

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】令和 3 年 1 月 28 日 (2021.1.28)

【公表番号】特表 2020-516232 (P2020-516232A)

【公表日】令和 2 年 6 月 11 日 (2020.6.11)

【年通号数】公開・登録公報 2020-023

【出願番号】特願 2019-531917 (P2019-531917)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/6816 (2018.01)

G 0 1 N 33/566 (2006.01)

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

G 0 1 N 21/64 (2006.01)

C 1 2 Q 1/25 (2006.01)

C 1 2 Q 1/6862 (2018.01)

C 1 2 Q 1/6876 (2018.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 9/00 (2006.01)

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

C 1 2 N 15/11 (2006.01)

C 1 2 N 15/113 (2010.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/6816 Z

G 0 1 N 33/566

G 0 1 N 33/53 M

G 0 1 N 33/53 D

G 0 1 N 21/64 F

C 1 2 Q 1/25

C 1 2 Q 1/6862 Z

C 1 2 Q 1/6876 Z

C 1 2 N 15/09 Z

C 1 2 N 9/00

C 1 2 Q 1/02

C 1 2 N 15/11 Z

C 1 2 N 15/113 Z

【手続補正書】

【提出日】令和 2 年 12 月 11 日 (2020.12.11)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

組成物であって、前記組成物は、

検出分子およびアンチセンスオリゴマーであって、前記検出分子が、i) 試料中の標的分子に結合するリガンド；および ii) 前記リガンドに連結されている一本鎖核酸を含み、前記一本鎖核酸が、前記アンチセンスオリゴマーにハイブリダイズされて、前記一本鎖核酸または前記アンチセンスオリゴマー中の 1 または複数の不対合ヌクレオチドを含むオ

オーバーハングを有する二本鎖核酸を形成することができる、検出分子およびアンチセンスオリゴマー、ならびに

第 1 の検出標識および第 2 の検出標識を含む複数の検出標識であって、前記第 1 の検出標識が、前記二本鎖核酸の前記オーバーハングに相補的なオーバーハングを含み、前記第 2 の検出標識が、前記複数の検出標識からの検出標識のオーバーハングに相補的なオーバーハングを含む、複数の検出標識

を含み、

前記検出標識のうちの少なくとも 1 個は、検出標識とのハイブリダイゼーションのために構成されたオーバーハングを有する多方向分枝を含む、組成物。

【請求項 2】

前記第 1 の検出標識が、第 2 のオーバーハングをさらに含み、前記第 2 のオーバーハングが、前記第 2 の検出標識中のオーバーハングと相補的であつハイブリダイズすることができる配列を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記リガンドが抗体であるか、または前記標的分子がタンパク質である、請求項 1 または請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記オーバーハングが、少なくとも 5、10、15、20、25 または 30 個のヌクレオチドを含む、請求項 1 または請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記組成物が、複数の前記検出分子を含み、必要に応じて、前記複数の検出分子のそれぞれが、異なる標的分子に結合する、請求項 1 または請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記検出標識のうちの少なくとも 1 個が、検出タグを含む、請求項 1 または請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記検出タグが、フルオロフォアを含む、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記多方向分枝が、前記オーバーハングを含み、前記オーバーハングのそれぞれが前記検出標識のうちの少なくとも 1 個にハイブリダイズすることができる、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 9】

前記多方向分枝が、3 方向分枝または 4 方向分枝である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 10】

前記多方向分枝が 3 個のオーバーハングを有する T 字構造または 4 個のオーバーハングを有する十字構造を有する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 11】

前記多方向分枝および検出標識が、サイクリングによってハイブリダイズされる、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記サイクルの数は、2 ~ 10 である、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記標的分子は細胞表面タンパク質である、請求項 1 または請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 14】

キットであって、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の前記検出分子、前記アンチセンスオリゴマーおよび前記複数の検出標識を含み、前記検出標識のうちの少なくとも 1 個は、検出標識とのハイブリダイゼーションのために構成されたオーバーハングを有する多方向分枝を含む、キット。

【請求項 15】

方法であって、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の前記標的分子を前記検出分子、

前記アンチセンスオリゴマーおよび前記検出標識のうちの少なくとも1個と接触させることを含み、前記検出標識のうちの少なくとも1個は、検出標識とのハイブリダイゼーションのために構成されたオーバーハングを有する多方向分枝を含む、方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0038

