

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7646575号  
(P7646575)

(45)発行日 令和7年3月17日(2025.3.17)

(24)登録日 令和7年3月7日(2025.3.7)

(51)国際特許分類	F I			
C 1 2 Q 1/6869(2018.01)	C 1 2 Q	1/6869	Z	
C 1 2 Q 1/6876(2018.01)	C 1 2 Q	1/6876	Z	
C 1 2 Q 1/686(2018.01)	C 1 2 Q	1/686	Z	
C 1 2 Q 1/6844(2018.01)	C 1 2 Q	1/6844	Z	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	1 1 0	
請求項の数 17 (全22頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号	特願2021-573547(P2021-573547)	(73)特許権者	518344597
(86)(22)出願日	令和2年6月10日(2020.6.10)		エヌキャン ジェノミクス, インコーポ レイテッド
(65)公表番号	特表2022-536907(P2022-536907 A)		カナダ国 ブイ6ティー 1ゼット3 ブ リティッシュ コロンビア, バンクーバ ー, イースト モール 2 3 8 6 - ス イート 3 0 2
(43)公表日	令和4年8月22日(2022.8.22)	(74)代理人	100099759
(86)国際出願番号	PCT/US2020/036910		弁理士 青木 篤
(87)国際公開番号	WO2020/251968	(74)代理人	100123582
(87)国際公開日	令和2年12月17日(2020.12.17)		弁理士 三橋 真二
審査請求日	令和5年5月15日(2023.5.15)	(74)代理人	100117019
(31)優先権主張番号	62/859,486		弁理士 渡辺 陽一
(32)優先日	令和1年6月10日(2019.6.10)	(74)代理人	100141977
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 中島 勝
最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 連結された標的捕捉

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

二本鎖DNA挿入を検出するための方法であって、以下を含む方法：

複数の二本鎖核酸断片の一つまたは複数が、挿入部位に挿入されたタグ配列を含む、前記複数の二本鎖核酸断片上にユニバーサルプライミング部位(universal priming site)をライゲーションする工程であって、ここで、該タグ配列は二本鎖DNAのセグメントを含む、工程；

複数の連結された二本鎖核酸断片を変性させて、ユニバーサルプライミング部位を含む一本鎖核酸断片を作成する工程；

前記一本鎖核酸断片を、前記一つまたは複数のタグ配列および前記挿入部位の3'側または5'側に近接する配列の少なくとも一部に対して相補的である一本鎖DNAのセグメントを含む標的プローブを含む複数の連結された捕捉プローブに曝露する工程であって、ここで該標的プローブが標的核酸配列にハイブリダイズし、連結された一本鎖DNAユニバーサルプライマーが該ユニバーサルプライミング部位にハイブリダイズする、工程；  
該連結された一本鎖DNAユニバーサルプライマーを伸長して、前記挿入部位または前記タグ領域のコピーを作成する工程；および

前記挿入部位の前記タグ配列の存在を決定するために前記コピーの配列決定をする工程。

【請求項2】

前記挿入部位の3'側または5'側に近接する配列は、前記挿入部位にまたがらない、請求項1に記載の方法。

10

20

**【請求項 3】**

前記挿入部位の 3' 側または 5' 側に近接する配列は、前記挿入部位の 150 ヌクレオチド以内にある、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記複数の連結された捕捉プローブは、前記タグ配列の少なくとも一部に対する親和性を有する標的プローブ、および前記挿入部位の 3' 側または 5' 側に近接する前記配列の少なくとも一部に対する親和性を有する標的プローブを含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 5】**

ゲノム編集ツールを使用して前記タグ配列を前記挿入部位に挿入する工程をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

10

**【請求項 6】**

前記ゲノム編集ツールは、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート (CRISPR) および関連する酵素、メガヌクレアーゼ、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ [transcription activator effector-like nucleases] (TALEN)、およびジンクフィンガーヌクレアーゼからなる群から選択される、請求項 5 に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記ゲノム編集ツールの組込み率 (integration rate) を決定するために、前記挿入部位に前記タグ配列を含む配列の量を、前記タグ配列が挿入されていない前記挿入部位を含む配列の量と比較することをさらに含む、請求項 5 に記載の方法。

20

**【請求項 8】**

前記ゲノム編集ツールの非特異的な (off-target) 組込み率を決定するために、前記挿入部位に前記タグ配列を含む配列の量を、前記挿入部位の標的外に (off-target) 挿入された前記タグ配列を含む配列の量と比較することをさらに含む、請求項 5 に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記タグ配列と前記プローブ配列との間の融解温度は、前記連結された捕捉プローブの結合を可能にするのに十分である、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記ライゲーションする工程は、前記複数の二本鎖核酸断片上に固有のバーコードをライゲーションすることをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

30

**【請求項 11】**

前記固有のバーコードは、センス特異的 (sense specific) である、請求項 10 に記載の方法。

**【請求項 12】**

結合分子 (linking molecule) を使用して前記標的プローブと前記ユニバーサルプライマーを一緒に結合することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 13】**

クリック化学を使用して前記標的プローブと前記ユニバーサルプライマーを一緒に連結する、請求項 12 に記載の方法。

40

**【請求項 14】**

前記配列決定をする工程の前に、目的のゲノム領域を増幅するために前記曝露する工程および前記伸長する工程を繰り返すことをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 15】**

前記配列決定をする工程の前に、連結されていないユニバーサルプライマーを使用して前記目的のゲノム領域を増幅することをさらに含む、請求項 1 または 14 に記載の方法。

**【請求項 16】**

PCR 増幅および前記ユニバーサルプライミング部位に相補的なユニバーサルプライマーを使用して前記目的のゲノム領域を増幅することをさらに含む、請求項 1 または 14 に記載の方法。

50

## 【請求項 17】

ライゲーションの前に前記二本鎖核酸断片を切断する ( s h e a r )、請求項 1 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

## 関連出願

この出願は、2019年6月10日に出願された米国仮出願第62/859,486号の優先権および利益を主張し、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

## 【0002】

本発明は、概して、核酸の捕捉、増幅、および配列決定に関する。

## 【背景技術】

## 【0003】

より強力でユーザーフレンドリーなゲノム編集ツールの出現により、遺伝性疾患の治療、病気の根絶、収穫量/耐性の向上、および生物を改変するその他の潜在的な利点の可能性の新しい世界が開かれてきた。クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート ( C R I S P R ) および関連する酵素、メガヌクレアーゼ、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ [ t r a n s c r i p t i o n a c t i v a t o r e f f e c t o r - l i k e n u c l e a s e s ] ( T A L E N )、およびジンクフィンガーヌクレアーゼを含む系は、特定の標的配列でのDNAの二本鎖切断の導入を可能にし、これは、切断点での所望の配列の挿入を含む標的変異を可能にすることができる。

## 【0004】

これらのツールの有効性を証明し、一般的な使用への受け入れを促進するために、挿入された配列の組み込み率の評価を含め、それらの効率および特異性を評価する必要がある。非特異的な切断および挿入の分析も重要である。

## 【発明の概要】

## 【0005】

本発明は、前述のゲノム編集ツールのいずれかの組み込み率および非特異的効果を評価するための方法を提供する。挿入された二本鎖タグ配列は、成功率を評価するために濃縮および定量化することができる。非特異的な ( o f f - t a r g e t ) 組み込みのモニタリングおよび標的上の ( o n - t a r g e t ) 組み込みの定量化の組み合わせは、ゲノム編集系を評価するための強力なツールを提供する。

## 【0006】

特定の実施形態では、本発明は、様々なゲノム編集ツールを使用して挿入された二本鎖タグを標的とするプローブを用いた連結された標的捕捉技術の方法を提供する。二本鎖切断を検出するための標的捕捉は、溶液中で、または液滴ベースの方法を使用して行うことができる。ユニバーサルプライマーおよび標的的特異的プローブを含む連結された標的捕捉プローブが使用され、ユニバーサルプライマーの結合を可能にするために標的的特異的プローブが結合することを必要とする条件下で反応が起こる。分析するゲノム編集法を使用してタグ配列を組み込みした後、ユニバーサルプライミング部位を備えたデュプレックスアダプター ( d u p l e x a d a p t e r ) を、改変されたDNAの末端にライゲーションすることができる。標的的特異的プローブは、タグ配列、二本鎖切断点に隣接するゲノムDNA配列、またはその両方に相補的であってもよい。この不均一に組み込まれた ( h e t e r o g e n e o u s l y - i n t e g r a t e d ) DNA e n R i c h m e n t、または本明細書に記載するHIDN-Seqプロセスにより、タグ配列またはタグおよび隣接する配列の濃縮が可能になり、組み込み率に関するデータが提供されるだけでなく、非特異的組み込みが識別され、DNA編集パフォーマンスの包括的な評価が提供される。タグ配列の濃縮により、望ましくない非特異的な部位を含むすべての組み込み部位の測定が可能になり、タグ配列に対してのみ設計されたプローブが使用される。一方、所望の組み込み部位の濃縮により、特定の部位での組み込み率の測定が可能になり、予想されるゲノムDNA組

