



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的核酸配列をシーケンシングする方法であって、

前記標的核酸配列を、前記標的核酸配列に相補的な部分を有するガイドRNA配列およびCas9タンパク質と接触させることを含み、

前記ガイドRNAおよび前記Cas9タンパク質は、前記標的核酸配列に共局在して複合体を形成し、

前記Cas9タンパク質は、前記標的核酸の鎖にニックを形成するCas9ニッカーゼであり、前記ニックからプライマー伸長が開始されて相補鎖を鋳型として成長鎖が形成されることにより、前記標的核酸がシーケンシングされる

10

前記方法。

【請求項 2】

前記シーケンシングが、前記成長鎖への個々のヌクレオチドの付加を検出することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記ヌクレオチドが、蛍光標識されている、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記ヌクレオチドA、C、G、Tが、それぞれ異なる標識をされており、各塩基付加サイクル中に溶液で供給される、請求項 2 に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記ヌクレオチドが可逆的ターミネーターであり、合成による逐次シーケンシングが行われる、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 6】

前記ヌクレオチドが末端リン酸で標識されており、リアルタイムシーケンシングが行われる、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 7】

前記標的核酸配列が、線状のひも (linear string) として分析される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記標的核酸配列が、実質的に伸展された線状のひもとして分析される、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 9】

前記ニックからのシーケンシングの開始が、標的核酸線状ひも上の複数の部位から開始される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

各核酸上の複数の部位および複数の標的核酸上の複数の部位が並行して分析される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

ゲノムの 1 または複数の領域がシーケンシングされる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記gRNA/Cas9複合体が、ニック形成後に除去される、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 13】

前記核酸が、細胞中で*in situ*で分析される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

前記核酸が細胞中で*in situ*で分析され、前記細胞が分析前に固定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

分析前にRNA分子が除去される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

50

標的核酸配列を検出する方法であって、

前記標的核酸配列を、前記標的核酸配列に相補的な部分を有するガイドRNA配列およびCas9タンパク質と接触させることであって、

ここで、前記ガイドRNAおよび前記Cas9タンパク質は、前記標的核酸配列に共局在して複合体を形成し、

前記ガイドRNAは、3'テール核酸配列を含む、前記接触させること；

検出可能なプローブ配列を前記3'テール配列にハイブリダイズさせること；および
前記検出可能なプローブ配列を検出することにより前記標的核酸配列を検出すること
を含む前記方法。

【請求項17】

10

前記3'テール配列が、プライマーとして働くことができる、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

前記3'テール配列が、前記gRNAの結合位置のすぐ近くの配列に相補的な配列を含む、請求項16に記載の方法。

【請求項19】

前記3'テール配列が、DNA PAINTのためのドッキング部位またはハンドルを含む、請求項16に記載の方法。

【請求項20】

20

標的核酸配列を検出する方法であって、

前記標的核酸配列を、前記標的核酸配列に相補的な部分を有するガイドRNA配列およびCas9タンパク質と接触させることを含み、

前記ガイドRNAおよび前記Cas9タンパク質は、前記標的核酸配列に共局在して複合体を形成し、

前記標的核酸は線状のひもとして分析される

前記方法。

【請求項21】

前記線状のひもが、表面上、フローストリーム（flow stream）中、またはマイクロチャンネルもしくはナノチャンネル中で伸展される、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

30

前記線状のひもが、一方の末端が表面に付着し、且つ第2の末端が光または磁気ピンセット、物理化学的結合、フローストリーム中でのぶら下がり（dangling）を含む牽引力に付着することにより伸展される、請求項20に記載の方法。

【請求項23】

前記核酸に沿った1または複数の複合体の結合位置が検出される、請求項20に記載の方法。

【請求項24】

複数の複合体の結合位置により、単一分子マップの構築が可能になる、請求項20に記載の方法。

【請求項25】

40

前記gRNAが、反復DNAを標的とし、1または複数の反復単位的位置が検出される、請求項20に記載の方法。

【請求項26】

前記gRNAが、DNA上の単一コピー配列を標的とする、請求項20に記載の方法。

【請求項27】

複数のgRNAが、単一ゲノム遺伝子座を標的とする、請求項20に記載の方法。

【請求項28】

（空欄）

【請求項29】

複数の単一コピー遺伝子座が、各々の遺伝子座に特異的なgRNAによって標的化され

50

る、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 30】

ある遺伝子座への結合が、別の遺伝子座への結合と区別可能である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 31】

複数の gRNA が、各々の遺伝子座に結合する、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 32】

前記線状のひもが、クロマチン繊維である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 33】

前記線状のひもが、染色体内で折り畳まれている、請求項 20 に記載の方法。

10

【請求項 34】

前記線状のひもが、染色体内で折り畳まれており、前記染色体が、中期または有糸分裂期の染色体である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 35】

標的核酸配列を検出する方法であって、

前記標的核酸配列を、前記標的核酸配列に相補的な部分を有するガイド RNA 配列および Cas9 タンパク質と接触させることを含み、

前記ガイド RNA および前記 Cas9 タンパク質は、前記標的核酸配列に共局在して複合体を形成し、

前記標的核酸は、ナノポアまたはナノギャップを、特性を変化させるように横切るか、または通過し、

20

前記変化した特性を検出することにより前記複合体の結合を検出することによって前記標的核酸配列を検出する

前記方法。

【請求項 36】

前記核酸に沿った 1 または複数の複合体の結合位置が、イオン電流、電子トンネル、または光学的検出を含む方法によって検出される、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

前記ガイド中の認識配列が比較的短く、前記ガイドの残りの部分が、縮重塩基またはユニバーサル塩基を含み、前記標的核酸に沿った多数の結合部位を可能にしている、請求項 35 に記載の方法。

30

【請求項 38】

複数の複合体の結合位置により、単一分子マップの構築が可能になる、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 39】

標的核酸配列を検出する方法であって、

前記標的核酸配列を、前記標的核酸配列に相補的な部分を有するガイド RNA 配列および Cas9 タンパク質と接触させることを含み、

前記ガイド RNA および前記 Cas9 タンパク質は、前記標的核酸配列に共局在して複合体を形成し、

40

前記複合体を検出することにより前記標的核酸配列を検出する

前記方法。

【請求項 40】

前記ガイド RNA が検出可能な標識を含む、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

前記 Cas9 タンパク質が検出可能な標識を含む、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 42】

前記複合体が検出可能な標識を含む、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 43】

前記複合体がナノポアによって検出される、請求項 39 に記載の方法。

50

【請求項 4 4】

前記複合体が電子顕微鏡によって検出される、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記複合体が走査型プローブ顕微鏡によって検出される、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記複合体がカンチレバーによって検出される、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記複合体が水晶発振子マイクロバランスによって検出される、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記複合体が電界効果トランジスタによって検出される、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記ガイドRNAが、プローブ配列に相補的な3'テール配列を含む、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記ガイドRNAが、検出可能な標識を含むプローブ配列に相補的な3'テール配列を含み、前記プローブ配列が前記3'テール配列に結合される、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記ガイドRNAが、複数の検出可能な標識を含むプローブ配列に相補的な3'テール配列を含み、前記プローブ配列が前記3'テール配列に結合される、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記ガイドRNAが、検出可能な標識を含むプローブ配列に相補的な3'テール配列を含み、前記プローブ配列が前記3'テール配列に結合され、前記プローブ配列が増幅される、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記ガイドRNAが、プローブまたは検出可能な標識に対する結合対として3'テール配列を含む、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記標的核酸が二本鎖ゲノムDNAである、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記標的核酸が染色体DNAである、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記標的核酸が、基板上で伸長される、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記標的核酸が、平面状の表面上で伸長される、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記標的核酸が、ポア内で伸長される、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記標的核酸が、チャンネル内で伸長される、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記Cas9タンパク質が、野生型Cas9、cas9ニッカーゼ、またはヌクレアーゼ欠損Cas9である、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 6 1】

検出可能な標識が、前記Cas9タンパク質に直接または間接的に結合されている、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 6 2】

検出可能な標識が、前記ガイドRNAに直接または間接的に結合されている、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 6 3】

10

20

30

40

50

検出可能な標識を、前記複合体に直接または間接的に結合させる、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 64】

前記 Cas9 タンパク質が、前記標的核酸の鎖にニックを形成する Cas9 ニッカーゼであり、前記ニックから相補鎖を鋳型としてプライマー伸長が開始されることにより前記標的核酸がシーケンシングされる、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 65】

前記 Cas9 タンパク質が、前記標的核酸の鎖にニックを形成する Cas9 ニッカーゼであり、前記ニックから前記相補鎖を鋳型としてプライマー伸長が開始されて検出可能な標識が取り込まれることにより前記標的核酸が検出される、請求項 39 に記載の方法。

10

【請求項 66】

前記ガイド RNA および前記 Cas9 タンパク質が組み合わせられた後に、前記標的核酸と接触させられる、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 67】

前記ガイド RNA および前記 Cas9 タンパク質が組み合わせられた後に、試料内の前記標的核酸と接触させられる、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 68】

前記ガイド RNA が、シード領域配列を含む、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 69】

ガイド RNA が、前記ガイド RNA の非シード領域に、縮重位置もしくは縮重配列またはユニバーサル塩基を含む、請求項 39 に記載の方法。

20

【請求項 70】

前記標的核酸配列を、前記標的核酸配列に相補的な部分を各々有する複数のガイド RNA 配列と接触させることを含む、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 71】

前記標的核酸が溶液試料内にある、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 72】

前記標的核酸が基板上に存在する、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 73】

前記標的核酸が基板に結合している、請求項 39 に記載の方法。

30

【請求項 74】

前記標的核酸が細胞内にある、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 75】

標的核酸配列を検出する方法であって、

前記標的核酸配列を、前記標的核酸配列に相補的な部分を有し且つ 3' プライマー伸長部を有するガイド RNA 配列および Cas9 タンパク質と接触させることであって、

ここで、前記ガイド RNA および前記 Cas9 タンパク質は、前記標的核酸配列に共局在して複合体を形成する、前記接触させること；

前記プライマーを鋳型に沿って伸長させて 1 または複数の検出可能な標識を伸長産物に取り込ませること；および

40

前記 1 または複数の検出可能な標識を検出することにより前記標的核酸配列を検出すること

を含む前記方法。

【請求項 76】

標的核酸配列を検出する方法であって、

前記標的核酸配列を、前記標的核酸配列に相補的な部分を有し且つ 3' プライマー伸長部を有するガイド RNA 配列および Cas9 タンパク質と接触させることであって、

ここで、前記ガイド RNA および前記 Cas9 タンパク質は、前記標的核酸配列に共局在して複合体を形成する、前記接触させること；

前記プライマーをローリングサークル増幅鋳型に沿って伸長させて、複数の検出可能な

50

標識をローリングサークルコンカテマー中に取り込ませること；および

前記複数の検出可能な標識を検出することにより前記標的核酸配列を検出することを含む前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願データ

本願は、2014年8月19日に提出された米国仮特許出願第62/039,341号に基づく優先権を主張するものであり、あらゆる目的のために、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

細菌および古細菌のCRISPR-Casシステムは、Casタンパク質と複合体を形成した短鎖ガイドRNAに依存して、侵入する外来核酸中に存在する相補的配列を分解する。Deltcheva, E. et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 471, 602-607 (2011); Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P. & Siksnys, V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, E2579-2586 (2012); Jinek, M. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816-821 (2012); Sapranas, R. et al. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic acids research* 39, 9275-9282 (2011); およびBhaya, D., Davison, M. & Barrangou, R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annual review of genetics* 45, 273-297 (2011) を参照されたい。近年、*Streptococcus pyogenes* (S. pyogenes) のII型CRISPRシステムのインビトロ再構成により、通常はトランスにコードされるtracrRNA(「トランス活性化型CRISPR RNA」)と融合したcrRNA(「CRISPR RNA」)が、そのcrRNAに一致する標的DNA配列をCas9タンパク質に配列特異的に切断させるのに十分であることが実証された。標的部位に相同なgRNAの発現により、Cas9が動員され、標的DNAが分解される。H. Deveau et al., Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bacteriology* 190, 1390 (Feb, 2008) を参照されたい。CRISPR/Cas9システムの種々の使用が知られている。国際公開第2014/099744号、同第2013176772号、米国特許第8,697,359号、およびSternberg et al., *Nature*, Vol. 507, pp. 62-67 (2014) を参照されたい。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0003】

本開示の態様は、標的核酸配列を検出する方法であって、標的核酸配列を、標的核酸配列に相補的な部分を有するガイドRNA配列およびCas9タンパク質と接触させるステップを含み、ガイドRNAおよびCas9タンパク質が標的核酸配列に共局在して複合体を形成し、複合体を検出することにより標的核酸配列が検出される、方法に関する。ある態様では、方法は、エクスピボ、すなわち、容器内または基板(substrate)上などのインビトロで行われる。ある態様では、ガイドRNAおよびCas9タンパク質は、調製および単離されて本開示のインビトロの方法において試薬として使用される。本方法の態様は、DNAなどの、分析的プロービングまたは調製用のプロービング、検出、標識、マッピング、およびシーケンシングなどの核酸のプロービングを含む。例えば、本開示は、DNAの存在を同定する目的での、例えば単一分子レベルでの、DNAのプロービング方法；DNAをアフィニティー精製する目的でのDNAのプロービング方法；DNAに沿った

10

20

30

40

50

重要な特異的領域を区切る (mark out) ため、またはシーケンシング開始部位を形成するための DNA のマッピング方法に関する。

【0004】

本明細書に記載の方法によれば、ガイド RNA、Cas9 タンパク質などの DNA 結合タンパク質、および二本鎖 DNA 標的配列を含む複合体が形成される。ある態様では、本開示の範囲に含まれる DNA 結合タンパク質は、ガイド RNA と複合体を形成するタンパク質を含み、ガイド RNA は複合体を二本鎖 DNA 配列へとガイドし、ここで複合体は DNA 配列に結合する。本開示のこの態様は、二本鎖 DNA へのまたは二本鎖 DNA との RNA および DNA 結合タンパク質の共局在と呼ばれることもある。このようにして、DNA 結合タンパク質-ガイド RNA 複合体を用いて、特異的標的 DNA 配列で検出可能な複合体を形成させることができ、これにより、標的 DNA 配列の存在が検出される。ある態様では、複合体は、検出可能な標識の存在によって検出され得る。ある態様では、複合体は、直接標識されてもよく、間接的に標識されてもよい。ある態様では、検出可能な標識は、ガイド RNA、Cas9 タンパク質、または複合体上に存在し得る。

【0005】

ある態様では、ガイド RNA の共局在因子は DNA 結合タンパク質でなくてもよい。ガイド RNA と標的核酸配列で共局在させるために試薬を用いてもよい。ある態様では、ガイド RNA は、必ずしも本開示のある態様において有効と考えられる DNA 結合タンパク質の存在を必要としなくてもよい。DNA 結合タンパク質は存在しなくてもよい。例えば、ガイド RNA 自身が標的核酸配列に結合してもよく、ガイド RNA に標識または他の機能的部分が結合していて、標識または他の機能的部分が標的核酸配列またはその近くに局在するようになっていてもよい。

【0006】

ある態様では、複合体は、検出可能な標識を有さず、複合体の構造を検出することにより検出され得る。蛍光的または他の視覚的または分光学的に検出可能な部分の可視化とは対照的に、複合体の物理的構造がプロービングされる。ある態様では、複合体は、検出可能な標識を有さず、複合体の静電荷などの物理化学的特性を検出することによって検出され得る。そのような方法としては、ナノポア検出法、電子顕微鏡、光学顕微鏡、走査型プローブ顕微鏡、原子間力顕微鏡、カンチレバー検出法、水晶発振子検出法、電界効果トランジスター検出法を用いて複合体を検出することが含まれ、これらの方法は全て当業者に公知である。当業者であれば、本開示に基づいて、複合体の構造を検出可能な他の方法を容易に想像することができる。

【0007】

ある態様では、CRISPR-Cas9 システムの文脈における「ガイド RNA」という用語は、当業者に公知であり、標的核酸に相補的な部分、例えば 20 ヌクレオチドの部分を含む。ガイド RNA を設計する方法は当業者に周知である。本明細書に記載の方法は、標的核酸配列を、標的核酸配列に相補的な部分を各々有する複数のガイド RNA 配列と接触させることを含む。本明細書に記載の方法は、複数の標的核酸配列を、対応する標的核酸配列に相補的な部分を各々有する複数の対応するガイド RNA 配列と接触させることを含む。