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0038】

本開示の追加的な態様および利点は、当業者であれば、本開示の単なる説明的な実施形態が示され記載されている、次の詳細な説明から容易に明らかになるであろう。理解できるであろうが、本開示は、他のおよび異なる実施形態が可能であり、そのいくつかの詳細は、様々な明らかな観点から修正が可能であり、これらは全て、本開示から逸脱するものではない。したがって、図面および記載は、本質的に制限的ではなく説明的として考慮されるべきである。

特定の実施形態では、例えば、以下が提供される：

(項目1)

試料中の標的分子を検出カブレットと接触させるステップを含む方法であって、前記検出カブレットが、第1の核酸および第2の核酸を含み、各核酸が、標的認識領域および自己ハイブリダイゼーション領域を有し、前記第1の核酸の前記標的認識領域が、前記標的分子の第1の領域に結合し、前記第2の核酸の前記標的認識領域が、前記標的分子の第2の領域に結合し、前記第1の核酸の前記自己ハイブリダイゼーション領域および前記第2の核酸の前記自己ハイブリダイゼーション領域がハイブリダイズされて、二本鎖核酸標識を形成する、方法。

(項目2)

前記二本鎖核酸標識が、少なくとも3個の連続した塩基対を有する、項目1に記載の方法。

(項目3)

前記二本鎖核酸標識が、オーバーハングを有する、項目1または2に記載の方法。

(項目4)

前記標的分子が、mRNA分子である、項目1～3のいずれか一項に記載の方法。

(項目5)

前記第1の核酸および前記第2の核酸が、一本鎖DNAである、項目1～4のいずれか一項に記載の方法。

(項目6)

前記標的分子の前記第1の領域および前記第2の領域が、2～15ヌクレオチド離れている、項目1～5のいずれか一項に記載の方法。

(項目7)

クロスリンカーを使用して、前記検出カブレットを前記試料に固定するステップをさらに含む、項目1～6のいずれか一項に記載の方法。

(項目8)

前記第1の核酸または前記第2の核酸が、遊離アミン(-NH₂)修飾を有する、項目1～7のいずれか一項に記載の方法。

(項目9)

前記検出カブレットを固定するステップが、前記検出カブレットをアミン特異的クロスリンカーと接触させるステップを含む、項目7または8に記載の方法。

(項目10)

前記オーバーハングが、1個のヌクレオチドを含む、項目3～9のいずれか一項に記載の方法。

(項目11)

前記オーバーハングが、複数のヌクレオチドを含む、項目 3 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 12)

前記オーバーハングが、少なくとも 5、10、15、20、25 または 30 個のヌクレオチドを含む、項目 11 に記載の方法。

(項目 13)

前記二本鎖核酸標識を DNA リガーゼと接触させるステップをさらに含む、項目 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 14)

前記二本鎖核酸標識を少なくとも 1 個の検出標識と接触させるステップをさらに含む、項目 13 に記載の方法。

(項目 15)

前記少なくとも 1 個の検出標識が、前記二本鎖核酸標識の前記オーバーハングに相補的なオーバーハングを有する二本鎖核酸である、項目 14 に記載の方法。

(項目 16)

前記少なくとも 1 個の検出標識が、前記二本鎖核酸標識の前記オーバーハングに相補的な一本鎖核酸である、項目 14 に記載の方法。

(項目 17)

前記少なくとも 1 個の検出標識が、複数の検出標識を含む、項目 14 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 18)

前記二本鎖核酸標識および前記少なくとも 1 個の検出標識が、前記 DNA リガーゼを使用してライゲーションされる、項目 14 または 15 に記載の方法。

(項目 19)

前記少なくとも 1 個の検出標識が、少なくとも 5、10、15、20、25 または 30 個の検出標識を含む、項目 14 ~ 18 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 20)

前記少なくとも 1 個の検出標識が、切断可能なリンカーを含む、項目 14 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 21)

前記少なくとも 1 個の検出標識が、検出タグを含む、項目 14 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 22)

前記少なくとも 1 個の検出標識が、複数の検出タグを含む、項目 21 に記載の方法。

(項目 23)

前記検出タグが、量子ドットを含む、項目 21 または 22 に記載の方法。

(項目 24)

前記検出タグが、フルオロフォアを含む、項目 21 または 22 に記載の方法。

(項目 25)

前記フルオロフォアが、クマリン、ローダミン、キサンテン、フルオレセインまたはシアニンを含む、項目 24 に記載の方法。

(項目 26)

前記検出タグを検出し、これにより、前記試料中の前記標的分子の存在を検出するステップを含む、項目 21 ~ 25 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 27)