10

20

30

40

50

込み部位に対して設計されたプローブが使用される。

【0007】

複数の結合工程が必要なため、従来の単一結合ターゲットキャプチャー (single binding target capture) 技術よりも特異性が向上する。連結されたプローブの結合後、結合したユニバーサルプライマーは、鎖置換ポリメラーゼ (strand displacing polymerase) を使用して伸長され、標的鎖のコピーを生成する。これは、ユニバーサルプライマーを使用したPCRを使用して増幅することができる。連結された捕捉プローブは、より高い特異性および二重情報が必要なDNAの両方のセンス (sense) に使用することができる。以下で説明するように、複数のリンカータイプが可能である。本発明の溶液ベースの標的捕捉方法と同様に、液滴でのマルチプレックスPCRに限定されるのではなく、ユーザーが液滴でのDNA組込み分析のための標的捕捉を行うことを可能にする液滴ベースの方法を提供する。

10

【0008】

二本鎖固有分子識別子 [duplex unique molecular identifiers] (UMI) を含むバーコードを使用して、増幅または濃縮された配列にタグ付けし、分析される二本鎖DNAの開始分子情報とともにセンス情報を保持することができる。したがって、配列決定の結果は、正確な組込み率の評価のために、個々の開始分子に起因する可能性がある。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】図1は、二本鎖核酸の連結された標的捕捉の例示的な方法を示す。

【図2】図2は、連結された標的捕捉核酸の増幅方法を示す。

【図3】図3Aおよび3Bは、本発明の液滴ベースの標的捕捉方法の工程を示す。

【図4】図4は、例示的なタグ配列の組込みおよび誘導されたDNAの二本鎖切断を示す。

【図5】図5は、HIDN-Seqおよびタグ配列に特異的な連結された標的捕捉プローブを使用する例示的なオフターゲット (off-target) 発見ワークフローを示す。

【図6】図6は、HIDN-Seqおよびタグ配列および切断点に隣接するゲノムDNA領域に特異的な連結された標的捕捉プローブを使用する例示的なオフターゲットおよび隣接発見ワークフローを示す。

【図7】図7は、HIDN-Seqおよびタグ配列および切断点に隣接するゲノムDNA領域に特異的な連結された標的捕捉プローブセットを使用する、例示的な組み合わせられたワークフローを示す。

30

【図8】図8は、HIDN-Seqおよびタグ配列および切断点に隣接するゲノムDNA領域に特異的な連結された標的捕捉プローブセットを使用し、単一のチューブで実行される、例示的な組み合わせられたワークフローを示す。

【図9】図9は、バーコーディングPCRおよび定量化および配列決定を伴うHIDN-Seqを使用する例示的なワークフローを示す。

【図10】図10は、実施例1の実験的概要を示す。

【図11】図11は、実施例1のゼロ、一方、または両方の読み取りにおいて、意図されたタグ配列を含むS1、S2、およびS3クラスターの数および割合を示す。

40

【図12】図12は、ゲノム内の塩基数をプロットしたゲノム全体のUMIカバー度、および実施例1のS1、S2、およびS3グループの最小UMIカバー度を示す。

【図13】図13は、スパイクされたサンプルについてHIDN-Seqで決定された実施例2のオンターゲットフラクションを示す。

【発明を実施するための形態】

【0010】

本発明は、概して、特にゲノム編集系の効率および特異性の分析のための、DNAにおける二本鎖切断の標的化された捕捉および分析のための方法に関する。連結された標的捕捉技術が使用され、ここでユニバーサルプライマーおよび標的的特異的プローブを含む連結された標的捕捉プローブが使用され、ユニバーサルプライマーの結合を可能にするために

50

標的特異的プローブが結合することを必要とする条件下で反応が起こる。ユニバーサルプライミング部位は、ゲノムDNAの編集後（たとえば、切断および配列挿入）の断片の端にライゲーションすることができる。次に、連結された標的捕捉プローブの標的特異的部分は、DNAの標的切断点、挿入されたタグ配列、または2つの組み合わせに特異的になるように設計することができる。タグ配列を単独で、または標的部位とともに濃縮することにより、組込み率および非特異的な組込みに関する情報を得ることができる。その情報は、ゲノム編集の急成長している分野での既存のおよび将来の技術を評価するために不可欠である。連結された標的捕捉、ならびに結合分子（linking molecule）を使用する関連する増幅および配列決定技術は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許公開番号第20190106729号に記載されているように本明細書で企図されている。タグ配列は、評価用に特別に設計されている場合もあれば、ゲノム修飾での使用を目的とした機能配列である場合もある。タグ配列を標的とする標的特異的プローブは、ゲノム編集技術の一般的な性能を評価するため、または特定のインサートを使用して特定の修飾の性能を評価するために、任意の配列（評価特異的タグまたはゲノムDNAインサート）に結合するように設計することができる。

10

## 【0011】

本明細書に記載の系および方法は、CRISPR関連（Cas）エンドヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、またはRNA誘導型改変ヌクレアーゼ[RNA-guided engineered nuclease]（RGEN）に依存するものを含む任意のそのような技術を分析することができる。プログラム可能なヌクレアーゼおよびそれらの使用は、たとえば、Zhang F, Wen Y, Guo X (2014). "CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges" に記載されている。

20

## 【0012】

Human Molecular Genetics. 23 (R1): R40-6. doi:10.1093/hmg/ddul25; Ledford H (March 2016). "CRISPR: gene editing is just the beginning". Nature. 531 (7593): 156-9.

## 【0013】

doi:10.1038/531156a; Hsu PD, Lander ES, Zhang F (June 2014). "Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering". Cell. 157 (6): 1262-78.

30

## 【0014】

doi:10.1016/j.cell.2014.05.010; Boch J (February 2011). "TALEs of genome targeting". Nature Biotechnology. 29 (2): 135-6. doi:10.1038/nbt.1767; Wood AJ, Lo TW, Zeitler B, Pickle CS, Ralston EJ, Lee AH, Amora R, Miller JC, Leung E, Meng X, Zhang L, Rebar EJ, Gregory PD, Umov FD, Meyer BJ (July 2011). "Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs". Science. 333 (6040): 307. doi:10.1126/science.1207773; Carroll, D (2011). "Genome engineering with zinc-finger nucleases". Genetics Society of America. 188 (4): 773-782.

40

## 【0015】

doi:10.1534/genetics.111.131433; Urnov,

50

F. D., Rebar, E. J., Holmes, M. C., Zhang, H. S., & Gregory, P. D. (2010). "Genome Editing with Engineered Zinc Finger Nucleases". *Nature Reviews Genetics*. 11 (9): 636-646. doi:10.1038/nrg2842、そのそれぞれの内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0016】

二本鎖切断を同定し、ゲノム編集ツールを評価するための既存の技術は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第9,822,407号および第9,850,484号に記載されている。そして、本明細書に記載のバックエンド配列決定および分析技術は、二本鎖切断および挿入効率の分析のために本明細書に記載の連結された標的捕捉方法と共に使用してもよい。

10

【0017】

例示的な二本鎖切断およびタグ挿入を図4に示す。議論された方法のいずれか(たとえば、CRISPR-Cas RNA誘導型ヌクレアーゼ(RGN)、TALEN(転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ)、およびZFN(ジンクフィンガーヌクレアーゼ)を二本鎖切断を導入するために使用することができる。切断後、設計されたタグ配列は、図4に示されるように組み込むことができる。タグ組み込みは、参照により本明細書に組み込まれる、Tsai S. Q., Zheng Z., Nguyen N. T., Fiebers M., Topkar V. V., et al. (2015) GU 20  
IDE-seq enables genome wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nat Biotechnol* 33: 187-197に記載されているような方法によって達成され得る。タグの修飾(両端の5'リン酸および2ホスホロチオエート結合等)を使用して、タグの組み込み率を高めることができる。

20

【0018】

不完全な切断および組み込みを想定すると、一部の標的断片は切断されないかタグ配列の組み込みに成功し、一部はタグ配列の組み込みに成功し、一部のタグ配列は標的外(off-target)部位に組み込まれる。次に、本明細書に記載されている連結された標的捕捉(FTC)技術を使用して、それらの結果の割合を決定することができる。

