くなることが判明した。ミスマッチヌクレオチドの場合には、これによって、DNA末端に近似するが、不

50

完全なマッチングが可能になり、それ以上の重合を遅らせるか、又は阻止するが、依然として「雑な (sloppy)」リガーゼ (例えば、T4 DNA リガーゼ) は、連結部をつなげることができる。低速化 / ストッパーが失敗すれば、反応は、そのステップについての前のクローラ設計と同様に進行する。クローラ設計と同様に、低濃度の自由「b」ドメイン鎖を時折結合し、これにより、新たな連結鎖をコピーするポリメラーゼを取得し、これを全てのプローブから放出させ、このようにしてさらなる使用のためのプローブを再生することによって、新たな連結バーコード鎖を終結させることができる (図 4 4 D)。最終結果は、クローラと同様に、それぞれのプローブに最初に結合したとき、連結バーコードコピーの幾分ランダムなパッチワークであるが、その後、放出され、潜在的に異なるパターンで反復される (図 4 4 E)。前述と同様に、鎖の内容を PCR、ハイブリダイゼーション、次世代シーケンシング、又は他の手段により分析することができる。図 4 4 F は、プローブ配列の例を提示し、それぞれのドメインを示す。

【 0 1 0 9 】

一部の実施形態では、分子モータシステムは、分子レベルの標的の大きな集団の同時「ボトムアップ」検査のための分子計器を使用する。分子記録は、各々ユニークな DNA バーコードで標識された所与の標的の分子地形に沿って、標的自体を妨害又は破壊することなく、反復して生成され、その後、基本的な標的の画像のコンピュータ再構築のためのハイスループットシーケンシングにより読み取ることができる。同じスケールのサンプルと「計器」を用いて、この技術は、顕微鏡を用いた技術に伴う多くの課題に取り組む。例えば、動的プロセスの高空間解像度を記録することができ；それらの標的と同じサイズである分子計器は、「超鮮明な (ultra-sharp) 分子画像」を有し得る。別の例として、各々の標的 (標的種ではなく) がユニークにバーコード化され、分子モータシステムは、全ての分子の空間及び時間的分布に従うための高度多重化を提供する。また別の例として、分子モータは、超並列方式でプロセスを記録することができ、これにより、超ハイスループット分子イメージングが可能になる。また別の例として、分子モータは、全体から細部に至る顕微鏡法の構造又は環境上の制約なしに、インサイチュで分子標的にアクセスできるため、粗く、有害なサンプル処理を回避することができる。分子モータシステムが、超並列方式で個々の分子の地形を、インサイチュで同定、追跡、及び記録した後、情報の読み取り及び再組立てを行う能力は、高精度での分子構造の画像のコンピュータ再構成を可能にする。分子モータはさらに、顕微鏡法では解像不可能な空間内の分子標的の数量化、並びに個々のネットワークからの生物学的構造、真の接続性及び動力学的データの超高解像度視覚化を可能にする。分子モータシステムは、分子地形の同時及び多重化検査のための高度に有用なツールを提供することによって、生物学的基礎研究、薬物発見、及び診断薬を変化させる。

【 0 1 1 0 】

一部の実施形態では、分子モータ (例えば、クローラ分子及びウォーカ分子) の走路部位は、(i) 不對 3' トーホールドドメイン及び (ii) 置換鎖のヌクレオチドと、トーホールドドメインを含有するテンプレート鎖のヌクレオチド同士の塩基対により形成される、トーホールドドメインから 5' 側に位置する対ドメインを含む。この構成を有する走路部位の例を図 3 1 A 及び図 3 2 A に示す。

【 0 1 1 1 】

図 3 1 A を参照にすると、不對 3' トーホールドドメイン (前述した PER システムのトーホールドドメインと類似する) は「a*」で示される。不對トーホールドドメインを含有する核酸鎖は、「テンプレート鎖」と呼ばれる。これは、重合を開始するために、プライマーがアニーリングする鎖である。テンプレート鎖が結合 (対合、ハイブリダイズ) した反対側の鎖は、「置換鎖」と呼ばれる。置換鎖のサブドメイン「1」及び「b」は、それぞれ、テンプレート鎖のサブドメイン「1*」及び「b*」と対合して、トーホールドドメインから 5' 側に位置する対ドメインを形成する。テンプレート鎖のトーホールドドメインに対するプライマーの結合により開始した重合の間、置換鎖は、初め、伸長産物により置換される。しかし、後に、置換鎖は、伸長産物を置換し、テンプレート鎖に再度結合す

10

20

30

40

50

る（分岐移動と呼ばれるプロセス）（上の列）。この時点で初期分子部位からの情報を含む伸長産物は、プライマーとして機能するのに自由であり、別の分子部位のトーホールドドメインと結合し、伸長／分岐移動プロセスの別のサイクルを開始する（中央の列）。各々のサイクルによって、各分子部位からの情報の記録が、成長する核酸ポリマー鎖（クロラ分子と呼ばれる）に付加される（下の列、「 $1 + 2 + 3$ 」）。

【0112】

図32Aを参照にすると、不對3'トーホールドドメインは、「 1^* 」+「 2^* 」で示される。不對トーホールドドメインを含有する核酸鎖は、重合を開始するために、プライマー「1」がアニーリングするテンプレートである。テンプレート鎖が結合（対合、ハイブリダイズ）した反対側の鎖は、置換鎖である。置換鎖のサブドメイン「3」は、テンプレート鎖のサブドメイン「 3^* 」と対合して、トーホールドドメインから5'側に位置する対ドメインを形成する。テンプレート鎖のトーホールドドメインに対するプライマーの結合により開始した重合の間、置換鎖は、初め、伸長産物により置換される。しかし、後に、置換鎖は、伸長産物を置換し、テンプレート鎖に再度結合する（上の列）。この時点で初期分子部位からの情報を含む伸長産物は、プライマーとして機能するのに自由であり、別の分子部位のトーホールドドメイン（この場合、トーホールドドメインのサブドメイン「 3^* 」）に結合し、伸長／分岐移動プロセスの別のサイクルを開始する（中央の列）。各々のサイクルによって、各分子モータ（分子モータ同士の各相互作用）からの情報の記録が、成長する核酸ポリマー鎖（ウォーカ分子と呼ばれる）に付加される（下の列、「 $1 + 2 + 3 + 4 + 5$ 」）。

【0113】

分子モータの走路部位は、前述のように、一般に、不對（一本鎖）3'トーホールドドメインと、3'トーホールドドメインから5'側に位置する対（二本鎖）ステムドメインを含む。一部の実施形態では、対ドメインは、トーホールドドメインと直接隣接する。

【0114】

走路部位分子の長さは、変動し得る。一部の実施形態では、分子モータは、25～300ヌクレオチド長である。例えば、走路部位分子は、25～250、25～200、25～150、25～100、25～50、50～300、50～250、50～200、50～150又は50～100ヌクレオチド長であってよい。一部の実施形態では、走路部位分子は、30～50、40～60、50～70、60～80、70～90、80～100、100～125、100～150又は100～200ヌクレオチド長であってよい。一部の実施形態では、走路部位分子は、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99又は100ヌクレオチド長であってよい。走路部位分子は、一部の実施形態において、300ヌクレオチドより長い、又は25ヌクレオチドより短い。

【0115】

前述した「トーホールドドメイン」は、走路部位分子の3'末端に位置するヌクレオチドの不對配列を指し、プライマー（又はプライマーのプライマードメイン）のヌクレオチド配列と相補的である（且つ結合する）。トーホールドドメインの長さは、変動し得る。一部の実施形態では、トーホールドドメインは、5～40ヌクレオチド長である。例えば、トーホールドドメインは、2～35、2～30、2～25、2～20、2～15、2～10、5～35、5～30、5～25、5～20、5～15、5～10、10～40、10～35、10～30、10～25、10～20、10～15、15～40、15～35、15～30、15～25、15～20、20～40、20～35、20～30、20～25、25～40、25～35、25～30、30～40、30～35又は35～40ヌクレオチド長であってよい。一部の実施形態では、トーホールドドメインは、5、10、15、20、25、30、35又は40ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、トーホ

10

20

30

40

50

ールドドメインは、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長である。トーホールドドメインは、一部の実施形態において、40ヌクレオチドより長い、又は5ヌクレオチドより短い。

【0116】

一部の実施形態では、トーホールドドメインは、例えば、図32Aに示すように、サブドメイン（例えば、2つのサブドメイン）を有する。こうした実施形態では、プライマーは、典型的に、最も3'側のサブドメイン（「1*」）と結合する。すなわち、分子モーター反応で使用するプライマーは、必ずしもトーホールドドメインの全長にわたる必要はなく、トーホールドドメインのサブドメイン（その一部）だけに結合してもよい。

【0117】

走路部位分子の「対ドメイン」は、走路部位の不对トーホールドドメインに隣接して（且つそれから5'側に）位置するヌクレオチドの対配列（例えば、ワトソン・クリック型核酸塩基対）を指す。走路部位分子の対ドメインは、テンプレート鎖のドメインと置換鎖のドメインとの塩基対により形成される。対ドメインの長さは、変動し得る。一部の実施形態では、対ドメインは、5～40ヌクレオチド長である。例えば、対ドメインは、5～35、5～30、5～25、5～20、5～15、5～10、10～40、10～35、10～30、10～25、10～20、10～15、15～40、15～35、15～30、15～25、15～20、20～40、20～35、20～30、20～25、25～40、25～35、25～30、30～40、30～35又は35～40ヌクレオチド長であってよい。一部の実施形態では、対ドメインは、5、10、15、20、25、30、35又は40ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、対ドメインは、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長である。対ドメインは、一部の実施形態において、40ヌクレオチドより長い、又は5ヌクレオチドより短い。

【0118】

一部の実施形態では、鎖置換ポリメラーゼによるプライマー（プライマー結合部位に結合してる）の延長は、走路部位中の重合を終結させる分子又は修飾の存在によって終結させる。従って、一部の実施形態では、本開示の走路部位分子モーターは、重合を終結させる分子又は修飾を含む。重合を終結させる分子又は修飾（「ストッパー」）は、典型的には、対ドメインによって、重合がプライマーの延長を終結させるように、走路部位のテンプレート鎖上の対ドメイン内に位置する。一部の実施形態では、重合を終結させる分子は、合成非DNAリンカー、例えば、Int Spacer 9 (iSp9) 又はSpacer 18 (Integrated DNA Technologies (IDT)) などのトリエチレングリコールスペースサである。ポリメラーゼによる重合を終結させる任意の非ネイティブリンカーを本明細書に記載のように使用してもよいことは理解すべきである。こうした分子及び修飾の他の非限定的な例として、三炭素結合 (/iSpC3/) (IDT)、ACRYDITE (商標) (IDT)、アデニル化、アジ化物、ジゴキシゲニン (NHSエステル)、コレステリル-TEG (IDT)、I-LINKER (商標) (IDT)、及び3-シアノピニルカルバゾール (CNVK) 及びこれらの変異体が挙げられる。典型的には、しかし常にではないが、短いリンカー（例えば、iSp9）は、より高速の反応時間をもたらす。

【0119】

一部の実施形態では、重合を終結させる分子は、それぞれ、シトシン及びグアニンの化学変異体である、iso-dG及びiso-dC (IDT) などの単一又は対の非天然ヌクレオチド配列である。Iso-dCは、Iso-dGと塩基対合（水素結合）するが、dGとはしない。同様に、Iso-dGは、Iso-dCと塩基対合するが、dCとはしない。対ドメインの反対側の対のストッパー位置にこれらのヌクレオチドを対で組み込むことによって、ポリメラーゼは、その位置に付加すべき溶液中の相補的ヌクレオチドがないため、停止される。

【0120】

一部の実施形態では、「ストッパー」修飾の性能の効率は、反応物中のdNTP濃度を（例えば、200 µMから）100 µM、10 µM、1 µM、又はそれ以下まで低下させる

10

20

30

40

50

ことにより向上する。

【 0 1 2 1 】

重合を終結させる分子又は修飾の含有は、分子又は修飾が対ではないため、触媒分子の二本鎖ドメイン（例えば、ヘアピン構造の場合、ステムドメイン）中に「バルジ」を生成することが多い。従って、一部の実施形態では、分子モータの走路部位は、分子又は修飾の反対側に、単一のヌクレオチド（例えば、チミン）、少なくとも2つの同じヌクレオチド（例えば、チミン二量体（TT）若しくは三量体（TTT））、又は非天然修飾を含有する。

【 0 1 2 2 】

分子モータシステムは、走路部位分子に加えて、インプットプライマー又はアウトプットプライマーと呼ばれるプライマーを含み、それは、延長されて、クロール分子及び/又はウォールカ分子となる。プライマーについては本明細書の他所で説明する。

10

【 0 1 2 3 】

分子モータ反応の完全な「ステップ」を図31Aに示す。インプットプライマー（「a」）は、走路部位分子のトーホールドドメイン（「a*」）と結合して、反応を開始する。ポリメラーゼ（例えば、鎖置換ポリメラーゼ）とdNTPを含有する反応溶液中の走路部位分子との結合時に、初期プライマーは、対ドメインを介して伸長され、対ドメインの置換鎖（サブドメイン「1+b」）を置換する。次に、置換された鎖は、テンプレート鎖上のその相補的結合ドメインとの結合（再アニーリング）について延長プライマーと競合し、これにより、延長アウトプットプライマーを置換する。これによって、反応のステップが完了する。その後、置換されたアウトプットプライマー「1+b」は、反応の次のステップで、引き続きインプットプライマーとして機能し得る。

20

【 0 1 2 4 】

一部の実施形態では、プライマー又はプライマードメイン（走路部位分子のトーホールドドメインと結合するヌクレオチド配列）は、10～50ヌクレオチド長である。例えば、プライマー又はプライマードメインは、10～45、10～40、10～35、10～30、10～25、10～20、10～15、15～50、15～45、15～40、15～35、15～30、15～25、15～20、20～50、20～45、20～40、20～35、20～30、20～25、25～50、25～45、25～40、25～35、25～30、30～50、30～45、30～40、30～35、35～50、35～45、35～40、40～50、40～45又は45～50ヌクレオチド長であってよい。一部の実施形態では、プライマー又はプライマードメインは、10、15、20、25、30、35、40、45又は50ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、プライマー又はプライマードメインは、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長である。プライマー又はプライマードメインは、一部の実施形態において、50ヌクレオチドより長い、又は10ヌクレオチドより短い。プライマーの完全長は、少なくとも部分的に、付加（重合）配列の数及び長さに応じて変動し、これらが、反応物中に存在する走路部位分子の数及び長さ依存することは理解すべきである。

30

【 0 1 2 5 】

本明細書に記載するプライマーは、検出可能な分子（例えば、蛍光又は化学発光シグナルなどの検出可能なシグナルを発する分子）に連結（で標識）してもよい。一部の実施形態では、標識は、蛍光色素である。蛍光色素又は他の蛍光/化学発光分子と連結したプライマーは、単に「蛍光プライマー」と呼ばれる。本明細書で 사용할 ことができる蛍光色素の例として、限定はしないが、ヒドロキシクマリン、メトキシクマリン、Alexa Fluor、アミノクマリン、Cy2、FAM、Alexa fluor 405、Alexa fluor 488、Fluorescein FITC、Alexa fluor 430、Alexa fluor 532、HEX、Cy3、TRITC、Alexa fluor 546、Alexa fluor 555、R-phycoerythrin (PE)、Rhodamine Red-X、Tamara、Cy3.5 581、Rox、Alexa fluor 568、Red 613、Texas Red、Alexa fluor 594、Alexa fluor 633、Allophycocyanin、Alexa fluor 647、Cy5、Alexa fluor 660、Cy5.5、TruR

40

50

ed、Alexa fluor 680、Cy7及びCy7.5が挙げられる。検出可能なシグナルを発する他の蛍光色素及び分子は、本開示に包含される。

【0126】

一部の実施形態では、検出可能な分子は、プライマーではなく、むしろ走路部位分子に連結される。

【0127】

一部の実施形態では、走路部位分子は、生体分子に連結される。生体分子としては、例えば、核酸（例えば、DNA又はRNA）及びタンパク質が挙げられる。生体分子は、治療、予防、診断又はイメージング用分子であってよい。一部の実施形態では、生体分子は、癌関連遺伝子若しくはタンパク質、又はFDA承認若しくは潜在的薬物標的などの疾患関連又は薬物関連生体分子である。一部の実施形態では、生体分子は、酵素、抗原、受容体、リガンド、膜タンパク質、分泌されたタンパク質、又は転写因子である。

10

【0128】

分子モータシステムは、ポリメラーゼの使用を必要とする。一部の実施形態では、ポリメラーゼは、DNA鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼなどのDNAポリメラーゼ（DNAP）である。「鎖置換」は、合成中に遭遇する下流のDNAを置換する能力を意味する。本明細書に記載されるように、使用することができるDNA鎖置換活性を有するポリメラーゼの例として、限定はしないが、phi29 DNAポリメラーゼ（例えば、NEB #M0269）、Bst DNAポリメラーゼ、ラージフラグメント（例えば、NEB #M0275）、又はBsu DNAポリメラーゼ、ラージフラグメント（例えば、NEB #M0330）が挙げられる。鎖置換活性を有する他のポリメラーゼを用いてもよい。一部の実施形態では、ポリメラーゼは、RNAポリメラーゼである。

20

【0129】

一部の実施形態では、ポリメラーゼは、phi29 DNAポリメラーゼである。こうした実施形態において、反応条件は、次の通りであってよい：精製済ウシ血清アルブミン（BSA）で補充した1×反応バッファー（例えば、50 mM Tris-HCl、10 mM MgCl₂、10 mM (NH₄)₂SO₄、4 mM DTT）、pH 7.5、30 でインキュベート。

【0130】

一部の実施形態では、ポリメラーゼは、Bst DNAポリメラーゼ、ラージフラグメントである。こうした実施形態において、反応条件は、次の通りであってよい：1×反応バッファー（例えば、20 mM Tris-HCl、10 mM (NH₄)₂SO₄、10 mM KCl、2 mM MgSO₄、0.1% TRITON（登録商標）X-100）、pH 8.8、65 でインキュベート。

30

【0131】

一部の実施形態では、ポリメラーゼは、Bsu DNAポリメラーゼである。こうした実施形態において、反応条件は、次の通りであってよい：1×反応バッファー（例えば、50 mM NaCl、10 mM Tris-HCl、10 mM MgCl₂、1 mM DTT）、pH 7.9、37 でインキュベート。

【0132】

反応システム中のプライマー、分子走路及びdNTPの濃度は、例えば、具体的な適用、及びその具体的な適用に要求される速度論に応じて変動し得る。

40

【0133】

反応物中のプライマーの濃度は、例えば、10 nM ~ 1000 nMであってよい。一部の実施形態では、反応物中のプライマーの濃度は、10 ~ 20、10 ~ 30、10 ~ 40、10 ~ 50、10 ~ 60、10 ~ 70、10 ~ 80、10 ~ 90、10 ~ 100、10 ~ 125、10 ~ 150、10 ~ 200、25 ~ 50、25 ~ 75、25 ~ 100、25 ~ 150、25 ~ 200、50 ~ 75、50 ~ 100、50 ~ 150又は50 ~ 200 nMである。一部の実施形態では、反応物中のプライマーの濃度は、100 ~ 200、100 ~ 300、100 ~ 400、100 ~ 500、100 ~ 600、100 ~ 70、100 ~

50

800、100～900又は100～1000 nMである。一部の実施形態では、反応物中のプライマーの濃度は、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195又は200 nMである。一部の実施形態では、反応物中のプライマーの濃度は、100、200、300、400、500、600、700、800、900又は1000 nMである。反応物中のプライマーの濃度は、10 nM未満又は1000 nM超であってもよい。

【0134】

反応物中の走路部位分子の濃度は、例えば、5 nM～1000 nMであってよい。一部の実施形態では、反応物中の走路部位分子の濃度は、5～10、5～20、5～30、5～40、5～50、5～60、5～70、5～80、5～90、5～100、5～125、5～150、5～200、10～50、10～75、10～100、10～150、10～200、25～75、25～100、25～125又は25～200 nMである。一部の実施形態では、反応物中の走路部位分子の濃度は、10～200、10～300、10～400、10～500、10～600、10～70、10～800、10～900又は10～1000 nMである。一部の実施形態では、反応物中の走路部位分子の濃度は、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195又は200 nMである。一部の実施形態では、反応物中の走路部位分子の濃度は、10、20、30、40、50、60、70、80、90又は100 nMである。反応物中の走路部位分子の濃度は、5 nM未満又は1000 nM超であってもよい。

【0135】

反応物中のプライマーと走路部位分子の比は、2：1～100：1であってよい。一部の実施形態では、プライマーと分子モータの比は、2：1、3：1、4：1、5：1、6：1、7：1、8：1、9：1、10：1、11：1、12：1、13：1、14：1、15：1、16：1、17：1、18：1、19：1又は20：1である。一部の実施形態では、プライマーと走路部位分子の比は、30：1、40：1、50：1、60：1、70：1、80：1又は90：1である。

【0136】

反応物中の異なる走路部位分子の数は、非限定的である。反応物は、1～10¹⁰個の異なる走路部位分子（各々、例えば、特定のトーホールドドメイン配列を有する）を含んでもよい。一部の実施形態では、反応物は、1～10、1～10²、1～10³、1～10⁴、1～10⁵、1～10⁶、1～10⁷、1～10⁸、1～10⁹、1～10¹⁰個、又はそれ以上の異なる走路部位分子を含む。一部の実施形態では、反応物は、1～5、1～10、1～15、1～20、1～25、1～30、1～35、1～40、1～45、1～50、1～55、1～60、1～65、1～70、1～75、1～80、1～85、1～90、1～95、1～100、5～10、5～15、5～20、5～25、5～30、5～35、5～40、5～45、5～50、5～55、5～60、5～65、5～70、5～75、5～80、5～85、5～90、5～95、5～100、10～15、10～20、10～25、10～30、10～35、10～40、10～45、10～50、10～55、10～60、10～65、10～70、10～75、10～80、10～85、10～90、10～95又は10～100個の異なる走路部位分子を含む。一部の実施形態では、反応物は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、28、19、20、21、22、23、24又は25個の異なる走路部位分子を含む。走路部位分子は、例えば、それらのトーホールドドメインが互いに異なっていれば、互いに異なる。

【0137】

10

20

30

40

50

反応の速度論は、例えば、温度、時間、バッファー / 塩条件、及びデオキシリボヌクレオチド三リン酸 (dNTP) 濃度を変えることにより制御され得る。ほとんどの酵素と同様、ポリメラーゼは、イオン強度、pH 及び存在する金属イオンの種類 (例えば、ナトリウムイオン対マグネシウムイオン) をはじめとする様々なバッファー条件に対して感受性である。従って、反応が実施される温度は、例えば、4 ~ 65 (例えば、4、25、37、42 又は 65) の範囲で変動し得る。一部の実施形態では、反応が実施される温度は、4 ~ 25、4 ~ 30、4 ~ 35、4 ~ 40、4 ~ 45、4 ~ 50、4 ~ 55、4 ~ 60、10 ~ 25、10 ~ 30、10 ~ 35、10 ~ 40、10 ~ 45、10 ~ 50、10 ~ 55、10 ~ 60、25 ~ 30、25 ~ 35、25 ~ 40、25 ~ 45、25 ~ 50、25 ~ 55、25 ~ 60、25 ~ 65、35 ~ 40、35 ~ 45、35 ~ 50、35 ~ 55、35 ~ 60、又は 35 ~ 65 である。一部の実施形態では、反応は室温で実施されるが、他の実施形態では、反応は、37 で実施される。

【0138】

反応は、30分 (min) ~ 24時間 (hr) にわたって実施 (インキュベート) してよい。一部の実施形態では、反応は、10分、35分、40分、45分、50分、55分、60分、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、18時間又は24時間にわたって実施される。

【0139】

反応物中の dNTP の濃度は、例えば、2 ~ 1000 μ M であってよい。一部の実施形態では、反応物中の dNTP の濃度は、2 ~ 10 μ M、2 ~ 15 μ M、2 ~ 20 μ M、2 ~ 25 μ M、2 ~ 30 μ M、2 ~ 35 μ M、2 ~ 40 μ M、2 ~ 45 μ M、2 ~ 50 μ M、2 ~ 55 μ M、2 ~ 60 μ M、2 ~ 65 μ M、2 ~ 70 μ M、2 ~ 75 μ M、2 ~ 80 μ M、2 ~ 85 μ M、2 ~ 90 μ M、2 ~ 95 μ M、2 ~ 100 μ M、2 ~ 110 μ M、2 ~ 120 μ M、2 ~ 130 μ M、2 ~ 140 μ M、2 ~ 150 μ M、2 ~ 160 μ M、2 ~ 170 μ M、2 ~ 180 μ M、2 ~ 190 μ M、2 ~ 200 μ M、2 ~ 250 μ M、2 ~ 300 μ M、2 ~ 350 μ M、2 ~ 400 μ M、2 ~ 450 μ M、2 ~ 500 μ M、2 ~ 600 μ M、2 ~ 700 μ M、2 ~ 800 μ M、2 ~ 900 μ M 又は 2 ~ 1000 μ M である。例えば、反応物中の dNTP 濃度は、2 μ M、5 μ M、10 μ M、15 μ M、20 μ M、25 μ M、30 μ M、35 μ M、40 μ M、45 μ M、50 μ M、55 μ M、60 μ M、65 μ M、70 μ M、75 μ M、80 μ M、85 μ M、90 μ M、95 μ M、100 μ M、105 μ M、110 μ M、115 μ M、120 μ M、125 μ M、130 μ M、135 μ M、140 μ M、145 μ M、150 μ M、155 μ M、160 μ M、165 μ M、170 μ M、175 μ M、180 μ M、185 μ M、190 μ M、195 μ M 又は 200 μ M であってよい。一部の実施形態では、反応物中の dNTP 濃度は、10 ~ 20 μ M、10 ~ 30 μ M、10 ~ 40 μ M、10 ~ 50 μ M、10 ~ 60 μ M、10 ~ 70 μ M、10 ~ 80 μ M、10 ~ 90 μ M 又は 10 ~ 100 μ M である。