【0008】

ある態様では、本開示に係るガイド RNA は、標的核酸に相補的な部分と、プローブ配列もしくは検出可能な標識に相補的であるかもしくは相補的であり得るか、またはその他の方法で結合する 3' テール部分または配列とを含む。ある態様では、3' テール部分により特異的機能性が与えられる。3' テール部分は、モジュラーであってよく、同じ機能性または複数の機能性のための複数の配列 (element) を有してよい。ある態様では、3' テール部分は、1 以上または複数のプローブ配列または検出可能な標識に、相補的であり得るか、またはその他の方法で (例えば、アダプター機構を介して) 結合し得る。各プローブ配列または検出可能な標識は別個の役割を果たし得る (例えば、1 つの配列の役割は、CY3 標識オリゴヌクレオチドに結合することであってもよく、第 2 の配列の役割は

、C y 5 標識オリゴヌクレオチドに結合することであってもよい）。例えば、テール配列は、機能性タンパク質を標的核酸配列に局在させるために用いることができる。例えば、テール配列は、ガイドRNAによって置換される標的二本鎖の部分に結合することができる。

【0009】

ある態様では、プローブ配列は1つの検出可能な標識を含み、プローブ配列は3'テール配列に結合する。ある態様では、プローブ配列は複数の検出可能な標識を含み、プローブ配列は3'テール配列に結合する。ある態様では、プローブ配列は検出可能な標識を含み、プローブ配列は3'テール配列に結合し、そこでプローブ配列は増幅される。ある態様では、プローブ配列は3'テール配列に結合し、そこでプローブ配列は増幅される。ある態様では、ガイドRNAは、プローブまたは検出可能な標識に対する結合対として、3'テール配列を含む。ある態様では、テール配列は、鋳型配列に結合した場合、プライマーとして働くことができる。その後、テール配列を伸長して、蛍光ヌクレオチドなどの1または複数の検出可能な標識、または1または複数の標識が直接もしくは間接的に結合可能なビオチン標識ヌクレオチドもしくはdig標識ヌクレオチドなどの1または複数の結合部分を取り込ませる。ある態様では、ローリングサークル増幅を、テールプライマー配列およびローリングサークル増幅鋳型と共に用いて、複数の検出可能な部分または検出可能な部分が結合可能な結合部分を有するローリングサークルコンカテマー産物を作成することができる。このように、ローリングサークル増幅を用いてシグナル強度を増幅することができる。ローリングサークル増幅法は当業者に公知であり、Drmanac et al., Human genome sequencing using unchained base reads on self-assembling DNA nanoarrays, Science, vol. 327, p. 78-81 (2009)を含む。

【0010】

ある態様では、標的核酸は二本鎖核酸である。ある態様では、標的核酸は二本鎖ゲノムDNAである。ある態様では、標的核酸は染色体DNAである。

【0011】

ある態様では、ガイドRNAはシード領域配列を含む。ある態様では、ガイドRNAは、ガイドRNAの非シード領域に、縮重する位置もしくは配列、またはユニバーサル塩基を含む。

【0012】

ある態様では、標的核酸は、平面基板上またはポアもしくはチャネル上などの基板上で伸長される。すなわち、標的核酸はポアまたはチャネル内で伸長される。

【0013】

ある態様では、Cas9タンパク質は、当業者に知られるように、野生型Cas9、Cas9ニックアーゼ、またはヌクレアーゼ欠損(nuclease null)Cas9である。野生型Cas9を単離する方法は当業者に公知である。Cas9ニックアーゼの作製方法は当業者に公知である。ヌクレアーゼ欠損Cas9の作製方法は当業者に公知である。

【0014】

ある態様では、検出可能な標識が、Cas9タンパク質に直接または間接的に結合されている。ある態様では、検出可能な標識が、ガイドRNAに直接または間接的に結合されている。ある態様では、検出可能な標識はガイドRNAの一部である(例えば、ガイドRNAの(例えばインビトロ転写による)作製中に蛍光標識ヌクレオチドが取り込まれる場合。ある態様では、検出可能な標識が複合体に直接または間接的に結合されている。

【0015】

ある態様によれば、シーケンシング法によって標的核酸の配列を決定する方法が提供される。ある態様では、Cas9タンパク質は、標的核酸の鎖にニックを形成するCas9ニックアーゼであり、そこで相補鎖を鋳型としてニックからプライマー伸長または鎖伸長が開始されることにより、標的核酸の鎖の一方などの標的核酸がシーケンシングされる。ニックキングエンドヌクレアーゼおよびDNase 1の使用などのその他のニックングアプローチに対する利点は、ガイドRNAの使用によりニックが形成される位置がプログラム

可能なことであり、複数の特異的位置を標的とすることができる。コンピューターにより実行される方法およびソフトウェアを用いて、合成のための目的のゲノム部分を同定し、gRNAを作製するために必要なDNA鋳型をオーダーし、ガイドRNAをインビトロ転写し、その後、所望の位置でニックを形成して標的シーケンシングを行うことができる。鋳型に沿ったプライマー伸長によるシーケンシング法は当業者に公知である。プライマーとしてのニックの利用は当業者に公知である。さらに、本開示のこの特徴を用いて、伸長産物中に検出可能な標識を含めることにより、例えば標的核酸から配列情報を得る代わりにまたはそれ加えて、標的核酸を検出することができる。したがって、Cas9タンパク質は、標的核酸の鎖にニックを形成するCas9ニッカーゼであり、相補鎖を鋳型としてニックからプライマー伸長が開始されて検出可能な標識が取り込まれることにより、標的核酸が検出される。この態様では、伸長産物に取り込まれた標識が検出されるので、標識が伸長産物に取り込まれると、gRNA/Cas9複合体は標的DNAと共にある必要はない。

10

【0016】

ある態様では、単離されたガイドRNAおよび単離されたCas9タンパク質を好適な条件下で混合した後、インビトロで反応液中または複合体形成媒体中で標的核酸と接触させる。ある態様では、標的核酸は、核酸試料などの試料内にある。核酸試料は複数の核酸を含んでいてもよく、核酸の複合混合物 (complex mixture) と呼ばれ得る。ある態様では、標的核酸に特異的なガイドRNAを用いて核酸の複合混合物中の標的核酸を同定する方法が提供される。ある態様では、1以上または複数の標的核酸に特異的なガイドRNAを用いて核酸の複合混合物中の1以上または複数の標的核酸を同定する方法が提供される。この態様では、複数の標的核酸を検出するためのマルチプレックス法が提供される。複数の標的核酸の各々には、対応するガイドRNA/Cas9タンパク質複合体が結合することができる、それにより、本明細書に記載されているようにまたは当該技術分野で知られるように、検出またはシーケンシングすることができる。

20

【0017】

ある態様では、標的核酸に特異的なガイドRNAを用いて核酸の複合混合物中の標的核酸をアフィニティー精製する方法が提供される。ある態様では、1以上または複数の標的核酸に特異的なガイドRNAを用いて核酸の複合混合物中の1以上または複数の標的核酸をアフィニティー精製する方法が提供される。この態様では、複数の標的核酸をアフィニティー精製するためのマルチプレックス法が提供される。複数の標的核酸の各々に、対応するガイドRNA/Cas9タンパク質複合体が結合し得る。これらの態様では、当業者に公知の結合対を用いたアフィニティーシステムを用いることができる。複合混合物中の他の核酸を枯渇させる (deplete) ことにより標的核酸が精製される。複合混合物から標的核酸を枯渇させることにより標的核酸が精製される。枯渇は、枯渇させる標的のアフィニティー捕捉によって起こり得る。あるいは、枯渇は、枯渇させる標的の切断によって起こり得る。場合によっては、より少量の標的を分析するために、複合混合物中に多量に存在する核酸を混合物から枯渇させる必要があり得る。例えば、反復DNAまたは他の高濃度核酸を試料から枯渇させることが望ましいことがある。

30

【0018】

ある態様では、枯渇の標的となる核酸に特異的なガイドRNAを用いて核酸の複合混合物中の標的核酸を枯渇させる方法が提供される。ある態様では、1以上または複数の標的核酸に特異的なガイドRNAを用いて核酸の複合混合物中の1以上または複数の標的核酸のための方法が提供される。この態様では、複数の標的核酸を枯渇させるためのマルチプレックス法が提供される。複数の枯渇させる標的である核酸の各々に、対応するガイドRNA/Cas9タンパク質複合体が結合し得る。

40

【0019】

ある態様では、標的核酸は溶液試料内にある。ある態様では、標的核酸は基板上に存在する。ある態様では、標的核酸は基板に結合している。ある態様では、標的核酸は細胞内にある。ある態様では、細胞は真核細胞である。ある態様では、細胞は、酵母細胞、植物

50

細胞、または動物細胞である。ある態様では、細胞は哺乳動物細胞である。ある実施形態では、哺乳動物細胞は生細胞であり、Cas9または他のDNA結合タンパク質などのガイドRNAまたはDNA結合タンパク質が、エレクトロポレーション、キャリアを介した送達（例えば、リポフェクチン）、マイクロインジェクション、および当業者に公知の他の方法によって送達される。ある実施形態では、哺乳動物細胞は、Cas9または他のDNA結合タンパク質などの送達されるDNA結合タンパク質、およびガイドRNAを含む溶液に浸した固定細胞である。同様に、gRNAおよびDNA結合タンパク質を用いて標的核酸配列で共局在させる本明細書に記載の方法を中期染色体スプレッドに対して行うことができる。

【0020】

ある態様では、ガイドRNAは約10～約500ヌクレオチドである。ある態様では、ガイドRNAは約20～約100ヌクレオチドである。ある態様では、ガイドRNAはtracrRNA-crRNA融合体である。ある態様では、tracrRNAおよびcrRNAは別個の種であり、融合されている。

【0021】

ある態様では、DNAは、ゲノムDNA、ミトコンドリアDNA、ウイルスDNA、または外来性DNAである。

【0022】

ある態様では、DNA量などによって特徴付けられる2つ以上の異なるポリヌクレオチド種または細胞の混合物を含む試料をプロービングする方法であって、試料中の1または複数のポリヌクレオチド種に相補的な1または複数の配列を選択し、相補的配列を含む1または複数のgRNAを生成し、1または複数のgRNAをCas9と組み合わせ、試料をgRNAおよびCas9に晒し、試料中の1または複数のポリヌクレオチド種と結合したgRNA/Cas9を検出し；検出に基づいて試料のポリヌクレオチド成分または細胞のアイデンティティを決定することによる、方法が提供される。ある態様では、gRNAおよびCas9は、インビトロで生成されるか、インビトロで存在する。ある態様では、gRNAおよびCas9はインビトロで組み合わせられる。ある態様では、gRNAはインビトロで生成されるか、または存在するが、Cas9タンパク質はインビボで生成される。別の態様では、試料は、複数の異なるポリヌクレオチド種を含み、例えば10または100または1000または10,000の異なるポリヌクレオチド種の複合混合物で存在し得る。

【0023】

その他の応用例としては、ガイドRNAおよびCas9を用いることを含む、標的生物のアイデンティティを評価する方法；ガイドRNAおよびCas9を用いることを含む、標的生物の状態を評価する方法；DNA分子に結合したCas9とガイドRNAの複数とを分解（resolve）することを含む、DNA分子をマッピングする方法；またはCas9とガイドRNAの複数の複合体ならびに複数のプローブを用いることを含む、DNA分子中のアレル変異体（variant）を分解する方法が含まれる。これらの具体的応用例のそれぞれは、本明細書に記載のgRNA/Cas9システムを用いて標的DNA部位で複合体を形成させてgRNA/Cas9複合体を検出する、DNAをプロービングする方法に基づく。

【0024】

DNA分子は、染色体または染色体外のものであってよい。Cas9エンドヌクレアーゼは、活性、または不活性、または一部不活性であってよい。Cas9は、蛍光タンパク質（GFP、ルシフェラーゼなど）および／または1もしくは複数のアフィニティータグと融合してよい。アフィニティータグは、1または複数の蛍光プローブによって認識され得る。アフィニティータグは、Cas9に測定可能な属性（例えば、電荷または形状）を付与する1または複数のタグによって認識され得る。Cas9は、1または複数の直交（orthogonal）アミノ酸を含み得る。直交アミノ酸は、プローブ、タグ、リンカーなどの他の分子に対する親和性を付与することができる。

10

20

30

40

50

【0025】

ガイドRNAは、1または複数の蛍光プローブを用いて直接プロービングすることができる。ガイドRNAは、Cas9に測定可能な属性（例えば、電荷または形状）を付与する1または複数のタグによって直接プロービングすることができる。ガイドRNAは、1または複数の修飾された塩基を含み得る。修飾塩基は、プローブ、タグ、リンカーなどの他の分子に対する親和性を付与することができる。

【0026】

生物は、原核生物であっても真核生物であってもよく、単細胞であっても多細胞であってもよい。DNAは生物から抽出される。DNAは天然形態であってもよく、DNAは表面上またはデバイス中で伸展（stretch）されていてもよい。DNAは、チャンネルまたはナノポア中を移動することができる。生物は固定されて、インビトロ合成されたCas9とガイドRNAの複合体に対して透過性にされる。

10

【0027】

ある実施形態では、Cas9およびガイドRNAは、DNAの標的化に用いられる前に複合体化される。ガイドRNAは標的DNAに相補的である。DNAに結合した複合体は、蛍光シグナルを測定することによって検出される。DNAに結合した複合体は、ナノポアセンサー中を移動中またはナノポアもしくはナノギャップセンサーの近くでの電流シグナルを測定することによって検出される。

【0028】

DNA上の1または複数の複合体を一度に検出することができる。DNA上の任意の2つの複合体の分解能（resolution）は、1ナノメートルまたは5ナノメートルまたは10ナノメートルと低くてもよく、1000ミリメートルと大きくてもよい（およびその間の任意の値）。特異的複合体の検出は特異的アレルの存在を示す。DNAに結合した複合体のパターンを作成して、これを用いてDNA分子のマッピングを得ることができる。DNAに結合した複合体のパターンを作成して、これを用いて生物のアイデンティティおよび／または状態を知ることができる。ある態様では、ガイドRNAもしくはCas9またはガイドRNA／Cas9複合体は、生細胞または生育不能（すなわち、死んだ）細胞のいずれかに供給され得る。

20

【0029】

Cas9とガイドRNAの複合体を用いてDNA分子上に配列特異的開始部位を作る方法が提供される。ポリメラーゼまたはリガーゼを用いて単一分子シーケンシングを行うことができる。開始部位は、ゲノム変異体、反復配列、高度可変領域の近位であってもよい。

30

【0030】

Cas9とガイドRNAの複合体を用いてDNA分子をプルダウン、すなわちアフィニティー精製する方法が提供される。プルダウンを可能にするアフィニティータグをCas9とガイドRNAの複合体に結合させる。アフィニティータグは、複合体がDNAに結合する前または後に複合体に結合させる。1または複数のCas9とガイドRNAの複合体に結合した1または複数の特異的標的DNA分子をプールから抽出することができる。抽出された標的DNA分子は、ディープシーケンシングなどのシーケンシングに供することができる。

40

【0031】

ある実施形態では、ガイドRNAは、特定の条件下では、Cas9（または他のDNA結合タンパク質）なしで用いられ、特定の種類の配列に対して標的化された場合、ガイドRNAは、DNA標的への安定なまたは一時的な結合を形成するのに十分である。

【0032】

ある実施形態では、gRNA／Cas9共局在複合体は二本鎖切断をもたらすが、gRNA／Cas9共局在複合体は標的核酸に結合したままである。そのようなgRNA／Cas9共局在は、複合体の解体（break up）を開始させるための7M尿素の添加などの条件を用いて標的核酸から除去されてもよい（その全体を参照により援用するSternberg et

50

al Nature 507:62 (2014) 参照)。

【0033】

いくつかの実施形態では、gRNAとCas9の複合体が、DNAなどの標的核酸配列への結合前に形成される。いくつかの実施形態では、複合体は、Cas9が最初に標的核酸と相互作用した後に形成され、すなわち、Cas9が標的核酸と相互作用し、その後、ガイドRNAとの共局在複合体が形成される。

【0034】

本発明の特定の実施形態のその他の特徴および利点は、以下の実施形態およびそれらの図面の説明において、および特許請求の範囲から、さらに十分に明らかになるであろう。

【0035】

本発明の、前述した特徴およびその他の特徴、ならびに利点は、添付の図面と共に、具体的実施形態についての以下の詳細な説明からより十分に理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1】 標識gRNA/Cas9によってプロービングされた固定マウス細胞の画像を示す図である。