30

【0019】

特定の実施形態では、図5に示されるように、ユニバーサルプライマーに連結されたタグ特異的プローブを有する連結された標的捕捉プローブが使用される。プローブの結合および増幅の前に、ユニバーサルプライミング部位を含むアダプターをサンプル断片にライゲーションし、それによってユニバーサルプライマーの標的部位を提供する。ライゲーションされたアダプターは、固有分子識別子[unique molecular identifiers](UMI)または他のバーコード配列を含んでもよく、後でこれらのバーコード配列を使用して、配列が最終的に派生した元の分子を判別することができる。このような情報を使用して、個々の分子のコンセンサス配列を決定し、切断および標的上の(on-target)および非特異的な(off-target)組み込み率のより正確な定量化を提供することができる。バーコードは、センス固有のタグ情報を保持するために、yアダプターのステム部分またはyアダプターの非相補部分に含めることができる。同様に、ユニバーサルプライミング部位は、アダプターのステムまたはy部分に配置することができる。特定の実施形態では、改善された機能のために、連結された標的捕捉プローブの標的部位をより近くに配置するために、ステム位置が好ましい。そのような実施形態では、センス固有のタグ情報が失われているにもかかわらず、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願第16/239,100号で論じられているように、エラー低減の利点が依然として達成されている。

40

【0020】

タグ濃縮によるオフターゲット検出の場合、標的固有のプローブは、挿入された配列に

50

優先的に結合する。以下に記載する連結された標的捕捉技術を使用すると、増幅は、連結されたプローブの両方が断片に沿って互いに比較的近接して結合する場合にのみ行われる。連結されたプローブは、別のユニバーサルPCRプライミング配列（ライゲーションされたアダプターの部位とは異なる）を含むことができるため、連結されたプローブを使用した増幅の数サイクル後に、サンプルのインデックス作成が行われ、従来のユニバーサルPCRプライマーを使用したより安定した増幅を使用して、シーケンスライブラリを作成することができる。タグに特異的な連結されたプローブは、タグとライゲーションされたユニバーサルプライミング部位との間に隣接するゲノムDNA配列とともに、任意のタグ配列を捕捉して増幅する必要がある。したがって、配列決定およびその後の分析を通じて、正しい部位に組み込まれたタグ、オフターゲット（off-target）に組み込まれたタグ、および組み込まれていないタグの比較数を評価することができ、それにより、有望なゲノム編集ツールで使用されている切断および組み込み技術の特異性および効率の評価を提供する。

10

#### 【0021】

オフターゲット発見は、図6に示すように、隣接配列の濃縮と組み合わせることができる。連結された標的捕捉および増幅技術は、図5に示すものと同様に実行されるが、異なるプローブ依存プライマー（PDP）が使用される。両方のPDPは、ライゲーションされたアダプター配列に相補的なユニバーサルプライマーを含むが、標的特異的プローブは異なる標的に優先的に結合する。一方の標的特異的プローブはタグ特異的配列に結合し、もう一方は目的の組み込み部位に隣接するゲノムDNAの一部に結合する。結果として得られる配列捕捉は、組み込まれていないタグおよび非特異的組み込みを除外し、正しく組み込まれた標的のみを捕捉する必要がある。特定の実施形態では、標的特異的プローブとのミスマッチは許容することができ、それにより、数ヌクレオチドによってオフターゲットになるか、さもなければ切断点で意図しない変化を引き起こし得る組み込みエラーを捕捉することができる。

20

#### 【0022】

切断点に隣接するゲノムDNAの両側を標的とする標的特異的プローブを含むPDPを使用することもできる。これにより、目的の切断点を含むすべてのゲノム断片を捕捉することができる。捕捉された分子は、タグ配列が正常に組み込まれたゲノムDNA、ならびに切断されなかった、または組み込まれずに修復されたゲノムDNAが含まれている必要がある。したがって、二本鎖切断および配列組み込み効率は、試験されているゲノム編集ツールについて評価することができる。

30

#### 【0023】

図7に示すように、これらの方法を組み合わせることができ、ここでアダプターを断片にライゲーションし、タグインサートおよび切断点に隣接するゲノムDNA配列の両方の両端を標的とするプローブを使用する。事前増幅は、組み込み率を測定するためにそのようなアッセイで使用することができる。このようなアッセイは、非特異的な（off-target）組み込み率および標的上の（on-target）組み込み率を同時に提供し、単一のアッセイで完全なゲノム編集性能評価を提供する。図8に示すように、ワークフローの複雑さを軽減するために、組み合わせたアッセイを単一のチューブで実行することができる。

40

#### 【0024】

バックエンド分析を用いた例示的な方法を図9に示す。図4に示すように標的切断およびタグ配列の組み込みの後、アダプターをタグ挿入ゲノムDNAの末端にライゲーションする。アダプターは、プライミング部位および任意のバーコードを含む。アダプターに特異的なプライマーを使用した前増幅（Pre-amplification）を任意選択で使用することができる。標的捕捉は、図5～8を参照して説明したように、連結された標的捕捉プローブを使用して行われる。バーコーディングPCRが使用され、続いてDNAの定量および配列決定が行われる。配列分析を任意選択で使用して、次に各固有識別分子（uniquely-identified molecule）のコンセンサス配列を

50

決定することができる。次に、生の配列決定データまたは折りたたまれた読み取り ( collapsed reads ) を分析して、使用する連結された標的捕捉プローブに応じて、標的切断点で修飾されていないゲノムDNA、組込まれていないタグ配列、標的上の ( on-target ) 組込み、および/または非特異的な ( off-target ) 組込みの相対量を決定することができる。任意の配列決定技術、ならびに既知の配列分析/比較技術またはソフトウェアを使用することができる。

#### 【0025】

連結された標的捕捉方法は、標的とされたDNAの配列決定のための目的のゲノム領域の溶液ベースの捕捉を含む場合がある。図1および2は、溶液ベースの標的捕捉の例示的な方法を示す。ユニバーサルプライミング部位および任意のバーコード ( センストリニックな場合がある ) は、抽出されたDNAにライゲーションされる。次に、ライゲーションされたDNA産物は変性され、標的トリニックなプローブに連結されたユニバーサルプライマーを含む連結された標的捕捉プローブと結合する。標的の捕捉は、標的プローブの結合により局所濃度が高くない限り、ユニバーサルプライマーが単独で結合できない温度で行われる。次に、鎖置換ポリメラーゼ (たとえば、Taq、BST、phi29、SD) を使用して、標的に結合した連結されたプローブを伸長する。図1および2の黒いひし形によって示されるように、標的プローブは伸長からブロックされ、その結果、伸長は結合したユニバーサルプライマーに沿ってのみ起こり、標的プライマーに連結されたままである結合した標的核酸鎖をコピーする。次に、いくつかの連結されたPCR伸長サイクルを使用して、標的配列を増幅することができる。次に、連結された標的捕捉プローブ由来のユニバーサルプライミング部位に対応するユニバーサルプライマーを使用してPCRを実行し、標的核酸の一方または両方の鎖を増幅することができる。このPCR工程は、精製工程を必要とせずと同じ反応で行うことができる。次に、増幅された標的配列を上記のように配列決定することができる。ギャップは許容されるが、反対方向に使用する場合、連結された捕捉プローブ間にギャップは必要ない。捕捉プローブは、ユニバーサルプライマーを事前に作成された捕捉プローブに結合することにより、ユニバーサル5'-リンカーを使用して作成することができる。捕捉プローブは、クリック化学または以下に記載する他の手段によって結合することができる。

#### 【0026】

一部の実施形態では、核酸は、より小さな核酸断片に断片化または分解され得る。アダプターのライゲーションの前に達成されるより短い断片は、連結されたプローブがまたがるのに必要な距離を短くするのに役立つ、それによって結合および濃縮効率を高めることができる。ゲノム核酸を含む核酸は、機械的断片化、化学的断片化、および酵素的断片化等の様々な方法のいずれかを使用して断片化することができる。核酸断片化の方法は当技術分野で知られており、DNase消化、超音波処理、機械的切断 ( mechanical shearing ) 等を含むが、これらに限定されない ( J. Sambrook et al, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 1989, 2. sup. nd Ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press: New York, N.Y.; P. Tijssen, "Hybridization with Nucleic Acid Probes - Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (Parts I and II)", 1993, Elsevier; C. P. Ordahl et al, Nucleic Acids Res., 1976, 3: 2985-2999; P. J. Oefner et al, Nucleic Acids Res., 1996, 24: 3879-3889; Y. R. Thorstenson et al, Genome Res., 1998, 8: 848-855 )。米国特許公開第2005/0112590号は、当技術分野で知られている断片化の様々な方法の一般的な概要を提供している。