【0140】

一部の実施形態では、dNTP 変異体を使用する。例えば、分子モータシステムは、ホットスタート / クリーンアンプ (hot start/clean amp) dNTP、ホスホロチオエート dNTP、又は蛍光 dNTP を使用し得る。他の dNTP 変異体を用いてもよい。

【0141】

一部の実施形態では、精製済タンパク質サンプルの単一分子レベルで、個々のタンパク質分子の同定に基づくタンパク質「フィンガープリント法」に分子モータを用いてもよい。タンパク質の配列情報は、核酸の配列情報に変換することができ、次に、例えば、分子クローラにより、これを記録及び報告することができる。

【0142】

タンパク質フィンガープリント法は、一部の実施形態において、以下の方法により達成される (図40)。(1) タンパク質分子を表面に付着させ、変性させた後、伸張する。タ

ンパク質分子は、N末端又はC末端特異的ケミカルカップリング法により、表面に固定する。表面結合タンパク質分子は、尿素又はドデシル硫酸ナトリウムなどの一般的変性剤で変性させることができ、外力の適用、例えば、表面から離れた末端に磁気ビーズを付着させ、磁界を適用することにより、又は同様に、荷電粒子及び電界を使用することにより、伸張することができる。(2)ユニークな識別子を含有するDNA鎖により、アミノ酸残基を特異的に標識する。DNAとアミノ酸残基同士のケミカルカップリングは、アミノ酸特異的化学修飾法によって達成することができる。例えば、リシン残基は、NHS-エステルケミストリーで修飾することができ、システイン残基は、マレイミド基と選択的に相互作用することができる。アミノ酸と結合したDNA鎖は、標的アミノ酸のアイデンティティ情報を単にコードすることもできるし、又は特定の部位のユニークな分子情報も含むことができる(例えば、ランダム化配列により)。3)分子クローラは、標識部位を検査し、配列情報を記録する。分子クローラは、下流分子構成要素が、プログラムされた様式で、インサイチュで合成され、標的分子からの情報をコピーすることを可能にする原理に基づいて動作する。分子クローラの群は、空間内を動き回り、超並列方式で、分子地形の量的及び幾何学的情報を調べて、記録する。複数のクローラが、同じ標的に作用することができるため、部分的に余剰の記録を生成することができる。(4)記録が放出され、収集される。記録は、相補鎖のインサイチュ合成により、又は熱媒介性脱ハイブリダイゼーションによって放出することができる。(5)検索された記録を、ポリメラーゼ連鎖反応及びゲル電気泳動により、又は次世代シーケンシングによって分析する。(6)記録からの余剰及び部分的に重複する配列情報を用いて、標識アミノ酸の配列を構築する。標識アミノ酸は、標的タンパク質の全アミノ酸配列のサブセットを表す。次に、この部分配列の情報を、全ゲノムシーケンシングからの遺伝的に同定した全てのタンパク質コード配列のライブラリーと比較及びマッチングし、このようにして、タンパク質のアイデンティティを明らかにすることができる。

【0143】

分子定規

生物学的研究は、分子相互作用について量的、感受性及びシステムレベルの情報を報告することができるツールを必要とする。これらのツールは、1分子のレベルで、長期にわたり相互作用を報告する能力を有すると同時に、膨大且つ多様な相互作用を処理しなければならない。本明細書には、「分子定規」と呼ばれる分子記録システムも提供され、これは、DNA分子内の距離情報を記録することによって標的分子間のナノスケール距離を記録する(図31A~31B)。生成されたDNA記録の長さは、測定される距離に直接対応する。加えて、各DNA記録は、その配列の一部として、標的分子のアイデンティティをコードする。1ラウンドの記録生成は以下のように進行する(図34Bを参照):(a)標的にDNA記録の前駆体を接種する。(b)前駆体は、それらがパートナー核酸と遭遇するまで、鎖置換ポリメラーゼ及び触媒分子(例えば、触媒ヘアピン)の助けによって成長する。パートナー同士がハイブリダイズし、延長して記録を生成し、各々が他方をテンプレートとして用いる。(c)記録が放出され、標的はリセットされて、更なる記録ラウンドを可能にする。複数の記録ラウンドによって、複数の隣接物との距離、さらには距離の変化/相違を報告する記録が得られる。

【0144】

距離は、DNA記録の長さにコードされ(1進符号化(unary encoding))、これは自律的に生成され、各々の標的ペアについて複数の記録が生成される。分子定規は、変化する距離の追跡を続けることができ、距離分布を報告する(超解像フィッティング)。生成された記録の読み出しは、ゲル電気泳動を介して記録され、それをほぼ全ての研究室に対してアクセス可能にする。

【0145】

分子定規は、標的分子の溶液、又は固相若しくはインサイチュでの距離を記録することができる。分子定規によって、ほぼ全ての研究室が、一般的で、しかも安価な試薬及び計器を用いることにより、分子距離測定の実施が可能になる。アウトプットは、DNA分子の

形態であることから、多くの情報を簡潔にコードすることができ、この技術は、大規模な多重化能力を有する。特定のニーズに応じて、ゲル電気泳動などの迅速且つ一般的なアッセイを用いて、アウトプットを読み取ることができ、あるいは、次世代シーケンシングのハイスループット及び単一分子能力を利用することができる。これらの特徴は、例えば、本明細書に記載される分子定規技術が、タンパク質相互作用をアッセイし、タンパク質複合体組織化を研究し、染色体立体配座を明らかにすることを可能にする。

【0146】

分子定規は、一部の実施形態において、標的生体分子に結合した触媒分子と相互作用する複数の自由（非結合）触媒分子（上記）を含む。これらの相互作用は、分子定規反応物中に存在するプライマーによって開始され、置換された伸長産物（続くサイクルでインプットプライマーとして機能する、1サイクルにおけるアウトプットプライマー）により媒介される。分子定規システムの一例を図36A～36Hに示す。

10

【0147】

各標的生体分子（グレーの丸と黒い丸）を触媒分子（この例ではヘアピン）と連結する（図36A）。反応物は、さらに、触媒分子の1つのトーホールドドメインに結合するプライマーと、他方の触媒分子のトーホールドドメインに結合するもう1つのプライマーも含む（図36B）。鎖置換ポリメラーゼ及びdNTPの存在下での、プライマーとトーホールドドメインとの結合は、各分子の伸長プロセスを開始する。プライマーは、対ドメインを通して延長され、対ドメインの塩基対を破壊する。置換された鎖は、延長産物と競合して、元の対ドメインを再形成し（図36C）、次に、置換された延長産物は、反応物中に存在する別の自由触媒分子に結合するためのプライマーの役割を果たす（図36D）。置換された延長産物と自由触媒分子との結合（図36E）は、自由触媒分子の対ドメインを介した重合、続いて、さらなる延長産物（現時点で、生体分子に結合した両方の触媒分子からの情報（DNA）及び自由触媒分子からの情報（DNA）を含む）の置換を開始する（図36F）。このプロセスは、反応物中の他の自由触媒分子と一緒に、各々のサイクルが、生体分子に連結した触媒分子を成長させるポリマーに新たな情報を加えながら、2つのポリマーが会合して、互いに結合するまで継続する（図36G）。この時点で、重合は、ポリマーの全長にわたって進行し、全ての分子定規相互作用の二本鎖核酸記録を形成する（図36H）。核酸記録の長さは、2つの生体分子間の距離に対応する。

20

【0148】

図37Aは、二本鎖DNAロッドの両端の間の距離を記録する分子定規の別の例を示す。DNA配列ドメインは、文字として、場合によっては添え字（例えば、a、b、a¹など）と共に示される。A「*」の符号は、ドメインの配列補体を示す（例えば、r*は、rの配列補体である）。記録は、自律的に進行するが、概念として、4つのステップで行われると理解することができる。（1）接種：前駆体が、DNAロッドとハイブリダイズする。（2）活性化：前駆体が、鎖置換ポリメラーゼ（例えば、BSTラージフラグメント）及びdNTPの助けにより、バーコード配列（この例では、a¹又はa²）及び活性化ドメイン（rrr又はr*r*r*）をコピーする。これらは、「停止配列」（ここでは、s又はs*）により停止される。停止配列は、溶液中に補充される対応ヌクレオチド（例えば、dGTP）を含まない1つ又は複数のDNA塩基/ヌクレオチド（例えば、GGG）の1区間である。従って、これらは、ポリメラーゼが、それ以上のヌクレオチドをコピーすることを停止する。重合を終結させる他の分子を用いてもよい。（3）成長：活性化ドメイン（ここでは、rrr及びr*r*r*）は、前駆体が、触媒ヘアピンと相互作用して、配列ドメイン（ここでは、r及びr*）を繰り返し付加することを可能にする。（4A）放出：前駆体が十分な長さまで成長すると、これらは、互いに会合して、相補的ドメイン（ここでは、r及びr*）を介してハイブリダイズすることができる。次に、ポリメラーゼが、各々他方をテンプレートとして用いて、溶液中に放出されるまで、これらを伸長することができる。放出された記録は、DNAロッドの両端の間の距離の尺度である。（4B）リセット：DNAロッドは、この場合、さらなる前駆体を接種して、より多くの記録を生成することができ、これにより、距離の反復測定値が得られる。

30

40

50

【 0 1 4 9 】

図 3 7 B 及び 3 7 C は、成長ステップ（図 3 7 A のステップ 3）の一例のさらに詳細を示す。成長ステップでは、短い配列ドメイン（ r 又は r^* ）が、繰り返し且つ自律的に、活性化前駆体分子の末端に付加される。活性化前駆体（図 3 7 A では、 $a1 \ r \ r \ r$ 又は $a2 \ r^* \ r^* \ r^*$ ）は、触媒成長ヘアピンのトーホールドドメインとハイブリダイズする。配列は、鎖置換ポリメラーゼ及び dNTP の助けにより、単一ドメイン（ r 又は r^* ）だけ延長される。これらは、停止配列（ x ）によってそれ以上の延長が停止される。この時点で、新しくコピーされたドメインを触媒分子から置換することができる。短いトーホールドドメイン（ $r \ r \ r$ 又は $r^* \ r^* \ r^*$ ）は、この複合体から自発的に解離する。解離した活性化前駆体分子は、現時点で、末端の 3 つのドメイン（ $r \ r \ r$ 又は $r^* \ r^* \ r^*$ ）を介して成長ステップに再び参加することができる。

10

【 0 1 5 0 】

分子定規は、前述した触媒分子（例えば、触媒ヘアピン分子）の変形である。分子定規（例えば、標的生体分子に結合した核酸分子）の長さは、変動し得る。一部の実施形態では、分子定規は、25 ~ 300 ヌクレオチド長である。例えば、分子定規は、25 ~ 250、25 ~ 200、25 ~ 150、25 ~ 100、25 ~ 50、50 ~ 300、50 ~ 250、50 ~ 200、50 ~ 150 又は 50 ~ 100 ヌクレオチド長であってよい。一部の実施形態では、分子定規は、30 ~ 50、40 ~ 60、50 ~ 70、60 ~ 80、70 ~ 90、80 ~ 100、100 ~ 125、100 ~ 150 又は 100 ~ 200 ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、分子定規は、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 又は 100 ヌクレオチド長である。分子定規は、一部の実施形態において、300 ヌクレオチドより長い、又は 25 ヌクレオチドより短い。

20

【 0 1 5 1 】

前述した「トーホールドドメイン」は、分子定規の 3' 末端に位置するヌクレオチドの不对配列を指し、プライマー（又はプライマーのプライマードメイン）のヌクレオチド配列と相補的である（且つ結合する）。トーホールドドメインの長さは、変動し得る。一部の実施形態では、トーホールドドメインは、5 ~ 40 ヌクレオチド長である。例えば、トーホールドドメインは、2 ~ 35、2 ~ 30、2 ~ 25、2 ~ 20、2 ~ 15、2 ~ 10、5 ~ 35、5 ~ 30、5 ~ 25、5 ~ 20、5 ~ 15、5 ~ 10、10 ~ 40、10 ~ 35、10 ~ 30、10 ~ 25、10 ~ 20、10 ~ 15、15 ~ 40、15 ~ 35、15 ~ 30、15 ~ 25、15 ~ 20、20 ~ 40、20 ~ 35、20 ~ 30、20 ~ 25、25 ~ 40、25 ~ 35、25 ~ 30、30 ~ 40、30 ~ 35 又は 35 ~ 40 ヌクレオチド長であってよい。一部の実施形態では、トーホールドドメインは、5、10、15、20、25、30、35 又は 40 ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、トーホールドドメインは、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 又は 25 ヌクレオチド長である。トーホールドドメインは、一部の実施形態において、40 ヌクレオチドより長い、又は 5 ヌクレオチドより短い。

30

40

【 0 1 5 2 】

分子定規の「対ドメイン」は、分子定規の不对トーホールドドメインに隣接して（且つそれから 5' 側に）位置するヌクレオチドの対配列（例えば、ワトソン・クリック型核酸塩基対）を指す。分子定規の対ドメインは、テンプレート鎖のドメインと置換鎖のドメインとの塩基対により、又は同じ核酸鎖のドメイン同士の分子内塩基対（ヘアピン構造を形成する）によって形成される。対ドメインの長さは、変動し得る。一部の実施形態では、対ドメインは、5 ~ 40 ヌクレオチド長である。例えば、対ドメインは、5 ~ 35、5 ~ 30、5 ~ 25、5 ~ 20、5 ~ 15、5 ~ 10、10 ~ 40、10 ~ 35、10 ~ 30、10 ~ 25、10 ~ 20、10 ~ 15、15 ~ 40、15 ~ 35、15 ~ 30、15 ~ 25

50

、15～20、20～40、20～35、20～30、20～25、25～40、25～35、25～30、30～40、30～35又は35～40ヌクレオチド長であってよい。一部の実施形態では、対ドメインは、5、10、15、20、25、30、35又は40ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、対ドメインは、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長である。対ドメインは、一部の実施形態において、40ヌクレオチドより長い、又は5ヌクレオチドより短い。

【0153】

一部の実施形態では、鎖置換ポリメラーゼによるプライマー（プライマー結合部位に結合してる）の延長は、分子定規中の重合を終結させる分子又は修飾の存在によって終結する。従って、一部の実施形態では、本開示分子定規は、重合を終結させる分子又は修飾を含む。重合を終結させる分子又は修飾（「ストッパー」）は、典型的には、重合が、対ドメインを介してプライマーの延長を終結させるように、分子定規のテンプレート鎖上の対ドメイン内に位置する。一部の実施形態では、重合を終結させる分子は、合成非DNAリンカー、例えば、Int Spacer 9（iSp9）又はSpacer 18（Integrated DNA Technologies（IDT））などのトリエチレングリコールスペースサである。ポリメラーゼによる重合を終結させる任意の非ネイティブリンカーを本明細書に記載のように使用してもよいことは理解すべきである。こうした分子及び修飾の他の非限定的な例として、三炭素結合（/iSpC3/）（IDT）、ACRYDITE（商標）（IDT）、アデニル化、アジ化物、ジゴキシゲニン（NHSEステル）、コレステリル-TEG（IDT）、I-LINKER（商標）（IDT）、及び3-シアノビニルカルバゾール（CNVK）及びこれらの変異体が挙げられる。典型的には、しかし常にではないが、短いリンカー（例えば、iSp9）は、より高速の反応時間をもたらす。

【0154】

一部の実施形態では、重合を終結させる分子は、それぞれ、シトシン及びグアニンの化学変異体である、iso-dG及びiso-dC（IDT）などの単一又は対の非天然ヌクレオチド配列である。Iso-dCは、Iso-dGと塩基対合（水素結合）するが、dGとはしない。同様に、Iso-dGは、Iso-dCと塩基対合するが、dCとはしない。ヘアピンの反対側の対のストッパー位置にこれらのヌクレオチドを組み込むと、その位置に付加すべき溶液中の相補的ヌクレオチドがないため、ポリメラーゼは停止される。

【0155】

一部の実施形態では、「ストッパー」修飾の性能の効率は、反応物中のdNTP濃度を（例えば、200µMから）100µM、10µM、1µM、又はそれ以下まで低下させることにより向上する。

【0156】

重合を終結させる分子又は修飾を含有させると、分子又は修飾が対ではないため、触媒分子の二本鎖ドメイン（例えば、ヘアピン構造の場合、ステムドメイン）中に「バルジ」を生成することが多い。従って、一部の実施形態では、分子定規は、分子又は修飾の反対側に、単一のヌクレオチド（例えば、チミン）、少なくとも2つの同じヌクレオチド（例えば、チミン二量体（TT）若しくは三量体（TTT））、又は非天然修飾を含有するように設計される。

【0157】

分子定規反応システムは、さらに、インプットプライマー又はアウトプットプライマーと呼ばれるプライマーも含む。プライマーについては本明細書の他所で説明する。

【0158】

分子定規反応の完全な「ステップ」を図37A～37Cに示す。

【0159】

一部の実施形態では、プライマー又はプライマードメイン（分子定規のトーホールドドメインと結合するヌクレオチド配列）は、10～50ヌクレオチド長である。例えば、プライマー又はプライマードメインは、10～45、10～40、10～35、10～30、

10

20

30

40

50

10 ~ 25、10 ~ 20、10 ~ 15、15 ~ 50、15 ~ 45、15 ~ 40、15 ~ 35、15 ~ 30、15 ~ 25、15 ~ 20、20 ~ 50、20 ~ 45、20 ~ 40、20 ~ 35、20 ~ 30、20 ~ 25、25 ~ 50、25 ~ 45、25 ~ 40、25 ~ 35、25 ~ 30、30 ~ 50、30 ~ 45、30 ~ 40、30 ~ 35、35 ~ 50、35 ~ 45、35 ~ 40、40 ~ 50、40 ~ 45又は45 ~ 50ヌクレオチド長であってよい。一部の実施形態では、プライマー又はプライマードメインは、10、15、20、25、30、35、40、45又は50ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、プライマー又はプライマードメインは、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチド長である。プライマー又はプライマードメインは、一部の実施形態において、50ヌクレオチドより長い、又は10ヌクレオチドより短い。プライマーの完全長は、少なくとも部分的に、付加（重合）配列の数及び長さに応じて変動し、これは、反応物中に存在する自由（タンパク質などの生体分子に連結していない）触媒分子の数及び長さ、並びに触媒分子が連結される標的生体分子間の距離に依存することは理解すべきである。

【0160】

本明細書に記載するプライマーは、検出可能な分子（例えば、蛍光又は化学発光シグナルなどの検出可能なシグナルを発する分子）と連結（で標識）してもよい。一部の実施形態では、標識は、蛍光色素である。蛍光色素又は他の蛍光／化学発光分子と連結したプライマーは、単純に「蛍光プライマー」と呼ばれる。本明細書で 사용할 ことができる蛍光色素の例として、限定はしないが、ヒドロキシクマリン、メトキシクマリン、Alexa Fluor、アミノクマリン、Cy2、FAM、Alexa fluor 405、Alexa fluor 488、Fluorescein FITC、Alexa fluor 430、Alexa fluor 532、HEX、Cy3、TRITC、Alexa fluor 546、Alexa fluor 555、R-phycoerythrin (PE)、Rhodamine Red-X、Tamara、Cy3.5 81、Rox、Alexa fluor 568、Red 613、Texas Red、Alexa fluor 594、Alexa fluor 633、Allophycocyanin、Alexa fluor 647、Cy5、Alexa fluor 660、Cy5.5、TruRed、Alexa fluor 680、Cy7及びCy7.5が挙げられる。検出可能なシグナルを発する他の蛍光色素及び分子は、本開示に包含される。

【0161】

一部の実施形態では、検出可能な分子は、プライマーではなく、むしろ分子定規と連結させる。

【0162】

一部の実施形態では、分子定規は、生体分子と連結させる。生体分子としては、例えば、核酸（例えば、DNA又はRNA）及びタンパク質が挙げられる。生体分子は、治療、予防、診断又はイメージング用分子であってよい。一部の実施形態では、生体分子は、癌関連遺伝子若しくはタンパク質、又はFDA承認若しくは潜在的薬物標的などの疾患関連又は薬物関連生体分子である。一部の実施形態では、生体分子は、酵素、抗原、受容体、リガンド、膜タンパク質、分泌されたタンパク質、又は転写因子である。

【0163】

分子定規反応には、ポリメラーゼの使用が必要である。一部の実施形態では、ポリメラーゼは、DNA鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼなどのDNAポリメラーゼ（DNA P）である。「鎖置換」は、合成中に遭遇する下流のDNAを置換する能力を意味する。本明細書に記載されるように、使用することができるDNA鎖置換活性を有するポリメラーゼの例として、限定はしないが、phi29 DNAポリメラーゼ（例えば、NEB #M0269）、Bst DNAポリメラーゼ、ラージフラグメント（例えば、NEB #M0275）、又はBsu DNAポリメラーゼ、ラージフラグメント（例えば、NEB #M0330）が挙げられる。鎖置換活性を有する他のポリメラーゼを用いてもよい。一部の実施形態では、ポリメラーゼは、RNAポリメラーゼである。

【0164】

一部の実施形態では、ポリメラーゼは、phi29 DNAポリメラーゼである。こうした実施形態において、反応条件は、次の通りであってよい：精製済ウシ血清アルブミン（

10

20

30

40

50

B S A) で補充した 1 × 反応バッファー (例えば、5 0 m M T r i s - H C l、1 0 m M M g C l₂、1 0 m M (N H₄)₂ S O₄、4 m M D T T)、p H 7 . 5、3 0 でインキュベート。

【 0 1 6 5 】

一部の実施形態では、ポリメラーゼは、B s t DNAポリメラーゼ、ラージフラグメントである。こうした実施形態において、反応条件は、次の通りであってよい：1 × 反応バッファー (例えば、2 0 m M T r i s - H C l、1 0 m M (N H₄)₂ S O₄、1 0 m M K C l、2 m M M g S O₄、0 . 1 % T R I T O N (登録商標) X-100)、p H 8 . 8、6 5 でインキュベート。

【 0 1 6 6 】

一部の実施形態では、ポリメラーゼは、B s u DNAポリメラーゼである。こうした実施形態において、反応条件は、次の通りであってよい：1 × 反応バッファー (例えば、5 0 m M N a C l、1 0 m M T r i s - H C l、1 0 m M M g C l₂、1 m M D T T)、p H 7 . 9、3 7 でインキュベート。

【 0 1 6 7 】

反応システム中のプライマー、触媒分子及び d N T P の濃度は、例えば、具体的な適用、及びその具体的な適用に要求される速度論に応じて変動し得る。

【 0 1 6 8 】

反応物中のプライマーの濃度は、例えば、1 0 n M ~ 1 0 0 0 n M であってよい。一部の実施形態では、反応物中のプライマーの濃度は、1 0 ~ 2 0、1 0 ~ 3 0、1 0 ~ 4 0、1 0 ~ 5 0、1 0 ~ 6 0、1 0 ~ 7 0、1 0 ~ 8 0、1 0 ~ 9 0、1 0 ~ 1 0 0、1 0 ~ 1 2 5、1 0 ~ 1 5 0、1 0 ~ 2 0 0、2 5 ~ 5 0、2 5 ~ 7 5、2 5 ~ 1 0 0、2 5 ~ 1 5 0、2 5 ~ 2 0 0、5 0 ~ 7 5、5 0 ~ 1 0 0、5 0 ~ 1 5 0 又は 5 0 ~ 2 0 0 n M である。一部の実施形態では、反応物中のプライマー濃度は、1 0 0 ~ 2 0 0、1 0 0 ~ 3 0 0、1 0 0 ~ 4 0 0、1 0 0 ~ 5 0 0、1 0 0 ~ 6 0 0、1 0 0 ~ 7 0、1 0 0 ~ 8 0 0、1 0 0 ~ 9 0 0 又は 1 0 0 ~ 1 0 0 0 n M である。一部の実施形態では、反応物中のプライマー濃度は、1 0、1 5、2 0、2 5、3 0、3 5、4 0、4 5、5 0、5 5、6 0、6 5、7 0、7 5、8 0、8 5、9 0、9 5、1 0 0、1 0 5、1 1 0、1 1 5、1 2 0、1 2 5、1 3 0、1 3 5、1 4 0、1 4 5、1 5 0、1 5 5、1 6 0、1 6 5、1 7 0、1 7 5、1 8 0、1 8 5、1 9 0、1 9 5 又は 2 0 0 n M である。一部の実施形態では、反応物中のプライマー濃度は、1 0 0、2 0 0、3 0 0、4 0 0、5 0 0、6 0 0、7 0 0、8 0 0、9 0 0 又は 1 0 0 0 n M である。反応物中のプライマーの濃度は、1 0 n M 未満又は 1 0 0 0 n M 超であってもよい。