【図2】 図1と同様なCas9プロービングプロトコールに従って、標識オリゴヌクレオチドによってプロービングされた固定マウス細胞の画像を示す図である。

【図3】 gRNA/Cas9切断およびゲルシフトアッセイのアガロースゲルを示す図である。

【図4-1】 gRNAテールをプロービングするための種々の模式図である。

【図4-2】 gRNAテールをプロービングするための種々の模式図である。

【図4-3】 gRNAテールをプロービングするための種々の模式図である。

【図5A】 ラテラルフローアッセイのダイアグラムを示す図である。

【図5B】 ラテラルフローアッセイのダイアグラムを示す図である。

【図5C】 ラテラルフローアッセイのダイアグラムを示す図である。

【図6A】 標識gRNA/Cas9によってプロービングされる伸展DNAの画像を示す図である。

【図6B】 標識gRNA/Cas9によってプロービングされる伸展DNAの画像を示す図である。

【図6C】 標識gRNA/Cas9によってプロービングされる伸展DNAの画像を示す図である。

【図7】 gRNA/Cas9プロービングを用いてゲノム再編成を同定するためのダイアグラムを示す図である。

【図8】 gRNA/Cas9に結合した折り紙バーコードを用いてゲノム領域を同定するためのダイアグラムを示す図である。

【図9】 ニック部位からシーケンシングを開始させるためのダイアグラムを示す図である(配列番号: 1~2)。

【図10】 CHOPCHOPを用いた、Her2を同定するための、gRNA/Cas9標的部位を同定する出力のダイアグラムを示す図である。

【図11】 オリゴヌクレオチドの集合(ensemble)からgRNA鋳型を作製するためのPCRアセンブリー法を示す図である。

【図12】 gRNA/Cas9プロービングを用いてゲノム融合を同定するためのダイアグラムを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0037】

本開示の実施形態は、DNA結合タンパク質およびガイドRNAを使用して標的核酸で共局在または複合体化させた後、複合体に会合または結合した検出可能な部分の検出によって、または複合体自体の物理的プロービングによって標的核酸を検出することに基づく。そのようなDNA結合タンパク質には、種々の目的のためにDNAに結合させるための

10

20

30

40

50

当業者に周知のRNA誘導型DNA結合タンパク質 (RNA-guided DNA binding protein) が含まれる。そのようなDNA結合タンパク質は天然のものであってよい。本開示の範囲に含まれるDNA結合タンパク質としては、本明細書中でガイドRNAと呼ぶRNAによってガイドされ得るものが含まれる。この態様では、ガイドRNAおよびRNA誘導型DNA結合タンパク質はDNAで共局在複合体を形成する。ある態様では、DNA結合タンパク質はヌクレアーゼ欠損DNA結合タンパク質であってよい。この態様では、ヌクレアーゼ欠損DNA結合タンパク質は、ヌクレアーゼ活性を有するDNA結合タンパク質の変更または修飾によって生じ得る。そのようなヌクレアーゼ活性を有するDNA結合タンパク質は当業者に公知であり、例えばII型CRISPRシステム中に存在するCas9タンパク質などのヌクレアーゼ活性を有する天然DNA結合タンパク質が含まれる。そのようなCas9タンパク質およびII型CRISPRシステムは当該技術分野で十分に裏付けられている。その全体が参照により援用される、全ての補足情報を含む、Makarova et al., Nature Reviews, Microbiology, Vol. 9, June 2011, pp. 467-477を、参照されたい。

【0038】

ヌクレアーゼ活性を有する例示的なDNA結合タンパク質は、二本鎖DNAにニックを形成するか、または二本鎖DNAを切断するように機能する。そのようなヌクレアーゼ活性は、ヌクレアーゼ活性を示す1つまたは複数のポリペプチド配列を有するDNA結合タンパク質から生じ得る。そのような例示的なDNA結合タンパク質は、それぞれが二本鎖DNAの特定の鎖を切断すること、またはニックを形成することに関与する、2つの別個のヌクレアーゼドメインを有していてもよい。当業者に知られているヌクレアーゼ活性を有する例示的なポリペプチド配列としては、McrA-HNHヌクレアーゼ関連ドメインおよびRuvC様ヌクレアーゼドメインが挙げられる。したがって、例示的なDNA結合タンパク質は、McrA-HNHヌクレアーゼ関連ドメインおよびRuvC様ヌクレアーゼドメインの1つまたは複数のドメインを含む天然タンパク質である。ある態様によれば、DNA結合タンパク質は、ヌクレアーゼ活性が不活性化されるように変更または修飾されている。そのような変更または修飾には、ヌクレアーゼ活性またはヌクレアーゼドメインを不活性化するような1または複数のアミノ酸の変更が含まれる。そのような修飾としては、ヌクレアーゼ活性を示す1または複数のポリペプチド配列すなわちヌクレアーゼドメインがDNA結合タンパク質に存在しないようにするために、ヌクレアーゼ活性を示す1または複数のポリペプチド配列すなわちヌクレアーゼドメインを除去することが含まれる。本開示に基づいて、当業者は、ヌクレアーゼ活性を不活性化するためのその他の修飾を容易に知ることができるであろう。したがって、ヌクレアーゼ欠損DNA結合タンパク質は、ヌクレアーゼ活性を不活性化するように修飾されたポリペプチド配列を含むか、またはヌクレアーゼ活性を不活性化するような、1もしくは複数のポリペプチド配列の除去を含む。ヌクレアーゼ欠損DNA結合タンパク質は、ヌクレアーゼ活性は不活性化されているものの、DNAに結合する能力は保持している。したがって、DNA結合タンパク質は、DNA結合に必要な1または複数のポリペプチド配列を含むが、ヌクレアーゼ活性を示すヌクレアーゼ配列の1または複数、または全てを欠いていてもよい。したがって、DNA結合タンパク質は、DNA結合に必要な1または複数のポリペプチド配列を含むが、不活性化されたヌクレアーゼ活性を示すヌクレアーゼ配列の1または複数、または全てを有していてもよい。

【0039】

ある態様によれば、2つ以上のヌクレアーゼドメインを有するDNA結合タンパク質は、ヌクレアーゼドメインのうちの1つを除いた全てが不活性化されるように修飾または改変されていてもよい。そのような修飾または改変されたDNA結合タンパク質は、DNA結合タンパク質が二本鎖DNAの一方の鎖のみを切断するか、またはニックを形成するものである限り、DNA結合タンパク質ニックアーゼと呼ばれる。RNAによってDNAまでガイドされる場合、DNA結合タンパク質ニックアーゼはRNA誘導型DNA結合タンパク質ニックアーゼと呼ばれる。したがって、有用なCas9タンパク質は、野生型Cas9、

C a s 9 ニッカーゼ、またはヌクレアーゼ欠損 C a s 9、ならびにそのホモログおよびオルソログであり得る。その全体が参照により援用される Jinek et al., Science 337, 816-821 (2012) を参照されたい。

【0040】

ストレプトコッカス・ピオゲネス (*S. pyogenes*) では、C a s 9 は、タンパク質中の2つの触媒ドメイン、すなわち DNA の相補鎖を切断する HNH ドメインおよび非相補鎖を切断する RuvC 様ドメインが介在するプロセスによって、プロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) の 3 b p 上流に平滑末端二本鎖切断を形成する。その全体が参照により援用される Jinke et al., Science 337, 816-821 (2012) を参照されたい。C a s 9 タンパク質は、Makarova et al., Nature Reviews, Microbiology, Vol. 9, June 2011, pp. 467-477 の補足情報で確認されている以下のものを含む、多数の I I 型 C R I S P R システム中に存在することが知られている。メタノコッカス・マリパルディス (*Methanococcus maripaludis*) C 7 株；コリネバクテリウム・ジフテリアエ (*Corynebacterium diphtheriae*) ；コリネバクテリウム・エフィシエンス (*Corynebacterium efficiens*) Y S - 3 1 4 株；コリネバクテリウム・グルタニカム (*Corynebacterium glutamicum*) A T C C 1 3 0 3 2 K i t a s a t o 株；コリネバクテリウム・グルタニカム A T C C 1 3 0 3 2 B i e l e f e l d 株；コリネバクテリウム・グルタニカム R 株；コリネバクテリウム・クロッペンステッティイ (*Corynebacterium kroppenstedtii*) D S M 4 4 3 8 5 株；マイコバクテリウム・アブセサス (*Mycobacterium abscessus*) A T C C 1 9 9 7 7 株；ノカルディア・ファルシニカ (*Nocardia farcinica*) I F M 1 0 1 5 2 株；ロドコッカス・エリスロポリス (*Rhodococcus erythropolis*) P R 4 株；ロドコッカス・ジョスティイ (*Rhodococcus jostii*) R H A 1 株；ロドコッカス・オパカス (*Rhodococcus opacus*) B 4 u i d 3 6 5 7 3 株；アシドサーマス・セルロリティカス (*Acidothermus cellulolyticus*) 1 1 B 株；アルスロバクター・クロロフェノリカス (*Arthrobacter chlorophenolicus*) A 6 株；クリベラ・フラビダ (*Kribbella flavida*) D S M 1 7 8 3 6 u i d 4 3 4 6 5 株；サーモモノスポラ・カーバタ (*Thermomonospora curvata*) D S M 4 3 1 8 3 株；ビフィドバクテリウム・デンティウム (*Bifidobacterium dentium*) B d 1 株；ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*) D J O 1 0 A 株；スラッキア・ヘリオトリニレデュースェンス (*Slackia heliotrinireducens*) D S M 2 0 4 7 6 株；パーセフォネラ・マリナ (*Persephonella marina*) E X H 1 株；バクテロイデス・フラギリス (*Bacteroides fragilis*) N C T C 9 4 3 4 株；カプノサイトファガ・オクラセア (*Capnocytophaga ochracea*) D S M 7 2 7 1 株；フラボバクテリウム・サイクロフィルム (*Flavobacterium psychrophilum*) J I P 0 2 8 6 株；アッカーマンシア・ムシニフィラ (*Akkermansia muciniphila*) A T C C B A A 8 3 5 株；ロゼイフレクサス・キャストンホルツィイ (*Roseiflexus castenholzii*) D S M 1 3 9 4 1 株；ロゼイフレクサス (*Roseiflexus*) R S 1 株；シネコシスティス (*Synechocystis*) P C C 6 8 0 3 株；エルシミクロビウム・ミストゥム (*Elusimicrobium minutum*) P e i 1 9 1 株；未培養細菌 *Termite group 1 bacterium phylotype Rs D17* ；フィプロバクター・サクシノゲネス (*Fibrobacter succinogenes*) S 8 5 株；バチルス・セレウス (*Bacillus cereus*) A T C C 1 0 9 8 7 株；リステリア・イノキュア (*Listeria innocua*) ；ラクトバチルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*) ；ラクトバチルス・ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*) G G 株；ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*) U C C 1 1 8 株；ストレプトコッカス・アガラクティアエ (*Streptococcus agalactiae*) A 9 0 9 株；ストレプトコッカス・アガラクティアエ N E M 3 1 6 株；ストレプトコッカス・アガラクティアエ 2 6 0 3 株；ストレプトコッカス・ディスガテクティアエ亜種エクイシミリス (*Streptococcus dysgalactiae equisimilis*) G G S 1 2 4 株；ストレプトコッカス・エクイ亜種ズーエピデミカス (*Streptococcus equi zooepidemicus*) M G C S 1 0 5 6 5 株；ストレプトコッカス・ガロリティカス (*Streptococcus gallolyticus*) U C N 3 4 u i d 4 6 0 6 1 株；ストレプトコッカス・ゴルドニイ (*Streptococcus gordonii*) チャリス (*Challis*) 株 C H 1 亜株；ストレプトコッカ

ス・ミュータンス (*Streptococcus mutans*) NN 2 0 2 5 u i d 4 6 3 5 3 株; ストレプトコッカス・ミュータンス; ストレプトコッカス・ピオゲネス (*Streptococcus pyogenes*) M 1 G A S 株; ストレプトコッカス・ピオゲネス M G A S 5 0 0 5 株; ストレプトコッカス・ピオゲネス M G A S 2 0 9 6 株; ストレプトコッカス・ピオゲネス M G A S 9 4 2 9 株; ストレプトコッカス・ピオゲネス M G A S 1 0 2 7 0 株; ストレプトコッカス・ピオゲネス M G A S 6 1 8 0 株; ストレプトコッカス・ピオゲネス M G A S 3 1 5 株; ストレプトコッカス・ピオゲネス S S I - 1 株; ストレプトコッカス・ピオゲネス M G A S 1 0 7 5 0 株; ストレプトコッカス・ピオゲネス N Z 1 3 1 株; ストレプトコッカス・サーモフィラス (*Streptococcus thermophiles*) C N R Z 1 0 6 6 株; ストレプトコッカス・サーモフィラス L M D - 9 株; ストレプトコッカス・サーモフィラス L M G 1 8 3 1 1 株; クロストリジウム・ボツリヌム (*Clostridium botulinum*) A 3 L o c h M a r e e 株; クロストリジウム・ボツリヌム B E k l u n d 1 7 B 株; クロストリジウム・ボツリヌム B a 4 6 5 7 株; クロストリジウム・ボツリヌム F L a n g e l l a n d 株; クロストリジウム・セルロリチカム (*Clostridium cellulolyticum*) H 1 0 株; フィネゴルディア・マグナ (*Finegoldia magna*) A T C C 2 9 3 2 8 株; ユウバクテリウム・レクターレ (*Eubacterium rectale*) A T C C 3 3 6 5 6 株; マイコプラズマ・ガリセプティカム (*Mycoplasma gallisepticum*); マイコプラズマ・モービレ (*Mycoplasma mobile*) 1 6 3 K 株; マイコプラズマ・ペネトランス (*Mycoplasma penetrans*); マイコプラズマ・シノビアエ (*Mycoplasma synoviae*) 5 3 株; ストレプトバチルス・モニリフォルミス (*Streptobacillus moniliformis*) D S M 1 2 1 1 2 株; ブラジリゾビウム (*Bradyrhizobium*) B T A i 1 株; ニトロバクター・ハンブルゲンシス (*Nitrobacter hamburgensis*) X 1 4 株; ロドシュードモナス・パルストリス (*Rhodopseudomonas palustris*) B i s B 1 8 ; ロドシュードモナス・パルストリス B i s B 5 株; パルビバクラム・ラバメンティボランス (*Parvibaculum lavamentivorans*) D S - 1 株; ディノロセオバクター・シバエ (*Dinoroseobacter shibae*) D F L 1 2 株; グルコンアセトバクター・ジアゾトロフィクス (*Gluconacetobacter diazotrophicus*) P a l 5 F A P E R J 株; グルコンアセトバクター・ジアゾトロフィクス P a l 5 J G I 株; アゾスピリillum (*Azospirillum*) B 5 1 0 u i d 4 6 0 8 5 株; ロドスピリillum・ルブラム (*Rhodospirillum rubrum*) A T C C 1 1 1 7 0 株; ディアフォロバクター (*Diaphorobacter*) T P S Y u i d 2 9 9 7 5 株; フェルミネフォロバクター・エイセニアエ (*Verminephrobacter eiseniae*) E F 0 1 - 2 株; ナイセリア・メニンジティディス (*Neisseria meningitidis*) 0 5 3 4 4 2 株; ナイセリア・メニンジティディス a l p h a 1 4 ; ナイセリア・メニンジティディス Z 2 4 9 1 株; デスルホビブリオ・サレキシゲンス (*Desulfovibrio salexigens*) D S M 2 6 3 8 株; キャンピロバクター・ジェジュニ亜種ドイレイ (*Campylobacter jejuni doylei*) 2 6 9 9 7 株; キャンピロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*) 8 1 1 1 6 株; キャンピロバクター・ジェジュニ; キャンピロバクター・ラリ (*Campylobacter lari*) R M 2 1 0 0 株; ヘリコバクター・ヘパティカス (*Helicobacter hepaticus*); ウォリネラ・サクシノゲネス (*Wolinella succinogenes*); トルモナス・アウエンシス (*Tolomonas auensis*) D S M 9 1 8 7 株; シューダルテロモナス・アトランティカ (*Pseudoalteromonas atlantica*) T 6 c 株; シューワネラ・ペアレアナ (*Shewanella pealeana*) A T C C 7 0 0 3 4 5 株; レジオネラ・ニューモフィラ (*Legionella pneumophila*) P a r i s 株; アクチノバチルス・サクシノゲネス (*Actinobacillus succinogenes*) 1 3 0 Z 株; パスツレラ・ムルトシダ (*Pasteurella multocida*); フランシセラ・ツラレンシス亜種ノビシダ (*Francisella tularensis novicida*) U 1 1 2 株; フランシセラ・ツラレンシス亜種ハラークティカ (*Francisella tularensis holarctica*); フランシセラ・ツラレンシス F S C 1 9 8 株; フランシセラ・ツラレンシス亜種ツラレンシス (*Francisella tularensis tularensis*); フランシセラ・ツラレンシス W Y 9 6 - 3 4 1 8 株; およびトレポネマ・デンティコラ (*Treponema denticola*) A T C C 3 5 4 0 5 株。したがって、本開示の態様は、本明細書に記載のようにヌクレアーゼ欠損、またはニックアーゼにした、I I 型 C R I S P R シス