#### 【0027】

本明細書で説明される標的捕捉技術に使用されるプローブ依存性プライマーは、標的特定のDNAプローブの5'末端(たとえば、タグ挿入配列の一部または切断点でのゲノムDNA配列の隣接部分に相補的)をユニバーサルプライマーの5'末端まで連結することができる。DNAプローブは、その3'末端に逆位dT、C3スペーサー、または他のブロッキング部分を含んでもよく、断片内の相補的な標的配列に結合するDNAプローブによって標的核酸断片に近接させられた、続いて結合されるユニバーサルプライマーの伸長を支持するDNAプローブの伸長を防ぐ。プライマーおよびプローブは別々に合成し、以下で説明する技術を使用して連結することができる。

#### 【0028】

連結された標的捕捉プローブには標的特定の配列が好ましいが、特定の実施形態では、ユニバーサルプライマーの5'末端(以下で説明するように任意のバーコードを有する)は、任意のタンパク質、核酸、または核酸中の特定の標的配列または標的特徴に対する結合親和性を示す他の分子からなってもよいプローブ分子の5'末端に付着させることができる。プローブ分子は、DNAまたはRNA結合プローブであってもよく、たとえば、クリック化学、ビオチン/ストレプトアビジン結合、または誘導体、たとえばデュアルビオチンおよびストレプトアビジン、PEG、免疫PCR化学、たとえば金ナノ粒子、化学的架橋または融合タンパク質、またはタンパク質/抗体のDNAプライマー配列への直接結合を使用して一緒に連結される前に、プライマー(たとえば、ユニバーサルプライマー)とは別に合成または単離することができる。連結方法については、以下で詳しく説明する。

#### 【0029】

例示的なDNAまたはRNA結合プローブは、特定のDNAまたはRNA配列を標的とするためのDNAまたはRNAプローブを含んでもよい。ジンクフィンガードメイン、TALエフェクター、または他の配列特異的結合タンパク質を改変し、ユニバーサルアダプターまたはプライマーに連結して、特定のDNAまたはRNA配列を標的とするプローブ依存性プライマーまたはアダプターを作成することができる。メチルCpG結合ドメイン(MBD)または抗体(メチル化DNA免疫沈降で使用される)は、メチル化配列を標的とするアダプターまたはプライマーに連結することができる。本系および方法で使用するために、標的特定のプローブは、組込みされたタグの所望の部分またはゲノムDNA配列に隣接する切断点に優先的に結合する必要があるだけである。特定の実施形態では、タグは、特定のプローブを使用して標的化可能な特徴(たとえば、メチル化された配列)を含んでもよい。

#### 【0030】

プローブ依存性プライマーは、ユニバーサルプライマーと標的特定のプローブをリンク修飾で連結することで作成することができる。プローブは、リンク修飾で直接合成することができる。アレイ合成プローブのようにこれが不可能な場合は、PCRによってリンカー修飾を添加することができる。プローブは、カラムベースの合成で大量に作成するのではなく、シリコンチップ上でアレイに合成してから増幅することができる。標的配列決定およびユニバーサルプライミング部位を含むアレイベースのプローブは、リンク修飾を含むユニバーサルプライマーによって増幅することができる。アレイベースのオリゴは、たとえば合成後のPCRによって5'リンカー修飾を加えることにより、連結された標的捕捉プローブに変換することができる。3'ブロッカーは、擦り切れたプライマーの末端に置換することができる。増幅後、修飾されたプローブをユニバーサルプライマーに連結させ、プローブ依存性プライマーとして使用することができる。

#### 【0031】

特定の実施形態では、結合分子は、ストレプトアビジン分子であってもよく、そして連結される断片は、ビオチン化核酸を含んでもよい。連結されたプライマーが増幅によって連結された核酸断片を作成するために使用される実施形態では、プライマーはビオチン化され、ストレプトアビジン分子と一緒に結合されてもよい。たとえば、4つの断片を四量体ストレプトアビジンで結合することができる。たとえば、コンカテマーの形成により、4つ以上の分子が結合する可能性がある。本発明の特定の方法では、2つ以上の核酸断

10

20

30

40

50

片は、クリック化学反応を介して連結することができる。何章によって本明細書に組み込まれる Kolb, et al, Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions, Angew Chem Int Ed Engl. 2001 Jun 1; 40(11): 2004 - 2021を参照されたい。

#### 【0032】

たとえば、結合分子、およびいくつかの既知のナノ粒子は、単一の結合分子内の数百または数千の断片を含む多数の断片および/またはDNA結合タンパク質を連結することができる。結合ナノ粒子の一例は、それらの表面上にチオールでキャップされた合成DNA配列で修飾されたコロイド金を含む多価DNA金ナノ粒子であってもよい。参照により本明細書に組み込まれる、Mirkin, et al, 1996, A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials, Nature, 382: 607 - 609を参照されたい。表面DNA配列は、所望のテンプレート分子配列に相補的であってもよく、またはユニバーサルプライマーを含んでもよい。

10

#### 【0033】

結合分子はまた、核酸断片を分離するのに役立ち得る。好ましい実施形態では、断片は、それらの間の結合を防ぐように配向されている。リンカーが断片の空間的な分離および配向を制御することで、断片間の折りたたみおよび結合を回避および防止することができる。

20

#### 【0034】

一部の実施形態では、リンカーは、ポリエチレングリコール(PEG)または修飾されたPEGであってもよく、たとえばDBCO-PEG4またはPEG-11等の修飾PEGを使用して、2つのアダプターまたは核酸を結合することができる。別の例では、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)修飾PEGを使用して2つのアダプターを結合する。たとえば、Schlingman, et al, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 83 (2011) 91 - 95を参照されたい。任意のオリゴヌクレオチドまたは他の分子を使用して、アダプターまたは核酸を結合することができる。

#### 【0035】

一部の実施形態において、アダプターは、2つのプローブを結合するために使用される。アダプターは、プライマー、タンパク質、または核酸等の様々な分子標的に結合するように設計することができる。アダプターは、SELEX(指数関数的濃縮によるリガンドの系統的進化)法によって設計または選択することができる。アダプターは、標的分子に特異的に結合する核酸高分子である。すべての核酸と同様に、特定の核酸リガンド、すなわちアダプターは、通常15~40ヌクレオチド長のヌクレオチド(A、U、T、C、およびG)の線形配列によって記述することができる。一部の好ましい実施形態では、アダプターは、逆塩基(inverted base)または修飾塩基(modified base)を含んでもよい。一部の実施形態では、アダプターまたは修飾されたアダプターは、少なくとも1つの逆塩基または修飾された塩基を含む。

30

40

#### 【0036】

リンカーは、逆塩基で構成されていてもよく、または少なくとも1つの逆塩基を含み得ることを理解されたい。逆塩基または修飾塩基は、任意の営利団体を通じて取得できる。逆塩基または修飾塩基は、開発され、市販されている。逆塩基または修飾塩基は、他の分子に組み込むことができる。たとえば、2-アミノプリンはオリゴヌクレオチドで置換することができる。2-アミノプリンは、DNAの構造およびダイナミクスをモニタリングするためのプローブとして有用な蛍光塩基である。2,6-ジアミノプリン(2-アミノ-dA)は修飾された塩基であり、dTと塩基対を形成すると、3つの水素結合を形成し、短いオリゴのTmを増加させることができる。5-プロモデオキシウリジンは、光反応性のハロゲン化塩基であり、オリゴヌクレオチドに組み込んで、UV光に曝露されるとD

50

NA、RNA、またはタンパク質に架橋することができる。逆塩基または修飾塩基の他の例は、デオキシウリジン(dU)、逆dT、ジデオキシシチジン(ddC)、5-メチルデオキシシチジン、または2'-デオキシイノシン(dI)を含む。鋳型核酸を連結する際に、任意の逆塩基または修飾塩基を使用することができることを理解されたい。

**【0037】**

好ましい実施形態では、リンカーは、2つのプライマーまたは2つの核酸断片を結合するための分子を含む。リンカーは、単一の分子であっても、複数の分子であってもよい。リンカーは、いくつかの逆塩基または修飾塩基、あるいは完全に逆塩基または修飾塩基を含んでもよい。リンカーは、ワトソクリック塩基および逆塩基または修飾塩基の両方を含んでもよい。