前記標的分子を複数の検出カプレットと接触させるステップを含む、項目 1 ~ 26 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 28)

前記複数の検出カプレットのそれぞれが、異なる標的分子に結合する、項目 27 に記載の方法。

(項目 2 9)

前記試料が、インタクトな組織試料である、項目 1 ~ 2 8 のいずれか一項に記載の方法

。

(項目 3 0)

前記インタクトな組織試料が、20 ~ 1000 nmの間の厚さの切片にスライスされ得るように、樹脂に前記インタクトな組織試料を包埋するステップを含む、項目 2 9 に記載の方法。

(項目 3 1)

前記試料中の前記標的分子の存在に関連する状態または疾患を診断するステップを含む、項目 2 6 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 2)

試料中の標的分子を検出分子およびアンチセンスオリゴマーと接触させるステップを含む方法であって、前記検出分子が、前記標的分子に結合する少なくとも1個のリガンドを含み、前記少なくとも1個のリガンドが、一本鎖核酸に連結されており、前記一本鎖核酸が前記アンチセンスオリゴマーとハイブリダイズされて、オーバーハングを有する二本鎖核酸標識を形成する、方法。

(項目 3 3)

前記リガンドが、抗体である、項目 3 2 に記載の方法。

(項目 3 4)

前記標的分子が、タンパク質である、項目 3 2 または 3 3 に記載の方法。

(項目 3 5)

前記オーバーハングが、1個のヌクレオチドを含む、項目 3 2 ~ 3 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 6)

前記オーバーハングが、複数のヌクレオチドを含む、項目 3 3 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 7)

前記オーバーハングが、少なくとも5、10、15、20、25または30個のヌクレオチドを含む、項目 3 3 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 8)

前記二本鎖核酸標識をDNAリガーゼと接触させるステップをさらに含む、項目 3 2 ~ 3 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 9)

前記二本鎖核酸標識を少なくとも1個の検出標識と接触させるステップをさらに含む、項目 3 2 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 0)

前記少なくとも1個の検出標識が、前記二本鎖核酸標識の前記オーバーハングに相補的なオーバーハングを有する二本鎖核酸である、項目 3 9 に記載の方法。

(項目 4 1)

前記少なくとも1個の検出標識が、複数の検出標識である、項目 4 0 に記載の方法。

(項目 4 2)

前記少なくとも1個の検出標識が、前記二本鎖核酸標識の前記オーバーハングに相補的な一本鎖核酸である、項目 4 0 に記載の方法。

(項目 4 3)

前記少なくとも1個の検出標識が、複数の検出標識を含む、項目 4 1 ~ 4 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 4)

前記少なくとも1個の検出標識が、少なくとも5、10、15、20、25または30個の検出標識を含む、項目 3 9 ~ 4 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 5)

前記少なくとも 1 個の検出標識が、切断可能なリンカーを含む、項目 3 2 ~ 4 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 6)

前記少なくとも 1 個の検出標識が、切断可能なリンカーを含まない、項目 3 2 ~ 4 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 7)

前記少なくとも 1 個の検出標識が、検出タグを含む、項目 3 2 ~ 4 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 8)

前記検出タグが、フルオロフォアを含む、項目 4 7 に記載の方法。

(項目 4 9)

前記フルオロフォアが、クマリン、ローダミン、キサンテン、フルオレセインまたはシアニンを含む、項目 4 8 に記載の方法。

(項目 5 0)

前記検出タグを検出し、これにより、前記試料中の前記標的分子の存在を検出するステップを含む、項目 4 7 ~ 4 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 1)

前記試料を複数の検出分子と接触させるステップを含む、項目 3 2 ~ 5 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 2)

前記複数の検出分子のそれぞれが、異なる標的分子に結合する、項目 5 1 に記載の方法。

(項目 5 3)

前記試料が、インタクトな組織試料である、項目 3 2 ~ 5 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 4)

前記インタクトな組織試料が、20 ~ 1000 nm の間の厚さの切片にスライスされるように、樹脂に前記インタクトな組織試料を包埋するステップを含む、項目 5 3 に記載の方法。

(項目 5 5)

前記インタクトな組織試料が、骨髓組織試料、胃腸管組織試料、肺組織試料、肝臓組織試料、前立腺組織試料、神経系組織試料、泌尿生殖器系組織試料、脳組織試料、乳房組織試料、筋肉組織試料または皮膚組織試料である、項目 2 9 または 5 3 に記載の方法。