テム中に存在するC a s 9タンパク質に関する。

【0041】

C a s 9タンパク質は、文献中で当業者にC s n 1と呼ばれることもある。ストレプトコッカス・ピオゲネス (S. pyogenes) のC a s 9タンパク質配列を以下に示す。その全体が参照により援用されるDeltcheva et al., Nature 471, 602-607 (2011)を参照されたい。

【0042】

【化1】

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAE
ATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFG
NIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRILIYLAHAMIKFRGHFLIEGDLNPDNSD
VDKLFQILVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGN
LIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDDLNDLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAI
LLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYA
GYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELH
AILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEE
VVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSLLEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFL
SGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKI
IKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWG
RLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFQMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSL
HEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDLVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRER
MKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDH
IVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNL
TKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKS
KLVSDFRKDFQFYKVINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVR
K
MIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDF
ATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVA
YSVLVVAKEVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEKPNIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPK
YSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLGSPEDNEQKQLFVE
QHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKHDKPIREQAENIIHLFTLTNLGA
PAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQ SITGLYETRIDLSQLGGD-

10

20

30

40

50

【0043】

標的核酸としては、本明細書に記載されるような共局在複合体が検出に有用となり得る任意の核酸配列が挙げられる。標的核酸としては遺伝子が挙げられる。標的核酸は、単一細胞から抽出されたDNA内であってもよい。標的核酸は、単一染色体から抽出されたDNAであってもよい。本開示の目的のために、二本鎖DNAなどのDNAは標的核酸を含んでいてもよく、共局在複合体は、その標的核酸においてまたはその標的核酸に隣接して、またはその標的核酸の近傍で、標的核酸を検出するように、DNAに結合するか、またはDNAと共局在することができる。そのような標的核酸は、内在性（または天然）の核酸および外来性（または外来）核酸を含んでいてもよい。そのような標的核酸は、核酸の混合物であってもよい。そのような標的核酸は、基板に結合していてもよい。そのような標的核酸は、当業者に公知の方法を用いて伸長または伸展されていてもよい。DNAを伸展させる方法は、KH Rasmussen, R Marie, JM Lange, WE Svendsen, A Kristensen, and KU Mir, Lab Chip, 2011, 11:1431-44, and A device for extraction, manipulation and stretching of DNA from single human chromosomes; DLV Bauer, R Marie, KH Rasmussen, A Kristensen, KU Mir, 2012 Nucl Acids Res, 2012, 1-7, DNA catenation maintains structure of human metaphase chromosomesに記載されている。

【0044】

検出可能な標識または部分は当業者に公知である。本明細書において、「検出可能な標識」という用語は、標的核酸の同定に用いることができる標識を指す。検出可能な標識は、当業者に公知の方法を用いてgRNAまたはCas9タンパク質に結合させる。あるいは、gRNAまたはCas9タンパク質が結合対の半分を含み、対応する結合対のもう半分が検出可能な標識に結合していてもよい。このように、標識を、結合対の結合により、gRNAまたはCas9タンパク質に間接的に結合させることができる。好適な結合対または結合力は、当業者に公知であり、相補的核酸配列、ビオチン-アビジン、ビオチン-ストレプトアビジン、NH₂-エステルなど、チオエーテル結合、静電荷相互作用、ファンデルワールス力など（例えば、Holtke et al., 米国特許第5,344,757号；同第5,702,888号；および同第5,354,657号；Huber et al., 米国特許第5,198,537号；Miyoshi, 米国特許第4,849,336号；Misiura and Gait, 国際公開第91/17160号参照）を含む。ビオチン、またはその誘導体を、オリゴヌクレオチド標識として（例えば、標的化部分、回収可能部分（retrievable moiety）、および／または検出可能な標識として）用い、その後、（例えば、検出可能に標識された）アビジン／ストレプトアビジン誘導体（例えば、フィコエリトリン結合ストレプトアビジン）または抗ビオチン抗体（例えば、検出可能に標識された抗体）を結合させてよい。ジゴキシゲニンを標識として取り込ませて、その後、検出可能に標識された抗ジゴキシゲニン抗体（例えば、検出可能に標識された抗体、例えば蛍光標識された抗ジゴキシゲニン）を結合させてよい。アミノアリル-dUTP残基をオリゴヌクレオチド中に取り込ませて、その後、N-ヒドロキシスクシンイミド（NH₂S）誘導体化蛍光色素にカップリングさせてもよい。一般的に、検出可能に標識されたコンジュゲートパートナーを結合させて検出可能にする限りにおいて、コンジュゲート対の任意のメンバーを回収可能部分および／または検出可能な標識に取り込ませてよい。本明細書において、抗体という用語は、任意のクラスの抗体分子またはその任意の細断片、例えばFabを指す。

【0045】

検出可能な標識のサイズおよび組成は大きく異なってもよい：以下の参照文献は具体的な実施形態に適切なオリゴヌクレオチドタグを選択するためのガイダンスを提供する：Brenner、米国特許第5,635,400号；Brenner et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 97: 1665；Shoemaker et al. (1996) Nature Genetics, 14:450；Morris et al., 欧州特許出願公開第0799897（A1）号；Wallace、米国特許第5,981,179など。

【0046】

検出可能な標識を核酸プローブ中に取り込ませる方法は周知である。通常は、例えばP

C Rによる重合または増幅ステップ、ニックトランスレーション、ランダムプライマー標識、末端トランスフェラーゼターリング（例えば、1または複数の標識を、プライマー配列の切断後に加えることができる）、およびその他の最中に、検出可能な標識を（例えば、ハプテン結合デオキシリボヌクレオチドまたは蛍光色素結合デオキシリボヌクレオチドとして）核酸プローブなどの核酸に取り込ませる（Ausubel et al., 1997, Current Protocols In Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York参照）。

【0047】

本明細書に記載されているように検出可能な部分、標識、またはレポーターを用いて標的核酸を検出することができる。ガイドRNAまたはCas9タンパク質を、蛍光部分、ハプテン、発色部分などの検出可能な部分の直接または間接的な結合などの種々の方法で標識することができる。標識が結合され得る位置は、本明細書中で、標識付加部位または検出可能部分の付加部分と呼ばれ、標識を結合可能なヌクレオチドを含んでいてもよい。当業者は、核酸またはタンパク質の標識化に関する参照文献を参考にすることができる。検出可能な部分の例としては、種々の放射活性部分、酵素、補欠分子族、蛍光マーカー、発光マーカー、生物発光マーカー、金属粒子、タンパク質-タンパク質結合対、タンパク質-抗体結合対などが含まれる。蛍光部分の例としては、黄色蛍光タンパク質（YFP）、緑色蛍光タンパク質（GFP）、シアン蛍光タンパク質（CFP）、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、シアニン、塩化ダンシル、フィコシアニン、フィコエリトリンなどが含まれるが、これらに限定されない。生物発光マーカーの例としては、ルシフェラーゼ（例えば、細菌、ホタル、コメツキムシ（click beetle）など）、ルシフェリン、エクオリンなどが含まれるが、これらに限定されない。視覚的に検出可能なシグナルを有する酵素システムの例としては、ガラクトシダーゼ、グルクロニダーゼ、ホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、コリンエステラーゼなどが含まれるが、これらに限定されない。同定可能なマーカーとしてはさらに、放射活性化合物、例えば¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C、または³Hが含まれる。同定可能なマーカーは種々の供給元から市販されている。

【0048】

蛍光標識、およびヌクレオチドおよび／またはオリゴヌクレオチドへの蛍光標識の結合は、Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Ninth Edition (Molecular Probes, Inc., Eugene, 2002); Keller and Manak, DNA Probes, 2nd Edition (Stockton Press, New York, 1993); Eckstein, editor, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, 1991); およびWetmur, Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 26:227-259 (1991))などの多くの総説に記載されている。本発明に応用可能な具体的な方法論が以下の参照文献の例に開示されている：米国特許第4,757,141号、同第5,151,507号、および同第5,091,519号。ある態様では、例えば米国特許第5,188,934号（4,7-ジクロロフルオレセイン色素）；同第5,366,860号（スペクトル分解可能なローダミン色素）；同第5,847,162号（4,7-ジクロロローダミン色素）；同第4,318,846号（エーテル置換フルオレセイン色素）；同第5,800,996号（エネルギー転移色素（energy transfer dye））；Lee et al.；同第5,066,580号（キサンチン色素）；同第5,688,648号（エネルギー転移色素）などに開示されているように、標識された標的配列の標識として1または複数の蛍光色素を用いる。標識は、以下の特許および特許出願に開示されているように、量子ドットを用いて行うこともできる：米国特許第6,322,901号、同第6,576,291号、同第6,423,551号、同第6,251,303号、同第6,319,426号、同第6,426,513号、同第6,444,143号、同第5,990,479号、同第6,207,392号、米国特許出願公開第2002/0045045号、および同第2003/0017264号。本明細書において、「蛍光標識」という用語は、1または複数の分子の蛍光吸収および／または放出特性を通じて情報を伝えるシグナル伝達部分を含む。そのよう

な蛍光特性には、蛍光強度、蛍光寿命、発光スペクトル特性、エネルギー転移などが含まれる。

【0049】

ヌクレオチドおよび／またはオリゴヌクレオチド配列に容易に取り込まれる市販の蛍光ヌクレオチドアナログとしては、これらに限定されるものではないが、Cy 3-dCTP、Cy 3-dUTP、Cy 5-dCTP、Cy 5-dUTP（アマシャム・バイオサイエンス社、ピスカタウェイ、ニュージャージー州）、フルオレセイン-12-dUTP、テトラメチルローダミン-6-dUTP、TEXAS RED（商標）-5-dUTP、CASCAD E BLUE（商標）-7-dUTP、BODIPY（商標）FL-14-dUTP、BODIPY（商標）R-14-dUTP、BODIPY（商標）TR-14-dUTP、RHODAMINE GREEN（商標）-5-dUTP、OREGON GREEN（登録商標）（商標）488-5-dUTP、TEXAS RED（商標）-12-dUTP、BODIPY（商標）630/650-14-dUTP、BODIPY（商標）650/665-14-dUTP、ALEXA FLUOR（商標）488-5-dUTP、ALEXA FLUOR（商標）532-5-dUTP、ALEXA FLUOR（商標）568-5-dUTP、ALEXA FLUOR（商標）594-5-dUTP、ALEXA FLUOR（商標）546-14-dUTP、フルオレセイン-12-UTP、テトラメチルローダミン-6-UTP、TEXAS RED（商標）-5-UTP、mCherry、CASCAD E BLUE（商標）-7-UTP、BODIPY（商標）FL-14-UTP、BODIPY（商標）R-14-UTP、BODIPY（商標）TR-14-UTP、RHODAMINE GREEN（商標）-5-UTP、ALEXA FLUOR（商標）488-5-UTP、LEXA FLUOR（商標）546-14-UTP（モレキュラープローブス社、ユージーン、オレゴン州）などが挙げられる。あるいは、上記フルオロフォアおよび本明細書に記載のものは、例えばホスホロアミダイトまたはNHSケミストリーを用いてオリゴヌクレオチド合成中に添加され得る。他のフルオロフォアを有するヌクレオチドをカスタム合成するためのプロトコールは当該技術分野で公知である（Henegariu et al. (2000) Nature Biotechnol. 18:345参照）。2-アミノプリンは、オリゴヌクレオチド配列の合成中にその中に直接取り込ませることができる蛍光塩基である。DAPI、YOYO-1、臭化エチジウム、シアニン色素（例えば、SYBR Green）などのインターカレーション色素で事前に核酸を染色することもできる。

【0050】

合成後の結合に利用可能な他のフルオロフォアとしては、これらに限定されるものではないが、ALEXA FLUOR（商標）350、ALEXA FLUOR（商標）405、ALEXA FLUOR（商標）430、ALEXA FLUOR（商標）532、ALEXA FLUOR（商標）546、ALEXA FLUOR（商標）568、ALEXA FLUOR（商標）594、ALEXA FLUOR（商標）647、BODIPY 493/503、BODIPY FL、BODIPY R6G、BODIPY 530/550、BODIPY TMR、BODIPY 558/568、BODIPY 558/568、BODIPY 564/570、BODIPY 576/589、BODIPY 581/591、BODIPY TR、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665、Cascade Blue、Cascade Yellow、ダンシル、リサミンローダミンB、Marina Blue、Oregon Green 488、Oregon Green 514、Pacific Blue、Pacific Orange、ローダミン 6G、ローダミングリーン、ローダミンレッド、テトラメチルローダミン、Texas Red（モレキュラープローブス社、ユージーン、オレゴン州から入手可能）、Cy 2、Cy 3、Cy 3.5、Cy 5、Cy 5.5、Cy 7（アマシャム・バイオサイエンス社、ピスカタウェイ、ニュージャージー州）などが挙げられる。これらに限定されるものではないが、PerCP-Cy 5.5、PE-Cy 5、PE-Cy 5.5、PE-Cy 7、PE-Texas Red、APC

－Cy7、PE－Alexa色素（610、647、680）、APC－Alexa色素などのFRETタンデムフルオロフォアを用いることもできる。

【0051】

PerCP－Cy5.5、PE－Cy5、PE－Cy5.5、PE－Cy7、PE－Texas Red、およびAPC－Cy7；さらに、PE－Alexa色素（610、647、680）およびAPC－Alexa色素などのFRETタンデムフルオロフォアを用いることもできる。

【0052】

金属銀または金粒子を用いて、蛍光標識ヌクレオチドおよび／またはオリゴヌクレオチド配列からのシグナルを増強してもよい（Lakowicz et al. (2003) BioTechniques 34:62）。

【0053】

ビオチン、またはその誘導体を、ヌクレオチドおよび／またはオリゴヌクレオチド配列上の標識として用いた後に、検出可能に標識されたアビジン／ストレプトアビジン誘導体（例えば、フィコエリトリン結合ストレプトアビジン）、または検出可能に標識された抗ビオチン抗体を結合させてもよい。ビオチン／アビジンはリガンド－リガンド結合対の一例である。抗体／抗原結合対を本明細書に記載の方法と共に用いることもできる。他のリガンド－リガンド結合対またはコンジュゲート結合対も当業者に周知である。ジゴキシゲニンを標識として取り込ませた後、検出可能に標識された抗ジゴキシゲニン抗体（例えば、フルオレセイン化抗ジゴキシゲニン）を結合させてもよい。アミノアリル－dUTPまたはアミノヘキシルアクリルアミド－dCTP残基をオリゴヌクレオチド配列に取り込ませた後、N－ヒドロキシスクシンイミド（NHS）誘導体化蛍光色素にカップリングさせてもよい。一般的に、検出可能に標識されたコンジュゲートパートナーを結合させて検出可能になる限りにおいて、コンジュゲート対の任意のメンバーを検出オリゴヌクレオチドに取り込ませることができる。本明細書において、抗体という用語は、任意のクラスの抗体分子またはFabなどのその任意の細断片を指す。

【0054】

その他の好適な標識には、フルオレセイン（FAM、FITC）、ジゴキシゲニン、ジニトロフェノール（DNP）、ダンシル、ビオチン、プロモデオキシウリジン（BrdU）、ヘキサヒスチジン（6×His）、蛍光アミノ酸（phosphor－amino acid）（例えば、P－tyr、P－ser、P－thr）などが含まれ得る。ある実施形態では、以下のハプテン／抗体対が検出に用いられ、各抗体は検出可能な標識で誘導体化されている：ビオチン／α－ビオチン、ジゴキシゲニン／α－ジゴキシゲニン、ジニトロフェノール（DNP）／α－DNP、5－カルボキシフルオレセイン（FAM）／α－FAM。