10

**【0038】**

本発明では、任意のスペーサー分子または結合分子を使用することができることを理解されたい。一部の実施形態では、リンカーまたはスペーサー分子は、脂質またはオリゴ糖、あるいはオリゴ糖および脂質であってもよい。米国特許5,122,450号を参照されたい。この例では、分子は、好ましくは脂質分子であり、より好ましくは、少なくとも2つの疎水性ポリアルキレン鎖を有するグリセリドまたはホスファチドである。

**【0039】**

リンカーは、任意の数のアダプター、プライマー、および断片のコピーで構成されていてもよい。リンカーは、2つの同一のアームを含む場合があり、ここで各アームは、結合分子、増幅プライマー、シーケンシングプライマー、アダプター、および断片で構成されている。リンカーは、3つまたは4つのアームなど、任意の数のアームを連結することができる。本発明の一部の態様では、核酸鋳型は、スペーサー分子によって連結されていることを理解されたい。本発明におけるリンカーは、2つの断片またはプライマーを結合するための任意の分子または方法であってもよい。一部の実施形態では、ポリエチレングリコール、またはDBC0-PEG4またはPEG-11等の修飾PEGが使用される。一部の実施形態では、リンカーは脂質または炭化水素である。一部の実施形態では、タンパク質は、アダプターまたは核酸に結合することができる。一部の実施形態では、オリゴ糖は、プライマーまたは核酸を連結する。一部の実施形態では、アダプターは、プライマーまたは核酸を連結する。断片が連結されると、コピーは同相になるように配向され、その間の結合を防ぐ。

20

30

**【0040】**

特定の実施形態では、リンカーは、抗体であってもよい。抗体は、単量体、二量体または五量体であってもよい。2つのプライマーまたは核酸を結合するための任意の抗体を使用することができることを理解されたい。たとえば、ヌクレオシドは、タンパク質に結合することによって免疫原性にするのが当技術分野で知られている。Void, BS(1979), Nucl Acids Res 7, 193-204を参照されたい。さらに、修飾された核酸に結合するように抗体を調製することができる。Biochemical Education, Vol. 12, Issue 3を参照されたい。

**【0041】**

リンカーは、増幅中に複合体に付着したままになる場合がある。一部の実施形態では、リンカーは、増幅の前に除去される。一部の実施形態では、リンカーは、結合分子に結合され、次いで、結合分子は、増幅プライマーに結合される。リンカーが除去されると、結合分子または結合プライマーが露出する。露出した結合分子も固体支持体に付着し、アーチが形成される。リンカーは、溶媒での洗浄、熱の適用、pHの変更、洗剤または界面活性剤での洗浄などを含む、当技術分野での任意の既知の方法によって除去することができる。

40

**【0042】**

本発明の方法は、二本鎖分子を捕捉するために、任意選択でユニバーサルリンクプライマーを使用する、液滴ベースの標的捕捉を含む。米国特許公開第20190106729

50

号に記載されているが、そこに記載され、図 1 および 2 に示されている連結された標的捕捉プローブを使用する液滴ベースの方法。ユニバーサルプライマーおよび任意のバーコード（センス特異的であってもよい）を、抽出された DNA（たとえば、セルフリーの DNA）に連結する。エマルジョンは、二重鎖型分子、および標的的特異的プローブに連結されたユニバーサルプライマーを含む標的捕捉プローブを使用して、上記のように作成される。上記のように、標的捕捉は、標的プローブの結合により局所濃度が高く、捕捉プローブがそれ自体の伸長を阻止されない限り、ユニバーサルプライマーが単独で結合できない温度で行われるが、エマルジョンに含まれるユニバーサルプライマーおよび連結ユニバーサルプライマーを使用して標的核酸を増幅し、標的核酸のセンス鎖およびアンチセンス鎖の両方を含む連結二本鎖分子を生成することができるようなユニバーサルプライミング部位を含む。標的捕捉のみを行うために、ユニバーサルリンカーを省略することができる。次に、エマルジョンを破壊し、連結していない鎖型を酵素的に消化して、連結した二本鎖分子のみを残して、クラスターをシードするか、または上記のように配列決定することができる。

10

#### 【0043】

図 3 A および 3 B は、本発明の液滴ベースの標的捕捉方法の追加の詳細を提供する。図 3 A の工程 0 は、ユニバーサルプライミング部位を有する二重鎖型分子を示し、それに連結された任意のバーコードが、連結されたユニバーサルプライマーおよび標的捕捉プローブを有する液滴にロードされる。鎖型 DNA は液滴内で変性し、標的捕捉プローブは、標的プローブも結合しない限り、ユニバーサルプライマーが単独で結合しない温度で、変性した鎖型鎖に結合する。ユニバーサルプライマーは、次に捕捉された標的にのみ結合する。鎖置換ポリメラーゼによる伸長は、捕捉された標的の上でのみ発生する。次に、図 3 B に移動して、所望の標的捕捉プローブおよびプライマーが消耗するまで、伸長サイクルが実行される（たとえば、4 ~ 6 サイクル）。得られた伸長産物は、ユニバーサルリンクプライマーを使用して増幅され、鎖特異的バーコードを有する連結された二重鎖分子を生成する。溶液ベースの方法と同様に、反対方向にある場合、連結された捕捉プローブ間にギャップは必要ない。連結された捕捉プローブは、ユニバーサルリンカーを省略して標的捕捉のみを行う場合、一方向または両方向で使用することができる。従来のポリメラーゼは、液滴内の鎖置換ポリメラーゼと混合して、方法の様々な伸長および増幅工程を行うことができる。

20

30

#### 【実施例】

#### 【0044】

実施例 1 : C a s 9 細胞株の H I D N - S e q

C a s 9 細胞株を使用して、対照として 1 つの群の細胞にインサートを追加し、所望の挿入切断点を標的とする誘導 RNA とともにインサートを添加した。次に、上記の H I D N - S e q を、両方の細胞群の DNA に対して行った。実験（gRNA + インサート）群の場合、アダプターライゲーション後の PCR 増幅なしで（すなわち、図 9 に示すように、ライゲーションから連結された標的捕捉増幅に直接）、上記のように連結された標的捕捉を待った。実験の概要を図 10 に示す。ここで、S 1 は対照 DNA（gRNA が追加されていない）で行われた H I D N - S e q を表し、S 2 は上記のように連結された標的捕捉を使用した H I D N - S e q を表す。S 3 は、記載したように連結された標的捕捉が伴うが、アダプターライゲーション後の PCR 増幅がない H I D N - S e q を表す。3 つのサンプルすべてについて、約 100 万のクラスターが配列決定された。結果を図 11 および 12 に示す。

40

#### 【0045】

図 11 は、ゼロ、1 つ、または両方の読み取りでタグ配列を含む S 1、S 2、および S 3 クラスターの数および割合を示す。示されているように、各サンプルのクラスターの 99% 以上には、予想されるタグ配列（編集距離 4 以内）の読み取りが少なくとも 1 つ含まれている。これは、本質的に無駄な読み取りがなかったことを意味する。

#### 【0046】

50

図12は、ゲノム内の塩基数およびS1、S2、およびS3群の最小UMIカバー範囲をプロットした、ゲノム全体のUMIカバー範囲を示す。SI（タグのみ）群のカバー範囲ははるかに低く、最大カバー範囲は20未満であった。これは、gRNAがない場合に予想されるように、低い組込み率で発生した切断部位はごくわずかであることを示す。ただし、S2およびS3群は、特定の領域ではるかに高いカバー範囲を示しており、複数の部位での顕著な組込みを示唆している。

【0047】

S2およびS3群のオフターゲット部位の配列決定結果を以下の表に示す。SI（タグのみ）群はgRNAと一致しなかったが、S2およびS3群は上位50のカバー範囲領域のそれぞれでgRNA配列が見出された。それぞれの上位20を表に示す。標的配列には下線を引いている。

【0048】

【表1-1】

### S2

umi カバー範囲	参照配列	gRNAの 編集距離	chr	start	stop
	<u>GTTGGAGCATCTGAGTCCAG</u> (SEQ ID NO: 1)				
1029.7	GATGGAGCAACCGAGTCCAG (SEQ ID NO: 2)	3	chr1	27592693	27592713
972.8	<u>GTTGGAGCATCTGAGTCCAG</u> (SEQ ID NO: 1)	0	chrX	67545904	67545924
930.5	AATGGGGCATCTGAGTCCATG (SEQ ID NO: 3)	4	chr17	14626783	14626804