(項目 5 6)

前記試料中の前記標的分子の存在に関連する状態または疾患を診断するステップを含む、項目 2 6 または 5 0 に記載の方法。

(項目 5 7)

前記状態または疾患が、腎臓疾患、感染性疾患、代謝性疾患、前がん性状態、がん性状態または脳障害である、項目 5 6 に記載の方法。

(項目 5 8)

検出カプレットを含む組成物であって、前記検出カプレットが、第 1 の核酸および第 2 の核酸を含み、各核酸が、標的認識領域および自己ハイブリダイゼーション領域を有し、前記第 1 の核酸の前記標的認識領域が、標的分子の領域に結合し、前記第 2 の核酸の前記標的認識領域が、前記標的分子の第 2 の領域に結合し、前記第 1 の核酸の前記自己ハイブリダイゼーション領域および前記第 2 の核酸の前記自己ハイブリダイゼーション領域がハイブリダイズされて、二本鎖核酸標識を形成する、組成物。

(項目 5 9)

前記二本鎖核酸標識が、少なくとも 3 個の連続した塩基対を有する、項目 5 8 に記載の組成物。

(項目 6 0)

前記二本鎖核酸標識が、オーバーハングを有する、項目 58 または 59 に記載の組成物。

(項目 61)

前記オーバーハングが、1 個のヌクレオチドを含む、項目 60 に記載の組成物。

(項目 62)

前記オーバーハングが、複数のヌクレオチドを含む、項目 60 に記載の組成物。

(項目 63)

前記オーバーハングが、少なくとも 5、10、15、20、25 または 30 個のヌクレオチドを含む、項目 60 に記載の組成物。

(項目 64)

前記標的分子が、mRNA 分子である、項目 58 ~ 63 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 65)

前記第 1 の核酸および前記第 2 の核酸が、一本鎖 DNA である、項目 58 ~ 64 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 66)

前記第 1 の核酸および前記第 2 の核酸のそれぞれが、遊離アミン ($-NH_2$) 修飾を有する、項目 58 ~ 65 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 67)

DNA リガーゼをさらに含む、項目 58 ~ 66 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 68)

少なくとも 1 個の検出標識をさらに含む、項目 58 ~ 67 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 69)

前記少なくとも 1 個の検出標識が、前記二本鎖核酸標識の前記オーバーハングに相補的なオーバーハングを有する二本鎖核酸である、項目 68 に記載の組成物。

(項目 70)

前記少なくとも 1 個の検出標識が、前記二本鎖核酸標識の前記オーバーハングに相補的な一本鎖核酸である、項目 68 に記載の組成物。

(項目 71)

前記少なくとも 1 個の検出標識が、複数の検出標識を含む、項目 68 または 70 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 72)

前記少なくとも 1 個の検出標識が、少なくとも 5、10、15、20、25 または 30 個の検出標識を含む、項目 69 または 70 に記載の組成物。

(項目 73)

前記少なくとも 1 個の検出標識が、切断可能なリンカーを含む、項目 68 ~ 72 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 74)

前記少なくとも 1 個の検出標識が、検出タグを含む、項目 68 ~ 73 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 75)

前記少なくとも 1 個の検出標識が、複数の検出タグを含む、項目 74 に記載の組成物。

(項目 76)

前記検出タグが、量子ドットを含む、項目 74 または 75 に記載の組成物。

(項目 77)

前記検出タグが、フルオロフォアを含む、項目 74 または 75 に記載の組成物。

(項目 78)

前記フルオロフォアが、クマリン、ローダミン、キサンテン、フルオレセインまたはシアニンを含む、項目 77 に記載の組成物。

(項目 7 9)

検出分子およびアンチセンスオリゴマーを含む組成物であって、前記検出分子が、標的分子に結合する少なくとも1個のリガンドを含み、前記少なくとも1個のリガンドが、一本鎖核酸に連結されており、前記一本鎖核酸が前記アンチセンスオリゴマーにハイブリダイズされて、オーバーハングを有する二本鎖核酸標識を形成する、組成物。

(項目 8 0)

前記リガンドが、抗体である、項目79に記載の組成物。

(項目 8 1)

前記標的分子が、タンパク質である、項目79または80に記載の組成物。

(項目 8 2)

前記オーバーハングが、1個のヌクレオチドを含む、項目79～81のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 8 3)

前記オーバーハングが、複数のヌクレオチドを含む、項目79～81のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 8 4)