【 0 1 6 9 】

反応物中の分子定規及び / 又は触媒分子の濃度は、例えば、5 n M ~ 1 0 0 0 n M であってよい。一部の実施形態では、反応物中の分子定規及び / 又は触媒分子の濃度は、5 ~ 1 0、5 ~ 2 0、5 ~ 3 0、5 ~ 4 0、5 ~ 5 0、5 ~ 6 0、5 ~ 7 0、5 ~ 8 0、5 ~ 9 0、5 ~ 1 0 0、5 ~ 1 2 5、5 ~ 1 5 0、5 ~ 2 0 0、1 0 ~ 5 0、1 0 ~ 7 5、1 0 ~ 1 0 0、1 0 ~ 1 5 0、1 0 ~ 2 0 0、2 5 ~ 7 5、2 5 ~ 1 0 0、2 5 ~ 1 2 5 又は 2 5 ~ 2 0 0 n M である。一部の実施形態では、反応物中の分子定規及び / 又は触媒分子の濃度は、1 0 ~ 2 0 0、1 0 ~ 3 0 0、1 0 ~ 4 0 0、1 0 ~ 5 0 0、1 0 ~ 6 0 0、1 0 ~ 7 0、1 0 ~ 8 0 0、1 0 ~ 9 0 0 又は 1 0 ~ 1 0 0 n M である。一部の実施形態では、反応物中の分子定規及び / 又は触媒分子の濃度は、1 0、1 5、2 0、2 5、3 0、3 5、4 0、4 5、5 0、5 5、6 0、6 5、7 0、7 5、8 0、8 5、9 0、9 5、1 0 0、1 0 5、1 1 0、1 1 5、1 2 0、1 2 5、1 3 0、1 3 5、1 4 0、1 4 5、1 5 0、1 5 5、1 6 0、1 6 5、1 7 0、1 7 5、1 8 0、1 8 5、1 9 0、1 9 5 又は 2 0 0 n M である。一部の実施形態では、反応物中の分子定規及び / 又は触媒分子の濃度は、1 0、2 0、3 0、4 0、5 0、6 0、7 0、8 0、9 0 又は 1 0 0 n M である。反応物中の分子定規及び / 又は触媒分子の濃度は、5 n M 未満又は 1 0 0 0 n M 超であってもよい。

10

20

30

40

50

【0170】

反応物中のプライマーと分子定規及び／又は触媒分子の比は、2 : 1 ~ 100 : 1 であってよい。一部の実施形態では、プライマーと分子定規及び／又は触媒分子の比は、2 : 1、3 : 1、4 : 1、5 : 1、6 : 1、7 : 1、8 : 1、9 : 1、10 : 1、11 : 1、12 : 1、13 : 1、14 : 1、15 : 1、16 : 1、17 : 1、18 : 1、19 : 1 又は 20 : 1 である。一部の実施形態では、プライマーと分子定規及び／又は触媒分子の比は、30 : 1、40 : 1、50 : 1、60 : 1、70 : 1、80 : 1 又は 90 : 1 である。

【0171】

反応物中の異なる分子定規及び／又は触媒分子の数は、非限定的である。反応物は、1 ~ 1010 個の異なる分子定規及び／又は触媒分子（各々、例えば、特定のトーホールドドメイン配列を有する）を含んでもよい。一部の実施形態では、分子定規反応物は、1 ~ 10、1 ~ 102、1 ~ 103、1 ~ 104、1 ~ 105、1 ~ 106、1 ~ 107、1 ~ 108、1 ~ 109、1 ~ 1010 個、又はそれ以上の異なる分子定規及び／又は触媒分子を含む。一部の実施形態では、反応物は、1 ~ 5、1 ~ 10、1 ~ 15、1 ~ 20、1 ~ 25、1 ~ 30、1 ~ 35、1 ~ 40、1 ~ 45、1 ~ 50、1 ~ 55、1 ~ 60、1 ~ 65、1 ~ 70、1 ~ 75、1 ~ 80、1 ~ 85、1 ~ 90、1 ~ 95、1 ~ 100、5 ~ 10、5 ~ 15、5 ~ 20、5 ~ 25、5 ~ 30、5 ~ 35、5 ~ 40、5 ~ 45、5 ~ 50、5 ~ 55、5 ~ 60、5 ~ 65、5 ~ 70、5 ~ 75、5 ~ 80、5 ~ 85、5 ~ 90、5 ~ 95、5 ~ 100、10 ~ 15、10 ~ 20、10 ~ 25、10 ~ 30、10 ~ 35、10 ~ 40、10 ~ 45、10 ~ 50、10 ~ 55、10 ~ 60、10 ~ 65、10 ~ 70、10 ~ 75、10 ~ 80、10 ~ 85、10 ~ 90、10 ~ 95 又は 10 ~ 100 個の異なる分子定規及び／又は触媒分子を含む。一部の実施形態では、反応物は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 又は 25 個の異なる分子定規及び／又は触媒分子を含む。分子定規は、例えば、それらのトーホールドドメインが互いに異なっていれば、互いに異なる。

【0172】

反応の速度論は、例えば、温度、時間、バッファー／塩条件、及びデオキシリボヌクレオチド三リン酸（dNTP）濃度を変えることにより制御され得る。ほとんどの酵素と同様に、ポリメラーゼは、イオン強度、pH 及び存在する金属イオンの種類（例えば、ナトリウムイオン対マグネシウムイオン）をはじめとする様々なバッファー条件に対して感受性である。従って、反応が実施される温度は、例えば、4 ~ 65（例えば、4、25、37、42 又は 65）の範囲で変動し得る。一部の実施形態では、反応が実施される温度は、例えば、4 ~ 25、4 ~ 30、4 ~ 35、4 ~ 40、4 ~ 45、4 ~ 50、4 ~ 55、4 ~ 60、10 ~ 25、10 ~ 30、10 ~ 35、10 ~ 40、10 ~ 45、10 ~ 50、10 ~ 55、10 ~ 60、25 ~ 30、25 ~ 35、25 ~ 40、25 ~ 45、25 ~ 50、25 ~ 55、25 ~ 60、25 ~ 65、35 ~ 40、35 ~ 45、35 ~ 50、35 ~ 55、35 ~ 60、又は 35 ~ 65 である。一部の実施形態では、反応は室温で実施されるが、他の実施形態では、反応は 37 で実施される。

【0173】

反応は、30 分（min）~ 24 時間（hr）にわたって実施（インキュベート）してよい。一部の実施形態では、反応は、10 分、35 分、40 分、45 分、50 分、55 分、60 分、1 時間、2 時間、3 時間、4 時間、5 時間、6 時間、7 時間、8 時間、9 時間、10 時間、11 時間、12 時間、18 時間又は 24 時間にわたって実施される。

【0174】

反応物中の dNTP の濃度は、例えば、2 ~ 1000 μ M であってよい。一部の実施形態では、反応物中の dNTP の濃度は、2 ~ 10 μ M、2 ~ 15 μ M、2 ~ 20 μ M、2 ~ 25 μ M、2 ~ 30 μ M、2 ~ 35 μ M、2 ~ 40 μ M、2 ~ 45 μ M、2 ~ 50 μ M、

10

20

30

40

50

2 ~ 55 μ M、2 ~ 60 μ M、2 ~ 65 μ M、2 ~ 70 μ M、2 ~ 75 μ M、2 ~ 80 μ M、2 ~ 85 μ M、2 ~ 90 μ M、2 ~ 95 μ M、2 ~ 100 μ M、2 ~ 110 μ M、2 ~ 120 μ M、2 ~ 130 μ M、2 ~ 140 μ M、2 ~ 150 μ M、2 ~ 160 μ M、2 ~ 170 μ M、2 ~ 180 μ M、2 ~ 190 μ M、2 ~ 200 μ M、2 ~ 250 μ M、2 ~ 300 μ M、2 ~ 350 μ M、2 ~ 400 μ M、2 ~ 450 μ M、2 ~ 500 μ M、2 ~ 600 μ M、2 ~ 700 μ M、2 ~ 800 μ M、2 ~ 900 μ M又は2 ~ 1000 μ Mである。例えば、反応物中のdNTP濃度は、2 μ M、5 μ M、10 μ M、15 μ M、20 μ M、25 μ M、30 μ M、35 μ M、40 μ M、45 μ M、50 μ M、55 μ M、60 μ M、65 μ M、70 μ M、75 μ M、80 μ M、85 μ M、90 μ M、95 μ M、100 μ M、105 μ M、110 μ M、115 μ M、120 μ M、125 μ M、130 μ M、135 μ M、140 μ M、145 μ M、150 μ M、155 μ M、160 μ M、165 μ M、170 μ M、175 μ M、180 μ M、185 μ M、190 μ M、195 μ M又は200 μ Mであってよい。一部の実施形態では、反応物中のdNTP濃度は、10 ~ 20 μ M、10 ~ 30 μ M、10 ~ 40 μ M、10 ~ 50 μ M、10 ~ 60 μ M、10 ~ 70 μ M、10 ~ 80 μ M、10 ~ 90 μ M又は10 ~ 100 μ Mである。

【0175】

一部の実施形態では、dNTP変異体を使用する。例えば、分子定規システムでは、ホットスタート/クリーンアンプ(hot start/clean amp) dNTP、ホスホロチオエートdNTP、又は蛍光dNTPを使用してもよい。他のdNTP変異体を用いてもよい。

【0176】

本開示は、さらに、以下の番号付けしたパラグラフにより包含される実施形態を提供する：
1. (a) (i) 不對3'トールドドメイン、(ii) 分子の3'サブドメインと分子の5'サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメイン、及び(iii) 結合ドメインを含む初期触媒ヘアピン分子；

(b) 3'トールドドメインと相補的で、これと結合する初期プライマー；並びに
(c) 鎖置換活性を有するポリメラーゼ

を含むプライマー交換反応(PER)システム。

2. 結合ドメインが、ループドメインである、パラグラフ1に記載のPERシステム。

3. (d) (i) 不對3'トールドドメイン、(ii) 第2ヘアピン分子の3'サブドメインと第2ヘアピン分子の5'サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメイン、及び(iii) ループドメインを含む第2触媒ヘアピン分子をさらに含み、ここで、第2ヘアピン分子の3'トールドドメインが、初期ヘアピン分子の5'サブドメインと相補的である、パラグラフ1又は2に記載のPERシステム。

4. 第2ヘアピン分子の不對3'トールドドメイン内に位置するヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを含む第2プライマーをさらに含み、パラグラフ3に記載のPERシステム。

5. (e) (i) 不對3'トールドドメイン、(ii) 第3ヘアピン分子の3'サブドメインと第3ヘアピン分子の5'サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメイン、及び(iii) ループドメインを含む第3触媒ヘアピン分子をさらに含み、ここで、第3ヘアピン分子の3'トールドドメインが、第2ヘアピン分子の5'サブドメインと相補的である、パラグラフ1 ~ 4のいずれか1つに記載のPERシステム。

6. 第3ヘアピン分子の不對3'トールドドメインと相補的な第3プライマーをさらに含み、パラグラフ5に記載のPERシステム。

7. 複数の触媒ヘアピン分子をさらに含み、各ヘアピン分子は、(i) 不對3'トールドドメイン、(ii) 複数のうち1ヘアピン分子の3'サブドメインと、複数のうち1ヘアピン分子の5'サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメイン、及び(iii) ループドメインを含み、ここで、各ヘアピン分子の3'トールドドメインが、複数のうち1つの他のヘアピン分子の5'サブドメインと相補的である、パラグラフ5又は6に記載のPERシステム。

10

20

30

40

50

8. 複数のプライマーをさらに含み、各プライマーは、複数のうち1つのヘアピン分子の不对3'トーホールドドメインと相補的である、パラグラフ7に記載のPERシステム。

9. プライマーが、検出可能な分子と連結される、パラグラフ1~8のいずれか1つに記載のPERシステム。

10. プライマーが、生体分子と連結される、パラグラフ1~9のいずれか1つに記載のPERシステム。

11. 生体分子が、タンパク質である、パラグラフ10に記載のPERシステム。

12. ポリメラーゼが、phi29 DNAポリメラーゼ、Bst DNAポリメラーゼ又はBsu DNAポリメラーゼである、パラグラフ1~11のいずれか1つに記載のPERシステム。

10

13. デオキシリボヌクレオチド三リン酸(dNTP)をさらに含む、パラグラフ1~12のいずれか1つに記載のPERシステム。

14. (a)(i) 不对3'トーホールドドメイン、(ii) 分子の5'サブドメインと分子の3'サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメイン、及び(iii) ループドメインを含む初期触媒ヘアピン分子；

(b)(i) 不对3'トーホールドドメイン、(ii) 第2ヘアピン分子の3'サブドメインと第2ヘアピン分子の5'サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメイン、及び(iii) 結合ドメインを含む第2触媒ヘアピン分子(ここで、第2ヘアピン分子の3'トーホールドドメインは、初期ヘアピン分子の5'サブドメインと相補的である)；並びに

20

(c) 初期ヘアピン分子の不对3'トーホールドドメインと相補的な初期プライマーを含むプライマー交換反応(PER)システム。

15. 結合ドメインが、ループドメインである、パラグラフ14に記載のPERシステム。

16. 第2ヘアピン分子の不对3'トーホールドドメインと相補的な第2プライマーをさらに含む、パラグラフ14又は15に記載のPERシステム。

17. 鎖置換活性を有するポリメラーゼをさらに含む、パラグラフ14又は16に記載のPERシステム。

18. デオキシリボヌクレオチド三リン酸(dNTP)をさらに含む、パラグラフ14~17のいずれか1つに記載のPERシステム。

19. (a)(i) 不对3'トーホールドドメイン、(ii) 分子の3'サブドメインと分子の5'サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメイン、及び(iii) 結合ドメインを含む初期触媒ヘアピン分子、

30

(b)(i) 不对3'トーホールドドメイン、(ii) 第2触媒ヘアピン分子の3'サブドメインと第2触媒ヘアピン分子の5'サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメイン、及び(iii) ループドメインを含む第2触媒ヘアピン分子(ここで、第2触媒分子の3'トーホールドドメインは、初期触媒分子の5'サブドメインと相補的である)；

(c) 初期ヘアピン分子の不对3'トーホールドドメインと相補的なプライマー、

(d) 鎖置換活性を有するポリメラーゼ、並びに

(e) デオキシリボヌクレオチド三リン酸(dNTP)

40

を反応バッファー中で合わせることで、反応混合物を形成した後；

一本鎖核酸記録を生成するのに十分な時間にわたって、核酸重合、鎖置換及びアニーリングをもたらす条件下で反応混合物をインキュベートすること

を含むプライマー交換反応(PER)方法。

20. 結合ドメインがループドメインである、パラグラフ19に記載のプライマー交換反応。

21. (a) 鎖置換活性を有するポリメラーゼ及びデオキシリボヌクレオチド三リン酸(dNTP)の存在下で、インプットプライマーを触媒分子と接触させるが、ここで、触媒分子は、(i) 不对3'トーホールドドメイン及び(ii) 置換鎖と、トーホールドドメインを含有するテンプレート鎖とのヌクレオチド塩基対により形成される、トーホールドド

50

メインから 5' 側に位置する対ドメインを含み、インプットプライマーは、触媒分子の 3' トーホールドドメインと相補的であり；

(b) 触媒分子の対ドメインを介してプライマーを延長することにより、置換鎖を置換して、延長アウトプットプライマーを形成し；

(c) 置換鎖とテンプレート鎖同士の分子内ヌクレオチド塩基対によって、ヘアピン分子から延長アウトプットプライマーを置換し；

(d) 鎖置換活性を有するポリメラーゼ及び dNTP の存在下で、(c) の置換された延長アウトプットプライマーを第 2 触媒分子と接触させることを含み、ここで、第 2 触媒分子は、(i) 不對 3' トーホールドドメイン及び (ii) 置換鎖と、トーホールドドメインを含有するテンプレート鎖とのヌクレオチド塩基対により形成される、トーホールドドメインから 5' 側に位置する対ドメインを含み、延長アウトプットプライマーは、第 2 初期触媒分子の 3' トーホールドドメインと相補的である、プライマー交換反応。

10

22. 一本鎖核酸を生成する方法であって、

(a) (i) 不對 3' トーホールドドメイン、(ii) 分子の 3' サブドメインと分子の 5' サブドメイン同士の分子間ヌクレオチド塩基対により形成される、対ステムドメイン、及び (iii) ヘアピンループドメインを含む初期ヘアピン分子、

(b) 各ヘアピン分子が、(i) 不對 3' トーホールドドメイン、(ii) 複数のうち 1 ヘアピン分子の 3' サブドメインと複数のうち 1 ヘアピン分子の 5' サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメイン、及び (iii) ループドメインを含む、複数の異なるヘアピン分子（ここで、各ヘアピン分子の 3' トーホールドドメインは、複数のうち 1 つの他のヘアピン分子の 5' サブドメインと相補的である）、

20

(c) 初期ヘアピン分子の 3' トーホールドドメインと相補的な初期プライマー、

(d) 鎖置換活性を有するポリメラーゼ、並びに

(e) デオキシリボヌクレオチド三リン酸 (dNTP)

を反応バッファー中で合わせることににより、反応混合物を形成した後；

初期プライマーよりも長い一本鎖核酸記録を生成するのに十分な時間にわたって、核酸重合、鎖置換及びアニーリングをもたらす条件下で反応混合物をインキュベートすることを含む方法。

23. (e) で生成された一本鎖核酸が、複数のうちのヘアピン分子のステムドメインと相補的であるヌクレオチドドメインのコンカテマーを含む、パラグラフ 22 に記載の方法。

30

24. (e) で生成された一本鎖核酸が、自己相補性のドメインを含む、パラグラフ 22 又は 23 に記載の方法。

25. 自己相補性のドメインの同士の分子内ヌクレオチド塩基対によって (e) で生成された一本鎖核酸の折り畳みが達成される条件下で、反応混合物をインキュベートすることをさらに含む、パラグラフ 24 に記載の方法。

26. 核酸ステーブル鎖の存在下で、一本鎖核酸及び核酸ステーブル鎖のドメイン同士のヌクレオチド塩基対によって (e) で生成された一本鎖核酸の折り畳みが達成される条件下で、反応混合物をインキュベートすることをさらに含む、パラグラフ 22 ~ 25 のいずれか 1 つに記載の方法。

27. パラグラフ 1 ~ 13 のいずれか 1 つに記載の PER システムを含む細胞。

40

28. 細胞が、原核細胞又は真核細胞である、パラグラフ 27 に記載の細胞。

29. 細胞が、哺乳動物細胞である、パラグラフ 28 に記載の細胞。

30. 少なくとも 2 つの核酸を含み、これらの各々が、(i) 不對 3' トーホールドドメイン、(ii) 触媒ヘアピン分子の 3' サブドメインと、同じ触媒ヘアピン分子の 5' サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメイン、及び (iii) ループドメインを含む触媒ヘアピン分子をコードする、ベクター。

31. 少なくとも 3 つ、少なくとも 4 つ、又は少なくとも 5 つの核酸をコードし、これらの各々が、(i) 不對 3' トーホールドドメイン、(ii) 触媒ヘアピン分子の 3' サブドメインと、同じ触媒ヘアピン分子の 5' サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメイン、及び (iii) ループドメインを含む触媒ヘアピン分子

50

をコードする、パラグラフ 30 に記載のベクター。

32. パラグラフ 30 又は 31 に記載のベクターを含む、細胞。

33. 触媒分子の 3' トーホールドドメインと相補的で、且つ、これと結合する初期プライマーをさらに含む、パラグラフ 32 に記載の細胞。

34. 鎖置換活性を有するポリメラーゼをさらに含む、パラグラフ 32 又は 33 に記載の細胞。

35. (a) (i) 不對 3' トーホールドドメイン、(ii) 分子の 3' サブドメインと分子の 5' サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメイン、及び (iii) 結合ドメインを含む触媒ヘアピン分子(ここで、(a) (i) 及び (a) (ii) のドメインは、タンデム反復配列を形成する)、

(b) (i) 3' トーホールドドメイン、(ii) 分子の 3' サブドメインと分子の 5' サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメイン、及び (iii) 結合ドメインを含む少なくとも 1 つの他の触媒ヘアピン分子(ここで、(b) (i) 及び (b) (ii) のドメインは、シグナル配列により分断されるタンデム反復配列を形成し、(b) (i) の 3' トーホールドドメインは、プロテクター鎖と不可逆的に結合している)、並びに

(c) (a) の触媒ヘアピン分子の 3' トーホールドドメインと相補的で、且つ (b) の触媒ヘアピン分子の 3' トーホールドドメインと相補的であるドメインを含む核酸プライマーを含む組成物。

36. (a) (iii) 及び / 又は (b) (iii) の結合ドメインが、ループドメインである、パラグラフ 35 に記載の組成物。

37. (a) (iii) 及び / 又は (b) (iii) の結合ドメインが、少なくとも 1 つの共有結合架橋したヌクレオチドを含む、パラグラフ 35 に記載の組成物。

38. 結合ドメインが、少なくとも 10 ヌクレオチド長の安定した対ドメインである、パラグラフ 35 に記載の組成物。

39. シグナル配列が、2 ~ 20 ヌクレオチドを有する、パラグラフ 35 ~ 38 のいずれか 1 つに記載の組成物。

40. シグナル配列が、標識分子に特異的にバーコード化される、パラグラフ 35 ~ 39 のいずれか 1 つに記載の組成物。

41. プライマーが、実験特異的バーコードを含む、パラグラフ 35 ~ 40 のいずれか 1 つに記載の組成物。

42. プロテクター鎖が、任意選択で、ループドメインを介して、(b) の少なくとも 1 つの他の触媒ヘアピン分子の 3' トーホールドドメインと連結している、パラグラフ 35 ~ 41 のいずれか 1 つに記載の組成物。

43. 標的分子をさらに含む、パラグラフ 35 ~ 42 のいずれか 1 つに記載の組成物。

44. 標的分子が、核酸である、パラグラフ 43 に記載の組成物。

45. 核酸が、一本鎖核酸又は二本鎖核酸である、パラグラフ 44 に記載の組成物。

46. 標的分子が、タンパク質、ペプチド、脂質、炭水化物、脂肪、及び分子量 900 ダルトン未満の小分子から選択される生体分子である、パラグラフ 43 に記載の組成物。

47. プロテクター鎖が、標的分子と結合することができる、パラグラフ 43 ~ 46 のいずれか 1 つに記載の組成物。

48. 標的分子が、プロテクター鎖と相補的なヌクレオチド配列を含むか、又はヌクレオチド配列と連結している、パラグラフ 47 に記載の組成物。

49. 鎖置換活性を有するポリメラーゼをさらに含む、パラグラフ 35 ~ 48 のいずれか 1 つに記載の組成物。

50. 標的分子を検出する方法であって、

標的分子、鎖置換ポリメラーゼ、及びデオキシリボヌクレオチド三リン酸(dNTP)を含有する反応バッファー中で、

(a) (i) 不對 3' トーホールドドメイン、(ii) 分子の 3' サブドメインと分子の 5' サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメイン、及び

10

20

30

40

50

(i i i) 結合ドメインを含む触媒ヘアピン分子 (ここで、(a) (i) 及び (a) (i i) のドメインは、タンデム反復配列を形成する) ;
 (b) (i) 3 ' トーホールドドメイン、(i i) 分子の 3 ' サブドメインと分子の 5 ' サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメイン、及び (i i i) 結合ドメインを含む少なくとも 1 つの他の触媒ヘアピン分子 (ここで、(b) (i) 及び (b) (i i) のドメインは、シグナル配列により分断されるタンデム反復配列を形成し、(b) (i) の 3 ' トーホールドドメインは、標的分子と結合することができるプロテクター鎖と不可逆的に結合している)、並びに
 (c) (a) の触媒ヘアピン分子の 3 ' トーホールドドメインと相補的で、且つ (b) の触媒ヘアピン分子の 3 ' トーホールドドメインと相補的であるドメインを含む核酸プライマーを合わせ、

10

初期プライマーよりも長く、且つシグナル配列の少なくとも 1 つを含む一本鎖核酸記録を生成するのに十分な時間にわたって、核酸重合、鎖置換及びアニーリングを達成する条件下で、反応混合物をインキュベートすることを含む方法。

5 1 . 分子事象間の時間を計測する方法であって、

(a) (i) 不對 3 ' トーホールドドメイン、(i i) 分子の 3 ' サブドメインと分子の 5 ' サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメイン、及び (i i i) ヘアピンループドメインを含む初期触媒ヘアピン分子、
 (b) 各ヘアピン分子が、(i) 不對 3 ' トーホールドドメイン、(i i) ヘアピン分子の 3 ' サブドメインとヘアピン分子の 5 ' サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメイン、及び (i i i) ループドメインを含む複数の異なる触媒ヘアピン分子 (ここで、各ヘアピン分子の 3 ' トーホールドドメインは、複数のうち 1 つの他のヘアピン分子の 5 ' サブドメインと相補的である)、
 (c) 初期ヘアピン分子の不對 3 ' トーホールドドメインと相補的な初期プライマー、
 (d) 鎖置換活性を有するポリメラーゼ、並びに
 (e) デオキシリボヌクレオチド三リン酸 (d N T P) を反応バッファー中で混ぜることにより、反応混合物を形成し ;

20

第 1 分子事象に反応混合物を曝露し ;

一本鎖核酸記録を生成するのに十分な時間にわたって、核酸重合、鎖置換及びアニーリングを達成する条件下で反応混合物をインキュベートした後 ;

30

第 2 分子事象に反応混合物を曝露することを含む方法。

5 2 . 第 1 分子事象が、DNA 重合を開始する、パラグラフ 5 1 に記載の方法。

5 3 . 第 2 分子事象が、DNA 重合を終結させる、パラグラフ 5 1 又は 5 2 に記載の方法。

5 4 . 生成される一本鎖核酸の長さに基づいて、第 1 分子事象と第 2 分子事象との間の時間間隔を決定することをさらに含む、パラグラフ 5 1 ~ 5 3 に記載の方法。