【0055】

ある例示的实施形態では、例えば米国特許第5,344,757号、同第5,702,888号、同第5,354,657号、同第5,198,537号、および同第4,849,336号、国際公開第91/17160号などに開示されているように、ヌクレオチドおよび／またはオリゴヌクレオチド配列をハプテンで間接的に標識し、その後、これに捕捉剤（capture agent）を結合させてもよい。多くの異なるハプテン－捕捉剤対が使用可能である。例示的なハプテンとしては、ビオチン、デスビオチンおよびその他の誘導体、ジニトロフェノール、ダンシル、フルオレセイン、CY5、ジゴキシゲニンなどが含まれるが、これらに限定されない。ビオチンの場合、捕捉剤はアビジン、ストレプトアビジン、または抗体であってもよい。抗体を他のハプテンに対する捕捉剤として用いてもよい（多くの色素－抗体対が市販されている。例えば、モレキュラープローブス社、ユージーン、オレゴン州）。

【0056】

ある態様では、本明細書に記載の検出可能な部分はスペクトル的に分解可能（spectrally resolvable）である。複数の蛍光標識に関して「スペクトル的に分解可能」とは、標

10

20

30

40

50

識の蛍光発光バンドが十分に異なり、すなわち、十分に非重複であり、米国特許第4, 230, 558号、同第4, 811, 218号など、またはWheeless et al., pp21-76, Flow Cytometry: Instrumentation and Data Analysis (Academic Press, New York, 1985)に記載のシステムによって例示される、例えばバンドパスフィルターおよび光電子増倍管のシステムを用いた標準的な光検出システムなどにより、それぞれの標識によって生成される蛍光シグナルに基づいて、それぞれの標識が結合する分子タグを区別できることを意味する。ある態様では、フルオレセイン、ローダミンなどの、スペクトル的に分離可能な有機色素とは、発光極大波長 (wavelength emission maxima) が少なくとも20 nm離れていること、その他の態様では少なくとも40 nm離れていることを意味する。その他の態様では、キレート化されたランタニド化合物、量子ドットなど、スペクトル的に分離可能とは、発光極大波長が少なくとも10 nm離れていること、その他の態様では少なくとも15 nm離れていることを意味する。

10

【0057】

ある実施形態では、検出可能な部分は、電子顕微鏡と併用した場合、通常の核酸と比べて高い検出性をもたらすことができる。より高い検出性を有する部分は、しばしば、酢酸水銀、白金ジメチルスルホキシド、複数の金属ービピリジル錯体 (例えば、オスミウムーbipy、ルテニウムーbipy、白金ーbipy) などの金属および有機金属のグループに属する。これらの部分のいくつかは容易に特異的に核酸を染色することができるが、これらの部分を核酸に結合させるためにリンカーを用いることもできる。合成中にヌクレオチドに付加されるそのようなリンカーとしては、acryditeで修飾された実体 (entity) およびチオールで修飾された実体、アミン反応性基、ならびにクリックケミストリーを実施するためのアジド基およびアルキン基が挙げられる。ガンマーアデノシンチオ三リン酸、ヨードデオキシシチジン三リン酸、およびメタロヌクレオシド (metallonucleoside) 一般 (Dale et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Vol. 70, No. 8, pp. 2238-2242 (1973) 参照) などのいくつかの核酸アナログもより検出可能である。修飾ヌクレオチドは合成中に付加される。合成とは、例えばオリゴヌクレオチドの固相合成を指し得る。この場合、核酸アナログであってもよい修飾核酸、または検出可能な部分もしくは結合ケミストリーリンカー (attachment chemistry linker) で修飾された核酸が、固相上で形成中の核酸断片に次々と加えられ、ホスホラミダイトによる合成が最も一般的な方法である。合成は、ポリメラーゼが核酸鋳型の相補鎖を合成している間の、ポリメラーゼにより行われるプロセスを指すこともある。あるDNAポリメラーゼは、核酸アナログ、または検出可能な部分もしくは相補的核酸鋳型への結合ケミストリーリンカーのいずれかで修飾された修飾核酸を用い、取り込ませることができる。

20

30

【0058】

用いられる検出方法は、反応性標識、回収可能な標識、および/または検出可能な標識において使用される具体的な検出可能な標識によって決まる。ある例示的な実施形態では、本明細書に記載のプロブを介して1または複数の反応性標識、回収可能な標識、または検出可能な標識が結合した、細胞周期の種々の時期、例えば、これらに限定されるものではないが、間期、前期前、前期、前中期、中期、後期、終期、および細胞質分裂期の染色体および染色体のサブ染色体領域などの標的核酸が、顕微鏡、分光光度計、チューブルミノメーターまたはプレートミノメーター、x線フィルム、シンチレーター、蛍光標式細胞分取 (FACS) 装置、マイクロフルイディクス装置などを用いて選択および/またはスクリーニングされ得る。

40

【0059】

本明細書において、「染色体」という用語は、DNA、タンパク質、RNA、および他の関連する因子を含む、生細胞中の遺伝を伝える遺伝子の担体 (support) を指す。本明細書中では、ヒトゲノムの染色体を同定およびナンバリングするための通常の国際的システムを用いる。個々の染色体のサイズは、マルチ染色体ゲノム内で異なってもよく、ゲノム間でも異なってもよい。染色体は任意の種から得ることができる。染色体は、成体の対象、若年の対象、乳児の対象、生まれていない対象 (例えば、羊水穿刺、絨毛採

50

取などの出生前検査などにより胎児から、または例えば胎児手術中に、胎児から直接)、生物学的試料(例えば、生物学的組織、体液、または細胞(例えば、痰、血液、血液細胞、組織または細針生検試料、尿、脳脊髄液、腹腔液、および胸膜液、またはそれらに由来する細胞)、または細胞培養試料(例えば、初代細胞、不死化細胞、半不死化細胞など)から得ることができる。ある例示的な実施形態では、1または複数の属から1または複数の染色体を得ることができ、そのような属には、ヒト属、ショウジョウバエ属、線虫属、ダニオ属、コイ属、ウマ属、イヌ属、ヒツジ属、タイヘイヨウサケ属(*Ocorynchus*)、タイセイヨウサケ属、ウシ属、イノシシ属、ヤケイ属、ナス属、コムギ属、イネ属、トウモロコシ属、オオムギ属、バショウ属、カラスムギ属、ポプラ属、アブラナ属、サトウキビ属などが含まれるが、これらに限定されない。

10

【0060】

蛍光標識された標的化部分または検出可能な標識を用いる場合、蛍光写真顕微鏡(fluorescence photomicroscopy)を用いて、当該技術分野で公知の通常の方法を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションの結果を検出および記録することができる。あるいは、画像処理能を有するデジタル(コンピューターにより実行される)蛍光顕微鏡を用いることもできる。複数色の標識が結合した染色体の FISH をイメージングするための2つの周知のシステムに、マルチプレックス FISH (M-FISH) およびスペクトル核型決定(SKY)が含まれる。染色体のペイント方法およびペイントされた染色体の検出方法の総説については、Schrock et al. (1996) Science 273:494; Roberts et al. (1999) Genes Chrom. Cancer 25:241; Fransz et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 14584; Bayani et al. (2004) Curr. Protocol. Cell Biol. 22.5.1-22.5.25; Danilova et al. (2008) Chromosoma 117:345; 米国特許第6, 066, 459号; および FISH TAG (商標) DNA Multicolor Kit の説明書(モレキュラープロブス社)を参照されたい。

20

【0061】

ある例示的な実施形態では、改変を加えた(例えば、ソフトウェア、Chroma 84000 フィルターセット、および強化フィルターホイール(enhanced filter wheel)) Applied Imaging Corporation CytoVision System (アプライドイメージングコーポレイション、サンタクララ、カリフォルニア州)などのコンピューター化されたイメージングシステムを用いて、蛍光標識された染色体の画像が検出および記録される。その他の好適なシステムとして、Zeiss AxioPhot 顕微鏡に接続した冷却 CCD カメラ(Kodak KAF 1400 CCD を備えた Photometrics 社の NU200 シリーズ)を用いたコンピューター化されたイメージングシステムが含まれ、画像は Ried et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1388 に記載されているように処理される。その他の好適なイメージングおよび分析システムが前述の Schrock et al. および前述の Speicher et al. に記載されている。

30

【0062】

本明細書に記載の方法によって作製されたプローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーション法を、種々の生物学的または臨床的試料に対して、細胞周期の任意(または全て)の段階(例えば、有糸分裂期、減数分裂期、間期、G0、G1、S、および/または G2)にある細胞中で行うことができる。例としては、全ての種類の細胞培養物、動物または植物の組織、末梢血液リンパ球、頬側スミア、無培養原発性腫瘍から調製された擦過標本(touch preparation)、癌細胞、骨髄、生検から得られた細胞または体液(例えば、血液、尿、痰など)中の細胞、羊水由来の細胞、母体血由来の細胞(例えば、胎児細胞)、精巣および卵巣に由来する細胞などが含まれる。試料は、通常、試料または検体の採取源に応じた通常の方法を用いて本発明のアクセイ用に調製される。これらの例は、本明細書に記載の方法および/または組成物に適用可能な試料の種類を限定するものと解釈されるべきではない。

40

【0063】

50

ある例示的な実施形態では、プローブは、それぞれ異なる標識をされた（すなわち、gRNA/Cas9複合体のうちの少なくとも2つが異なって標識されている）複数のgRNA/Cas9複合体を含む。複数色染色体ペインティングの種々のアプローチが当該技術分野で報告されており、本明細書に記載の指針に従って本発明に適用させることができる。そのようなそれぞれ異なる標識（「複数色FISH」）の例としては、Schrock et al. (1996) Science 273:494およびSpeicher et al. (1996) Nature Genet. 12:368）に記載のものが含まれる。Schrock et al.は、スペクトルのイメージング方法を記載しており、この方法では、落射蛍光フィルターセットおよびコンピューターソフトウェアを用いて、一組の標的染色体セットに同時にハイブリダイズさせた、異なって標識された複数のDNAプローブの検出および識別を行う。Speicher et al.は、「combinatorial multicolor FISH」と名付けられた27色のFISHにおいてヒト染色体（または染色体腕）の各々を標識するための5つの蛍光色素の異なる組合せの使用を記載している。その他の好適な方法を用いることもできる（例えば、Ried et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1388-92参照）。 10

【0064】

ある態様では、標的DNAを一本鎖にする必要なく、天然二本鎖DNA上の目的の領域をプロービングしてアクセスするためにCas9-gRNA複合体が用いられる。目的の標的二本鎖核酸配列に特異的なガイドRNAを当業者に公知の方法を用いて設計し、Cas9とプレインキュベートした後、標的DNAを含む試料に加える。その後、ガイドRNAおよびCas9は標的DNAに共局在してこれと複合体を形成する。 20

【0065】

本開示に基づき、当業者は、標的核酸を含むDNAに共局在するガイドRNAおよびCas9タンパク質を容易に同定または設計することができる。当業者はさらに、ガイドRNAまたはCas9タンパク質に直接的または間接的のいずれにせよ結合させるための検出可能な部分を同定することができる。DNAとしては、ゲノムDNA、ミトコンドリアDNA、ウイルスDNA、または外来性DNAが挙げられる。

【0066】

ある態様では、目的の配列に特異的なガイドRNAを設計する。gRNAをCas9とプレインキュベートした後、この組合せを、標的DNAを含む試料に加えるか、別の方法で標的DNAに接触させる。gRNAまたはCas9は検出可能な標識を含んでもよく、複合体形成後に検出可能な標識が加えられてもよい。コンポーネントの混合物の全てが溶液中で提供されてもよく、あるいは、標的核酸は表面に固定されてもよく、細胞もしくは組織内に存在してもよい。 30

【0067】

本開示の態様によれば、本明細書に記載のCRISPR-Cas9システムには（適切な設計で）配列特異的であるという利点があり、標的配列は、gRNA上の17〜25ヌクレオチドのスペーサー配列により「プログラム」される。

【0068】

Cas9システムは、gRNAの「シード」領域中に特定の配列が用いられた場合、非常に効率的な結合を示し、これは、ゲノム中におけるこれらの短い配列の頻繁な出現に基づいたゲノムマッピングツールとして用いることができる。 40

【0069】

Cas9システムはさらに、gRNAの非シード領域で縮重位置（および／またはユニバーサル塩基）を用いることにより、マッピングツールとなるように改変することができる。

【0070】

標識化の特異性を高めるために、目的の遺伝子座の周辺にガイドのクラスターを結合させることができる。

【0071】

ガイドRNAは、RNAの直接固相合成（IDT社などの業者で利用可能）により、ま 50

たは固相合成されたDNAオリゴのインビトロ転写により作製することができる。

【0072】

gRNAは、アレイ合成されたオリゴ（必要な約100～200ntより大きい長さで利用可能）から容易に合成することができ、増幅することができるので、各ガイドのコストが非常に低くなり、多数のgRNAの作製が容易に拡張可能になる。例えば、カスタムアレイ社（Custom Array Inc.）は、1回の機器のランにより、gRNA作製に適した90,000のアレイ合成オリゴを提供することができる。

【0073】

反応動態（reaction kinetic）は、等温（37度、あるいは室温）、迅速、1分未満であり、得られる複合体は非常に安定であり、容易にプロービング可能である。

10

【0074】

標的DNAは、溶液中のまたは表面に固定されたバルクDNA、細胞中の*in situ*のDNA、表面に広げられた染色体上のDNA、および表面上またはナノチャネル中の伸展された単一DNA分子であり得る。

【0075】

他の改変されたヌクレアーゼ、例えばホーミングエンドヌクレアーゼ（HE）、メガヌクレアーゼ、TALエフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、原核生物アルゴノート（pAgo）、またはBurH系ヌクレアーゼ（BurH-based nuclease: BuDN）を、Cas9の代わりにまたはCas9と同時に用いることができる。例えば、TtAGOは、RNAに対する高い親和性を示し、且つdsDNAへの低い親和性を示す。

20

【0076】

ある態様では、Cas9タンパク質を直接標識することにより（例えば、量子ドットまたは有機色素に結合したアフィニティタグを介して）、DNA結合Cas9-sgRNAを検出することができる。市販のCas9タンパク質は既にアフィニティタグを含んでいる（PNABio社のCas9はヒトインフルエンザ赤血球凝集素（HA）を含み、ニュー・イングランド・バイオラボ社から入手可能なCas9はヒスチジン（His）タグを含む。gRNAの3'末端のテール部分などでgRNAを標識することにより、テール部分がプロービングされ得、DNA結合Cas9-sgRNAを検出することができる。例えば、蛍光部分をテールに結合させることができ、異なる色のプローブを結合させてコーディングスキームを作成することができ、プローブを交換してコードのレパートリーを増やすことができる。DNA-PAINTと組み合わせ、超分解能イメージング（super-resolution imaging）を実現することができる。流体素子（fluidic device）と組み合わせ、EXCHANGE-PAINTを行うことができ、これにより超分解能での多重化（multiplexing）が可能になる。このスキームでは、各サイクルで同じ色（colors）が使用されるが、異なるDNA-PAINTイメージャー（imager）配列に色が関連付けられる、試薬交換のサイクルを行うことにより、限定された数のコードを用いて、多数の遺伝子座の超分解能イメージングを行うことができる。例えば、Cy3B、Atto655を含むたった2種の標識を、各回異なるイメージャー配列とカップリングさせて5回用いることにより、10種のgRNAをコーディングすることができる。各サイクルで、gRNAのサブセットが標識される。サイクルが完了した後、gRNAのアイデンティティは、色および特定のgRNAが光を発するサイクル数を決定することにより解読される。

30

40

【0077】

シグナル強度を増強するために、複数のフルオロフォアで標識されたオリゴをgRNAのテール部分に結合させてもよい。あるいは、テールに結合してパッドロックプローブとして環状化するオリゴを用いることにより、テールの3'末端によってプライミングされるローリングサークル増幅を行うことができる。ハイブリダイゼーション連鎖反応または当業者に公知の他のシグナル増幅方法も用いることができる。

【0078】

検出方法としては、蛍光検出方法、エレクトロルミネセンス検出方法、化学発光検出方

50

法、生物発光検出方法、および比色検出方法が含まれる。

【0079】

蛍光、エレクトロルミネセンス、化学発光、生物発光、または比色の部分または複合体の検出を含む方法以外の検出方法を用いることもでき、例として、Cas9-sgRNA結合DNA鎖をナノポアまたはナノギャップまたはナノチャネルを通過させてCas9-sgRNAの結合位置を決定すること、電子顕微鏡または走査型プローブ顕微鏡を用いて、表面上の伸長された／伸展されたDNAへのCas9-sgRNAの結合位置を検出すること、カンチレバー、水晶発振子マイクロバランス、電界効果トランジスタなどを用いて標的DNAへのCas9-sgRNAの結合を検出することが挙げられる。