前記オーバーハングが、少なくとも5、10、15、20、25または30個のヌクレオチドを含む、項目79～81のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 8 5)

DNAリガーゼをさらに含む、項目79～84のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 8 6)

少なくとも1個の検出標識をさらに含む、項目79～85のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 8 7)

前記少なくとも1個の検出標識が、前記二本鎖核酸標識の前記オーバーハングに相補的なオーバーハングを有する二本鎖核酸である、項目86に記載の組成物。

(項目 8 8)

前記少なくとも1個の検出標識が、前記二本鎖核酸標識の前記オーバーハングに相補的な一本鎖核酸である、項目86に記載の組成物。

(項目 8 9)

前記少なくとも1個の検出標識が、複数の検出標識を含む、項目86～88のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 9 0)

前記少なくとも1個の検出標識が、少なくとも5、10、15、20、25または30個の検出標識を含む、項目86～89のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 9 1)

前記少なくとも1個の検出標識が、切断可能なリンカーを含む、項目86～90のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 9 2)

前記少なくとも1個の検出標識が、切断可能なリンカーを含まない、項目86～90のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 9 3)

前記少なくとも1個の検出標識が、検出タグを含む、項目86～92のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 9 4)

前記少なくとも1個の検出標識が、複数の検出タグを含む、項目93に記載の組成物。

(項目 9 5)

前記検出タグが、量子ドットを含む、項目93または94に記載の組成物。

(項目 9 6)

前記検出タグが、フルオロフォアを含む、項目93または94に記載の組成物。

(項目 9 7)

前記フルオロフォアが、クマリン、ローダミン、キサンテン、フルオレセインまたはシアニンを含む、項目 9 6 に記載の組成物。

(項目 9 8)

複数の検出分子を含む、項目 7 9 ~ 9 7 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 9 9)

前記複数の検出分子のそれぞれが、異なる標的分子に結合する、項目 9 8 に記載の組成物。

(項目 1 0 0)

項目 1 ~ 3 1 のいずれか一項に記載の方法における使用のためのキットであって、前記キットは、以下：

第 1 の核酸および第 2 の核酸を含む検出力プレットであって、各核酸が、標的認識領域および自己ハイブリダイゼーション領域を有し、前記第 1 の核酸の前記標的認識領域が、標的分子の第 1 の領域に結合し、前記第 2 の核酸の前記標的認識領域が、前記標的分子の第 2 の領域に結合し、前記第 1 の核酸の前記自己ハイブリダイゼーション領域および前記第 2 の核酸の前記自己ハイブリダイゼーション領域がハイブリダイズされて、二本鎖核酸標識を形成する、検出力プレットと、

前記検出力プレットを前記標的分子と接触させる際に使用するための第 1 の試薬とを含む、キット。

(項目 1 0 1)

前記二本鎖核酸標識が、オーバーハングを有する、項目 1 0 0 に記載のキット。

(項目 1 0 2)

項目 3 2 ~ 5 7 のいずれか一項に記載の方法における使用のためのキットであって、前記キットは、以下：

検出分子およびアンチセンスオリゴマーであって、前記検出分子が、標的分子に結合する少なくとも 1 個のリガンドを含み、前記少なくとも 1 個のリガンドが、一本鎖核酸に連結されており、前記一本鎖核酸が前記アンチセンスオリゴマーにハイブリダイズされて、オーバーハングを有する二本鎖核酸標識を形成する、検出分子およびアンチセンスオリゴマーと、

検出力プレットを前記標的分子と接触させる際に使用するための第 1 の試薬とを含む、キット。

(項目 1 0 3)

前記標的分子の検出における使用のための第 2 の試薬をさらに含む、項目 1 0 0 ~ 1 0 2 のいずれか一項に記載のキット。

(項目 1 0 4)

前記標的分子が、遺伝子編集アッセイにおける構成成分を含む、項目 1 または 3 2 に記載の方法。

(項目 1 0 5)

前記遺伝子編集アッセイが、C R I S P R アッセイである、項目 1 0 4 に記載の方法。

(項目 1 0 6)

前記構成成分が、C a s ヌクレアーゼ、標的 D N A、D N A 標的化 R N A、トランス活性化 c r R N A (t r a c r R N A)、ドナー修復鋳型、またはこれらのいずれかの組み合わせを含む、項目 1 0 4 または 1 0 5 に記載の方法。

(項目 1 0 7)

前記構成成分が、C a s 9 ヌクレアーゼを含む、項目 1 0 6 に記載の方法。

(項目 1 0 8)