5 5 . (a) 不對 3 ' トーホールドドメイン、及びトーホールドドメインから 5 ' 側に位置し、且つ置換鎖と、トーホールドドメインを含有するテンプレート鎖とのヌクレオチド塩基対により形成される、対ドメインを含む初期触媒分子 ;

(b) 不對 3 ' トーホールドドメインと相補的な初期プライマー ; 並びに

(c) 鎖置換活性を有するポリメラーゼ

40

を含む、プライマー交換反応 (P E R) システム。

5 6 . 不對 3 ' トーホールドドメイン、及びトーホールドドメインから 5 ' 側に位置し、且つ置換鎖と、トーホールドドメインを含有するテンプレート鎖とのヌクレオチド塩基対により形成される、対ドメインを含む第 2 触媒分子をさらに含み、ここで、第 2 触媒分子の 3 ' トーホールドドメインは、初期触媒分子の対ドメインの置換鎖と相補的である、パラグラフ 5 5 に記載の P E R システム。

5 7 . (a) (i) 不對 3 ' トーホールドドメイン及び (i i) 置換鎖と、トーホールドドメインを含有するテンプレート鎖とのヌクレオチド塩基対により形成される、トーホールドドメインから 5 ' 側に位置する対ドメインを含む初期核酸分子 ;

(b) (i) 不對 3 ' トーホールドドメイン及び (i i) 置換鎖と、トーホールドドメイン

50

を含有するテンプレート鎖とのヌクレオチド塩基対により形成される、トーホールドドメインから 5' 側に位置する対ドメインを含む第 2 核酸分子（ここで、第 2 核酸分子の不对 3' トーホールドドメインは、初期核酸分子の置換鎖と相補的である）；

（c）初期核酸分子の不对 3' トーホールドドメイン内に位置するヌクレオチドと相補的なプライマー

を含む分子モータシステム。

58．鎖置換活性を有するポリメラーゼをさらに含む、パラグラフ 57 に記載の分子モータシステム。

59．初期核酸分子の対ドメインが、重合を終結させる分子を含む、パラグラフ 57 又は 58 に記載の分子モータシステム。

60．第 2 核酸分子の対ドメインが、重合を終結させる分子を含む、パラグラフ 57 ~ 59 のいずれか 1 つに記載の分子モータシステム。

61．第 2 核酸分子の 3' トーホールドドメインが、重合を停止する 3' 分子を含む、パラグラフ 57 ~ 59 のいずれか 1 つに記載の分子モータシステム。

62．複数の核酸分子をさらに含み、各分子が、（i）不对 3' トーホールドドメイン及び（ii）置換鎖と、トーホールドドメインを含有するテンプレート鎖とのヌクレオチド塩基対により形成される、トーホールドドメインから 5' 側に位置する対ドメインを含み、ここで、複数のうちの 1 分子の不对 3' トーホールドドメインは、複数のうち 1 つの他の核酸分子の置換鎖と相補的である、パラグラフ 57 ~ 61 のいずれか 1 つに記載の分子モータシステム。

63．核酸分子の少なくとも 1 つが、標的生体分子と結合している、パラグラフ 57 ~ 62 のいずれか 1 つに記載の分子モータシステム。

64．核酸分子の各々が、異なる標的生体分子と結合している、パラグラフ 63 に記載の分子モータシステム。

65．標的分子間の距離を記録する方法であって、

（a）（i）不对 3' トーホールドドメイン、及び（ii）置換鎖と、トーホールドドメインを含有するテンプレート鎖とのヌクレオチド塩基対により形成される、トーホールドドメインから 5' 側に位置する対ドメインを含む初期核酸分子（ここで、初期核酸分子は、標的生体分子と連結している）、

（b）（i）不对 3' トーホールドドメイン、及び（ii）置換鎖と、トーホールドドメインを含有するテンプレート鎖とのヌクレオチド塩基対により形成される、トーホールドドメインから 5' 側に位置する対ドメインを含む第 2 核酸分子（ここで、第 2 核酸分子の不对 3' トーホールドドメインは、初期核酸分子の置換鎖と相補的であり、また、第 2 核酸分子は、標的生体分子と連結している）、

（c）初期核酸分子の不对 3' トーホールドドメインと相補的なプライマー、

（d）鎖置換活性を有するポリメラーゼ、並びに

（e）デオキシリボヌクレオチド三リン酸（dNTP）を反応バッファー中で混ぜることにより、反応混合物を形成し；

一本鎖核酸記録を生成するのに十分な時間にわたって、核酸重合、鎖置換及びアニーリングを達成する条件下で反応混合物をインキュベートすることを含む方法。

66．反応混合物が、複数の核酸分子をさらに含み、各分子が、（i）不对 3' トーホールドドメイン及び（ii）置換鎖と、トーホールドドメインを含有するテンプレート鎖とのヌクレオチド塩基対により形成される、トーホールドドメインから 5' 側に位置する対ドメインを含み、ここで、複数のうち 1 核酸分子の不对 3' トーホールドドメインは、複数のうち 1 つの他の核酸分子の置換鎖と相補的であり、複数の核酸分子の各々が、標的生体分子と連結している、パラグラフ 65 に記載の方法。

67．（a）（i）不对 3' トーホールドドメイン、（ii）分子の 3' サブドメインと分子の 5' サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメイン、及び（iii）ループドメインを含む初期ヘアピン分子（ここで、初期ヘアピン分子は、標的生体分子と連結している）；

10

20

30

40

50

(b)(i) 不對 3' トーホールドドメイン、(ii) 分子の 3' サブドメインと分子の 5' サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメイン、及び (iii) ループドメインを含む第 2 ヘアピン分子（ここで、第 2 ヘアピン分子は、標的生体分子と連結しており、初期ヘアピン分子の 5' サブドメインは、第 2 ヘアピン分子の 5' サブドメインと相補的である）；

(c) 一方が、初期ヘアピン分子の不對 3' トーホールドドメインと相補的であり、他方が、第 2 ヘアピン分子の不對 3' トーホールドドメインと相補的である、2 つのプライマー；

(d) 各分子が、(i) 不對 3' トーホールドドメイン、(ii) 分子の 3' サブドメインと分子の 5' サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメイン、及び (iii) ループドメインを含む、複数の触媒ヘアピン分子（ここで、複数のヘアピン分子各々の 5' サブドメインは、複数のうち 1 つの他のヘアピン分子の 5' サブドメインと相補的であり、複数のヘアピン分子の 1 つの 3' トーホールドドメインは、初期ヘアピン分子の 5' サブドメインと相補的であり、複数のうちの別のヘアピン分子の 3' トーホールドドメインは、第 2 ヘアピン分子の 5' サブドメインと相補的である）；並びに

(e) 鎖置換活性を有するポリメラーゼを含む分子記録システム。

68. 標的生体分子間の距離を記録する方法であって、

(a)(i) 不對 3' トーホールドドメイン、(ii) 分子の 3' サブドメインと分子の 5' サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメイン、及び (iii) ループドメインを含む初期ヘアピン分子（初期ヘアピン分子は、標的生体分子と連結している）；

(b)(i) 不對 3' トーホールドドメイン、(ii) 分子の 3' サブドメインと分子の 5' サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメイン、及び (iii) ループドメインを含む第 2 ヘアピン分子（第 2 ヘアピン分子は、標的生体分子と連結しており、初期ヘアピン分子の 5' サブドメインは、第 2 ヘアピン分子の 5' サブドメインと相補的である）；

(c) 一方が、初期ヘアピン分子の不對 3' トーホールドドメインと相補的であり、他方が、第 2 ヘアピン分子の不對 3' トーホールドドメインと相補的である、2 つのプライマー；

(d) 各分子が、(i) 不對 3' トーホールドドメイン、(ii) 分子の 3' サブドメインと分子の 5' サブドメイン同士の分子内ヌクレオチド塩基対により形成される対ステムドメイン、及び (iii) ループドメインを含む、複数のヘアピン分子（ここで、複数のヘアピン分子各々の 5' サブドメインは、複数のうち 1 つの他のヘアピン分子の 5' サブドメインと相補的であり、複数のヘアピン分子の 1 つの 3' トーホールドドメインは、初期ヘアピン分子の 5' サブドメインと相補的であり、複数のうち別のヘアピン分子の 3' トーホールドドメインは、第 2 ヘアピン分子の 5' サブドメインと相補的である）；並びに

(e) 鎖置換活性を有するポリメラーゼ、並びにデオキシリボヌクレオチド三リン酸 (dNTP) を反応バッファー中で合わせることににより、反応混合物を形成した後；

二本鎖核酸記録を生成するのに十分な時間にわたって、核酸重合、鎖置換及びアニーリングを達成する条件下で反応混合物をインキュベートすることを含む方法。

【実施例】

【0177】

実施例

以下の実施例では、中でも、PER 分子プリミティブを使用するいくつかのシステムの設計及び実施を説明し、PER 分子プリミティブは、インサイチュで任意の ssDNA 配列を等温で合成するための一般的なフレームワークを提供する。データは、どのようにして、プライマー交換反応 (PER) を互いに連鎖させて、固定長さのオリゴを合成する反応カスケードを形成することができるかを示す。後述するように、発癌性 miRNA マーカの感知に回答して機能性 DNA ザイムを合成したナノデバイス、合成テロメラーゼを用いて、miRNA 標的を検出して、そのシグナル検出を増幅することができる無標識バイオセンサー、オルトゴナル RNA インプットを検出することができる論理回路、及び 2 つの

10

20

30

40

50

インプットシグナルの順序を記憶した分子レコーダは、全てインプリメントに成功した。多くのケースで、同じ分子インプット及びヘアピンを異なる経路中に再構成することによって、システムの論理を実行することができる。

【0178】

プライマー交換反応は、新生プライマー鎖の触媒による伸長を促進するために熱サイクルを必要とせず、安価で、しかも分子生物学者が容易に入手可能な d N T P を燃料源とする。さらに、溶液中のヘアピン及びマグネシウムイオンの濃度によって、反応速度を調整することができる。P E R の環境応答性は、ナノデバイス、バイオセンサー、論理回路、及びレコーダにおいて証明されており、シグナル処理及び駆動プラットフォームとして D N A の動的合成を使用する強力な新規の方法を呈示する。さらに、一本鎖アウトプットの配列を規定する能力は、D N A ザイム以外に任意の数の既存のナノデバイス、例えば、トールドスイッチ (Alexander A Green, et al. Cell, 159(4):925-939, 2014) 又は D N A 鎖置換回路 (David Yu Zhang and Georg Seelig. Nature chemistry, 3(2):103-113, 2011) などと直接相互作用する機会を提供する。さらには、P E R の環境応答性は、アダプターを介したタンパク質検出及び動的遺伝子合成までさらに広げることも可能である。P E R 回路のプログラム可能な記録、処理、及び駆動能力は、分子プログラム適用の新たなパラダイムを推進するものである。

10

【0179】

特に重要なことは、例えば、P E R 経路が可能にする分子記録適用である。長いポリマーは、環境の現状に応じて異なる経路に従って成長することができるため、P E R 経路を用いて、長期にわたり環境シグナル情報を記録する分子「ティックータープ」を作製することができる。次に、こうした情報豊富な D N A ポリマーテープをシーケンシングすることによって、分子事象記録を回収することができる。このタイプの記録行動は、例えば、それ自体がシステムを有意に妨害することなく、多様な分子種及び事象に関する情報を記録することによって、動的生物学的システムの研究に多大な影響をもたらす。

20

【0180】

実施例 1

この実施例は、プライマー交換反応を用いて、規定の経路に従って核酸鎖を伸長することができることを実証する。濃度 100 n M の C y 5 標識プライマーと濃度 10 n M のヘアピンを用いて、第 1 の反応物を 37 で 2 時間インキュベートした (図 3 A)。C y 5 標識プライマーを導入する前に 1 時間インキュベートした F A M 標識プライマーを用いて、第 2 の反応物を 37 で 4 時間インキュベートした。プライマーを 100 n M の濃度で使用し、ヘアピンを 10 n M の濃度で使用した。80 で 20 分間のインキュベーションによるポリメラーゼの熱変性によって反応を停止した。また、反応は、ポリメラーゼの熱不活性化又はキレート剤 (例えば、E D T A) の導入によって停止してもよい。

30

【0181】

別の反応では、基本的な単回プライマー交換反応を確認し、特性決定するために、様々な条件下で、プライマーとヘアピンと一緒にインキュベートした (図 1 C (i v))。システムは、2つの構成要素、すなわち図 1 C (i i) に示す蛍光色素標識プライマーとヘアピンを含み、変性ゲル電気泳動を用いて、基本的プライマー交換反応の進行を追跡する。レーン 1 は、ヘアピンを含まないプライマーに対応するバンドを示し、レーン 2 ~ 11 は、100 : 1 のプライマー及びヘアピン比を用い、10 分間隔で単回プライマー交換反応の時間的進行を示す。レーン 12 ~ 22 は、様々な量の出発ヘアピンを用いて、90 分間インキュベートした同じ反応を示す。これらのデータから、溶液中のヘアピンの触媒再利用が確認され、P E R システムの速度を調整するために用いることができるヘアピン濃度の汎用性が証明される。

40

【0182】

ヘアピンとのプライマーの結合親和性を設計する際、考慮されるいくつかの検討事項がある。第 1 に、プライマーは、成長鎖の主に一本鎖状態を維持すると共に、すべての後続プライマー交換反応を促進するために、最後のステップのヘアピンから自発的に解離する上

50

で十分に短くすべきである。他方で、プライマーは、ポリメラーゼにより伸長させるのに十分な時間にわたってヘアピンと結合する上で十分に長くすべきである。この長さは、ポリメラーゼ、温度、塩、及びバッファー条件の特定の組合せを用いて、例えば、7 ~ 10塩基対であってよい。

【0183】

実施例2

プライマー交換反応を互いに連鎖させて、規定の反応経路に従い固定長さの鎖を成長させるPERカスケードを形成することができる。本発明者らがインプリメントした第1のPER経路は、dNTP、ポリメラーゼ、マグネシウム、及びプライマーを含む溶液中の1組の触媒ヘアピン種により媒介される5つの伸長ステップのカスケードであった(図2A(i))。溶液中に存在する全5つのヘアピン及びプライマーを用いて、経路は、5つの伸長ステップを通して進行する(図2A(ii))。ヘアピンAは、ドメインbと一緒にプライマードメインaの延長を触媒する。次に、ヘアピンBが、ドメインcと一緒にドメインbの延長を触媒する。続いて、ヘアピンC~Eが、dと一緒にc、eと一緒にd、fと一緒にeの延長をそれぞれ触媒する。

【0184】

変性ゲル電気泳動によって、ヘアピンの様々なサブセットと混合したときのプライマー鎖の規則的伸長を確認する(図2A(iii))。レーン1は、ヘアピンを用いず、プライマーだけをインキュベートした反応を示す。レーン2は、1つ(ヘアピンA)を除いて、成長を開始する全てのヘアピンである、ヘアピンB~Eと一緒にインキュベートしたプライマーを示す。この制御は、検出可能な漏出を一切示さない。レーン3は、プライマーとヘアピンAと一緒にインキュベートする第1の伸長ステップを示す。レーン4は、プライマーを2つの最初のヘアピンA及びBとインキュベートした際の2つの伸長を示す。レーン5、6、及び7は、ヘアピンA~C、A~D、及びA~Eとそれぞれインキュベートした場合のプライマーの3、4、及び5つの伸長ステップを示す。生成されたバンドの長さは、Sybr Gold染色後のゲルのイメージングによってさらに確認した。全てのヘアピンの触媒ターンオーバーは、ヘアピンが、プライマー濃度の1/10で存在するにもかかわらず、全てのプライマーの最終状態へのほぼ完全な変換によって確認された。

【0185】

PER合成をさらにスケールアップすることができたか否かを調べるために、DNA折り紙構造のステーブルをワンポット反応で合成した。40のステーブル鎖により一緒に保持される3文字コードスカフォールドからなる構造は、コンパクトな長方形に折り畳まれるように設計され、この形状はその短手に沿って凝集して、折り紙構造の鎖を生成する。合計80のヘアピンは、40のプライマーから40のステーブル鎖を、各々2反応ステップで合成するように設計した(図2A(iv))。80の反応は、ポリメラーゼと37で1時間のインキュベーションにより、全て同時に実施した。熱不活性化の後、スカフォールド鎖をPER混合物に直接導入し、1時間にわたってアニーリングした。次に、原子間力顕微鏡を用いて折り紙構造を視覚化することにより、適正な構造形成を確認した。

【0186】

低漏出で、しかも高変換速度を有するプライマー交換反応の例をこの実施例でさらに説明する。プライマー交換反応を用いて、合成テロメラーゼを構築したが、これによって、任意の配列を連続的に重複することができ、その結果、わずか数時間で最大数百塩基によるその伸長が達成された(図4)。合成テロメラーゼ構築物(図3)は、最終濃度100nMのCy5標識プライマー、及び10nM~100nMのヘアピン濃度を使用した。Bstラージフラグメントポリメラーゼを1xThermoPolバッファー(20mM Tris-HCl、10mM、(NH₄)₂SO₄、10mM KCl、2mM MgSO₄、及び0.1% TritonX-100)、10mM MgSO₄、及び100µM dATP、dCTP、及びdTTPと混合した。20µL反応物を4で調製し、残留dGTPを除去する専用配列と15分間のプレインキュベーション期間の後、37で4時間インキュベートした。80で20分間のインキュベーションによるポリメラーゼの熱不活性化により反応を

10

20

30

40

50

停止した。インキュベーションの後、反応物を 10 μ L の 100 %ホルムアミドと混合し、5 μ L を 15 % PAGE 変性ゲル (1 \times TBE 及び 7 M 尿素) の各ゲルレーンにロードした。200 V にてゲルを 65 分で 35 分間泳動させ、Cy5 チャンネルでスキャンした。さらにゲルを Sybr Gold で染色した後、Sybr Gold チャンネルでイメージングした (データは示していない)。

【0187】

所与の回数の伸長ステップによる鎖の延長などの、より複雑な状態遷移もプログラムした (図5)。多段階反応 (図4) では、100 nM のプライマー濃度、10 nM のヘアピン濃度、及び 10 μ M dATP、dCTP、及び dTTP を使用した。他の反応及びイメージング条件は、テロメラーゼ構築物と同じである。ブレインキュベーション浄化ステップは実施しなかった。

10

【0188】

これらの実験のいずれも、プライマー交換反応を促進するために、37 のインキュベーション温度で十分な鎖置換活性を有する Bst DNA ポリメラーゼ、ラージフラグメントを使用した。ドメイン 1 ~ 6 (図5) は、ポリメラーゼを停止するための停止配列として G 塩基を使用することができるよう、塩基 C、A 及び T からなる 3 文字コードで構成した。プライマー配列は、長さが各々 8 ~ 9 塩基対であり、コピーされるのに十分に安定してヘアピンと結合し得るように十分長く、且つコピー後にヘアピンから自発的に解離するのに十分短くなるように設計した。プライマー配列長さは、より高い温度の反応の場合長くなるか、又は、より低い温度では短くなり得る。

20

【0189】

実施例 3 . 長いポリマーの組織化トリガー

一実験では、ヘアピン配列を、5 ステップのプライマー交換反応につき 10 塩基をコピーするように設計し (図5)、さらに合計 50 塩基が付加された。配列付加毎に 1 つのヘアピンを使用し、プライマー交換反応を用いて、5 つの連続的伸長反応の各々における 10 ヌクレオチドにより、9 ヌクレオチドプライマー配列を延長した。反応物を 37 で 4 時間インキュベートした。この伸長は、2 つの相補的アプローチを用いて、増大することができる (図8A ~ 8B)。最初に、反応グラフにおけるステップの数を増加するために、オルトゴナルプライマー配列 (例えば、少なくとも 30 プライマー配列) を設計することができる。また、コピーされる各ヘアピンに対する塩基の数を増加することもできる。各ヘアピンは、次のプライマー配列の前に、任意の配列がコピーされるようにプログラムすることができ、一部の事例では、ポリメラーゼ酵素の処理能力、及び戻し鎖置換プロセスのために増加する時間は、この領域の長さにくらかの実用的制約を課す。

30

【0190】

別の実験では、プライマー交換反応条件は、伸長毎に少なくとも 30 塩基がコピーされるようなものである。従って、長さが少なくとも 900 塩基のスcaffold が合成される。段階別組織化戦略が用いられ、その場合、各ヘアピンを順次導入して、表面に結合したプライマー鎖を伸長し、その間に洗浄ステップを設ける。どの時点でも、溶液中に他のヘアピンがないことから、偽プライミング事象が起こる確率は最小である。このため、上記の方法は、容易に、より大きな長さまでスケールアップすることができる。次に、経路から外れた結合事象を回避するために、scaffold をインサイチュで組織化した後、ステابل鎖を導入する。scaffold 合成中に全てのヘアピンを溶液中含有させる自律的戦略も使用される。

40

【0191】

方法 . 全ての DNA 鎖は、商業的に合成されており、-20 での長期保存のためにこれらを 1 \times TE バッファー (10 mM Tris - HCl 及び 1 mM EDTA) 中に懸濁させる。DNA 配列は、NUPACK ソフトウェアパッケージ、並びに所望の結合エネルギーを有するプライマーについて最適化するために開発されたソフトウェアを用いて、設計する。プライマーは、初めに HPLC で精製し、ヘアピンは、ポリメラーゼによる延長を防止するためにその 3' 末端に逆方向 dT 修飾を含む非精製のものが注文される。反応のために

50

、DNAをBst鎖置換ポリメラーゼ（又はPhi29、Bsuラージフラグメント、又はKlenow（エキソ-））及び1×ThermoPolバッファー（20mM Tris-HCl、10mM、(NH₄)₂SO₄、10mM KCl、2mM MgSO₄、及び0.1% TritonX-100）と合わせる。添加されるマグネシウムは、反応速度を著しく高めることができる（データは示していない）ため、MgSO₄濃度は、特異性を維持しながら、反応速度を調節するために、5mMから50mMまで変動する。プライマーは、100nMの最終濃度で導入し、ヘアピン濃度は、1nMから1μMまで変動する。dNTP濃度は、10μMから100μMまで変動する。8～9bpプライマー配列をその5'末端にCy5色素で標識し、PAGE変性ゲル（1×TBE及び7M尿素を含む15%ゲル）を用いて、固定長さの鎖の制御された成長を確認する。シーケンシングによって、鎖をさらに確認することもできる。段階的組織化アプローチを試験するために、プライマーをその5'末端にピオチンで標識し、ストレプトアビジンでコーティングした表面上に結合させる。バッファー交換のために、鎖が磁石で分解されるように、ストレプトアビジンでコーティングした磁気ビーズを使用する。洗浄のために1×PBSバッファーを用いて、細胞固定条件との適合性を確実にする。ワンポット合成反応の場合には2～10時間、又は段階的組織化反応の場合には1時間にわたって反応物を37℃でインキュベートする。

【0192】

実施例4．2D及び3D構造のトリガーされた組織化及び折り畳み

この実施例では、任意の2D及び3D形状を折り畳むために、長い固定長さの鎖をスカフォールドとして用いる。伝統的なDNA折り紙アプローチの場合、長い鎖をスカフォールドとして用いて、特定の形状に折り畳む。スカフォールド鎖で構造領域を前後に突き通す、ラスタ化戦略を使用する（図9A）。この戦略を用いて、スカフォールド鎖は、2D又は3D形状を通過した後、スカフォールド上で局在化しているはずのドメインと相補的なステーブル鎖と互いにテザリングする。顕微鏡法で視覚化する上で十分に大きな特徴を有する構造を組織化するために、実施例3で生成した900bpスカフォールドを使用する。約20のステーブル鎖（各々42～45塩基対を有する）が使用される。

【0193】

プライマー交換によって規定形状の構造を組織化する別の方法は、レンガ構造に自己組織化するDNA一本鎖タイル（SST）構造を合成することである（図9B）。このアプローチを用いて、多くの小さなDNA鎖が共同して、その相補的領域に基づく複雑な形状に組織化する。各々の鎖は、単一ヘアピンにコード化されるため、個別のヘアピン種の数、個別のSSTモノマーの数と等しい。あるいは、SST配列は全て、一本鎖スカフォールド上で合成され、その後、制限酵素により切断される。この戦略によって、実施例3のコピー領域を用いる、より少ないヘアピンの使用が可能になるが、1つの鎖への全てのSST配列が同時局在化するため、長い鎖がそれ自体とハイブリダイズして、伸長を減速する可能性がある。

【0194】

構造を組織化するさらに別のアプローチは、一本鎖DNA折り紙用のスカフォールドとして合成鎖を使用するものである（図9C）。このアプローチでは、鎖は節のない様式でそれ自体に折り畳まれて、特定の形状を形成するように設計されている。結合相互作用が分子内であるようにプログラムされていることから、折り畳みにステーブルを必要としない。一部の事例では、次のプライマー配列の前にコピーされるヘアピン上の領域内に結合領域が全て位置するような方法で、全ての結合領域がプライマー領域と一緒に挿入されるため、結合領域は、延長反応を妨害しない。

【0195】

方法．インキュベーション反応のための方法は、実施例3に記載のものと同一方法である。一部の事例では、プライマー交換反応が完了した後の構造の折り畳み及び安定性を促進するために追加のマグネシウムを添加し、10mM～100mMの濃度の余剰カチオンを使用する。アガロースゲル電気泳動（2%、Sybr Gold染色剤で染色）を用いて、構造形成を大量に視覚化する。完全に形成された構造に対応するゲルバンドを切り取り、透過型