【0080】

ある態様では、標的核酸におけるgRNAとCas9の複合体の存在は、当業者に公知のナノポアもしくはナノギャップ検出技術またはナノポアもしくはナノギャップシーケンシング技術を用いて決定される。簡潔に述べると、導電性の媒体中でgRNAおよびCas9が結合した標的核酸を電圧差の影響下でナノポアを通過させる。イオン電流の界面依存的变化を用いて、個々のヌクレオチドと核酸に結合したgRNA／Cas9複合体とを区別する。このようにして、gRNA／Cas9複合体の存在を検出することができる。ある態様では、イオン電流の界面依存的变化により、ナノポアまたはナノギャップ中への標的核酸の進入、およびgRNA／Cas9複合体が標的核酸に結合しているかどうか、および1または複数の結合位置が決定される。線状重合体として核酸がナノポアに進入すると、ポア中の重合体の物理的存在がポア中のイオンの流れを乱すため、イオン電流が低下する。gRNA／Cas9複合体がDNA上の特定の位置に結合している場合、その位置がポアに進入すると、イオンの流れはさらに低下し、イオン電流が低下する。この電流の低下はgRNA／Cas9複合体が標的核酸に結合していることを示している。そのサイズおよび物理化学的特性に応じて、標的核酸（すなわち、DNA重合体）に結合した各種の構造体または複合体は、イオン電流の特徴的变化を生じさせる。異なる位置またはアレルを標的とするgRNA-Cas9複合体を別々に標識して、ナノポアの読取りでこれらが区別できるようにすることができる。

【0081】

「ナノポア」とは、平面状の表面または膜を通る孔または通路などの、ナノメートルスケールの幅を有する孔または通路を意味する。ナノポアは、脂質二重層などの多量体タンパク質環によって形成され得る。ナノポアは、窒化ケイ素、グラフェン、またはそのような非生物学的材料の固体平面状表面中の物理的孔であってもよい。通常、通路の幅は0.2～25 nmである。本明細書において、ナノポアは、分子の膜通過を可能にする膜貫通構造を含み得る。ナノポアの例としては、α溶血素（黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*））およびMspA（*Mycobacterium smegmatis*）が含まれる。ナノポアのその他の例は、ナノポアシーケンシングを記述している技術分野中に見出すことができ、あるいは、β-PFT類Panton-ValentineロイコシジンS、アエロリジン、およびクロストリジウムε毒素、α-PFT類細胞溶解素A、二成分（binary）PFT炭疽毒素などの孔形成毒素、またはニューモリシンもしくはグラミシジンなどのその他のものとして当該技術分野で記述されていることがある。ナノポアは、ナノポアシーケンシング技術の出現と共に技術的および経済的に重要になってきている。ナノポアシーケンシングの方法は、例えば参照により援用される米国特許第5,795,782号に記載されているように、当該技術分野で公知である。簡潔に述べると、ナノポア検出は、電圧伝導性流体（voltage-conducting fluid）、例えばKCl、NaCl、NiCl、LiCl、または当業者に公知のその他のイオンを形成する無機化合物などのイオン溶液に浸したナノポア穿孔膜を含む。電圧が膜に印加され、ナノポアを通したイオンの伝導により電流が生じる。ナノポアがDNAなどの重合体と相互作用すると、所与の時点でポア中を移行する重合体サブ断片の特徴に応じて、例えばモノマー特異的に、ナノポア中の流れが変わり、その結果、モノマーまたはサブ断片の同定を可能にする電流の変化が生じる。本開示の範囲に含まれるナノポアとしては、当業者に公知の固体非タンパク質ナノポアおよび当業者に公

10

20

30

40

50

知のDNA折り紙ナノポアが含まれる。そのようなナノポアは、既知のタンパク質ナノポアより大きなナノポア幅を提供し、二本鎖標的核酸とCas9/gRNA複合体などのより大きな検出用分子が通過できるが、複合体がナノポアを通過する際のイオン電流の変化を検出するのに十分な感度を有したままである。

【0082】

「ナノポア分析」とは、重合体とナノポアの相互作用に基づいてgRNA/Cas9複合体を含むポリヌクレオチドなどの重合体のコンポーネントを決定する方法を意味する。ナノポア分析は、重合体との相互作用によって開口部のサイズが変化する際に起こる、ナノポアを通るイオンのコンダクタンスの変化を測定することにより実現され得る。

【0083】

ナノポアに加えて、本開示は、ギャップの幅が約0.2～約25nmまたは約2～約5nmなどの約数ナノメートルである、2つの電極間のギャップとして当該技術分野で知られるナノギャップの使用を想定する。ギャップは、ナノポアの開口部を模倣しており、DNAが電極間でギャップを通過するか、または超えることを可能にする。本開示の態様はさらにナノチャネルの使用を想定する。DNAが通過するナノチャネルに隣接して電極が配置される。それに加えて、またはその代わりに、複合体が光学的に標識される場合、ナノチャネル中で伸展されたDNA重合体に沿って結合した複合体の位置を決定することができる。電場中の分子または部分の移動および電場を通過する構造体を表す電場の歪みの発生に基づく、分子または部分の同定およびシーケンシングの異なる実施形態を当業者は容易に想像できると理解されるべきである。

【0084】

その他の態様では、Cas9ニッカーゼを用いて標的二本鎖核酸にニックを形成することができ、ニックを、ポリメラーゼまたはリガーゼに基づくシーケンシングのための、配列に定義されるプライミング部位として用いることができ、これにより、Cas9-sgRNA標的部位の周辺の配列情報が明らかになる。ゲノムの多数の選択された部分、例えばエクソーム、GWASシグナルによって同定される領域、心疾患、癌などに関連する特異的遺伝子のシーケンシングを可能にするガイドのライブラリーを設計することができる。プライマー伸長を用いて、蛍光ヌクレオチドの取込み、ライゲーション、または蛍光ヌクレオチドの取込み後のライゲーションなどにより、ニック形成部位を標識することもできる。プライマー伸長が既存の鎖を置換する場合、例えば置換されたフラップへのオリゴのハイブリダイゼーションによりそれを標識することができる。ガイドの一部が縮重配列を含む場合など、複数のニック形成部位がある場合、複数の標識部位をマッピングツールとして用いることができる。プライマー伸長法は当業者に公知である。

【0085】

本明細書に記載されている方法の具体的な応用例としては、同定または診断またはマッピング方法が挙げられる。図6Aに示されているようなセントロメア反復などのヒトゲノムの「暗黒物質 (dark matter)」へのアクセス。セントロメアDNA配列は、その高い反復性のため、現在の参照ゲノムから大部分が欠落している。CRISPR/Cas9を用いた本明細書に記載されている単一分子をマッピングまたはシーケンシングする方法は、標的化された様式で、超分解能で反復部位をマッピングして、さらにそれらの部位からのシーケンシングを可能にすることにより、参照ゲノムのより完全なアセンブリーを可能にする。そのような方法は個人的なゲノムと共に用いることができる。

【0086】

本開示に係る方法には、標識クローンを用いて現在行われているよりも高い効率および分解能で染色体スプレッドのFISHを行うことも含まれる。標識されたgRNA/Cas9複合体は、よりきれいなシグナルを得ることを可能にするので、本明細書に記載の例示的方法における効果的なFISHプローブである。この方法により、多くの癌および不妊問題に関連する染色体切断点 (chromosomal breakpoint)、複雑な転座または再編成のより速くより良い同定が可能になる。

【0087】

本開示に係る方法はインビトロ診断を可能にする。

【0088】

本開示に係る方法は、迅速な診断プラットフォームに関連して、細菌またはウイルスにおける多剤耐性をコードする遺伝子のプロービングを可能にし、これに関連して、dsDNAを直接および安定的に標的化するためにCas9-sgRNAを用いることができる。

【0089】

以下の例示的方法も本開示に含まれる。

【0090】

Mgの存在を含む野生型Cas9

いくつかの実施形態では、本発明は、核酸中の部位を検出、標識、プルダウン、または標的化する方法であって、(a)核酸を、ヌクレアーゼ活性を有するか、または保持しているCas9タンパク質およびガイドRNAを含む複合体と、複合体が核酸に結合し、核酸を切断するが、核酸から容易に解離しない(すなわち、核酸に結合したままであり、切断された鎖の両方を保持する条件下で)接触させること、および(b)ステップ(a)の生成物を分析することを含む方法に関する。いくつかの実施形態では、そのような条件は、Mg²⁺などの二価カチオンの存在を含む。いくつかの実施形態では、ステップ(a)とステップ(b)の間に少なくとも1つの洗浄ステップがある。いくつかの実施形態では、生じる複合体の少なくとも1つのコンポーネントが標識またはタグ化される。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは天然PAM部位に隣接する配列に結合する。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは人工PAM部位に隣接する配列に結合する。いくつかの実施形態では、Cas9はCas9の変化バージョンである。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは切断型(truncated)ガイドRNAである。いくつかの実施形態では、切断型ガイドは、ガイドRNAのシード領域、すなわちPAM部位に隣接する4〜7ヌクレオチドだけを含む。

【0091】

Mg非存在下での野生型Cas9

いくつかの実施形態では、本発明は、核酸中の部位を検出、標識、プルダウン、または標的化する方法であって、(a)核酸を、ヌクレアーゼ活性を有するか、または保持しているCas9タンパク質およびガイドRNAを含む複合体と、複合体が核酸に結合し、核酸を切断せず、核酸から容易に解離しない条件下で接触させること、および(b)ステップ(a)の生成物を分析することを含む方法に関する。いくつかの実施形態では、そのような条件は、Mg²⁺などの二価カチオンの欠如を含む。いくつかの実施形態では、ステップ(a)とステップ(b)の間に少なくとも1つの洗浄ステップがある。いくつかの実施形態では、生じる複合体の少なくとも1つのコンポーネントが標識またはタグ化される。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは天然PAM部位に隣接する配列に結合する。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは人工PAM部位に隣接する配列に結合する。いくつかの実施形態では、Cas9はCas9の変化バージョンである。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは切断型ガイドRNAである。いくつかの実施形態では、切断型ガイドは、ガイドRNAのシード領域、すなわちPAM部位に隣接する4〜7ヌクレオチドだけを含む。

【0092】

欠損/Dead Cas9

いくつかの実施形態では、本発明は、核酸中の部位を検出、標識、プルダウン、または標的化する方法であって、(a)核酸を、(例えばD10A/H840A-dCas9)などの酵素的に不活性な、またはヌクレアーゼ欠損のCas9タンパク質およびガイドRNAを含む複合体と、複合体が核酸を切断せず、核酸から容易に解離しない条件下で接触させること、および(b)ステップ(a)の生成物を分析することを含む方法に関する。いくつかの実施形態では、ステップ(a)とステップ(b)の間に少なくとも1つの洗浄ステップがある。いくつかの実施形態では、生じる複合体の少なくとも1つのコンポーネ

ントが標識またはタグ化される。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは天然PAM部位に隣接する配列に結合する。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは人工PAM部位に隣接する配列に結合する。いくつかの実施形態では、Cas9はCas9の変化バージョンである。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは切断型ガイドRNAである。いくつかの実施形態では、切断型ガイドは、ガイドRNAのシード領域、すなわちPAM部位に隣接する4～7ヌクレオチドだけを含む。

【0093】

ニッカーゼCas9

いくつかの実施形態では、本発明は、核酸中の部位を検出、標識、プルダウン、または標的化する方法であって、(a)核酸を、Cas9ニッカーゼ(すなわち、Cas9 D10A変異体またはH840A変異体などのCas9タンパク質のニック形成変異体)およびガイドRNAを含む複合体と、複合体が核酸から容易に解離しない条件下で接触させること、および(b)ステップ(a)の生成物を分析することを含む方法に関する。いくつかの実施形態では、ステップ(a)とステップ(b)の間に少なくとも1つの洗浄ステップがある。いくつかの実施形態では、生じる複合体の少なくとも1つのコンポーネントが標識またはタグ化される。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは天然PAM部位に隣接する配列に結合する。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは人工PAM部位に隣接する配列に結合する。いくつかの実施形態では、Cas9はCas9の変化バージョンである。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは切断型ガイドRNAである。いくつかの実施形態では、切断型ガイドは、ガイドRNAのシード領域、すなわちPAM部位に隣接する4～7ヌクレオチドだけを含む。

【0094】

DNA結合タンパク質なしでガイドRNAを用いる方法

いくつかの実施形態では、本発明は、核酸中の部位を検出、標識、プルダウン、または標的化する方法であって、(a)ガイドRNAが核酸から容易に解離しない条件下で核酸をガイドRNAと接触させること、および(b)ステップ(a)の生成物を分析することを含む方法に関する。いくつかの実施形態では、ステップ(a)とステップ(b)の間に少なくとも1つの洗浄ステップがある。いくつかの実施形態では、生じるガイドRNA-DNA複合体は標識またはタグ化される。いくつかの実施形態では、標識またはタグはテール上にある。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは天然PAM部位に隣接する配列に結合する。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは人工PAM部位に隣接する配列に結合する。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、PAM部位に隣接する配列への結合を必要としない。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは切断型ガイドRNAである。いくつかの実施形態では、切断型ガイドRNAは、ガイドRNAのシード領域、すなわちPAM部位に隣接する4～7ヌクレオチドだけを含む。いくつかの実施形態では、標的遺伝子座は反復DNAの領域であり、シグナルは増幅される。いくつかの実施形態では、標的核酸はガイドRNAの添加前に変性される。

【0095】

RNAを用いる方法

いくつかの実施形態では、本発明は、核酸中の部位を検出、標識、プルダウン、または標的化する方法であって、(a)RNAが核酸に結合する条件下で核酸をRNAと接触させること、および(b)ステップ(a)の生成物を分析することを含む方法に関する。いくつかの実施形態では、ステップ(a)とステップ(b)の間に少なくとも1つの洗浄ステップがある。いくつかの実施形態では、生じるRNA-DNA複合体は標識またはタグ化される。いくつかの実施形態では、標識またはタグはテール上にある。いくつかの実施形態では、標的遺伝子座は反復DNAの領域であり、シグナルは増幅される。

【0096】

二本鎖を不安定化／開鎖(open)する試薬およびRNA

いくつかの実施形態では、本発明は、核酸中の部位を検出、標識、プルダウン、または標的化する方法であって、(a)核酸を、二本鎖の不安定化／開鎖試薬およびガイドRNA

AまたはRNAと、複合体が形成されて核酸に結合して複合体が核酸から容易に解離しない条件下で接触させること、および(b)ステップ(a)の生成物を分析することを含む方法に関する。いくつかの実施形態では、ステップ(a)とステップ(b)の間に少なくとも1つの洗浄ステップがある。いくつかの実施形態では、生じる複体の少なくとも1つのコンポーネントは標識またはタグ化される。いくつかの実施形態では、標識またはタグはテール上にある。いくつかの実施形態では、Cas9はCas9の変化バージョンである。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは切断型ガイドRNAである。いくつかの実施形態では、切断型ガイドは、ガイドRNAのシード領域、すなわちPAM部位に隣接する4〜7ヌクレオチドだけを含む。いくつかの実施形態では、標的遺伝子座は反復DNAの領域であり、シグナルは増幅される。不安定化試薬(一本鎖DNA安定化剤を含む)には、ヘリカーゼ、複製タンパク質A(RPA)、大腸菌の一本鎖結合タンパク質(SSB)、ベタイン、ベタイン/グリシン、ホルムアミド、尿素、DMSOなどが含まれる。二本鎖開鎖試薬には、プライモソームタンパク質PriA、三本鎖形成bis-PNA、ガンマPNAなどが含まれる。

10

【0097】

インビトロRNA合成およびプロービング

いくつかの実施形態では、本発明は、核酸中の部位を検出、標識、プルダウン、または標的化する方法であって、(a)、無細胞系でRNAを合成すること、(b)核酸をRNAおよび他のコンポーネントと接触させることであって、これにより複合体が形成され、前記複合体が核酸から容易に解離しないこと、および(c)ステップ(b)の生成物を分析することを含む方法に関する。いくつかの実施形態では、ステップ(b)とステップ(c)の間に少なくとも1つの洗浄ステップがある。いくつかの実施形態では、生じる複体の少なくとも1つのコンポーネントは標識またはタグ化される。いくつかの実施形態では、標識またはタグはテール上にある。いくつかの実施形態では、Cas9はCas9の変化バージョンである。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは切断型ガイドRNAである。いくつかの実施形態では、切断型ガイドは、ガイドRNAのシード領域、すなわちPAM部位に隣接する4〜7ヌクレオチドだけを含む。