前記遺伝子編集アッセイが、N g A g o アッセイである、項目 1 0 4 に記載の方法。

(項目 1 0 9)

前記標的分子が、細胞分子である、項目 1 または 3 2 に記載の方法。

(項目 1 1 0)

前記標的分子が、細胞表面分子である、項目 1 または 3 2 に記載の方法。

(項目 1 1 1)

前記標的分子が、炭水化物、脂質、タンパク質または核酸である、項目 1 0 9 または 1 1 0 に記載の方法。

(項目 1 1 2)

前記標的分子が、タンパク質を含む、項目 1 1 1 に記載の方法。

(項目 1 1 3)

前記タンパク質が、細胞骨格タンパク質、細胞外マトリクスタンパク質、血漿タンパク質、凝固因子、急性期タンパク質、血液タンパク質、細胞接着、膜貫通輸送タンパク質、イオンチャネル、シンポート / アンチポートタンパク質、ホルモン、増殖因子、受容体、DNA 結合タンパク質、RNA 結合タンパク質、転写調節タンパク質、免疫系タンパク質、栄養素貯蔵もしくは輸送タンパク質、シャペロンタンパク質、酵素、またはこれらのいずれかの組み合わせを含む、項目 1 1 2 に記載の方法。

(項目 1 1 4)

前記標的分子が、核酸を含む、項目 1 1 1 に記載の方法。

(項目 1 1 5)

前記核酸が、mRNA、tRNA、rRNA、snRNA、非コードRNA 分子、またはこれらのいずれかの組み合わせを含む、項目 1 1 4 に記載の方法。

(項目 1 1 6)

前記標的分子が、遺伝子編集アッセイにおける構成成分を含む、項目 5 8 または 7 9 に記載の組成物。

(項目 1 1 7)

前記遺伝子編集アッセイが、CRISPR アッセイである、項目 1 1 6 に記載の組成物。

(項目 1 1 8)

前記構成成分が、Casヌクレアーゼ、標的DNA、DNA 標的化RNA、トランス活性化crRNA (tracrRNA)、ドナー修復鋳型、またはこれらのいずれかの組み合わせを含む、項目 1 1 6 または 1 1 7 に記載の組成物。

(項目 1 1 9)

前記構成成分が、Cas9ヌクレアーゼを含む、項目 1 1 8 に記載の組成物。

(項目 1 2 0)

前記遺伝子編集アッセイが、NgAgoアッセイである、項目 1 1 6 に記載の組成物。

(項目 1 2 1)

前記標的分子が、細胞分子である、項目 5 8 または 7 9 に記載の組成物。

(項目 1 2 2)

前記標的分子が、細胞表面分子である、項目 5 8 または 7 9 に記載の組成物。

(項目 1 2 3)

前記標的分子が、炭水化物、脂質、タンパク質または核酸である、項目 1 2 1 または 1 2 2 に記載の組成物。

(項目 1 2 4)

前記標的分子が、タンパク質を含む、項目 1 2 3 に記載の組成物。

(項目 1 2 5)

前記タンパク質が、細胞骨格タンパク質、細胞外マトリクスタンパク質、血漿タンパク質、凝固因子、急性期タンパク質、血液タンパク質、細胞接着、膜貫通輸送タンパク質、イオンチャネル、シンポート / アンチポートタンパク質、ホルモン、増殖因子、受容体、DNA 結合タンパク質、RNA 結合タンパク質、転写調節タンパク質、免疫系タンパク質、栄養素貯蔵もしくは輸送タンパク質、シャペロンタンパク質、酵素、またはこれらのいずれかの組み合わせを含む、項目 1 2 4 に記載の組成物。

(項目 1 2 6)

前記標的分子が、核酸を含む、項目 1 2 3 に記載の組成物。

(項目 1 2 7)

前記核酸が、mRNA、tRNA、rRNA、snRNA、非コードRNA分子、またはこれらのいずれかの組み合わせを含む、項目126に記載の組成物。

(項目 1 2 8)

前記標的分子が、遺伝子編集アッセイにおける構成成分を含む、項目100または102に記載のキット。

(項目 1 2 9)

前記遺伝子編集アッセイが、CRISPRアッセイである、項目128に記載のキット。

(項目 1 3 0)

前記構成成分が、Casヌクレアーゼ、標的DNA、DNA標的化RNA、トランス活性化crRNA(tracrRNA)、ドナー修復鋳型、またはこれらのいずれかの組み合わせを含む、項目128または129に記載のキット。