10

20

30

40

50

電子顕微鏡法 (TEM) 及び/又は原子間力顕微鏡法 (AFM) イメージングによる確認の場合と同じ塩条件のバッファー中で溶離する。また、DNA PAINT超解像イメージングを用いて、成長した個々の構造の空間的立体配座を直接視覚化し、評価することもできる。プライマー交換反応物は全て、37 でインキュベートし、この温度又は室温のいずれかで構造を折り畳むことにより、固定細胞条件との適合性を確実にする。

【0196】

実施例5．分岐構造の効率的な成長

この実施例では、プライマー交換反応を用いて、分岐構造を組織化する。新たなプライマーの伸長は、それらが構造と結合したときに初めて起こるべきであるため、ヘアピンは、この同時局在化を認識して、コピーを促進すべきである。これは、2つの配列からなるプライミング配列を用いることによって達成することができる (図10A)。2つの個別のプライマー領域 (図10Aのa1及びa2) は、それ自体では、ヘアピンと極めて弱く結合するために、プライミング反応を開始する上で十分長く結合することができないようにすべきである。しかし、同時局在化すると、これらのプライマーは、プライマー交換反応で以前使用した8~9塩基対プライマーと同様の動態学を有し、それによって、ヘアピンから自発的に解離するのに十分短く、且つ鎖置換プライミングを好適に開始するには十分長くなるようにすべきである。8~9塩基対は、通常のプライマー交換反応におけるプライマー長さについては十分であったことから、4~6塩基対のa1及びa2プライマー領域を使用した。

【0197】

方法．構造をインキュベート及び評価する方法は、実施例4に記載のものと同一である。

【0198】

実施例6．ナノデバイス

プライマー交換反応適用の多用途性の証明として、本発明者らは、発癌性miR-19aシグナルを検出した後、独立したRNA転写物を切断するようにプログラムされた機能性DNAザイムを合成するナノデバイスをインプリメントした (図26A)。標的検出のために、本発明者らは、発癌性microRNAであるmiR-19a及びmiR-19bの共有3'領域に結合するヘアピンを設計した。検出にตอบสนองして、PER経路は、Twist遺伝子の完全長mRNAを切断して、DNAザイム (DZ-TWT) を合成するが、これは、アポトーシスをインビボで促進することが判明している。

【0199】

この適用のために、1対の合成ヌクレオチド、iso-dG及びiso-dCを全ヘアピン上で停止配列として使用した (図26B)。これにより、合成配列において4つのDNA塩基全てを使用することが可能になった。PER経路のアウトプット構築物の一例として、本発明者らは、既にインビボで確認されているDZ-TWT DNAザイムを用いることを選択した。

【0200】

DZ-TWTは、同族RNA配列と相補的であるように設計された2つのアーム同士の特定のプリン-ピリミジン結合を切断する15nt触媒ドメインを有する10~23のDNAザイムのクラスの一部であり、任意のRNA配列を切断するように再プログラムすることができる。このシステム論理を実行するために、3つのPERヘアピンは、標的microRNAの検出時にだけDZ-TWT配列を合成するように設計した (図26C)。標的が存在するとき、Aヘアピンは、標的鎖上にドメインaの合成をパターン形成する (ステップ1)。続いて、B及びCヘアピンは、ドメインb及びcの付加をそれぞれパターン形成することができる (ステップ2~3)。完了したabc配列は、DZ-TWT配列を形成し、これが、溶液中の24bp TWT RNAフラグメントに結合して、特定の塩基でTWT mRNAの切断を触媒するループを形成することができる (ステップ4~5)。次に、DNAザイムが、切断した断片から解離した後、これを再利用することができる (ステップ6)。

【0201】

10

20

30

40

50

標的に付加された全DNAザイムの配列を図26Dに示す。DZ-TWT配列を分割した3つのドメインが、異なる色で示されている。新生鎖が、コピー後にヘアピンから解離することが確実にできるように、ヘアピン上のプライマー結合部位の長さ（ヘアピンA、B及びC上の19s*、as*、及びbs*）を調節して、8~9bpの新生鎖と結合させる。

【0202】

ナノデバイス機能を評価するために、本発明者らは、ヘアピンの様々なサブセットと、Cy5標識miRNA標的を含む、又は含まないFAM標識TWT断片とを含有させた（図26E）。レーン1及び2は、いずれのヘアピンも存在せずに、インキュベートした場合のTWT断片及びmiR-19aバンドを示す。レーン3は、最後の2つのヘアピンB及びCの存在下で、しかし最初のヘアピン、Aが存在しない場合、miRNAの伸長がないことを示す。レーン4は、miRNAをAヘアピンのみ及びTWT断片と一緒にインキュベートした場合の最初の延長ステップを示す。レーン5は、最初の2つのヘアピン、A及びBと標的のインキュベーションを示し、これにより2段階伸長が達成される。標的を3つのヘアピン全てと混合すると（レーン6）、全DZ-TWT配列が標的に付加され、TWT断片を首尾よく切断することができる。しかし、全てのヘアピンを標的なしで混合すると、TWT断片の切断は起こらない（レーン7）。DNAザイム構築物の触媒ターンオーバーは、わずか10nMのmiRNA標的で、20nMのTWT RNAのほぼ完全な切断によって示される。

【0203】

実施例7．無標識バイオセンサー

ナノデバイスを用いて、本発明者らは、任意のインプット配列に応答して、任意の生物学的に関連するDNA配列を合成することができる。1つの配列を別の配列に変換するPER経路のプログラム可能性は、環境応答性の合成システム用の強力なモジュラーフレームワークを提供するが、本発明者らは、いくつかの追加適用を用いて、これをさらに詳しく調べた。本発明者らは、反復配列ドメインの長い鎖を合成する単一ヘアピンシステム（合成テロメラーゼと呼ぶ）をインプリメントすることにより開始し、次に、この構築物を、無標識バイオセンサーのためのシグナル増幅の1形態として使用し、これは、特定のmiRNAインプットを検出すると、蛍光コンカテマーを成長させる（図27C）。

【0204】

合成テロメラーゼシステムは、単一プライマー配列（ドメインaなし）と、成長鎖に反復ドメインaの付加を触媒するヘアピンとを含む（図27A）。この実証のために、本発明者らは、反復配列として10bp配列ATCTCTTATT（配列番号1）を、この配列の最後の9bpに対応するヘアピン結合領域と共に選択した。前述と同様に、プライマーをゲル視覚化のためにCy5蛍光色素で標識し、ヘアピンには、その延長を防止するために、その3'末端に逆方向dTを設けた。

【0205】

本発明者らは、以前の実証と同様の実験セットアップを用いて、構築物を確認し、数桁にわたってヘアピン濃度を変化させることにより、どのようにして反応速度を調整することができるかを示した（図27B）。外来のdGTPを消費するように設計された専用のヘアピン種との15分のインキュベーション後、ヘアピンをプライマーと一緒にインキュベートした。レーン1は、ヘアピンを添加しないプライマーバンドを示し、レーン2~6は、1~100nMの範囲のヘアピン濃度で成長したテロメラーゼを示す。反応速度は、システム中のヘアピンの濃度を調節することにより容易に調整することができ、これによって、制御することができる反応速度の広い動的範囲が提供される。本発明者らは、さらに、マグネシウム濃度を用いて、テロメア化速度を調節することができ、これは、反応速度論を調節するためのさらに別の方法を提供することも見出した。

【0206】

続いて、本発明者らは、特定のmiRNAシグナルの存在に応答して初めてこのタイプのテロメアアウトプットを条件付きで成長させることができる無標識バイオセンサーをイン

10

20

30

40

50

プリメントする戦略を考案した(図27A)。特定の蛍光染色剤に結合する配列を設計することにより、本発明者らは、これらの合成されたテロメアを蛍光にすることができ、これによって、青色光の下で結果の直接視覚化が可能になる。蛍光は、Thioflavin T (ThT) 染色剤の結合によって達成され、これは、ヒトテロメア配列TTAGGGの反復により形成される四重鎖モチーフに挿入されると、より蛍光となることが判明している。本発明者らが選択した標的は、発癌性miRNA、miR-19aであった。

【0207】

検出器 - テロメラーゼシステム(図27D)をインプリメントするために、3つの構成要素: プライマー(P)、ゲートドヘアピン(A)、及びテロメラーゼヘアピン(B)が必要である。標的検出をヒトテロメア配列の合成に変換するために、トーホールド交換反応は、PERヘアピン(A)のプライマー結合が、同族miR-19aシグナルの存在下でしか露出されないように設計した。miRNA標的は、Aヘアピンに結合したプロテクター鎖上の短い露出ドメインに結合して、残る相補的配列を介して分岐移動することができる。相補的miR-19a*ドメインが完全に置換されたら、プロテクター鎖は、保護されたPERヘアピンから自発的に解離して、Aヘアピン上にプライマー部位a*を露出させることができる(ステップ1)。一旦露出したら、このPERヘアピンは、プライマーのドメイン上にbドメインの付加を促進する(ステップ2)。bドメインは、ヒトテロメア配列TTAGGGに対応し、この配列は、後に、構成的に活性のテロメラーゼヘアピンBによってテロメア化する(ステップ3)。最後に、これらのテロメアは、四重鎖構造を形成し、その中にThT染色剤が挿入されて、蛍光になる(ステップ4)。

【0208】

条件付きテロメア化反応を評価するために、本発明者らは、反応物を様々なサブセットの構成要素と一緒にインキュベートし、結果をネイティブPAGEゲル上で視覚化した(図27E)。レーン1は、miRNAだけを含み、分子プログラム成分のいずれも含まない反応を示す。プライマーPとテロメラーゼヘアピンBを含むが、ゲートドヘアピンAなしで、miRNA標的は、いずれのオリゴとも結合しないため、テロメア化は起こらない(レーン2)。プライマーPとゲートドヘアピンAを含むが、テロメラーゼヘアピンBなしで、miRNAは、そのバンドにおけるシフトにより示されるように、プロテクター鎖と結合する(レーン3)。テロメア化は、P、A、及びBの3つ全てがmiRNA標的と一緒に存在するときには起こらない(レーン4)。いずれのmiRNA標的も含まない対照反応では、要素P、A、及びBは、バックグラウンドテロメア化をほとんど生成しない(レーン5)。

【0209】

より単純な読み出し法として、Safe Imager 2.0 Transilluminatorを用い、アンバーフィルターユニット(vis)で、反応物の蛍光を視覚化することができる。これは、シグナルを読み出す、安全で、費用有効的、且つ時間効率的な方式を提供する。また、FAMチャネル(FAM)下の蛍光スキャナー上でチューブを視覚化してもよい(詳細については、方法のセクションを参照されたい)。

【0210】

実施例8 . 論理計算

論理式評価による標的配列のシグナル処理は、複雑な動的分子行動をプログラムするための有益なフレームワークとして生まれた。以下に、本発明者らは、単純に、標的鎖の存在の有無に基づいてどのプライマー配列が付加されるかをプログラムすることにより、任意の配列についてAND、OR、及びNOT論理をインプリメントするために、どのようにしてPERを用いることができるかを示す。基本的な戦略は、RNA標的をゲートドヘアピンと平衡させて、プライマーを導入し、インキュベーション後のゲル上の長さによる結果を読み出すことである(図28A)。

【0211】

2つのRNAインプットについてのORゲートは、センサー及びレコーダアプリケーションに導入されたゲートドヘアピンの2つと一緒にインプリメントすることができる(図

10

20

30

40

50

8 B)。各標的は、2つのヘアピンの1つを活性化することができ、2つのヘアピンの一方又は両方が活性化されるとき、bドメインがプライマーのドメイン上に付加され得る。変性ゲルを用いて結果を確認したが、これは、いずれの標的も存在しない場合、延長産物を示さない(レーン1)。しかし、一方又は両方の標的が存在すれば、プライマーは1つのドメインによって延長される(レーン2~4)。2つの標的が両方とも存在するか(AND論理)否かを評価するために、それらの存在を段階的にチェックした(図8C)。プライマードメインaは、いずれの標的も存在しない(レーン5)か、又はTWT標的だけが存在する(レーン6)場合、延長されない。miR-19a標的だけが存在する場合、プライマーは、1つのドメインによりabに延長される(レーン7)。しかし、両方の標的が存在する場合、プライマーは、完全なabc配列まで延長され、これは、AND式の評価の成功を示している(レーン8)。

10

【0212】

NOT論理のインプリメントには、標的容認と拒絶の間の時間尺度の分離が必要である(図8D)。これは、真(True)と評価する、ヘアピンよりはるかに高い濃度の標的依存性シンク反応物を含有させることによって達成することができる(bc)。従って、この場合、標的であるmiR-21が存在すれば、bプライマーは、不活性(グレー)状態に送り込まれる。しかし、標的が存在しなければ、低い速度で、全てのbプライマーが、bcに変換される。標的を含まないインキュベーション結果(レーン9)と標的を含むインキュベーション結果(レーン10)とを比較することにより、ゲートを確認した。

【0213】

20

最後に、これらのタイプのゲートのいくつかを互いに接続して、式(miR-19a OR TWT) AND (NOT miR-21)を計算することができる(図28E)ことを示す。この計算は、図28BからのmiR-19a OR TWTゲートの結果から、図28DからのmiR-21ゲートの結果へのカスケードによって達成される。前述と同様に、結果をゲル電気泳動によって確認した。インプットが全くないか、又はmiR-21標的だけが存在する(レーン13及び14)場合、プライマーは、大部分がその非延長状態のままである。TWTのみ又はmiR-19aのみのいずれかが存在する場合には、式は、完全に延長されたabc産物(レーン15及び16)によって示されるように、真(True)と評価する。しかし、これらのうちの1つが、miR-21に加えて存在する場合、プライマーは、不活性状態に送り込まれる(レーン17及び18)。miR-19a及びTWTの両方を有するが、miR-21を含まない場合には、再び真という結果になる(レーン19)が、3つの標的全てが存在する場合には、式は再び偽(False)と評価する(レーン20)。これらの回路構成要素は、PER方法のモジュール性を実証している。1つの論理評価の結果は、合成プライマードメイン及び結合プライマードメインを組み合わせることにより、互いに容易にカスケードすることができ、このタイプの再構成は、任意の一本鎖RNA又はDNAインプットを仮定して、理論的にあらゆるプライマードメインまで延長することができる。

30

【0214】

実施例9．事象レコーダ

前述のシステムを用いて、本発明者らは、アウトプット配列は、インプット配列から完全に独立となり得るため、PERが、いかにして、環境応答性動作をインプリメントするためのモジュールフレームワークを提供するかを示した。PERのプログラム可能性、及び分子シグナル処理でのその適用をさらに明らかにするために、本発明者らは、2つのRNA標的が、動的に合成された転写物の証拠となる、順序をコードすることができる時間的記録システムを作出した(図29A)。

40

【0215】

この適用に用いられる4つのヘアピンの各々は、無標識バイオセンサーとして標的検出のために同じトールド交換方法を使用し、これによって、ゲートドPERヘアピンの結合部位は、同族シグナル(この場合、miR-19a)の存在下でのみ、条件付きで露出される(図29B)。ゲートドヘアピンA~Dは、プライマーの動的伸長をパターン

50

形成し（図29C）、ヘアピンA及びDは、miR-19aシグナルの存在下でのみ活性化され、ヘアピンB及びCは、Twist遺伝子、TWTの断片の存在下でしか活性化されない（図29C）。

【0216】

2つのRNAシグナルが導入された順序に応じて、プライマーは、2つの伸長経路の1つを経ることになる。miR-19aが最初に導入された場合、初期プライマーは、ヘアピンAを介してbと一緒に延長される。次に、TWT標的が導入されると、ヘアピンBが、cをプライマーに付加することができる。これに対し、TWTが最初に導入された場合には、dが、露出したCヘアピンを含むプライマー配列に付加され、その後、miR-19aシグナルと遭遇すると、ヘアピンDが、eを付加することができる。

10

【0217】

ヘアピンは、付加のたびに異なる数のヌクレオチドをコピーするように設計されているため、シグナルが溶液に導入された順序に基づいて、配列長さの差別化を達成することができる。これらの結果は、PAGE変性ゲル上で読み出すことができる（図29D）。プライマー及びヘアピンA～Dとの5時間のインキュベーションに、1又は3時間のいずれかの時点でシグナルを導入することにより、記録動作を評価した。レーン1は、標的が導入されていないシステムを示し、4つのヘアピン全ての連続的保護によって延長を示していない。レーン2及び3は、miR-19a(miR)が1及び3時間の時点でそれぞれ導入されたときのヘアピンAによりパターン形成された10bpステップの単一延長を示す。1又は3時間でTWTを導入すると、露出したCヘアピンによる14bpの単一延長が得られる（レーン4及び5）。初めにmiRNAを、次にTWTを導入すると、2つの10bp延長が起こり、abc配列を形成する。最後に、初めにTWTを、次にmiRNAを導入すると、2つの14bp延長ステップが起こり、adeを形成するが、これによって、合成DNAの長さの2つのRNAシグナルの時間的關係を読み出す本発明の能力が確認される。

20

【0218】

PERによる鎖の動的且つ環境応答性合成は、このタイプのプログラム可能な時間的記録を可能にするものであり、分子事象の転写物を作成するPER技術の重要な利点を呈示する。本発明者らは、全てのステップで完全な配列プログラム可能性を有し、任意の標的配列の検出と、それに続いて、シグナル情報から、分子メモリーの形態としての配列アイデンティティ及び長さへの変換とを可能にする。

30

【0219】

実施例10．インビボでのPERのインプリメント

PERは、独立の核酸配列の読み取り及び書き込みを組み合わせる新規の方法を提供することから、これをインビボでインプリメントすれば、細胞内で高度にプログラム可能な遺伝子調節及び記録プラットフォームが可能になる。PERカスケードは、標準的な細胞インキュベーション温度である37℃で動作するように既に設計されているが、異なる温度でPERが動作できるように、プライマー長さを調節することもできる。反応は、生体サンプルと適合性である2mM～22mMまでの広範なマグネシウム濃度で確認されている。

40

【0220】

本明細書には、PERをインビボでインプリメントする少なくとも2つのアプローチが、それぞれ異なる適用と共に提供される（図30）。最初のアプローチは、PERヘアピンで、標的細胞集団を直接形質転換又はトランスフェクトするものである（図30A）。プライマーは、ヘアピンと一緒に導入するか、又は各細胞内に既に転写された配列であってもよい。このアプローチは、全ての細胞をターゲティングしないため、主として記録のためにこれらの適用を用いてもよい。例えば、PERを用いて、単細胞レベルで、多重化シグナル情報を記録することができ、合成された転写物を回収し、シーケンシングすることができる。ヘアピンの3'末端は、典型的に、逆方向dTベースを既に有することから、一部の事例では、これらの末端は、細胞内での分解に対する何らかの防御も有する。

50

【0221】

第2のアプローチは、P E Rヘアピン配列をプラスミド又は細胞のゲノム中に組み込むことによって、これらの配列が、R N A P E Rと一緒に使用するためのR N Aヘアピン中に転写され得るようにする(図30B)。この発現アプローチは、構成要素が首尾よく組み込まれた細胞がそのために選択されると、細胞内P E R合成を含む全集団を生成するという利点を有する。適用範囲がはるかに広く、しかもP E Rカスケード構成要素は継代されることから、細胞構成要素の記録は、第1のアプローチと比較して、長い時間枠にわたって起こり得る。いずれのプログラムされた行動も、より広い適用範囲を有する。P o l y Tテールは、不要なヘアピン延長の有効な阻害剤として既に立証されているため、これをヘアピンの3'末端に使用することができる。

10

【0222】

信頼性の高い停止配列は、鎖置換R N Aポリメラーゼが引き続きそれを通過するのを妨げるが、これは、ヘアピンからの新たに合成された鎖の置換に必要である。一部の実施形態では、停止合流点で構造を折り畳むことにより、重合を阻害する配列モチーフ(例えば、テトラプレックス(四重鎖)及びトリプレックス構造)を用いてもよい。別の実施形態では、重合を阻むのに全てのヘアピンステム同士で共有される特定の配列モチーフと結合する強力な結合タンパク質(例えば、d C a s 9(そのR N A結合ハンドルは、全ヘアピンのステムループ部分として直接含有され得るヘアピン構造である))を用いてもよい。

【0223】

実施例11. 時間を計測するための分子時計

20

P E R多重化能力を最大にするために、大きなセットの作動性シグナル検出モジュールを、D N A及びm R N Aなどの多様な一本鎖核酸、二本鎖D N A、及び小分子及びタンパク質について編集する(図12A~12F)。例えば、ヘアピンのプライマー結合領域は、同族シグナル(例えば、カルシウムイオン濃度)が、プロテクター鎖又は架橋剤のいずれかと一緒に、溶液中に存在するときだけ露出される。各ヘアピンが、プライマー鎖の状態間の遷移を決定することから、必要なシグナルが存在しないとき、ヘアピンを阻害すれば、プライマーは、その現状態で有効に停止される。一本鎖D N A及びR N Aを検出するために、修飾されたトーホールド交換反応^{58, 59}を使用するが、その場合、プロテクター鎖(例えば、図12Aでは、配列 $\times 2' \times 1'$)は、漏出の可能性を低減するために、ヘアピン濃度に対して過剰濃度で存在する。二本鎖D N Aの検出は、非対称P C R法を用いて、同族トーホールド対をデュプレックスの末端に結合させることにより実施する。この方法はさらに拡大され、アプタマー配列を用いて、シグナルが存在しないときだけ、ヘアピンのプライマー結合領域を塞ぐことにより、タンパク質及び小分子を検出する。最後に、U V照射は、C N V K架橋剤の使用によって検出する⁵⁷。これらのシグナル検出メカニズムは全て、可逆的であり、これは、シグナルが動作しているだろう溶液からシグナルが無期限に隔離されないことと、シグナル濃度の変化が、ヘアピン結合部位露出の変化により表されることとの両方を意味する。

30

【0224】

時間を計測するために、配列延長ステップにおける分布を追跡することにより、テロメラーゼサブ回路を時計として用いる(図13)。検出されたシグナルは、プライマー交換伸長ステップの場合の「結合」速度などのシステムの動態学的特性を変化させないため、シグナル検出の間に溶液中の鎖が経るテロメラーゼステップの数は、これらのテロメラーゼサブ回路が活性である時間の量を示している。全体として、システムは、ストップウォッチとして作用し、テロメラーゼを2つのインプットモジュールとつなげることにより、2つのシグナルの検出の間に経過した時間の量をコードする。さらに、時間を計測するのに用いる時間尺度は、ヘアピン濃度を変えることによって調節することができ、これにより、反応の速度、並びに溶液中のd N T Pの量を有効に変化させる。

40

【0225】

方法. 反応インキュベーション条件は、実施例4と同じである。初めにd N T Pを100 μ M濃度で使用し、ヘアピン濃度は、10 n Mから1 μ Mまで変動させ、テロメラーゼへ

50

アピンの濃度は、他の濃度より低い。d N T P 濃度は、所望の速度論と適合するように変動し、d N T P 濃度は、高忠実度重合を促進する上で十分に低く、システムの動作を通じて実質的に消費されないように十分高い。インプットシグナルの濃度は、シグナル検出モジュールを最適化すると共に、特異性と収率との間の適切な妥協点を見出すために変動させる。プライマーを 1 0 0 n M でインキュベートした後、変性ポリアクリルアミド (P A G E) ゲル上でのスクリーニングを可能にするために、前述したように C y 5 染色剤で標識する。検出された分子事象間の適正なラダー合成は、P A G E ゲル上でのバンド長さの分布により視覚化し、同じ反応条件で特定の時間にわたりインキュベートした基準反応物と比較することができる。ゲルの解像は、より長い配列の場合、正確な分布当てはめを困難にする恐れがあるため、次世代シーケンシングを用いて、これらの配列をさらに確認する。

10

【 0 2 2 6 】

実施例 1 2 . プログラム可能な時間駆動のための分子タイマー

この実施例で説明する遅延回路は、特定の時間にわたって起こるようにプログラムされる、シグナル検出事象と駆動の間の連続的伸長ステップのセットを含む (図 1 4 A ~ 1 4 C) 。作動の前に、プライマーにいくつかの反応状態を通過させることによって、時間遅延を生成し、反応の数又はヘアピンの濃度のいずれか、従って反応の速度を変化させることにより調整する。このモジュール性は、広範な時間遅延後に駆動を可能にする (例えば、分から日までの時間尺度で駆動する) 。

【 0 2 2 7 】

プライマー交換ヘアピン上に任意の配列をコピーする能力によって、プライマー交換反応システムは、アウトプットとして多数の任意の一本鎖シグナルをアウトプットすることができる。この一本鎖シグナルを用いて、溶液中の鎖置換回路と相互作用するか、又は相補的 R N A 分子とハイブリダイズすることができる。一部の事例では、このアウトプットは、タンパク質合成を活性化するトーホールドスイッチ^{5 8}を活性化する。あるいは、有害シグナルの感知が、1つのアウトプットでトーホールドスイッチをトリガーし、続いて、設定時間量の後、別のアウトプットで同じスイッチを不活性化する。これによって、アウトプットを無期限に活性化する必要なく、環境シグナルに応答するアウトプットシグナルのパルスが可能になる (図 1 5 A ~ 1 5 D) 。タンパク質シグナルのこのレベルのプログラム可能な、時間的制御は、以前の技術ではスケールアップが難しく、機能性合成システムを作製する、又は制御されたインビトロ環境において、反応速度論などの基本的生物学的メカニズムを研究する上で有用である。