20

【0098】

ニック形成およびシーケンシング

いくつかの実施形態では、本発明は、(a)複合体が核酸の一方の鎖中にニックを誘導する条件下で、核酸を、Cas9タンパク質のニック形成変異体および特異的位置を標的とするガイドRNAを含む複合体と接触させること、(b)ニックの3'末端をヌクレオチドで伸長させること、(c)ステップ(b)の生成物を検出するステップ、およびDNAがシーケンシングされるようにステップ(b)を繰り返すことを含む、標的シーケンシングに関する。いくつかの実施形態では、ヌクレオチドは標識されている。いくつかの実施形態では、ヌクレオチドは末端リン酸で標識されている。いくつかの実施形態では、ヌクレオチドは4つ以上のリン酸を含む。いくつかの実施形態では、ヌクレオチドは、切断可能な結合を介して塩基で標識されている。いくつかの実施形態では、ヌクレオチドは可逆的ターミネーターである。いくつかの実施形態では、塩基における標識により可逆的な終止がもたらされる。いくつかの実施形態では、糖の3'または2'位における修飾により可逆的な終止がもたらされる。いくつかの実施形態では、4つのヌクレオチド全てが同時に伸長に利用可能である。いくつかの実施形態では、単一分子検出方法が用いられる。いくつかの実施形態では、単一分子は、線状のひも(linear string)として分析される。いくつかの実施形態では、核酸は細胞中でin situで分析される。核酸が細胞中でin situで分析されるいくつかの実施形態では、細胞は分析前に固定される。いくつかの実施形態では、in situで分析される核酸はDNA分子であり、分析前にRNA分子が除去される。いくつかの実施形態では、試薬を用いて、ニック形成後に核酸から複合体が取り除かれる。いくつかの実施形態では、ステップ(b)とステップ(c)の間に少なくとも1つの洗浄ステップがある。いくつかの実施形態では、Cas9はCas9の変化バージョンである。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは切断型ガイドR

30

40

50

NAである。いくつかの実施形態では、切断型ガイドは、ガイドRNAのシード領域、すなわちPAM部位に隣接する4～7ヌクレオチドだけを含む。

【0099】

ニック形成および捕捉

いくつかの実施形態では、ニックの3'末端が修飾ヌクレオチドで伸長される。いくつかの実施形態では、修飾ヌクレオチドはビオチン修飾されている。いくつかの実施形態では、取り込まれたビオチンを用いて、例えば自身が標識されている（または標識される）ストレプトアビジン／ニュートラアビジンまたは抗ビオチン抗体との相互作用を介して、標的DNAを標識する。いくつかの実施形態では、取り込まれたビオチンを用いて、例えば、磁気ビーズもしくはアガロースビーズなどのビオチンコーティングされた捕捉材料にまたは表面に自身が結合している（または結合する）ストレプトアビジン／ニュートラアビジンまたは抗ビオチン抗体との相互作用を介して、標的DNAを捕捉する。いくつかの実施形態では、Cas9/gRNAによって導かれるニック形成および捕捉を助けるように修飾されている塩基の取込みを用いて、溶液中で行われる反応中で、核酸試料の特異的な1または複数の部分を単離する。この実施形態では、例えば、ニック形成およびビオチン化dUTPの取込み後、生成物を、ビーズ上のストレプトアビジンがゲノムのビオチン化部分に結合できる長さの時間（例えば、1時間）、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズと反応させる。その後、磁石を適用し、固相ビーズに結合しているゲノムの標的部分を上清から分離することにより、目的の標的領域を単離する。上清は捨てられる。種々の程度の洗浄ストリンジェンシーおよび上清の除去の後、選択されたゲノムDNAは、当該技術分野で公知の方法により（例えば、90℃超に加熱することにより）、ビーズから分離される。その後、サイズ選択、ポリッシング（polishing）、バーコード化、テーリング（tailing）、ライブラリー作製、クラスター増幅、コロニー（colony）増幅などから選択されるステップを含み得る、当業者に公知の次世代シーケンシングの方法およびデバイスなどにより、捕捉された分子をシーケンシングすることができる。核酸試料の一部またはサブセットを選択または濃縮するための本明細書に記載のニック形成および取込みのアプローチは、伸長により複数のビオチンを取り込むことが可能になって捕捉効率が向上される限り、ガイドRNA/Cas9の結合と比べて利点がある。もう1つの利点は、標的が捕捉可能になるまでにgRNA/cas9結合、ニック形成、および伸長の3つのステップが必要なので、オフターゲットな捕捉が減少することである。この選択方法は、既存のアプローチ（例えば、SureSelect）よりクリーンであり、オフターゲット配列がより少ないので、シーケンシングが少なくなる。いくつかの実施形態では、ライゲーション反応などニックの5'末端で、例えばビオチン化オリゴヌクレオチドのライゲーションなどの反応を行う。いくつかの実施形態では、DNA二本鎖のセンスおよびアンチセンス鎖を分離することができる。この態様では、一方の鎖がgRNA/Cas9結合により、またはビオチン化ヌクレオチドの取込みにより捕捉され、他方は上清から回収される。あるいは、二本鎖の、gRNA結合により置換された鎖は、一本鎖結合タンパク質、ヒドロキシアパタイト、または配列特異的オリゴヌクレオチドへの結合により捕捉することができる。

【0100】

ニック形成および直接シーケンシング

いくつかの実施形態では、gRNAにより導かれるニック形成が、表面に結合した標的核酸、すなわちDNAで行われるか、あるいは、ニック形成が行われた後、DNAを表面に結合させる。いくつかの実施形態では、その後、ニックの3'末端が用いられてDNAシーケンシングを開始させることができる。ニックの3'末端により、ポリメラーゼに基づくシーケンシング、例えばイルミナ社の合成によるシーケンシング（sequencing by synthesis）が可能になる。ニックの3'末端および5'末端の両方により、例SOLID（ライフテクノロジーズ社（Life Technologies））などのライゲーションに基づくシーケンシング、およびライゲーションによるシーケンシング（コンプリートゲノミクス社（Complete Genomics Inc.））が支持される。い

いくつかの実施形態では、ゲノムDNAは長さが長いままで保持され、これが表面に結合する前または結合した後にニック形成が行われる。いくつかの実施形態では、DNAを表面に結合させ、その長さに沿った配列または特徴を分析できるように伸展させるか、または伸長させる。そのような分析は、光学顕微鏡、電子顕微鏡、X線顕微鏡、または走査型プローブ顕微鏡を用いて行われ得る。いくつかの実施形態では、分析が光学的方法により行われる場合、表面上に配置されたポリヌクレオチド上でのシーケンシング反応に対して全反射照明 (Total Internal Reflection) またはエバネッセント光／導波管イメージングが行われる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、線状化されるが、表面に結合しなくてもよい。いくつかの実施形態では、線状化は、ポリヌクレオチドが一方の末端で結合して流れの中でぶら下がる (dangle) ことによって起こる。いくつかの実施形態では、標的核酸、すなわちDNAは、流体力学的抗力により実質的に線状にされる。いくつかの実施形態では、DNAは、ナノスリット、ナノチャネル、またはナノグループ中に配置されることによりナノコンファインメント (nano-confinement) によって伸展される。いくつかの実施形態では、線状DNAは実質的に直鎖状 (straight) である。いくつかの実施形態では、gRNAによって導かれるニックは、長い線状ポリヌクレオチド上の複数の選択された配列位置で行われる、合成によるシーケンシングを導く。この実施形態では、ポリメラーゼ酵素 (例えば、9 Degree Northもしくはその変異体またはPhi29もしくはその変異体) が、合成によるシーケンシングにおいて検出可能なヌクレオチドを取り込むことによりニックからの伸長を行う。この検出は、(Ion Torrentシーケンシングにおけるように) pHを介したものであり得る。いくつかの実施形態では、検出はヌクレオチド上の蛍光標識を介したものである。いくつかの実施形態では、ヌクレオチドは、蛍光標識されていることに加え、可逆的ターミネーターとしても働き、それにより、当該技術分野で公知の方法 (例えば、イルミナ社またはLaserGen社のシーケンシング) により、逐次的な4色シーケンシングを行うことができる。取り込まれるヌクレオチドは、lightning terminators (LaserGen社) であってもよく、光切断可能な部分はUV光により切断される。いくつかの実施形態では、gRNA/Cas9複合体形成に続くシーケンシングは、選択的または標的化されたシーケンシングを行うことを目的とする。その他の実施形態では、gRNAは縮重位置の少なくとも一部を含み、ゲノム中に分布する複数の開始部位からシーケンシングが開始され、これは特定の遺伝子座に選択的ではない。いくつかの実施形態では、DNAが細胞内にあるが、ニック形成が起こる。いくつかの実施形態では、細胞は固定されている。例えば、ニック形成は、DNAがシーケンシングされる蛍光in situシーケンシング (FISSEQ) 反応の一部を形成し得る。いくつかの実施形態では、ニック形成を用いて、細胞内のゲノムDNA中にニックを誘導し、その後、例えばPhi29などの標準的な鎖置換ポリメラーゼによる分岐またはローリングサークル増幅により、ニックに隣接した領域の増幅を開始する。その後、増幅産物に対してシーケンシングを行う。あるいは、TrueSeq (Helicos Bio社/SeqLL社) などの単一分子シーケンシング法を用いて、ニック形成されたゲノムDNAをニックから直接シーケンシングする。

【0101】

結合およびナノポア分析

いくつかの実施形態では、本発明は、核酸中の配列または結合部位の位置を検出する方法であって、(a) 複合体が核酸から容易に解離しない条件下で、核酸をCas9タンパク質およびガイドRNAを含む複合体と接触させること；(b) ナノポアまたはナノギャップに核酸を通過させること；および(c) 結合位置を分析すること、を含む方法に関する。いくつかの実施形態では、単一分子検出方法が用いられる。いくつかの実施形態では、単一チャネル記録が用いられる。いくつかの実施形態では、単一分子は線状のひもとして分析される。

【0102】

オフターゲット結合

いくつかの実施形態では、本発明は、ガイドRNAオフターゲット結合部位を検出する方法であって、(a)複合体が核酸から容易に解離しない条件下で、核酸をCas9タンパク質およびガイドRNAを含む複合体と接触させること、(b)結合位置を検出すること、(c)標的化された結合位置を決定すること、(d)オフターゲット結合の位置を決定すること、および(e)オフターゲット結合の位置によりオフターゲット結合の配列のアイデンティティを決定することを含む方法に関する。いくつかの実施形態では、標識を用いて目印を与え、これを参照して標的結合またはオフターゲット結合を決定することができる。いくつかの実施形態では、標識は、核酸上の物理地図を作成する結合試薬を含む。いくつかの実施形態では、結合試薬は、非乱雑gRNA(non-promiscuous gRNA)、制限酵素、ニッカーゼ酵素、オリゴヌクレオチドなどの1または複数であってもよい。いくつかの実施形態では、単一分子検出方法を用いる。いくつかの実施形態では、単一分子は線状のひもとして分析される。

10

【0103】

コピー数の検出

いくつかの実施形態では、本発明は、染色体またはゲノムの領域のコピー数を決定する方法であって、(a)標的核酸配列を、コピー数を決定する対象の染色体またはゲノム領域に相補的な部分を有するガイドRNA配列およびCas9タンパク質ならびに参照染色体および／またはゲノム領域に相補的な部分およびCas9タンパク質と接触させること、(b)コピー数を決定する対象の染色体／ゲノム領域からのシグナルと参照染色体またはゲノム領域からのシグナルとの比率を得ることを含む方法に関する。いくつかの実施形態では、方法は異数性の検出に応用される。いくつかの実施形態では、異数性はトリソミー21である。いくつかの実施形態では、コピー数を決定する対象の遺伝子座はLSI 21q22.13-q22.2である。

20

【0104】

Her2

いくつかの実施形態では、本発明は、Her2増幅の程度を決定する方法であって、(a)標的核酸配列を、Her2遺伝子座に相補的な部分を有するガイドRNA配列およびCas9タンパク質ならびに参照遺伝子座に相補的な部分およびCas9タンパク質と接触させること、および(b)参照遺伝子座と比べたHer2遺伝子座からのシグナルの比率を得ることを含む方法に関する。

30

【0105】

遺伝子融合

いくつかの実施形態では、本発明は、遺伝子融合の発生率を決定する方法であって、(a)標的核酸配列を、第1のゲノム遺伝子座に相補的な部分を有するガイドRNAプローブ配列およびCas9タンパク質ならびに第2のゲノム遺伝子座に相補的な部分を有するガイドRNAプローブ配列およびCas9タンパク質と接触させること、(b)第1および第2の遺伝子座間の共局在イベントを検出することであって、遺伝子融合がゲノム領域間の任意の融合であるステップを含む方法に関する。ある態様では、共局在の結果、プローブは互いに隣接する。

【0106】

Break Apart アッセイ

いくつかの実施形態では、本発明は、遺伝子融合の発生率を決定する方法であって、(a)標的核酸配列を、ゲノム遺伝子座(第1の遺伝子座)に相補的な部分を有するガイドRNA配列およびCas9タンパク質ならびに隣接ゲノム遺伝子座(第2の遺伝子座)に(参照に準じて)相補的な部分を有するガイドRNA配列およびCas9タンパク質と接触させること、および(b)第1および第2の遺伝子座間の共局在イベントが検出されないかを決定することを含む方法に関する。いくつかの実施形態では、方法は、ALKなどの未分化リンパ腫キナーゼに適用される(図12参照)。いくつかの実施形態では、方法はROS1に適用される。ROS1はインスリン受容体ファミリーの受容体型チロシンキナーゼである。いくつかの実施形態では、アッセイは非小細胞肺癌の診断において適用さ

40

50

れる。

【0107】

ゲノム再編成

いくつかの実施形態では、本発明は、ゲノム領域の再編成を検出する方法であって、(a) ゲノムDNA試料を、ゲノム領域の特異的サブ領域に相補的な部分を各々有する複数のガイドRNA配列およびCas9タンパク質と接触させることであって、各サブ領域に対するgRNAが、他のサブ領域に対するgRNAからの区別を可能にするコードを含んでいること、および(b) ゲノムDNAをイメージングし、コードを解読し、コードのオーダーを参照と比較することであって、ほぼ目的のゲノム領域の長さにわたってコードが共局在していること、を含む方法に関する。いくつかの実施形態では、gRNAはテールでコードされている。いくつかの実施形態では、コードの解読は、テールのコード化部分を解読分子(decoder molecule)と接触させることにより行われ、そのような解読分子には、DNAまたはタンパク質プローブが含まれる。いくつかの実施形態では、ゲノム再編成を決定することに加え、特定のゲノムセグメントの異なるアレルも区別される。いくつかの実施形態では、異なるゲノムセグメントに対してと同様に、異なるアレルに対して異なるコードを用いることができる。いくつかの実施形態では、目的の領域は、ゲノムのBRCA1および/またはBRCA2領域である。いくつかの実施形態では、目的の領域はMHCまたはHLA領域である。いくつかの実施形態では、目的の領域は、MMR遺伝子、MLH1-PMS2およびMSH2-EPCAM-MSH6の周辺の領域であり、遺伝性非ポリポーシス大腸癌(HNPCC)の診断または分析において用いることができる。いくつかの実施形態では、各ゲノムセグメントに対して複数のgRNAが用いられ、そのような複数のガイドRNAの各々は同じコードで標識されている。

【0108】

反復数の計数

いくつかの実施形態では、ゲノムDNAの鎖が線状のひもとして分析される。いくつかの実施形態では、DNAは伸展される。いくつかの実施形態では、ナノポア/ナノギャップ分析が行われる。いくつかの実施形態では、ヒト第4染色体および第10染色体上の3.3kbのD4Z4リピート含有遺伝子座上の反復単位の数进行計数(enumerate)する方法が用いられる。いくつかの実施形態では、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー(FSHD)の患者を診断または分析するためにD4ZA領域の評価を用いる。いくつかの実施形態では、方法は、テロメアサブユニット反復数を計数するために用いられる。いくつかの実施形態では、方法は、セントロメア反復数を計数するために用いられる。いくつかの実施形態では、方法は、メジャーサテライト反復数を計数するために用いられる。いくつかの実施形態では、方法は、マイナーサテライト反復数を計数するために用いられる。

【0109】

Cas9/ガイドRNA in situハイブリダイゼーション

ある態様では、Cas9仲介in situハイブリダイゼーションを行うための方法は、目的の染色体領域またはゲノム領域に相補的な部分を有するガイドRNA配列およびCas9タンパク質と標的核酸配列を接触させるステップを含み、ガイドRNAおよびCas9タンパク質が、標的核酸配列に共局在して複合体を形成し、目的の染色体領域またはゲノム領域が、フローセル中に配列され、in situハイブリダイゼーションの試薬および洗浄試薬が、目的の染色体領域またはゲノム領域の上に流される。ある態様では、複合体の位置は、蛍光、化学発光、エレクトロルミネセンス、比色検出などを含む群の方法を用いて検出される。