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

598.7	GTTGGAGAAACTGAGTCCAG (SEQ ID NO: 4)	2	chr20	46362541	46362561
438.3	G-GGGAGTATCTGAGTCCAG (SEQ ID NO: 5)	3	chr10	70535116	70535135
412.1	GTTGGAGCCTCTGAGTCCAG (SEQ ID NO: 6)	1	chr8	70014903	70014923
353	GGAGGAACATCTGAGTCCAG (SEQ ID NO: 7)	3	chr6	111617768	111617788
379.5	GGAGGAGCACCTGAGTCCAG (SEQ ID NO: 8)	3	chr12	122113358	122113378
336.3	GATGGTGCATCTGACTCCAG (SEQ ID NO: 9)	3	chr19	39394098	39394118
319.3	ATTGGAGCCTCTGAGTCCAG (SEQ ID NO: 10)	2	chr7	22126335	22126355
296.6	GTGTGGAGTATCCGAGTCCAG (SEQ ID NO: 11)	3	chr18	26782002	26782023
279	GATAGGAACATCTGAGACCAG (SEQ ID NO: 12)	4	chr1	195970287	195970308
283.4	GATGGAGCTTCTGAGTCCTG (SEQ ID NO: 13)	3	chr15	32101673	32101693
277.2	GAAGGATCATCTGAGTCCAG (SEQ ID NO: 14)	3	chr7	155641561	155641581
221.3	GGTGAAGAGCATCTGGAGTCCAG (SEQ ID NO: 15)	4	chr6	110986338	110986361
249.8	GTAGGAGTATCTGAGTCCAG (SEQ ID NO: 16)	2	chr4	33488669	33488689
184.8	GCTGGAGAAACTGAGTCCAG (SEQ ID NO: 17)	3	chr10	116741326	116741346
163.3	CCTGGAGC-TCAGAGTCCAG (SEQ ID NO: 18)	4	chr17	41631352	41631371
139.8	GTTGGATCATCTGAGTTCAG (SEQ ID NO: 19)	2	chr2	99538778	99538798
127.6	GTTGAACCATCTGAGTCCAG (SEQ ID NO: 20)	2	chr10	69736220	69736240

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

S 3

umi カバー範囲	参照配列	gRNAの 編集距離	chr	start	stop
	GTTGGAGCATCTGAGTCCAG (SEQ ID NO: 1)				
1415.4	GATGGAGCAACCGAGTCCAG (SEQ ID NO: 2)	3	chr1	27592693	27592713
1126.7	GTTGGAGCATCTGAGTCCAG (SEQ ID NO: 1)	0	chrX	67545904	67545924
1105.3	AATGGGGCATCTGAGTCCATG (SEQ ID NO: 3)	4	chr17	14626783	14626804
638.3	GTTGGAGAAACTGAGTCCAG (SEQ ID NO: 4)	2	chr20	46362541	46362561
570.7	GGAGGAGCACCTGAGTCCAG (SEQ ID NO: 8)	3	chr12	122113358	122113378
471.7	GTTGGAGCCTCTGAGTCCAG (SEQ ID NO: 6)	1	chr8	70014903	70014923
491.2	G-GGGAGTATCTGAGTCCAG (SEQ ID NO: 5)	3	chr10	70535116	70535135
451	ATTGGAGCCTCTGAGTCCAG (SEQ ID NO: 10)	2	chr7	22126335	22126355
408.1	GAAGGATCATCTGAGTCCAG (SEQ ID NO: 14)	3	chr7	155641561	155641581
378.3	GATGGAGCTTCTGAGTCCTG (SEQ ID NO: 13)	3	chr15	32101673	32101693

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

385.8	GATGGTGCATCTGACTCCAG (SEQ ID NO: 9)	3	chr19	39394098	39394118
352.9	GGAGGAACATCTGAGTCCAG (SEQ ID NO: 7)	3	chr6	111617768	111617788
294.4	GATAGGAACATCTGAGACCAG (SEQ ID NO: 12)	4	chr1	195970287	195970308
289.6	GGTGAAGAGCATCTGGAGTCCAG (SEQ ID NO: 15)	4	chr6	110986338	110986361
281.1	GTGTGGAGTATCCGAGTCCAG (SEQ ID NO: 11)	3	chr18	26782002	26782023
277.8	GTAGGAGTATCTGAGTCCAG (SEQ ID NO: 16)	2	chr4	33488669	33488689
230.7	GTTGGATCATCTGAGTTCAG (SEQ ID NO: 19)	2	chr2	99538778	99538798
238.6	GCTGGAGAACTGAGTCCAG (SEQ ID NO: 17)	3	chr10	116741326	116741346
203.2	CCTGGAGC-TCAGAGTCCAG (SEQ ID NO: 18)	4	chr17	41631352	41631371
167.7	GAAGGATCACCTGAGTCCAG (SEQ ID NO: 21)	4	chr17	16212979	16212999

10

20

## 【0049】

実験で使用した二本鎖タグ配列は次のとおりである：

BG Tag v1 配列 (SEQ ID NO: 22) :

/ 5 Phos / C \* A \* G T G T T T A A T T G A G T T G T C A T A T G T T A A T A  
A C G G T A T C A \* G \* C

BG Tag v1 配列 (逆相補 (reverse compliment), SEQ ID NO: 23) :

/ 5 Phos / G \* C \* T G A T A C C G T T A T T A A C A T A T G A C A A C T C A  
A T T A A A C A C \* T \* G

## 【0050】

フォワードプローブ (Tm = 69.1) 配列 (SEQ ID NO: 24) は以下のとおりであった：

C A + G T + G T T T A + A T T G A G T T G T C A T A T G T T A A T A A C G G

## 【0051】

リバースプローブ (Tm = 69.3) 配列 (SEQ ID NO: 25) は以下のとおりであった：

G + C T + G A T A C C G T T A T T A A C A T A T G A C A A C T C A

## 【0052】

タグ配列は、順方向および逆方向に連結された標的捕捉プローブの結合を可能にするのに十分高い融解温度を有するように選択された。プローブ配列は、タグ配列に対して高い特異性を有して選択されたが、オーバーラップ温度は低くなっている (たとえば、60 未満)。ロックト核酸 (LNA's、LNA塩基の前に「+」で示されている) を使用して

30

40

50

、目的のプロープ融解温度を達成した。

【 0 0 5 3 】

実施例 2 : タグの濃縮

タグ配列を含むゲノム DNA を様々な量でゲノム DNA にスパイクし、タグ特異的プロープを備えたフォワードおよびリバースプロープを使用してサンプルを H I D N - S e q に供した ( 図 5 を参照 ) 。 図 1 3 に示すように、タグ配列を含む配列読み取りの割合は、 $1 E 5$  および  $1 E 6$  の両方のタグスパイクレベルで  $99.8\%$  より大きい。連結された標的捕捉がライゲーションアダプターからのインサート全体を増幅するため、タグの隣接配列が回復した。

【 0 0 5 4 】

参照による組み込み

特許、特許出願、特許刊行物、ジャーナル、本、論文、ウェブコンテンツ等の他の文書の参照および引用が、この開示を通してなされてきた。そのようなすべての文書は、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 0 5 5 】

均等物

本発明は、その趣旨または本質的な特徴から逸脱することなく、他の特定の形態で具体化することができる。したがって、前述の実施形態は、本明細書に記載の本発明を限定するのではなく、すべての点で例示的であると見なされるべきである。