20

30

【 0 2 2 8 】

方法 . プライマー交換インキュベーション条件は、実施例 6 と同じである。例えば、アウトプットシグナルによりそのクエンチャー標識補体から蛍光色素標識鎖の置換を経時的に測定する分光蛍光計などで、アウトプットを経時的に直接測定して、駆動の適正な遅延を確認することにより、タイマー回路遅延を評価する。遅延を測定する別の選択肢は、G F P 生成トーホールドスイッチの駆動を経時的に用いて、蛍光を経時的にモニターするものである。

【 0 2 2 9 】

実施例 1 3 . 多重化時間記録及び駆動

プライマー交換反応は、例えば、2つの分子の1つが感知された場合 (O R 論理) のみ、又は両方が感知された場合 (A N D 論理) にのみ、アウトプットを放出することによって、様々なセットのシグナルに応答して駆動させるモジュールフレームワークを提供する (図 1 6 A ~ 1 6 I) 。これらはまた、一部の事例では、プログラムされた遅延後に、インプットが検出されていない場合、シグナルが存在しないか (N O T 論理) 否かを検出するようにもプログラムされている。これらのゲートは、互いに連結されて、大きなセットの環境シグナル上で論理を実施し、前述した方法で駆動する (図 1 7 A ~ 1 7 C) 。これらのデジタル論理回路は、様々な時点で検出される異なるセットのシグナルに応答性であり、転写及び翻訳ネットワークと相互作用する精巧なシグナル処理システムの基礎を提供す

40

50

る。

【0230】

集積システム内の各モジュールは、実施例6及び7に記載のように、まず個別に試験する。続いて、システム内の各サブ回路がその機能を維持し、あらゆる問題を処理するのに必要なデバッグを促進することを確実にするために、これらを段階的に組み合わせる。

【0231】

方法．方法は、実施例6及び7に記載のものと同一である。

【0232】

実施例14．発達性自己組織化による差別化

実施例6～8で作製したシグナル検出モジュールと、実施例3～5で作製したトリガーされる構造合成とを組み合わせることにより、環境シグナルに基づく形状形成の差別化を操作することが可能である（図19A～19C）。各シグナル検出器モジュールは、そのプライマー結合領域が、同族シグナルの存在下でしか露出されない単一ヘアピンを必要とする。差別化樹形図の終端状態は、構造形成のトリガーとして役立つ。

10

【0233】

方法．反応インキュベーション及び構造評価の方法は、前述した実施例に記載のものと同一である。Cy5標識プライマーを用いて、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動（変性PAGE、典型的には、TBE-尿素）によって、発達性自己組織化の最初のステップのための適正な鎖の長さ分布を確認する。続いて、プライマー上で成長した差別化形状をまず、非変性アガロースゲル電気泳動で評価し、次に、TEM又はAFMイメージングを用いて視覚化する。さらに構造は、DNA-Paint超解像法^{8,9}でもイメージングする。

20

【0234】

実施例15．環境記録のための分子ティックータブ

PERカスケードの動的合成反応を用いて、分子シグナル情報を経時的に記録することができる。この1つの有力な例は、分子ティックータブシステムであり、これは、シグナル依存的合成を連続的PERテロメア化反応と組み合わせることにより、特定のシグナルが溶液中に存在する場合についての情報を記録する（図20A～20D）。まず、1シグナル追跡システムをインプリメントし、これを用いて、2時間にわたる単一シグナルの速度論を解明することができる。実験及びその結果の説明を以下に記載する。

30

【0235】

分子インプリメンテーション．1シグナルシステムの分子インプリメンテーションは、2つのPERヘアピンから構成され、その1つは、分子「時計」として役立ち、全ての実験において同じ一定濃度で存在し、もう1つは、「シグナル」の役割を果たし、反復プライマー配列の前の2つの追加塩基の複写をパターン形成する（図21A～21D）。各々異なる実験では、反復ドメインの前に実験特異的バーコード配列を有するプライマーを使用するため、全ての実験を一緒にプールして、単一のシーケンシングランに供することができる。

【0236】

実験の概略

40

記録．3つの記録実験を実施した。実験Aでは、2時間のインキュベーション時間を通してシグナルを導入しなかった。これは、適正なクロック反応が起こったことを確認するための対照実験の役割を果たす。実験Bは、2時間のインキュベーションを通して、500 pMの一定シグナルヘアピン濃度を用いた。クロック速度に対する相対シグナルを用いて、濃度曲線を較正することができたため、上記の反応を最後の実験の当てはめのための基準として用いた。実験Cは、シグナルなしで1時間実施した後、200 pMのシグナルを途中で導入し、濃度曲線aステップ関数を作成した。

【0237】

記録は、37℃で2時間実施した。反応は、5 µLの10×ThermoPolバッファ、40単位のBstラージフラグメントDNAポリメラーゼ、5 µLの100 mM MgSO₄

50

、5 μ Lの混合dATP/dTTP/dCTPの100 μ M溶液、5 μ Lの1 μ Mの適切なプライマー、5 μ Lの50 nMクロックヘアピン、実験Bについてのみ5 μ Lの5 nMシグナル溶液、並びに50 μ Lまでの水を用いて、氷上で調製した。反応Cの場合、1時間のインキュベーション後、1 μ Lの10 nMを添加した。インキュベーション後、反応物を氷に移し、10 μ Lの0.5 M EDTAで停止した。プールした反応物をNEB Monarch PCR & DNA Cleanup Kitに通過させて、記録された転写物を精製した。

【0238】

アダプタータグ付け．精製した転写物を、アダプター配列で、その5'及び3'末端にタグ付けした(図22)。結合鎖と記録を余剰のスプリント鎖と混合し、23で1時間のインキュベーションにより、1 \times T4 DNAリガーゼバッファー中のT4 DNAリガーゼで連結した。連結後、転写物をDNAクリーンアップカラムで再度精製した。

10

【0239】

ゲル抽出．精製アダプタータグ付きオリゴを、65で維持する15%PAGE変性ゲル(1 \times TBE)上に泳動させた。ゲルは、200 Vで15分間泳動させ、1 \times Sybr Gold染色剤で染色した。Sybr Goldチャンネル内で配列分布を視覚化した後、アダプタータグ付き配列のゲル抽出をTyphoon FLA 9000スキャナーで実施した。ゲルの抽出された部分を1.5 ml円錐チューブ中に導入し、粉碎してから、50 μ Lの1 \times TEと合わせ、旋回させた。-80及び90でそれぞれ10分間の連続的インキュベーションの後、構成要素をFreeze 'N Squeeze DNAゲル抽出カラム内に導入し、15,000 gで1分間旋回させた。抽出した転写物をもう1回DNAクリーンアップカラムに通過させた後、シーケンシングした。

20

【0240】

転写物シーケンシング．Illumina(登録商標)ペアエンドDNAシーケンシングを用いて、転写物をシーケンシングした。

【0241】

配列の構文解析．配列をFASTQフォーマットで検索し、下記のように、クロック(0)及びシグナル(1)記録に構文解析した。初めに、有効な実験バーコード及び3'アダプタータグの最初の部分を有する初期プライマー配列の両方を同定することができた配列のみを検索した。というのは、これは、全記録がシーケンシングされ、実施された実験の1つに適用され得ることを示すためである。次に、シグナルヘアピンに対応する配列の全ての発生を「1」で置換し、次に、クロックヘアピンによりコードされる反復クロックドメインの全ての発生を「0」で置換し、その際、プライマー上の初期反復ドメインは除外した。0及び1の完全な2進列を有する記録だけを分析した。

30

【0242】

結果

構文解析した2進配列を用いて、濃度曲線を当てはめたが、この最適化の結果は、図23A~23Bで見ることができる。

【0243】

この実施例では、分子ティッカーテープを含む環境におけるシグナルに関する濃度情報を回収できるだけでなく、これらのシグナルが時間経過とともにどのように変化するかについての速度論的情報も回収できることを証明する。このタイプの時間記録は、多重化及び定量的様式で生物学的現象を研究する能力に多大な影響をもたらし得る。さらには、本発明者らのシーケンシングデータを用いて、200 pMのシグナルが容易に検出可能であったが、これは、この記録技術の別の潜在的適用：高感度標的検出を示すものである。検出限界をさらに低濃度までスケールダウンすることができれば、この技術は、血清又はその他の体液中のmiRNAといった非常に低濃度のマーカの多重化検出に適用することができるだろう。

40

【0244】

別の例として、実施例6~8でインプリメントしたクロック及び経路再構築システムを組み合わせるにより、環境シグナルに関する情報を記録し、その後、経時的に高精度で

50

読み出すことができる。これは、連続的に伸長する鎖にコードされるシグナル検出事象の使用によって達成される。1つのテロメア化反応がクロックとして用いられ、さらなる反応が、異なるシグナルを経時的に記録する(図20A~20D)。実際のシグナル濃度の結果としての経時的なクロック及びシグナル配列組込みの分布を考慮することにより、絶対時間にわたる各々のシグナルについての濃度トレースをデータに当てはめる。これらのデータを当てはめるために、クロックのみが作動し、シグナル濃度が変動し、1つのシグナル検出器モジュールだけが動作している、制御された実験を実施することによって、それぞれの組込みタイプについて反応速度を測定する。回路が作動する時間量及びシグナル濃度はわかっていることから、長さの分布を用いて、個別の反応それぞれについて結合速度、 k_{on} を決定する。次に、これらの速度を用いて、ディッカーテープ転写物中への組込みの数及び既知反応速度に基づいて相対シグナル濃度を決定する。

10

【0245】

プライマー配列は、その5'末端に、塩基のランダム配列から構成されるユニークな分子識別子(UMI)を含有する。これらを用いて、シーケンシングデータ中の重複読み取りを識別して、環境シグナルの時間依存性に関する可能な限り多くの定量的情報を保存することにより、データ分析におけるバイアスを低減する。

【0246】

方法・反応条件は、実施例6~8に記載のものと同一である。各Cy5標識プライマーは、15ヌクレオチドのユニークな分子識別子(UMI)でも標識されているため、転写物はPCR反応によって増幅され、次世代シーケンシング法で読み取られる。15ヌクレオチドUMIを用いると、1,073,741,824の可能性があり、従って、シーケンシングからの最大2千万の読み取りデータ中の同一UMIを有する読み取りデータは、ヌクレオチドバイアスさえ含む異なるプライマーに由来する。専用のスクリプトを用いてデータを分析することにより、データを構文解析し、選別して、時間トレースに当てはめる。

20

【0247】

ポリメラーゼ速度論に影響を与えるシグナルを記録するために、例えば、カルシウム濃度の急上昇、基準とするための外部クロックを用いてもよい。例えば架橋ヘアピンを用いて、特定の波長のUV照射を検出してよく、これを特定の時間間隔の後パルスし、図12Dで導入される検出器を用いて記録することができる。

【0248】

30

実施例16・分子モータの1Dの運動

クローラの基本的作動を試験するための1D走路は、構造的に明確な硬質DNAナノ構造上に構築される。単純なDNA折り紙長方形、又はDNAレンガシステムを使用する52,53。下記のパラメータを変更する:(1)インキュベーション時間、(2)プライマー、ポリメラーゼ、及びヌクレオチドモノマーの濃度、(3)様々なドメイン(プライマー、情報コード部位など)の結合強度、(4)走路上で隣接する部位同士の空間的間隔、並びに(5)放出条件。反応のほぼ完了を可能にする1~2時間の時間尺度を使用する。反応の速度論をより良く理解するために、秒から分を含むインキュベーション時間の様々な変化も試験する。100nMのプライマー濃度及び10~100nMのdNTP濃度を試験する。ドメインの長さ及びGC含量を変化させることにより、並びに必要であれば、反応平衡を偏らせるためのパルジなどの追加的補助成分を導入することによって、様々なドメインの結合強さを変更する。異なる空間的間隔を有する走路は、走路アンカーポイント間の様々な距離を有するナノ構造を組織化することによって作製する。初めに、単純な2部位走路を試験して、基本的な距離依存的性能を特性決定する。また、例えば、インキュベーションの終了時に「リバースプライマー」を手動で付加する、最終走路部位の横に放出シグナル部位を埋め込む、又は熱媒介性解離など、前述したような様々な放出戦略も試験する。

40

【0249】

さらに、走路の様々な全長を試験して、長い移動距離中の何らかの性能劣化を測定する。様々な走路組成も同様に試験する。順序指示(例えば、図31Aに示すように、プライマ

50

ー結合部位 a *、b * 及び c * の順) を有する十分にアドレスされた走路は、規定の経路に沿ってクローラを誘導する。反復プライマー(例えば、図 3 1 A で、a - a * として統合された全てのプライマーペアを考慮する)を含む走路は、クローラが、出発点を選択して、その方向に進むことを可能にする。

【0250】

走路構造のアセンブリを特性決定するために、原子間力顕微鏡法及び超解像イメージングなどの直接ナノスケールイメージング法を使用する。初期検査段階のクローラの操作のために、ほとんどの場合、ゲル電気泳動に基づく質的特性決定が実施される。ゲル電気泳動は、DNA 分子をサイズ別に分別することによって、反応産物の迅速なプロファイリングを可能にする。所与のステップの前後で反応混合物を比較することによって、反応体の産物への変換を評価することができる。完全な反応物はすべて、3 つの単一記録と一緒に結合した長さとも一致する長さを有するバンド(補助部分を含む)として見ることができる。不適当な産物の場合、反応の規模及び収率に応じて、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いる産物増幅ステップが、ゲル特性決定の前に追加される。ゲルバンドの強度の測定によって、反応収率の推定が可能になる。小規模産物形成の場合には、量的なリアルタイム PCR(qPCR)が、増幅トレースを経時的に分析し、初期状態に外挿し直すことによって、産物の量の推定を可能にする。次世代シーケンシングなどの単一分子分析ツールと組み合わせた、ランダム化 DNA 配列による分子の固有同定を用い、単一走路にわたる複数の記録の生成を検出することによって、クローラの触媒及び反復記録行動を明らかにする。

10

20

【0251】

実施例 17 . 2 D での分子モータの運動

この実施例は、次の特性を実証する：(1) 2 D 空間におけるクローラの運動の周角、(2) クローラが動き回って、従うべき経路を「選択」する能力、(3) クローラが、2 D 走路に関する情報を集団で収集する能力。

【0252】

2 D 走路は、構造が明確な硬質 DNA ナノ構造上に構築される。様々な走路アンカー地点の位置を有するナノ構造を組織化することによって、異なる空間的配置を有する走路を作製する。特定の角度を有する単純な 3 部位走路(例えば、「L」字型)を用いて、合流地点でのクローラの挙動を試験する。両方のタイプの分子モータシステム(クローラ及びウォーカ)を試験する。インキュベーション時間及び濃度などの一部のパラメータを調節して、組合せ数の考えられる経路を収容する。同様に、様々な走路組成を試験する。順序指示を含む、十分にアドレスされた走路は、規定の 2 D 経路に沿ってクローラの運動を誘導する。反復プライマー(a - a *、次に a - a * など)又は交互プライマー(a - a *、次に b - b *、次に a - a * など)の走路の場合、分子は、合流地点で従うべき経路を選択する自由を有する(図 3 1 B 及び 3 2 B)。図 3 1 B 及び 3 2 B の右側は、2 つのシステムのそれぞれについて分子モータの軌道例を示す。クローラが従う様々な走路は、生成された記録の異なる長さ及びアイデンティティとして表される。

30

【0253】

走路構造のアセンブリを特性決定するために、原子間力顕微鏡法及び超解像イメージングなどの直接ナノスケールイメージング法を使用する。結果を特性決定して、クローラの主要な能力を実証するために、複数の特性決定方法を使用する。最初に、ゲル電気泳動によって、余剰のプライマーを含む走路の場合に、正しい長さを有する記録の形成と、複数のタイプの記録の形成を明らかにする。十分に規定された走路の場合、ゲルバンドは、予め定めた数の走路部位に対応する長さを有すると思われる。クローラが自由に動き回ることが許される、余剰のプライマーを含む走路の場合には、様々な長さを有するゲルバンドの分布を見ることができ；クローラの場合には、観測される最大長さは、走路部位の数に対応する。1 D 走路と同様に、反応の規模及び記録生成の収率に応じて、ゲル特性決定の前に、記録の PCR 増幅を任意選択で追加する。第 2 に、PCR を用いて、特定の種類の記録を選択的に増幅し、指定された記録の形成を検出する。例えば、最初と最後の走路部位

40

50

のプライマー/プライマー結合領域と相補的なPCRプライマーを用いて、完全な記録を選択的に増幅する。第3に、次世代シーケンシング法を用いて、生成された記録のアイデンティティを直接調べる。これらの特性決定方法の組合せによって、全ての走路ポイントが、複数種の経路を介して分子クローラにより繰り返しアクセスされる。

【0254】

実施例18．量的情報の検査

分子モータは、所与の走路を動き回り、走路部位からの情報をコピーして、「記録」することができる。この能力について一般的に、各部位が、余剰のプライマーで標識された（全ての部位が同じプライマーを有する）未知の走路が想定される。生成された記録の長さから、分子によって採用される走路サイズ及びステップの数に関する量的情報が得られる。

10

【0255】

分子モータの計数能力をまず、規定数の走路部位を有するDNAナノ構造走路について試験する。例えば、1D構成上に3地点及び5地点を有する走路を性能の特性決定及び最適化のために試験する（図33A）。円などのより複雑な2D走路も試験して、一般的な走路に関する好適な計数挙動の能力を調べる。余剰のプライマーを含む走路から、クローラは、長さの分布を含む記録を生成するが、一度アクセスされた部位は、全クローラが走路から放出されるまで再びアクセスされることはできないため、最大長さは、走路部位の考えられる最大数を示す（図33Bの概略図を参照）。ウォーカは、ウォーカにより採用されるステップの数を反映する長さの分布を含む記録を生成する。次に、分子モータシステムが生物学的システムにおいてインプリメントされる（図28B）。例えば、特定の分子複合体のターゲティングを試験する。「走路」部位が結合したDNAアンカーと結合した抗体による核孔複合体のターゲティングを用いて、量的情報を収集する（例えば、試験プラットフォームについては、図33Cを参照）。隣り合うサブユニット間の距離は約30nmであるため、核孔複合体の大きさは重要であり、試験システムとして理想的である。量的情報を取得するために、読み出しデータ及び様々な方法の相対性能の比較のための標準として、オルトゴナルシステム、例えば、超解像での直接イメージング（図31C）又はqPAINTと呼ばれる確率的イメージングの速度論的トレースの分析に基づく計数（図31Cに示す同じシステムに、信頼できるものとして適用される）を使用する。

20

【0256】

実施例19．アイデンティティ情報の検査

30

分子モータは、走路からの情報をコピーして、記録するため、走路部位がユニークなDNA配列などのユニークな情報を含有していたら、クローラにより生成された記録は、各部位のアイデンティティ情報を含有するであろう。従って、量的情報以外に、ユニークなアイデンティティ情報も取得することができる（図33D）。

【0257】

部位のアイデンティティ情報を含有する記録を実証するために、複数の特性決定方法を使用する。第1に、特定の種類の記録の選択的PCR増幅と組み合わせたゲル電気泳動によって、特定の記録の生成を明らかにする。第2に、次世代シーケンシング法に基づく配列情報を直接調べることにより、生成された記録の分子アイデンティティを明らかにする。

【0258】

40

実施例20．分子地形の再構成

分子モータの特性：（1）所与の分子標的のアイデンティティ情報の記録及び（2）複数種の経路を介し、同じ標的に沿った反復記録によって、モータは、標的地形を調べ、記録することが可能になる。複数のクローラの作用により収集された集合的情報を用いて、標的部位の幾何学的配置を分析し、及び分子地形を再構築する。

【0259】

所与の分子地形に沿った情報の収集物を、規定配置の走路部位を含むDNAナノ構造走路について試験する（図33E）。クローラは、検査及び記録のラウンド毎に異なる経路を取ることができる。各ラウンド後に生成された記録は、隣り合う分子部位の近接情報の収集物を反映する。次世代シーケンシング法による記録を直接調べることにより、地形に沿

50

った可能な経路に各記録を割り当てることができる。一部の近接情報は、異なる記録からの情報と重複する。合流地点付近で生成された記録は、走路部位の複数のペアからの近接情報を含む。全ての近接情報を編集することによって、隣り合う地点及び合流地点の情報を収集することができ、従って、分子地形の再構築が可能になる。

【0260】

実施例21．分子距離の記録

この実施例に記載する分子記録実験では、4つの異なる長さ(ロッド38、ロッド49、ロッド59、ロッド70のDNAロッド(10nM)と負の対照とを使用した。実験の結果を図38Aに示す。数(例えば、ロッド38)は、塩基対内の二本鎖領域の長さを示す。DNAロッドは、独立に、1×ThermoPolバッファー(3mM Mg²⁺)中の前駆体(100nM)、触媒ヘアピン(1μM)、dATP(10μM)、dTTP(10μM)及びBst、ラージフラグメントDNAポリメラーゼ(0.26U/μL)と一緒に37で4時間インキュベートした。反応の産物を65の15%PAGEゲル(0.5×TBE、8M尿素)上に泳動させ、Typhoonゲルスキャナーで視覚化した。結果は、生成された記録が、測定された距離と一致することを示している。一部のゲルバンドは、それらの対応するDNA記録で標識する。

【0261】

3つの異なる長さ(5.4nm、12.6nm及び19.7nm)のDNAロッド(濃度100pM)を、ThermoPolバッファー(5mM MgSO₄で補充)中の前駆体(100pM)、触媒ヘアピン(200nM)、dATP(100μM)、dTTP(100μM)及びdCTP(100μM)並びにBSTラージフラグメントDNAポリメラーゼ(0.4U/μL)と一緒に37で30分間別々にインキュベートした。次に、溶液をExo I DNAエキソヌクレアーゼ(0.4U/μL)で処理して、非反応及び未完成の一本鎖産物を消化した。生成された記録をPCR(5プライムCy5色素標識プライマー-250nM、dNTP-200μM、Vent Exo-0.5U/μL、ThermoPolバッファー-1×、18サイクル、アニーリング温度が46の標準PCRプロトコル)により増幅した。PCR反応の結果を12%PAGEゲル(0.5×TBE、8M尿素、200V、65)上に泳動させ、Typhoonゲルスキャナーで視覚化した。結果を図38Bに示す。生成された記録は、測定された距離と一致する。一部のゲルバンドは、ゲルの解釈を助けるために、それらの対応するDNA記録で標識する。

【0262】

実施例22．DNAナノ構造上での分子定規技術の確認

DNAナノ構造を用いて、既知の固定距離で、DNA標的を正確に配置し(図35A)、実験により、分子定規がこれらの距離を記録することができることを明らかにする。

【0263】

実施例23．複雑な2D幾何学での単一分子、多重化及びハイスループット測定

DNAナノ構造上の正八角形の頂点に8つのバーコード化DNA標的を正確に配置することによって、核孔複合体(NPC)の構造模倣物を生成する(図35B)。次に、分子定規を用いて、距離を記録する。次世代シーケンス技術を用いて、距離と、対応する符号化バーコードとを読み出す。次に、分子定規を用いて、典型的な生物学的実験のインサイチュ条件と一致させるためのNPC模倣物の低いコピー数(10⁴~10⁶)を記録する。

【0264】

実施例24．固定U2OS細胞中の核孔複合体に分子定規を適用する

固定U2OS細胞(ヒト骨の骨肉腫細胞)中のヌクレオポリンNup98をカスタムDNA共役モノクローナル抗体(#2598、Cell Signaling)で標識する。超解像試験によって、この標識が、八角形構成中に8つのクラスターをもたらし、隣接するクラスター同士の距離は約30nmであることが判明した。分子定規を用い、4nm未満の解像度で、クラスター同士の距離を記録する。ゲル電気泳動読み出しデータは、予測した4つの異なる斜距離及びそれらの分散を明らかにする。NGS読み出しデータは、NPCの不均質性の研究を可能にする単一分子距離を明らかにする。

10

20

30

40

50

【 0 2 6 5 】

方法

DNA合成及び精製．オリゴは全て、未精製又はHPLC精製のいずれもIDTに注文した。精製RNA分子は、無RNAseHPLCで精製したものを注文した。一部の未精製オリゴは、キットの指示に従って、Qiagen MinElute PCR精製カラムに100 μ Lの100 μ M未精製オリゴを通過させることにより実験室内で精製した後、洗浄した。カラムに結合したオリゴを15 μ Lまで溶離し、濃度をNanodrop及びそれらのオリゴアナライザー (www.idtdna.com/site/order/oligoentry) 消散係数を用いて測定した。オリゴは、1 \times TEバッファー中に予め懸濁したものを100 μ M注文し、これらの濃度は、MinElute精製オリゴを除き、全ての希釈物について想定した。全てのオリゴは、1 \times TEで10 μ Mの使用濃度まで希釈し、DNAのストック及び使用溶液は、-20 で、RNAは、-80 で保存した。

10

【 0 2 6 6 】

PERインキュベーション．PER実験は全て、37 で表示される時間量にわたり、通常、1 \times ThermoPolバッファー (20 mM Tris - HCl、10 mM、(NH₄)₂SO₄、10 mM KCl、2 mM MgSO₄、及び0.1 % TritonrX-100)、10 mM MgSO₄、及び10 ~ 100 μ Mの適切なdNTPと一緒にインキュベートした。典型的には、20 μ Lの反応物を80 で20分間の酵素の熱不活性化によりクエンチングした後、10 μ Lのホルムアミドと一緒にロードした。RNA感受性サンプルの場合には、上記に代わり、反応物をEDTAでクエンチングした。無標識バイオセンサーの場合には、反応物をクエンチングしないが、インキュベーションの後直接ロードした。一部の実験は、溶液を平衡させるために、15分間ブレインキュベートした。