(項目 1 3 1)

前記構成成分が、Cas9ヌクレアーゼを含む、項目130に記載のキット。

(項目 1 3 2)

前記遺伝子編集アッセイが、NgAgoアッセイである、項目128に記載のキット。

(項目 1 3 3)

前記標的分子が、細胞分子である、項目100または102に記載のキット。

(項目 1 3 4)

前記標的分子が、細胞表面分子である、項目100または102に記載のキット。

(項目 1 3 5)

前記標的分子が、炭水化物、脂質、タンパク質または核酸である、項目133または134に記載のキット。

(項目 1 3 6)

前記標的分子が、タンパク質を含む、項目135に記載のキット。

(項目 1 3 7)

前記タンパク質が、細胞骨格タンパク質、細胞外マトリクスタンパク質、血漿タンパク質、凝固因子、急性期タンパク質、血液タンパク質、細胞接着、膜貫通輸送タンパク質、イオンチャネル、シンポート/アンチポートタンパク質、ホルモン、増殖因子、受容体、DNA結合タンパク質、RNA結合タンパク質、転写調節タンパク質、免疫系タンパク質、栄養素貯蔵もしくは輸送タンパク質、シャペロンタンパク質、酵素、またはこれらのいずれかの組み合わせを含む、項目136に記載のキット。

(項目 1 3 8)

前記標的分子が、核酸を含む、項目135に記載のキット。

(項目 1 3 9)

前記核酸が、mRNA、tRNA、rRNA、snRNA、非コードRNA分子、またはこれらのいずれかの組み合わせを含む、項目138に記載のキット。

(項目 1 4 0)

前記二本鎖核酸標識を第3の核酸と接触させるステップをさらに含み、前記第3の核酸が、前記第1の核酸の配列、前記第2の核酸の配列またはその両方に相補的な配列を含む、項目1～31のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 4 1)

前記第3の核酸が、前記第1の核酸の前記配列、前記第2の核酸の前記配列またはその両方に結合する、項目140に記載の方法。

(項目 1 4 2)

前記第3の核酸が、前記第1の核酸の前記配列および前記第2の核酸の前記配列に結合し、これにより、3方向分枝を作り出す、項目141に記載の方法。

(項目 1 4 3)

前記3方向分枝が、少なくとも2個のオーバーハングを含む、項目142に記載の方法。

°

(項目 1 4 4)

前記第 3 の核酸を第 4 の核酸と接触させるステップをさらに含み、前記第 4 の核酸が、前記第 1 の核酸の配列、前記第 2 の核酸の配列、前記第 3 の核酸の配列、またはこれらのいずれかの組み合わせに相補的な配列を含む、項目 1 4 0 に記載の方法。

(項目 1 4 5)

前記第 4 の核酸が、前記第 3 の核酸の前記配列および前記第 1 の核酸の前記配列または前記第 2 の核酸の前記配列に結合し、これにより、4 方向分枝を作り出す、項目 1 4 4 に記載の方法。

(項目 1 4 6)

前記 4 方向分枝が、少なくとも 3 個のオーバーハングを含む、項目 1 4 5 に記載の方法

°

(項目 1 4 7)

前記オーバーハングのうち少なくとも 2 個が、同じ配列または特有の配列を含む、項目 1 4 3 または 1 4 6 に記載の方法。

(項目 1 4 8)

前記オーバーハングのうち少なくとも 2 個が、相補的配列を含む、項目 1 4 3 または 1 4 6 に記載の方法。

(項目 1 4 9)

前記オーバーハングのうち少なくとも 1 個を検出標識と接触させるステップをさらに含む、項目 1 4 0 ~ 1 4 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 5 0)

前記検出標識が、3 方向分枝または 4 方向分枝を含む、項目 1 4 9 に記載の方法。

(項目 1 5 1)

前記検出標識が、前記オーバーハングのうち前記少なくとも 1 個に相補的なオーバーハングを含む、項目 1 4 9 に記載の方法。

(項目 1 5 2)

前記検出標識が、直接的ハイブリダイゼーション、酵素的ライゲーションまたは化学的ライゲーションによって、前記オーバーハングのうち前記少なくとも 1 個に連結される、項目 1 4 9 ~ 1 5 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 5 3)

第 3 の核酸をさらに含み、前記第 3 の核酸が、前記第 1 の核酸の配列、前記第 2 の核酸の配列またはその両方に相補的な配列を含む、項目 5 8 ~ 7 8 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 1 5 4)