10

20

30

40

50

【 図 面 】  
【 図 1 】

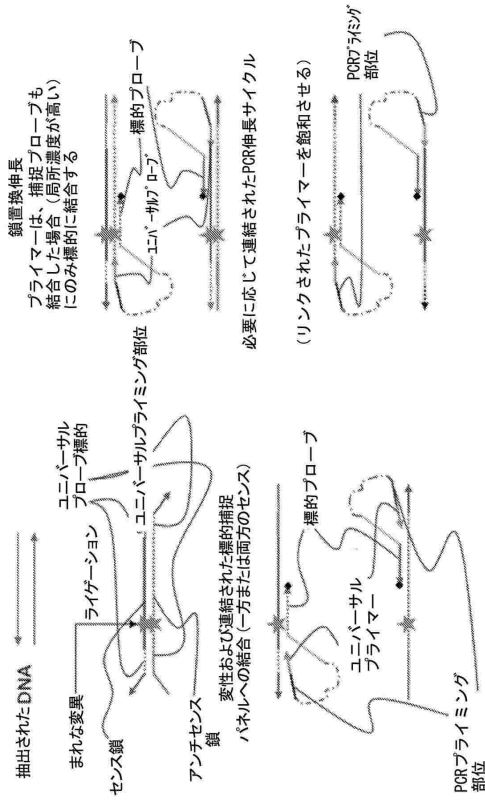
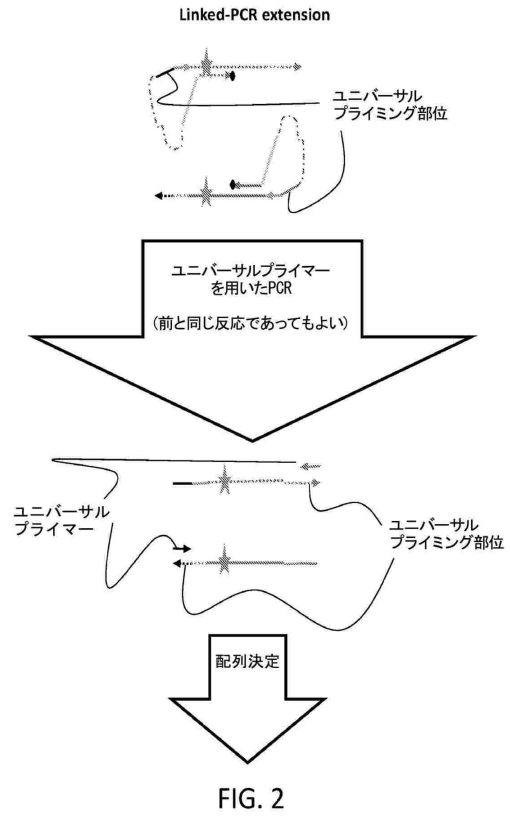