20

【 0 2 6 7 】

ゲル電気泳動．ほとんどの実験は、15 % TBE - 尿素PAGE変性ゲルを使用し、200 Vで、65 にて35分間泳動させ、Cy5及びFAMチャネルでスキャンした。ゲルは、Sybr Goldでも数分間染色し、その後、Sybr Goldチャネルでイメージングした。一部の実験では、異なるゲル条件を使用した。

【 0 2 6 8 】

AFM．AFMイメージングをNanoscope V装置で実施した。

【 0 2 6 9 】

配列設計．ほとんどの配列は、コマンドラインNUPACK実行ファイルと組み合わせた実験室内最適化コードを用いて設計した。構築物を分析するために、NUPACKウェブアプリケーションも使用した。

30

【 0 2 7 0 】

実施例25．クローラシステム

分子モータシステムの1つ、クローラについての一連の試験を実施して、基本的な操作を確認した (図43A ~ 43C)。DNAナノ構造プラットフォーム上の三角形アラインメントに沿った3点走路を設計した。図43Aの上のパネルは、この設計の概略図を示し、図43Aの下のパネルは、3つの標的部位にわたりクローリングした後のクローラの分子詳細を示す。クローリングプロセスの完了後、クローラは、長さ118 ntの完全な記録となる。PCRにより増幅され、変性ゲル上を泳動するとき、最終記録は、予測された長さ範囲で出現した (図43B)。さらに、原子間力顕微鏡法 (AFM) を用いて、クローラを視覚化した。図43Cの左側パネルは、クローリング反応を開始するプライマーが添加される前の標的プローブを示し、ここで、プローブは点として現れる。約1時間の記録反応後に、クローラは、図43Cの右側パネルに示すように、3つの走路部位と一緒に連結し、従って、これに応じてAFMイメージに出現する。これらの試験の結果は、各ステップ：(1) プライマー結合、(2) ポリメラーゼによるプライマー延長、(3) テンプレートによる鎖置換、(4) 隣接する部位との相互作用、(5) ポリメラーゼによるさらなる延長、(6) 記録の自律的放出についてクローラシステムの基本的操作を明らかにする。

40

【 0 2 7 1 】

50

参考文献（これらの各々は、その全体を本明細書に組み込む）

- 1 . B. Yurke, A.J. Turberfield, A.P. Mills, Jr., F.C. Simmel, and J.L. Neumann. A DNA-fueled molecular machine made of DNA. *Nature*, 406:605-608, 2000.
- 2 . R. M. Dirks and N.A. Pierce. Triggered amplification by hybridization chain reaction. *PNAS*, 101:15275-15278, 2004.
- 3 . G. Seelig, D. Soloveichik, D.Y. Zhang, and E. Winfree. Enzyme-free nucleic acid logic circuits. *Science*, 314(5805):1585-1588, 2006.
- 4 . L. Qian and E. Winfree. Scaling up digital circuit computation with DNA strand displacement cascades. *Science*, 332:1196-1201, 2011.
- 5 . W. B. Sherman and N. C. Seeman. A precisely controlled DNA biped walking device. *Nano Letters*, 4:1203-1207, 2004. 10
- 6 . P. Yin, H. M. T. Choi, C. R. Calvert, and N. A. Pierce. Programming biomolecular self-assembly pathways. *Nature*, 451:318-322, 2008.
- 7 . T. Omabegho, R. Sha, and N. Seeman. A bipedal DNA Brownian motor with coordinated legs. *Science*, 2009.
- 8 . Ralf Jungmann, Christian Steinhauer, Max Scheible, Anton Kuzyk, Philip Tinnefeld, and Friedrich C Simmel. Single-molecule kinetics and super-resolution microscopy by fluorescence imaging of transient binding on DNA origami. *Nano letters*, 10(11):4756-4761, 2010. 20
- 9 . Ralf Jungmann, Maier S Avendano, Johannes B Woehrstein, Mingjie Dai, William M Shih, and Peng Yin. Multiplexed 3d cellular super-resolution imaging with DNA-paint and exchange-paint. *Nature methods*, 11(3):313-318, 2014.
- 10 . J. Chen and N. C. Seeman. The synthesis from DNA of a molecule with the connectivity of a cube. *Nature*, 350:631-633, 1991.
- 11 . P.W.K. Rothemund. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature*, 440(7082):297-302, 2006.
- 12 . Y. He, T. Ye, M. Su, C. Zhang, A. E. Ribbe, W. Jiang, and C. D. Mao. Hierarchical self-assembly of DNA into symmetric supramolecular polyhedra. *Nature*, 452:198-201, 2008. 30
- 13 . Y. Ke, J. Sharma, M. Liu, K. Jahn, Y. Liu, and H. Yan. Scaffolded DNA origami of a DNA tetrahedron molecular container. *Nano. Lett.*, 9:2445-2447, 2009.
- 14 . E. S. Andersen, M. Dong, M. M. Nielsen, K. Jahn, R. Subramani, W. Mamdouh, M. M. Golas, B. Sander, H. Stark, C. L. P. Oliveira, J. S. Pedersen, V. Birkedal, F. Besenbacher, K. V. Gothelf, and J. Kjems. Self-assembly of a nanoscale DNA box with a controllable lid. *Nature*, 459:73-76, 2009.
- 15 . S. Douglas, H. Dietz, T. Liedl, B. Hogberg, F. Graf, and W. Shih. Self-assembly of DNA into nanoscale three-dimensional shapes. *Nature*, 459:414-418, 2009.
- 16 . H. Dietz, S. Douglas, and W. Shih. Folding DNA into twisted and curved nanoscale shapes. *Science*, 325:725-730, 2009. 40
- 17 . T. Liedl, B. Hogberg, J. Tytell, D. E. Ingber, and W. M. Shih. Self-assembly of three-dimensional prestressed tensegrity structures from DNA. *Nature Nanotech.*, 5:520, 2010.
- 18 . D. Han, S. Pal, J. Nangreave, Z. Deng, Y. Liu, and H. Yan. DNA origami with complex curvatures in three-dimensional space. *Science*, 332:342-346, 2011.
- 19 . S. H. Park, P. Yin, Y. Liu, J. H. Reif, T. H. LaBean, and H. Yan. Programmable DNA self-assemblies for nanoscale organization of ligands and proteins. *Nano Lett.*, 5:729-733, 2005.
- 20 . F. Aldaye, A. Palmer, and H. Sleiman. Assembling materials with dna as 50

the guide. *Science*, 321:1795-1799, 2008.

21 . H. Yan, S. H. Park, G. Finkelstein, J. H. Reif, and T. H. LaBean. Dna-templated self-assembly of protein arrays and highly conductive nanowires. *Science*, 301(5641):1882-1884, 2003.

22 . C.J. Delebecque, A. B. Lindner, P.A. Silver, and F.A. Aldaye. Organization of intracellular reactions with rationally designed RNA assemblies. *Science*, 333:470-474, 2011.

23 . A. Kuzyk, R. Schreiber, Z. Fan, G. Pardatscher, E.-M. Roller, A. Hoge, F. C. Simmel, A.O. Govorov, and T. Liedl. Dna-based self-assembly of chiral plasmonic nanostructures with tailored optical response. *Nature*, 483:311-314, 2012. 10

24 . H. M. T. Choi, Trinh Chang, J.Y., Padilla L. A., S. E. J. E., Fraser, and N. A. Pierce. Programmable in situ amplification for multiplexed imaging of mRNA expression. *Nature Biotechnol*, 28:1208, 2010.

25 . C. Lin, R. Jungmann, A.M. Leifer, C. Li, D. Levner, G.M. Church, W.M. Shih, and P. Yin. Submicrometre geometrically encoded fluorescent barcodes self-assembled from DNA. *Nature Chemistry*, 4:832-839, 2012.

26 . Jinglin Fu, Minghui Liu, Yan Liu, Neal W Woodbury, and Hao Yan. Inter enzyme substrate diffusion for an enzyme cascade organized on spatially addressable DNA nanostructures. *Journal of the American Chemical Society*, 134(12):5516-5519, 2012. 20

27 . Wei Sun, Etienne Boulais, Yera Hakobyan, Wei Li Wang, Amy Guan, Mark Bathe, and Peng Yin. Casting inorganic structures with DNA molds. *Science*, 346(6210):1258361, 2014.

28 . M. J. Berardi, W. M. Shih, S. C. Harrison, and J. J. Chou. Mitochondrial uncoupling protein 2 structure determined by NMR molecular fragment searching. *Nature*, 476:109-113, 2011.

29 . S. Venkataraman, R. M. Dirks, C. T. Ueda, and N. A. Pierce. Selective cell death mediated by small conditional RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107:16777, 2010. 30

30 . Lisa M Hochrein, Maayan Schwarzkopf, Mona Shahgholi, Peng Yin, and Niles A Pierce. Conditional dicer substrate formation via shape and sequence transduction with small conditional RNAs. *Journal of the American Chemical Society*, 135(46):17322- 17330, 2013.

31 . S.M. Douglas, I. Bachelet, and G.M. Church. A logic-gated nanorobot for targeted transport of molecular payloads. *Science*, 335:831-834, 2012.

32 . Qiao Jiang, Chen Song, Jeanette Nangreave, Xiaowei Liu, Lin Lin, Dengli Qiu, Zhen-Gang Wang, Guozhang Zou, Xingjie Liang, Hao Yan, et al. DNA origami as a carrier for circumvention of drug resistance. *Journal of the American Chemical Society*, 134(32):13396-13403, 2012. 40

33 . T. J. Fu and N. C. Seeman. DNA double-crossover molecules. *Biochemistry*, 32:3211-3220, 1993.

34 . E. Winfree, F. Liu, L.A. Wenzler, and N.C. Seeman. Design and self-assembly of two-dimensional DNA crystals. *Nature*, 394:539-544, 1998.

35 . S. Douglas, A. H. Marblestone, S. Teerapittayanon, A. Vazquez, G. M. Church, and W. Shih. Rapid prototyping of 3D DNAorigami shapes with caDNAno. *Nucleic Acids Research*, 37:5001-5006, 2009.

36 . Carlos Ernesto Castro, Fabian Kilchherr, Do-Nyun Kim, Enrique Lin Shiao, Tobias Wauer, Philipp Wortmann, Mark Bathe, and Hendrik Dietz. A primer 50

to scaffolded DNA origami. *Nature methods*, 8(3):221-229, 2011.

37 . P.W Rothemund, A. Ekani-Nkodo, N. Papadakis, A. Kumar, D.K. Fygenson, and Winfree E. Design and characterization of programmable DNA nanotubes. *JACS*, 126:16344-163452, 2005.

38 . P. Yin, R. Hariadi, S. Sahu, H. M. T. Choi, S. H. Park, T. H. LaBean, and J .H.Reif. Programming molecular tube circumferences. *Science*, 321:824-826, 2008.

39 . J. P. Zheng, J. Birktoft, Y. Chen, T. Wang, R. J. Sha, P. Constantinou, S. Ginell, C. D. Mao, and N. Seeman. From molecular to macroscopic via the rational design of a self-assembled 3d dna crystal. *Nature*, 461:74-77, 2009.

40 . P.W.K. Rothemund, N. Papadakis, and E. Winfree. Algorithmic self-assembly of DNA Sierpinski triangles. *PLoS Biology*, 2:2041-2053, 2004.

41 . A. Chworos, I Severcan, A.Y. A.Y. Koyfman, P. Weinkam, E. Emin Oroudjev, H.G. Hansma, and L Jaeger. Building programmable jigsaw puzzles with RNA. *Science*, 306:2068-2072, 2004.

42 . I. Severcan, Geary C., Chworos A., Voss N., Jacovetty E., and Jaeger L. A polyhedron made of trnas. *Nature Chemistry*, 2:772-779, 2010.

43 . D. Soloveichik, G. Seelig, and E. Winfree. Dna as a universal substrate for chemical kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107:5393-5398, 2010.

44 . David Yu Zhang, Sherry Xi Chen, and Peng Yin. Optimizing the specificity of nucleic acid hybridization. *Nature chemistry*, 4(3):208-214, 2012.

45 . Sherry Xi Chen, David Yu Zhang, and Georg Seelig. Conditionally fluorescent molecular probes for detecting single base changes in double-stranded DNA. *Nature chemistry*, 5(9):782-789, 2013.

46 . J. Kim, J. J. Hopfield, and E. Winfree. Neural network computation by in vitro transcriptional circuits. In *18th Neural Information Processing Systems (NIPS)*, 2004.

47 . Lulu Qian, Erik Winfree, and Jehoshua Bruck. Neural network computation with DNA strand displacement cascades. *Nature*, 475(7356):368-372, 2011.

48 . Jongmin Kim and Erik Winfree. Synthetic in vitro transcriptional oscillators. *Molecular systems biology*, 7(1):465, 2011.

49 . Joshua I Glaser, Bradley M Zamft, Adam H Marblestone, Jeffrey R Moffitt, Keith Tyo, Edward S Boyden, George Church, and Konrad P Kording. Statistical analysis of molecular signal recording. *PLoS Comput. Biol*, 9:e1003145, 2013.

50 . Chris Thachuk, Erik Winfree, and David Soloveichik. Leakless dna strand displacement systems. In *DNA Computing and Molecular Programming*, pages 133-153. Springer, 2015.

51 . Ryosuke Iinuma, Yonggang Ke, Ralf Jungmann, Thomas Schlichthaerle, Johannes B Woehrstein, and Peng Yin. Polyhedra self-assembled from DNA tripods and characterized with 3d dna-paint. *Science*, 344(6179):65-69, 2014.

52 . D. Wei, M. Dai, and P. Yin. Complex shapes self-assembled from modular molecular components. *Nature*, 485:623-626, 2012.

53 . Y. Ke, L.L. Ong, W. M. Shih, and P. Yin. Three-dimensional structures self-assembled from DNA bricks. *Science*, 2012.

54 . D. Han and P. Yin. Replicable single-stranded DNA origami. in preparation, 2015.

55 . John P Sadowski, Colby R Calvert, David Yu Zhang, Niles A Pierce, and Peng Yin. Developmental self-assembly of a DNA tetrahedron. *ACS nano*, 8(4):3251-3259, 2014.

10

20

30

40

50

56. Simon Fredriksson, Mats Gullberg, Jonas Jarvius, Charlotta Olsson, Kristian Pietras, Sigrun Margret Gustafsdottir, Arne Ostman, and Ulf Landegren. Protein detection using proximity-dependent dna ligation assays. *Nature biotechnology*, 20(5):473-477, 2002.

57. Yoshinaga Yoshimura and Kenzo Fujimoto. Ultrafast reversible photo-cross-linking reaction: Toward in situ DNA manipulation. *Organic letters*, 10(15):3227-3230, 2008.

58. Alexander A Green, Pamela A Silver, James J Collins, and Peng Yin. Toehold switches: de-novo-designed regulators of gene expression. *Cell*, 159(4):925-939, 2014.

58. David Yu Zhang and Erik Winfree. Control of DNA strand displacement kinetics using toehold exchange. *J Am Chem Soc*, 131(47):17303-14, 2009.

59. 国際公開第2012/058488A1号(2011年27日に出願されたPCT/米国特許第2011/058178号).

60. Rothmund, Paul W. K. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature* 440, 297-302, 2006.

【0272】

本明細書に開示した参照文献、特許及び特許出願は全て、各々が引用される主題、一部の事例では、文献の全体を包含し得る主題に関して、参照により本明細書に組み込むものとする。

【0273】

不定冠詞「1つの(a)」及び「1つの(an)」は、本明細書及び請求項で使用されるとき、明らかに反対のことが示されていない限り、「少なくとも1つの」を意味するものと理解すべきである。

【0274】

また、明らかに反対のことが示されていない限り、2つ以上のステップ又は行為を含む本明細書で請求されるあらゆる方法において、方法のステップ又は行為の順序は、方法のステップ又は行為が列記される順序に必ずしも限定されるわけではないことを理解されたい。

【0275】

特許請求の範囲、並びに上の明細書において、「含む」、「包含する」、「担持する」、「有する」、「含有する」、「含む」、「保持する」、「～から構成される」などの移行句は全て、制限がない、すなわち、包含するが、限定されないことを意味すると理解されるべきである。但し、「～からなる」及び「ほぼ～からなる」という移行句だけは、米国特許庁特許審査基準(United States Patent Office Manual of Patent Examining Procedures, Section 2111.03)に記載されている通り、それぞれ制限的又は半制限的移行句とする。

10

20

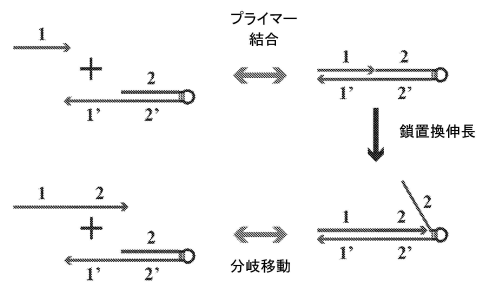
30

40

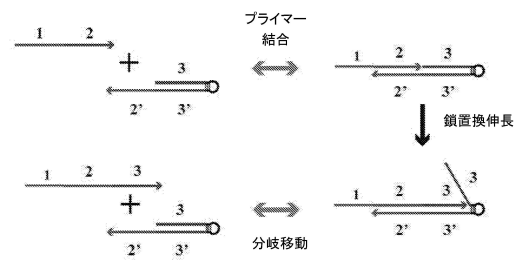
50

【図面】

【 図 1 A 】

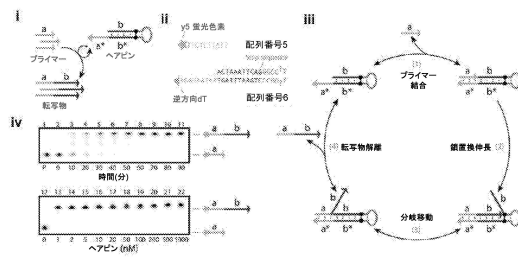


【 図 1 B 】

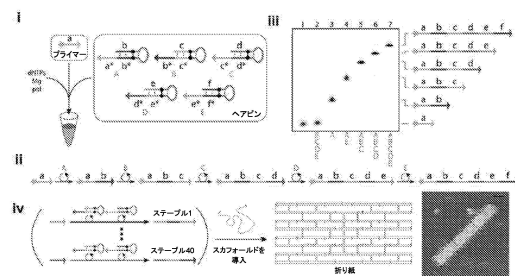


10

【 図 1 C 】



【 図 2 A 】



20

30

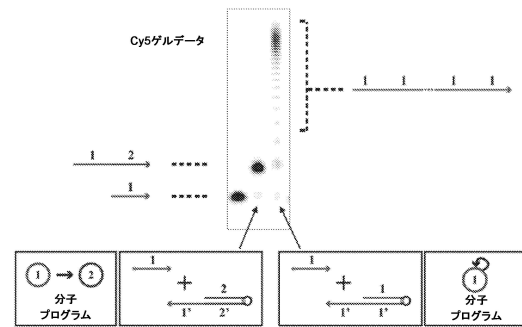
40

50

【 図 2 B 】

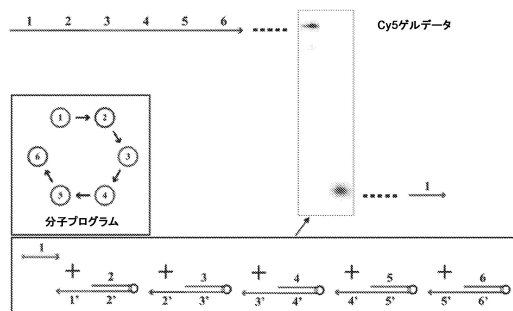
状態遷移図 抽象化	分子 インプリメンテーション	全体の反応
(a)	$\begin{array}{c} \xrightarrow{1} \\ + \\ \xrightarrow{1'} \quad \xrightarrow{1'} \end{array}$	$\xrightarrow{1} \longrightarrow \xrightarrow{1} \xrightarrow{1} \xrightarrow{1} \xrightarrow{1} \xrightarrow{1} \xrightarrow{1}$
(b)	$\begin{array}{c} \xrightarrow{1} \\ + \\ \xrightarrow{1'} \quad \xrightarrow{2} \\ \xrightarrow{1'} \quad \xrightarrow{2'} \end{array}$	$\xrightarrow{1} \xrightarrow{2} \longrightarrow \xrightarrow{1} \xrightarrow{2}$
(c)	$\begin{array}{c} \xrightarrow{1} \\ + \\ \xrightarrow{2} \\ \xrightarrow{1'} \quad \xrightarrow{2'} \\ + \\ \xrightarrow{3} \\ \xrightarrow{2'} \quad \xrightarrow{3'} \end{array}$	$\xrightarrow{1} \longrightarrow \xrightarrow{1} \xrightarrow{2} \xrightarrow{3} \xrightarrow{4} \xrightarrow{5} \xrightarrow{6} \xrightarrow{6}$ $\begin{array}{c} + \\ \xrightarrow{4} \\ \xrightarrow{3'} \quad \xrightarrow{4'} \end{array} \quad \begin{array}{c} + \\ \xrightarrow{5} \\ \xrightarrow{4'} \quad \xrightarrow{5'} \end{array} \quad \begin{array}{c} + \\ \xrightarrow{6} \\ \xrightarrow{5'} \quad \xrightarrow{6'} \end{array}$

【 図 3 A 】

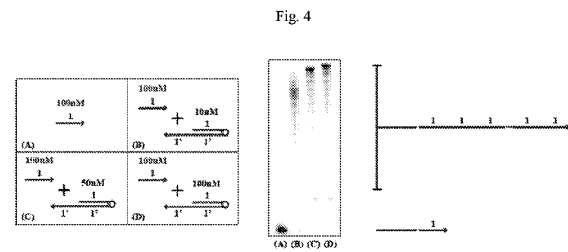


10

【 図 3 B 】



【 図 4 】



20

30

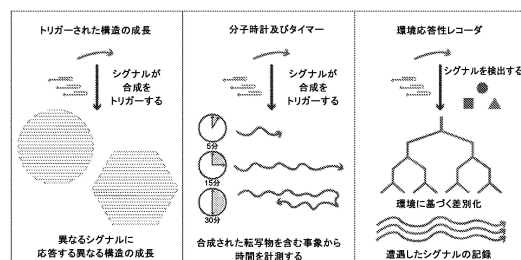
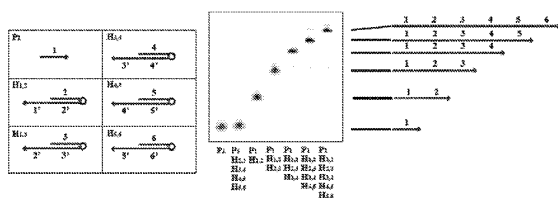
40

50

【 図 5 】

【 図 6 】

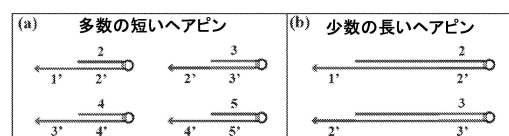
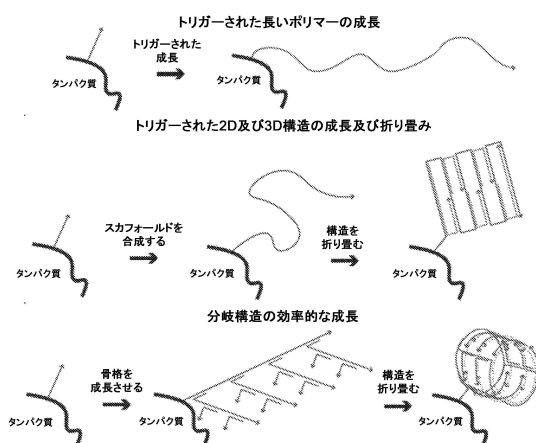
Fig. 5