前記第 3 の核酸が、前記第 1 の核酸の前記配列および前記第 2 の核酸の前記配列に結合し、これにより、3 方向分枝を作り出す、項目 1 5 3 に記載の組成物。

(項目 1 5 5)

前記 3 方向分枝が、少なくとも 2 個のオーバーハングを含む、項目 1 5 4 に記載の組成物。

(項目 1 5 6)

第 4 の核酸をさらに含み、前記第 4 の核酸が、前記第 1 の核酸の配列、前記第 2 の核酸の配列、前記第 3 の核酸の配列、またはこれらのいずれかの組み合わせに相補的な配列を含む、項目 1 5 5 に記載の組成物。

(項目 1 5 7)

前記第 4 の核酸が、前記第 3 の核酸の前記配列および前記第 1 の核酸の前記配列または前記第 2 の核酸の前記配列に結合し、これにより、4 方向分枝を作り出す、項目 1 5 6 に記載の組成物。

(項目 1 5 8)

前記 4 方向分枝が、少なくとも 3 個のオーバーハングを含む、項目 1 5 7 に記載の組成

物。

(項目 1 5 9)

前記オーバーハングのうち少なくとも 2 個が、同じ配列または特有の配列を含む、項目 1 5 5 または 1 5 8 に記載の組成物。

(項目 1 6 0)

前記オーバーハングのうち少なくとも 2 個が、相補的配列を含む、項目 1 5 5 または 1 5 8 に記載の組成物。

(項目 1 6 1)

検出標識をさらに含む、項目 1 5 3 ~ 1 6 0 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 1 6 2)

前記検出標識が、3 方向分枝または 4 方向分枝を含む、項目 1 6 1 に記載の組成物。

(項目 1 6 3)

前記検出標識が、前記オーバーハングのうち前記少なくとも 1 個に相補的なオーバーハングを含む、項目 1 6 2 に記載の組成物。

(項目 1 6 4)

前記二本鎖核酸標識を検出標識と接触させるステップをさらに含む、項目 3 2 ~ 5 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 6 5)

前記検出標識が、3 方向分枝または 4 方向分枝を含む、項目 1 6 4 に記載の方法。

(項目 1 6 6)

前記検出標識が、前記二本鎖核酸標識の前記オーバーハングに相補的なオーバーハングを含む、項目 1 6 5 に記載の方法。

(項目 1 6 7)

前記検出標識が、直接的ハイブリダイゼーション、酵素的ライゲーションまたは化学的ライゲーションによって、前記二本鎖核酸標識の前記オーバーハングに連結される、項目 1 6 4 ~ 1 6 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 6 8)

前記検出標識を第 2 の検出標識と接触させるステップをさらに含む、項目 1 6 4 ~ 1 6 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 6 9)

前記第 2 の検出標識が、3 方向分枝または 4 方向分枝を含む、項目 1 6 8 に記載の方法。

(項目 1 7 0)

前記第 2 の検出標識が、前記検出標識の前記オーバーハングに相補的なオーバーハングを含む、項目 1 6 9 に記載の方法。

(項目 1 7 1)

前記少なくとも 1 個の検出標識が、前記二本鎖核酸標識の前記オーバーハングに相補的なオーバーハングを含む、項目 8 6 に記載の組成物。

(項目 1 7 2)

前記少なくとも 1 個の検出標識が、3 方向分枝または 4 方向分枝を含む、項目 1 7 1 に記載の組成物。

(項目 1 7 3)

前記少なくとも 1 個の検出標識が、直接的ハイブリダイゼーション、酵素的ライゲーションまたは化学的ライゲーションによって、前記二本鎖核酸標識の前記オーバーハングに連結される、項目 1 7 1 または 1 7 2 に記載の組成物。

(項目 1 7 4)

第 2 の検出標識をさらに含む、項目 1 7 1 ~ 1 7 3 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 1 7 5)

前記第 2 の検出標識が、前記少なくとも 1 個の検出標識の前記オーバーハングに相補的なオーバーハングを含む、項目 1 7 4 に記載の組成物。

(項目 1 7 6)

前記第 2 の検出標識が、3 方向分枝または 4 方向分枝を含む、項目 1 7 5 に記載の組成物。

(項目 1 7 7)

前記項目のいずれか一項に記載の組成物を含む、項目 1 0 0 ~ 1 0 3 および 1 2 8 ~ 1 3 9 のいずれか一項に記載のキット。