FIG. 1

【 図 2 】



10

20

【 図 3 A 】

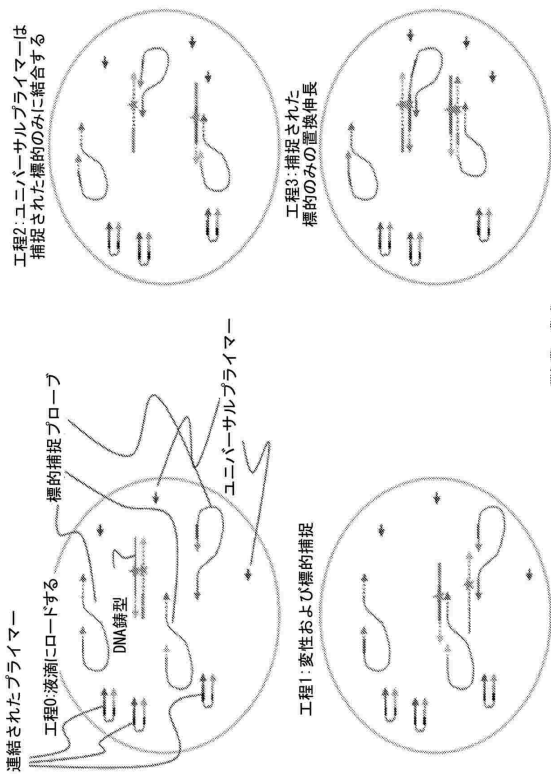


FIG. 3A

【 図 3 B 】

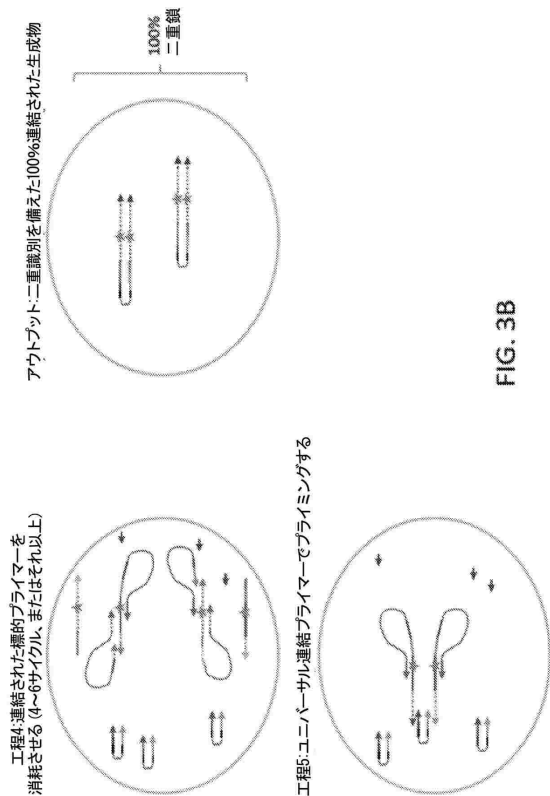


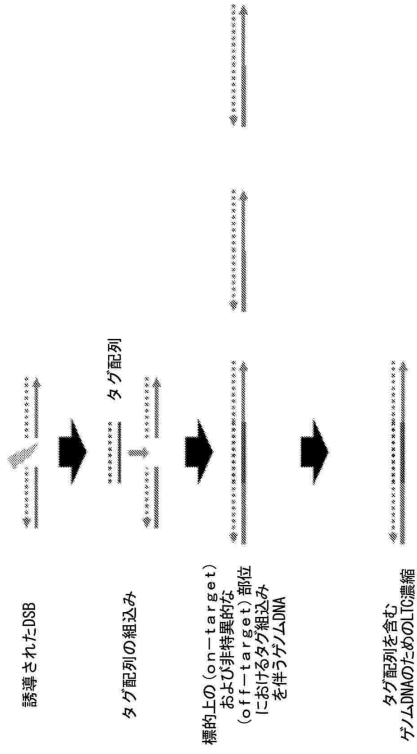
FIG. 3B

30

40

50

【 図 4 】



【 図 5 】

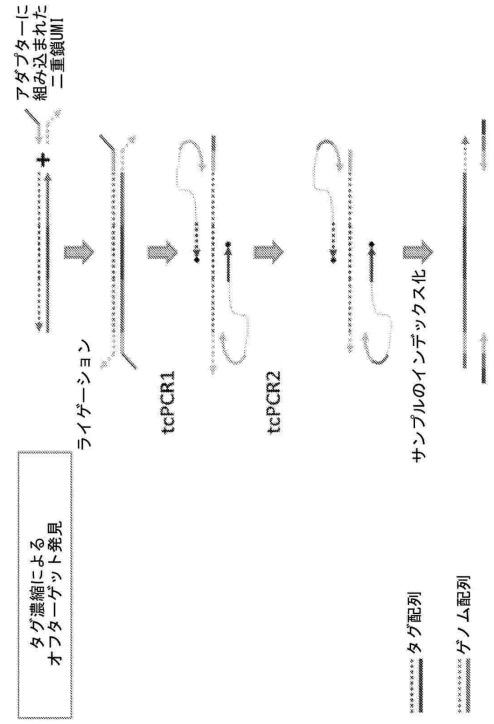


FIG. 4

FIG. 5

【 図 6 】

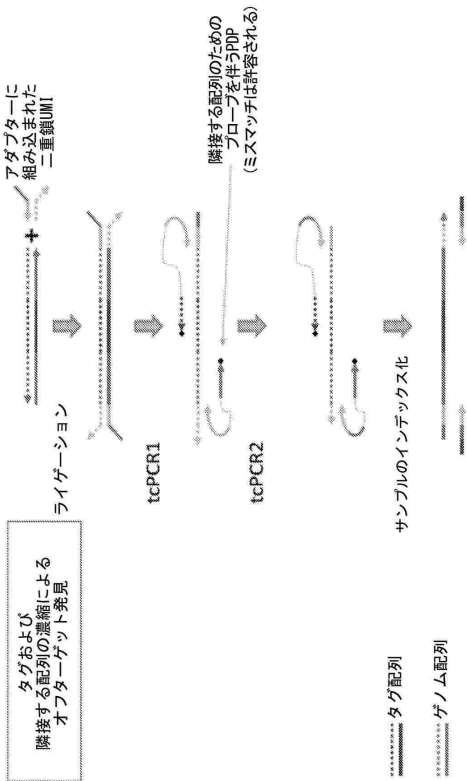


FIG. 6

【 図 7 】

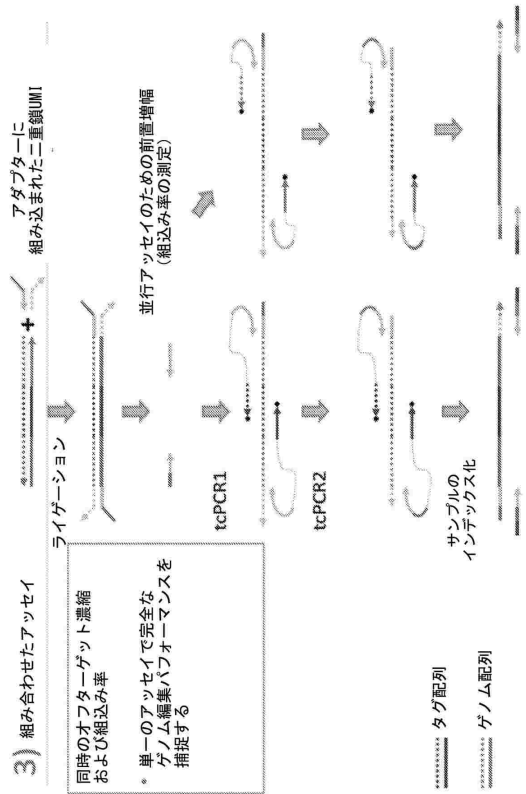


FIG. 7

【 図 8 】

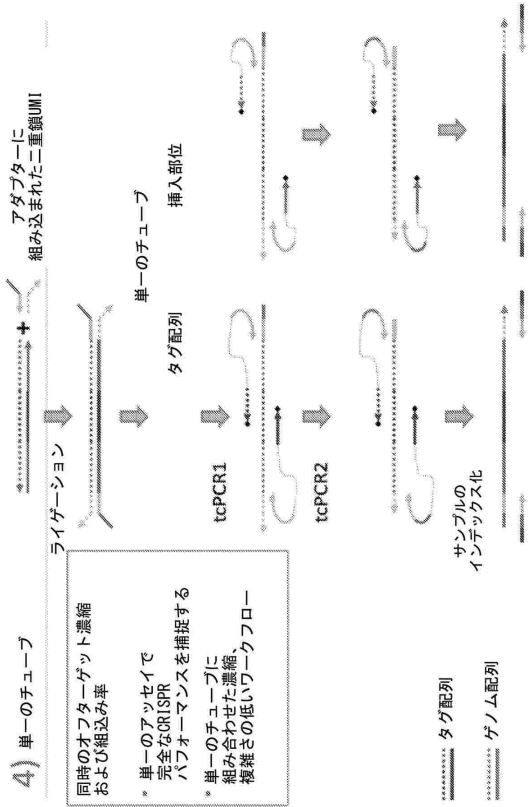


FIG. 8

【 図 9 】

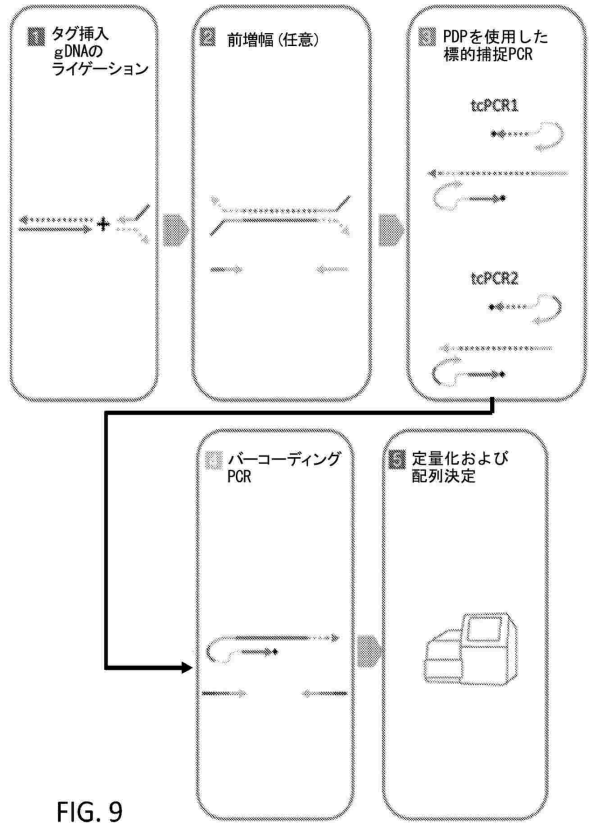


FIG. 9

【 図 10 】

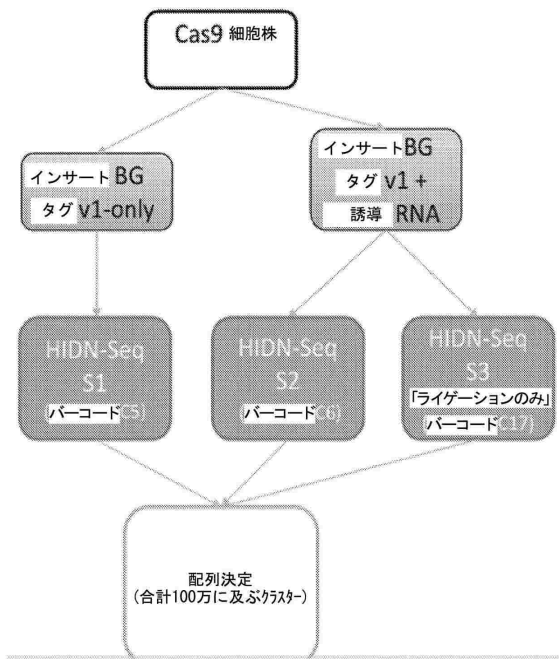


FIG. 10

【 図 11 】

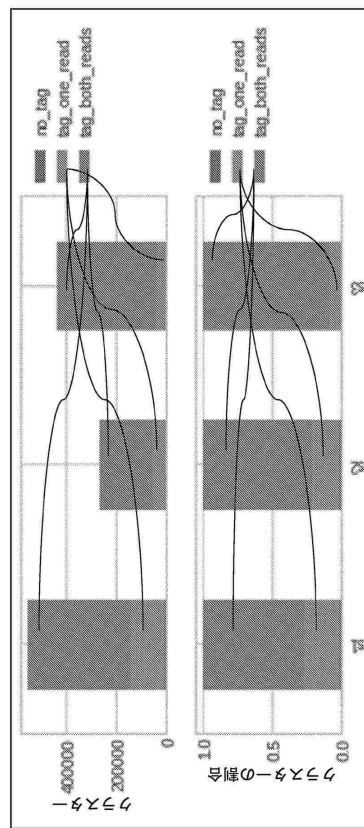


FIG. 11

10

20

30

40

50

【 図 1 2 】

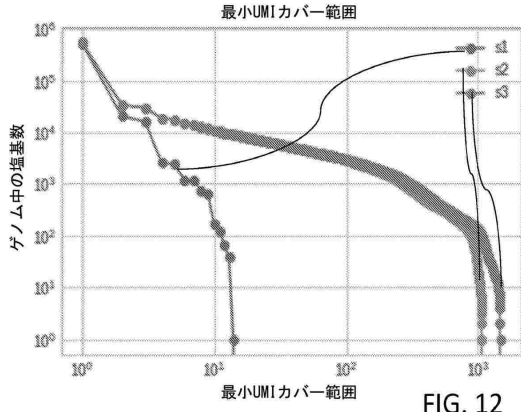


FIG. 12

【 図 1 3 】

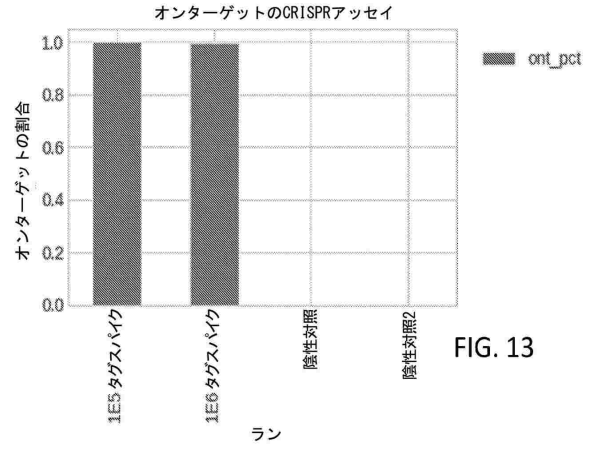


FIG. 13

【 配列表 】

[0007646575000001.app](#)

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

C 1 2 N 15/11 (2006.01)

F I

C 1 2 N 15/11

Z Z N A

(74)代理人 100138210

弁理士 池田 達則

(72)発明者 ジョール ペル

カナダ国, プリティッシュ コロンビア ブイ5エヌ 1エス7, バンクーバー, イースト セブンス  
アベニュー 2282

(72)発明者 アンドレア マルツィアーリ

カナダ国, プリティッシュ コロンビア ブイ7アール 1ジー3, ノース バンクーバー, モント  
ン アベニュー 3254

審査官 上條 のぶよ

(56)参考文献 特表2019-514357(JP, A)

特表2017-519508(JP, A)

国際公開第2018/104908(WO, A2)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 Q 1 / 6 8 - 6 8 9 7

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

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 )