10

【圖 7】

【圖 8】



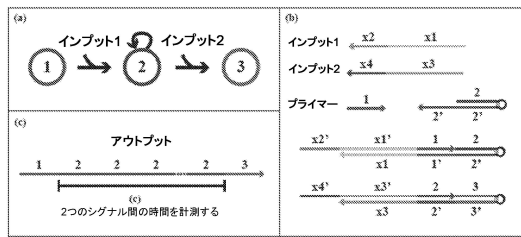
20

30

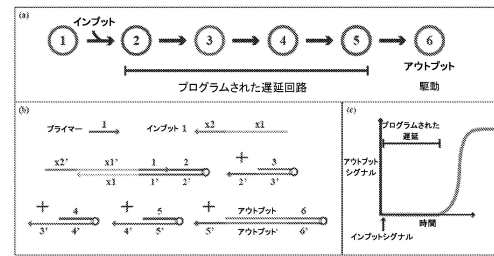
40

50

【図 13】

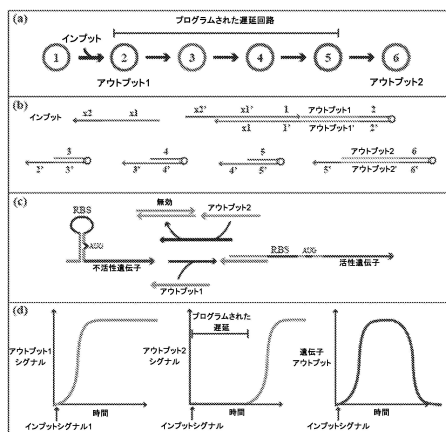


【図 14】

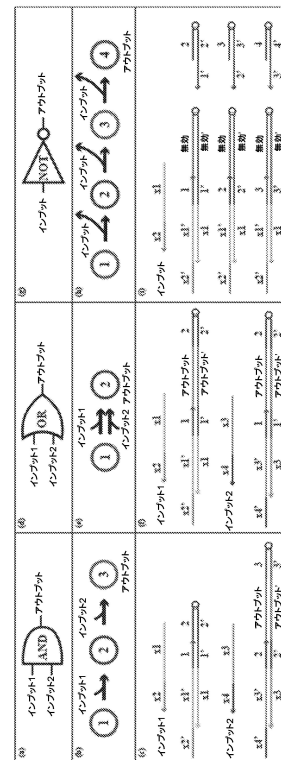


10

【図 15】



【図 16】



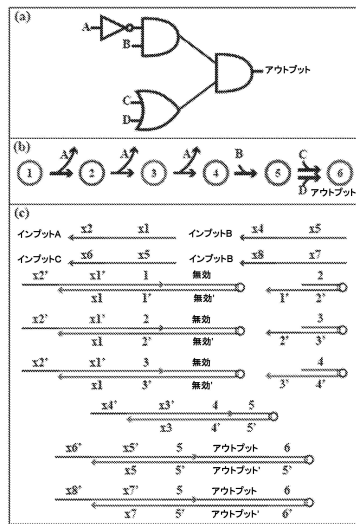
20

30

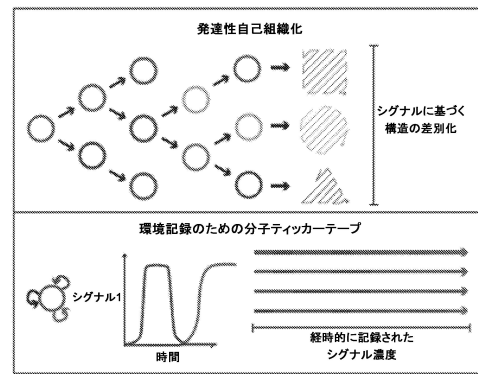
40

50

【図 17】

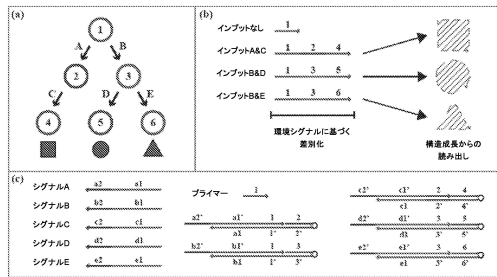


【図 18】

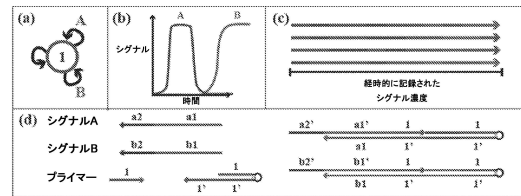


10

【図 19】



【図 20】



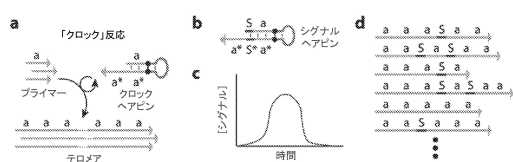
20

30

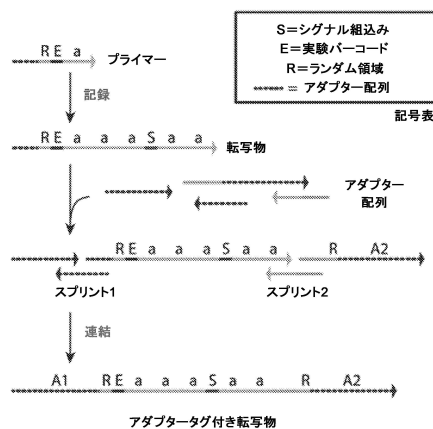
40

50

【 図 2 1 】

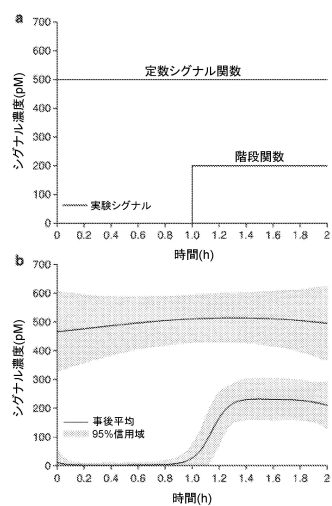


【 ㄨ 2 2 】

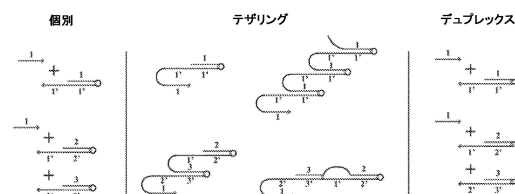


10

【 図 2 3 】



【 図 2 4 】



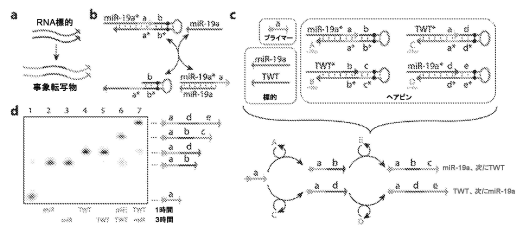
20

30

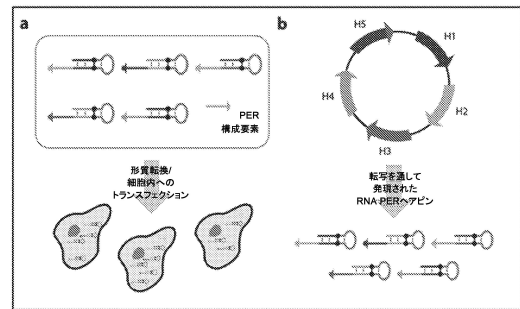
40

50

【図 29】

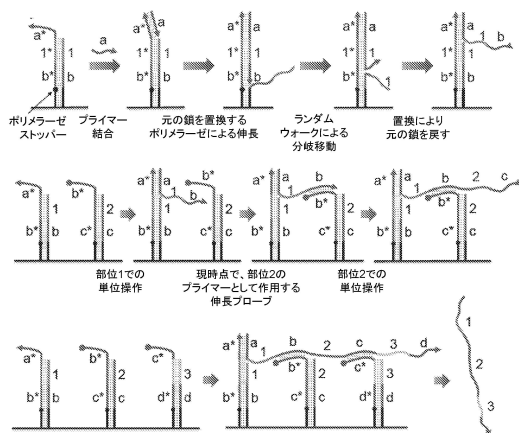


【図 30】

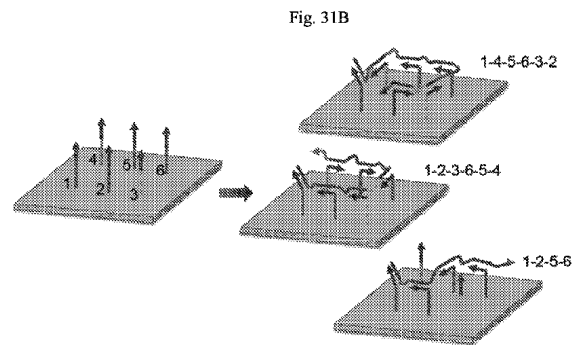


10

【図 31 A】



【図 31 B】



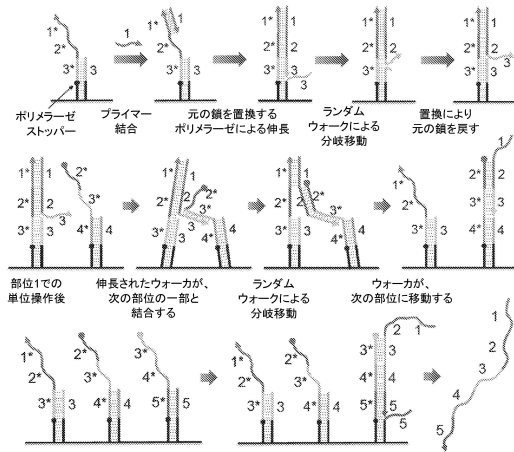
20

30

40

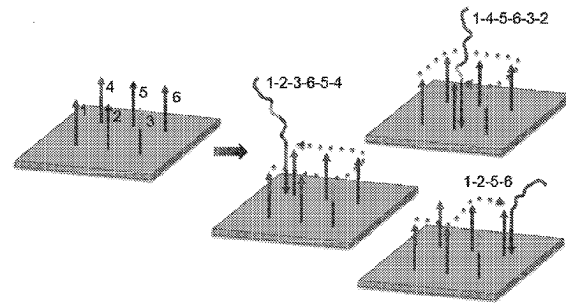
50

【 図 3 2 A 】



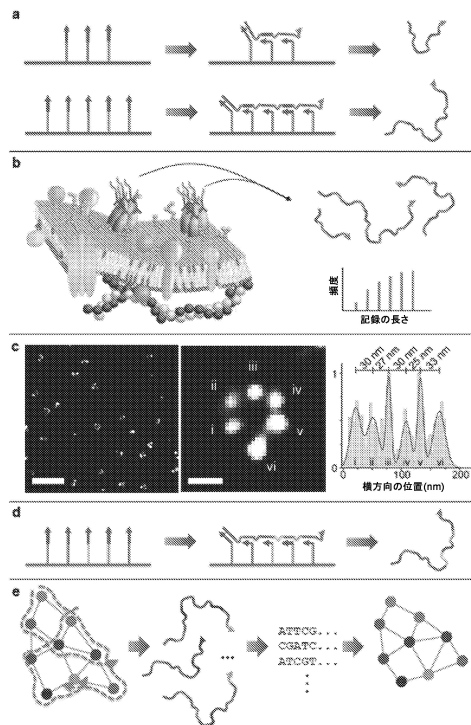
【 図 3 2 B 】

Fig. 32B

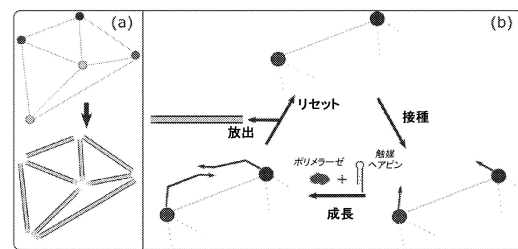


10

【 図 3 3 】



【 図 3 4 】



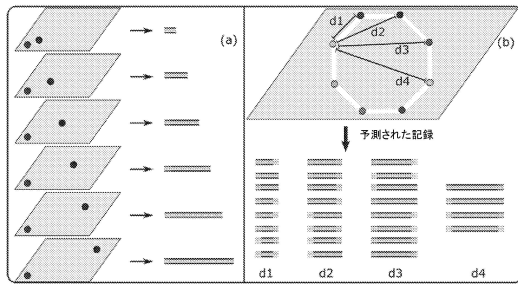
20

30

40

50

【 図 3 5 】



【 図 3 6 A 】

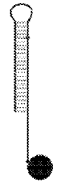


Fig. 36A

10

【 ㊦ 3 6 B 】



Fig. 36B

【 図 3 6 C 】

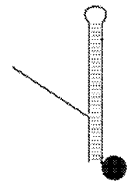
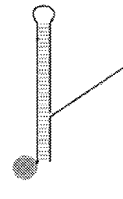
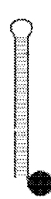


Fig. 36C

20

【 図 3 6 D 】

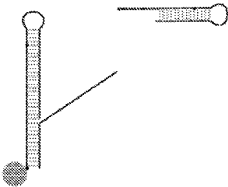


Fig. 36D

【 図 3 6 E 】

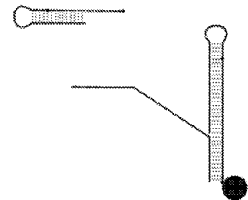
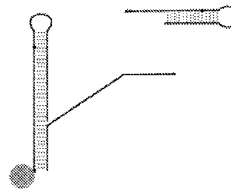
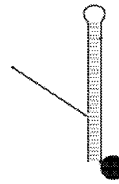
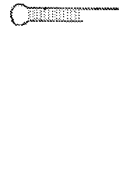


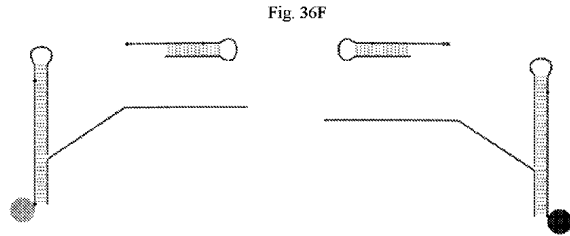
Fig. 36E

30

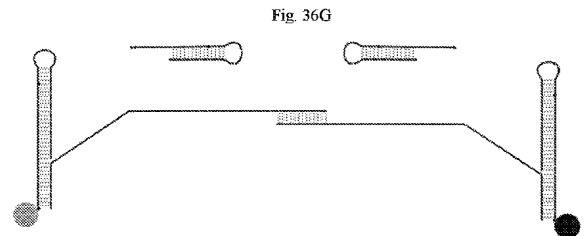
40

50

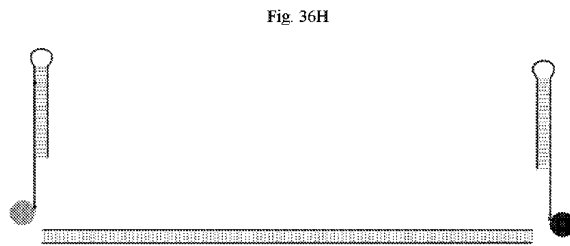
【図 36 F】



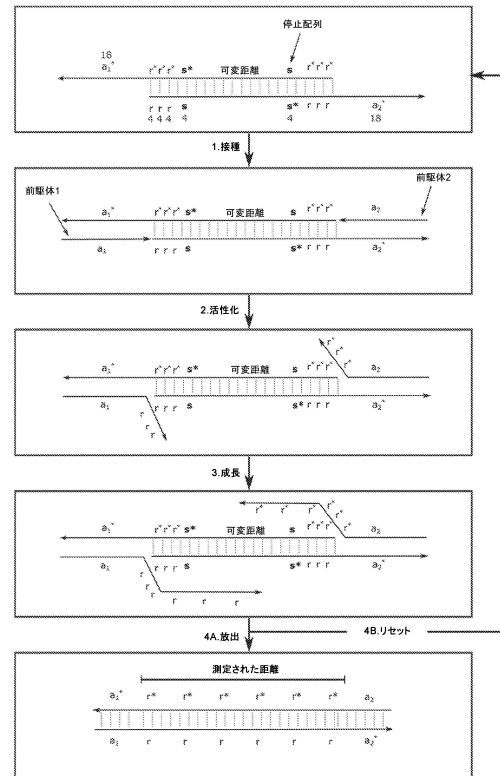
【図 36 G】



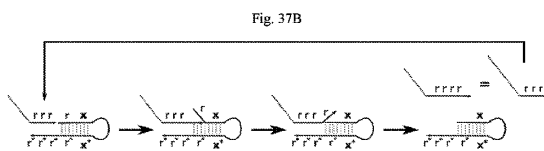
【図 36 H】



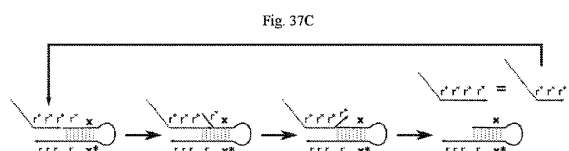
【図 37 A】



【図 37 B】



【図 37 C】



10

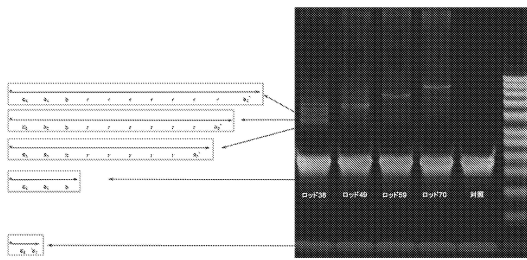
20

30

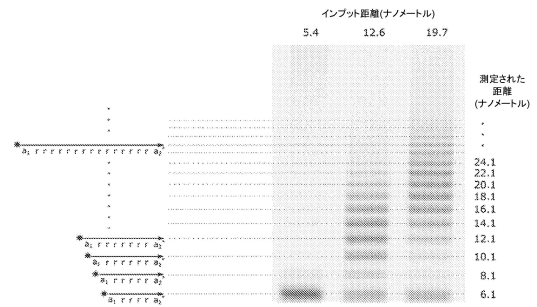
40

50

【図 3 8 A】

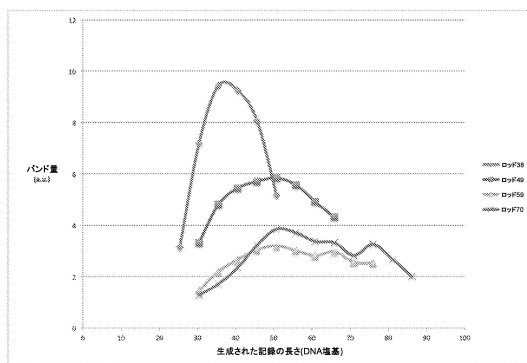


【図 3 8 B】

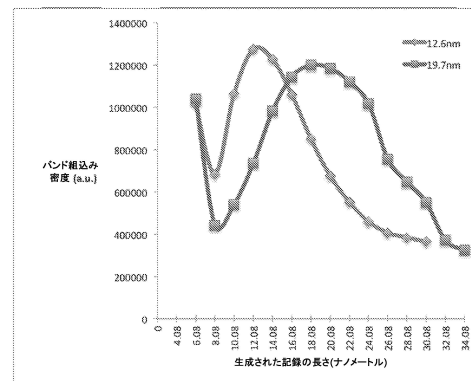


10

【図 3 9 A】



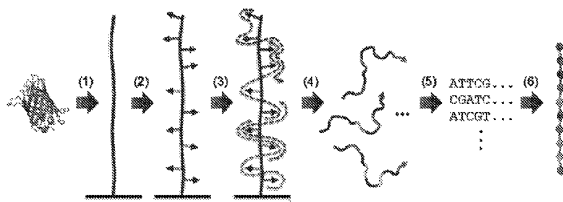
【図 3 9 B】



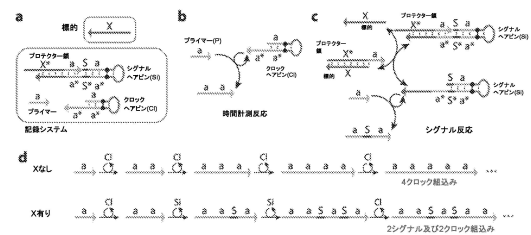
20

【図 4 0】

Fig. 40



【図 4 1】

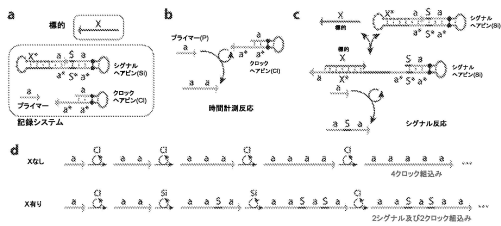


30

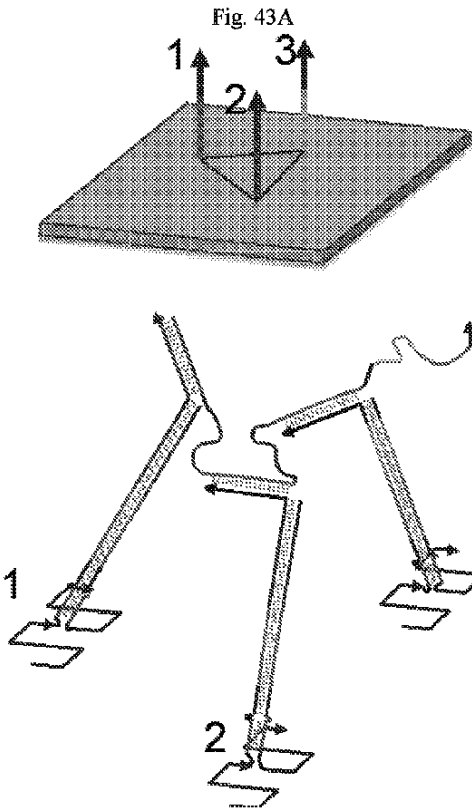
40

50

【図 4 2】



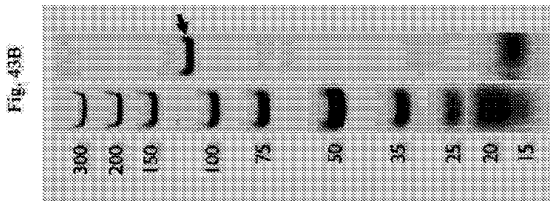
【図 4 3 A】



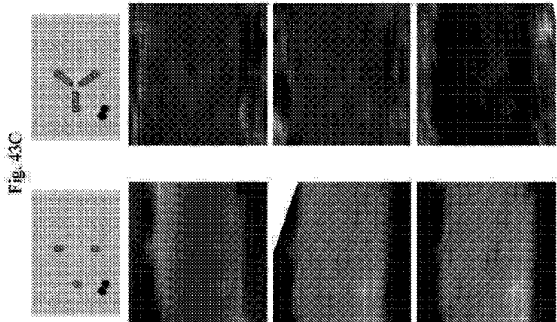
10

20

【図 4 3 B】



【図 4 3 C】

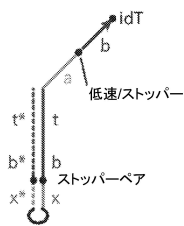


30

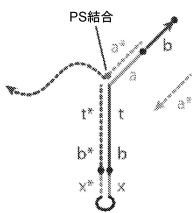
40

50

【図 4 4 A】

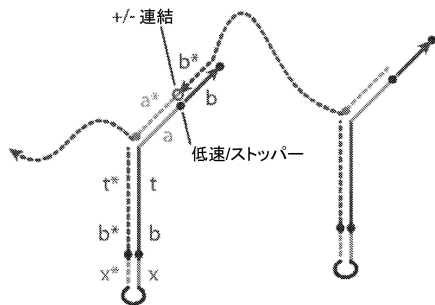


【図 4 4 B】

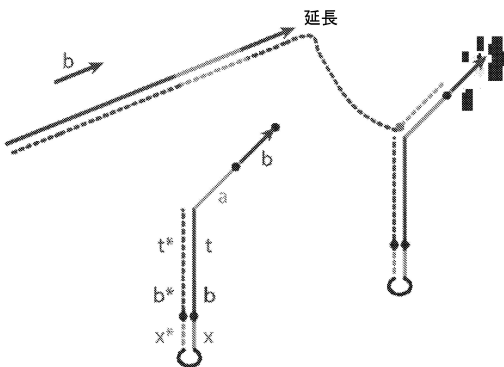


10

【図 4 4 C】



【図 4 4 D】



20

30

40

50

【 図 4 4 E 】

【 図 4 4 F 】

Fig. 44E

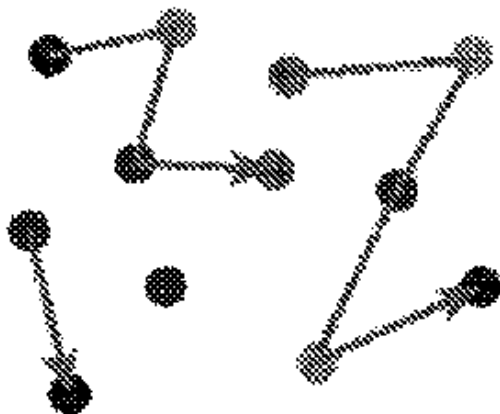
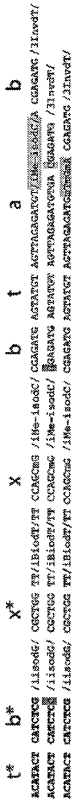


Fig. 44F



【 配列表 】

0007085999000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 15/11 (2006.01)

C 1 2 N 15/11

Z

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/296,310

(32)優先日 平成28年2月17日(2016.2.17)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/432,017

(32)優先日 平成28年12月9日(2016.12.9)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 2 1 5 , ボストン, ブルックライン アベニュー 1 7 0 , ナンバー 8 1 0

(72)発明者 シャウス, トーマス, イー.

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 4 7 6 , アーリントン, マウント バーノン 9 0

(72)発明者 イン, ペン

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 4 4 5 , ブルックライン, ウィンスロップ ロード 5 1

(72)発明者 スアン, フェン

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 2 1 5 , ボストン, ブルックライン アベニュー 4 0 0 , アpartment 5 ディー

(72)発明者 ゴバルクリシュナン, ニヒル

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 1 3 0 , ジャマイカ プレイン, ジャマイカウェイ 3 0 , アpartment 7

(72)発明者 ウー, サンオク

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 4 6 7 , チェスナット ヒル, ジェリー ロード 3 0

審査官 伊達 利奈

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 5 / 1 1 4 4 6 9 (W O , A 2)

特表 2 0 1 3 - 5 4 0 4 5 1 (J P , A)

特表 2 0 1 5 - 5 2 3 8 6 4 (J P , A)

特表 2 0 1 4 - 5 0 4 1 5 3 (J P , A)

特開 2 0 0 8 - 0 1 7 8 5 3 (J P , A)

Biosensors and Bioelectronics, 2014, Vol.59, pp.276-281

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0

C 1 2 Q 1 / 6 8

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

P u b M e d