【0110】

アレル特異的検出

いくつかの実施形態では、本発明は、特異的アレルの存在を決定する方法であって、(a) 標的核酸配列を、検出対象のアレルに相補的なシード部分(PAM部位に隣接する最初の4~7ヌクレオチド)を有するガイドRNA配列およびCas9タンパク質と接触させること、および(b) 核酸と共局在したgRNA/Cas9の存在を検出することを含

む方法に関する。

【0111】

結合アッセイ

ある態様では、特異的配列を検出するための診断方法であって、(a) 標的核酸配列を、標的核酸配列に相補的な部分を有するガイドRNA配列およびCas9タンパク質と接触させるステップ、(b) 表面上の位置で複合体を捕捉するステップ、(c) 複合体中にのみ存在し、標的核酸配列上には存在しない標識により、その位置で捕捉された複合体を検出するステップを含む方法が提供される。ある態様では、特異的配列を検出するための診断方法であって、(a) 標的核酸配列を、標的核酸配列に相補的な部分を有するガイドRNA配列およびCas9タンパク質と接触させるステップ、(b) 表面上の位置で複合体を捕捉するステップ、(c) 複合体中にのみ存在し、cas9/gRNA上に存在しない標識により、その位置で捕捉された複合体を検出するステップを含む方法が提供される。いくつかの実施形態では、アッセイは、ラテラルフローアッセイ、ディップスティックアッセイ、ペーパーマイクロfluidicsアッセイ (paper microfluidics assay)、ドットプロットアッセイ、マイクロアレイアッセイの一部として行われる。いくつかの実施形態では、アッセイは診断的アッセイである。

10

【0112】

免疫組織化学およびgRNA/Cas9 in situハイブリダイゼーション

いくつかの実施形態では、本発明は、同じ試料上で免疫組織化学 (IHC) およびgRNA/cas9仲介in situハイブリダイゼーション (ISH) を組み合わせる方法であって、(a) 標的クロマチン内の標的核酸配列を、標的核酸配列に相補的な部分を有するガイドRNA配列およびCas9タンパク質と接触させるステップであって、ガイドRNAおよびCas9タンパク質が、標的核酸配列に共局在して複合体を形成するステップ、(b) 標的クロマチンをタンパク質結合試薬と接触させるステップ、および(c) ガイドRNA/cas9複合体とタンパク質結合試薬の比較位置を検出するステップを含む方法に関する。いくつかの実施形態では、タンパク質結合試薬は抗体である。いくつかの実施形態では、タンパク質結合試薬はアプタマーである。いくつかの実施形態では、ガイドRNA/Cas9複合体およびタンパク質結合試薬はそれぞれ異なる標識をされている。いくつかの実施形態では、IHC試薬およびガイドRNA/Cas9 ISH試薬は一緒に添加される。いくつかの実施形態では、IHC試薬およびガイドRNA/Cas9 ISH試薬は連続して、すなわち次々と添加される。いくつかの実施形態では、ガイドRNA/Cas9 ISHは変性ステップを必要としないので、IHCを実施するためにタンパク質およびクロマチンの構造はインタクトなままである。いくつかの実施形態では、ガイドRNA/Cas9複合体を用いてクロマチンの特定の部分が単離され、分析方法を用いて、単離されたクロマチン上に存在するタンパク質が検出される。

20

30

【0113】

ガイドRNAテールのプロービング

いくつかの実施形態では、本発明は、標的核酸配列を検出する方法であって、(a) 標的核酸配列を、標的核酸配列に相補的な部分を有するガイドRNA配列およびCas9タンパク質と接触させるステップであって、ガイドRNAおよびCas9タンパク質が、標的核酸配列に共局在して複合体を形成し、ガイドRNAが、3' テール配列を含み、前記テールが、プローブ配列に相補的であるか、またはプライマーとして作用できるステップ、および(b) 複合体を検出することにより標的核酸配列を検出するステップを含む方法に関する。ある態様では、テールは、gRNA結合位置のすぐ近傍の配列に相補的な配列を含む。ある態様では、テールは、二本鎖の置換鎖に相補的な配列を含む。ある態様では、二本鎖の標的鎖の一方がガイドRNAにより隔離され、他方の鎖が他の試薬と結合できるように開鎖される。例示的な試薬としては、一本鎖結合タンパク質、標識されていてもよい相補的オリゴヌクレオチド、または鎖に相補的なテールの一部が含まれ得る。ある態様では、テールは、DNA PAINTのためのドッキング部位またはハンドルを含む。いくつかの実施形態では、もう一方の鎖とのCas9/gRNA複合体は安定化され

40

50

る。いくつかの実施形態では、R P Aなどの一本鎖結合タンパク質またはオリゴヌクレオチドもしくはそのアナログ／模倣物が置換鎖に結合することにより、C a s 9／ガイドRNA複合体が他方の鎖と安定化され得る。いくつかの実施形態では、安定化効果は、天然二本鎖の再ジッピング（re-zipping）による競合の減少によるものである。

【0114】

P A M特異性が変化したC a s 9

いくつかの実施形態では、本発明は、核酸中の部位を標識または標的化する方法であって、（a）核酸を、ガイドRNAと非標準的P A M配列に隣接して結合するように変化したC a s 9タンパク質とを含む標識複合体に、複合体が核酸に結合する条件下で接触させるステップ、および（b）ステップ（a）の生成物を分析するステップを含む方法に関する。ある態様では、ステップ（a）とステップ（b）の間に少なくとも1つの洗浄ステップがあってもよく、g RNAの結合を促進するために、補助的な試薬が供給されてもよい。

10

【0115】

一般に、本明細書に記載の実施形態では、ガイドRNAおよびRNAは、当業者に周知の修飾されたRNAヌクレオチドを含み得る。一般に、本明細書に記載の実施形態では、ガイドRNAおよびRNAは、RNA／DNAキメラまたはRNA／PNAキメラを含み得る。いくつかの実施形態では、ガイドRNAまたはRNAは無細胞系で作製される。g RNAまたはRNAの作製方法は、当業者に周知のインビトロ転写および自動化された化学的RNA合成法を含む。いくつかの実施形態では、g RNAまたはC a sタンパク質または補助的タンパク質は、細胞系で発現され、無細胞系で精製される。いくつかの実施形態では、g RNAまたはRNAは、無細胞系中でC a sタンパク質または補助的タンパク質と複合体を形成する。

20

【0116】

以下の実施例は本開示の代表例として記載されるものである。本開示、図面、および添付の特許請求の範囲を考慮して、これらの実施形態およびその他の同等な実施形態が明らかになるので、これらの実施例は本開示の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。

【実施例】

【0117】

実施例 I

プロトコール

g RNA合成プロトコール：

P C Rアセンブリーを以下の通り行う。

【0118】

以下を含む反応ミックスを調製する。

- ・ 12 μ LのQ5 DNAポリメラーゼ 2×マスターミックス（NEB社）
- ・ 3 μ Lの10 μ M T7フォワードプライマー
- ・ 3 μ Lの10 μ M バーコードリバースプライマー
- ・ 3 μ Lの10 μ M S p . g RNA . s p l i 6 0（フォワード）
- ・ 3 μ Lの10 μ M g RNA . e n d（リバース）

40

【0119】

P C Rデバイスのサイクル条件

1. 98 $^{\circ}$ C、30秒
2. 98 $^{\circ}$ C、10秒
3. 52 $^{\circ}$ C、20秒
4. 72 $^{\circ}$ C、15秒
5. ステップ2から29サイクル繰り返す
6. 72 $^{\circ}$ C、2分
7. 4 $^{\circ}$ Cで維持

50

【0120】

スピンカラム（Zymo社）でDNAを精製する。通常、約1 μgのdsDNA鋳型が産生される。

【0121】

インビトロ転写（IVT）を以下の通り行う。

【0122】

以下を含む反応ミックスを調製する。

- ・ 5. 8 μl のRNase-Free水
- ・ 2. 5 μl AmplicScribe T7-Flash 10×Reaction Buffer（イルミナ社）
- ・ 1. 8 μl 100mM ATP
- ・ 1. 8 μl 100mM CTP（+ 2 μL Cy3-dUTP）
- ・ 1. 8 μl 100mM GTP
- ・ 1. 8 μl 100mM UTP
- ・ 2 μl 100mM DTT
- ・ 0. 5 μl RiboGuard RNase Inhibitor
- ・ 5 μl DNA鋳型
- ・ 2. 0 μl AmplicScribe T7-Flash Enzyme Solution

10

【0123】

修飾NTPを用いてガイドRNAを合成することもでき、その場合、以下の修飾が行われる。

- ・ 1：1モル比の修飾されるNTPと修飾されたNTPを加える（例えば、0. 9 μlのUTPと0. 9 μlのUTP-Cy3）。

20

【0124】

PCRデバイス中で37℃にて2～16時間インキュベートした後、4℃を維持する。スピンカラム（Zymo社）を用いてRNAを精製する。典型的には約100 μgのRNA（すなわち、バーコードgRNA）が産生される。

【0125】

Cas9-gRNA複合体アセンブリーのプロトコール

参照用のテールに単一のバーコードを有する1 μgのgRNAは、25 pmolのRNAとする。Cas9タンパク質およびgRNAを通常モル比1：1で混合して、Cas9-gRNA複合体を形成させる。野生型Cas9、ニックアーゼCas9、およびヌクレアーゼ欠損またはdead Cas9の複合体化にも同じ反応条件を用いることができる。野生型Cas9を用いる場合には、MgClを除いてもよく、その目的は切断を防ぐことである。発現用プラスミド、野生型Cas9、ヌクレアーゼ欠損Cas9、およびCas9ニックアーゼはAddgene社から入手可能である。プラスミドは、好適な宿主中で発現させることができ、タンパク質は、発現タンパク質中のHisタグの利用などの当該技術分野で公知の方法により精製することができる。より多くのgRNAが確実にCas9と複合体化するように、Cas9とgRNAをより高い比率（例えば、3：1）で用いることもできる。活性複合体は通常、37℃で15分間プレインキュベートすることにより形成される。反応バッファは様々であり得る。例示的なバッファーとしては、20mM

HEPES、100mM NaCl、5mM MgCl₂、0. 1mM EDTA、pH 6. 5；20mM Tris-HCl、100mM KCl、5mM MgCl₂、5%グリセロール、1mM DTT、pH 7. 5；および1×PBS、5mM MgCl₂、0. 5%Tween-20、pH 7. 0が挙げられる。活性複合体は、すぐに用いることもでき、4℃で数週間保存することもできる。

30

40

【0126】

Cas9-gRNA蛍光in situアッセイ：

このアッセイでは、試料は顕微鏡スライド（またはカバースリップスライド）に固定さ

50

れている。スライドは、コプリンジャー中でインキュベートしてもよく、反応体積をさらに最小限に抑えるためおよびプロセスを自動化するために、フローチャンバーまたはフローセル中でアセンブルしてもよい。反応は以下の順番で行われ、特に断りのない限り、スライドはコプリンジャー中でインキュベートされる（フローチャンバーについて、情報を括弧で示す）。1×PBSおよび0.5%Tween-20と共に2分間インキュベートする（フローチャンバーの2倍量で洗浄し、各洗浄間に30秒間インキュベートする）。1×PBSおよび0.5%トリトンX-100と共に5分間インキュベートする（フローチャンバーの2倍量で洗浄し、各洗浄間に2分間インキュベートする）。0.1N HClと5分間インキュベートする（フローチャンバーの2倍量で洗浄し、各洗浄間に2分間インキュベートする）。1×PBSおよび0.5%Tween-20と共に2分間インキュベートする（フローチャンバーの2倍量で洗浄し、各洗浄間に30秒間インキュベートする）。Cas9バッファー中で5分間インキュベートする（フローチャンバーの2倍量で洗浄し、各洗浄間に30秒間インキュベートする）。この時間を用いて、37℃のCas9バッファー中でCas9-gRNAを予め複合体化するか、または冷蔵された複合体を37℃に温めることができる。通常は、5μMのgRNAおよび5μMのCas9を、試料当たり25μL容積の中で複合体化させる。25μLのCas9-gRNA複合体を含むCas9バッファーを加え、湿度室で37℃にて4時間インキュベートする。あるいは、取外し可能なゴム接着剤で密封して37℃でインキュベートする。37℃でCas9バッファー中にて5分間のインキュベーションを2回行うことにより洗浄する（フローチャンバーの4倍量で洗浄し、各洗浄間に30秒間インキュベートする）。1×PBSおよび0.5%Tween-20と2分間インキュベートする（フローチャンバーの2倍量で洗浄し、各洗浄間に30秒間インキュベートする）。場合により、必要であれば、各試料に20μLの2×SSCおよび0.5%Tween-20に1μMオリゴプローブを加えることによりプロービングし、湿度室で15分間インキュベートする。あるいは、インキュベーション前に取外し可能なゴム接着剤で密封する。1×PBSおよび0.5%Tween-20中で2分間のインキュベーションを2回行うことにより洗浄する（フローチャンバーの4倍量で洗浄し、各洗浄間に30秒間インキュベートする）。10μLの褪色防止用顕微鏡封入剤およびDAPIでマウントし、マニキュア液（例えば、AntiFadeまたはVectashield）で密封する。スライドはすぐにイメージング可能であり、あるいは暗所で一週間保存することもできる。場合によっては、HClステップを省くことができる。

【0127】

フローセル

両面テープまたはシート（Adhesive Research社または3M社の）を用いて、目的の試料を含むカバーガラスまたはスライドと第2のカバーガラスまたはスライドとの間に挟まれた障壁を作ることにより、フローセルを作成することができる。フローセルを作成するためのシステムがIbidi社から市販されており、用いることができる（sticky-Slide V1^{0.4}またはsticky-Slide I Luer）。ここで、細胞、染色体、またはDNAが堆積されたスライドまたはカバーガラスをフローセルの粘着性部分に付着させて、基板上にフローセルを作成する。入口領域中へと手作業でピペティングし、出口領域中で毛細管作用により吸い取る（例えば、吸取り紙を使用する）ことにより、試薬をフローセル中へと流す。あるいは、流体を動かすための自動試薬流動交換システムおよびマルチウェイバルブ（multi-way valve）により試薬を流す。これは、シリンジポンプ、圧力駆動流、および吸引を用いて実現することができる。自動システムは、フローセルがローディングされる顕微鏡またはイメージング機器に組み込まれている。

【0128】

DNAの分子的コーミング（combining）

例えばゲルプラグ法を用いて細胞から抽出されたオスのゲノムDNA（プロメガ社またはノバジェン社）またはDNAを、ビニルシラン（7-オクテニルトリクロロシラン）で

コーティングされたカバーガラス上にコーミングする。これは、カバーガラス（例えば、 $22 \times 22 \text{ mm}$ ）を、カバーガラスの大部分をカバーする 0.5 M MES バッファー溶液（例えば、 $22 \times 22 \text{ mm}$ のカバーガラスに対して $1 \sim 1.5 \text{ ml}$ ）中に DNA を含む容器（*trough*）に浸漬し、 DNA 末端が表面コーティングに結合可能になり（通常は、 $1 \text{ 分} \sim 10 \text{ 分}$ ）、その後、容器からカバーガラスを引き出すことにより行われる。容器中の DNA の濃度は、所望の密度のコーミングされた DNA が得られるように調整することができる。例えば、 $0.5 \text{ ng} / \mu\text{L}$ までの濃度が、個々の伸展された DNA 分子を分解可能な適切な密度を与え得る。その後、カバーガラスは、一定の速度（例えば、 $300 \mu\text{m} / \text{s}$ ）で DNA 溶液から引き出され、カバーガラスを引き出す際の後退メニスカス（*receding meniscus*）の力により DNA を伸展させることができる。必要に応じて、その後、約 $10 \sim 20 \text{ ジュール} / \text{cm}^2$ の紫外線照射エネルギーを用いてカバーガラス上に DNA を架橋結合させる。必要に応じて、前述のようにカバーガラス上にフローセルを形成する。コーミングされた DNA は、コーミングプロセス中またはその後 YOYO-1 などの 1 または複数のインターカレーション色素を用いて染色することによって可視化することができる。 DNA 塩基対と YOYO-1 染色の比率 $5 : 1 \sim 10 : 1$ が通常用いられる。

10

【0129】

カバーガラス上の予め伸展された DNA への $\text{Cas9} / \text{gRNA}$ 結合

最初に、フローセル作成のためのコーミングされたゲノム DNA が挟まれたカバーガラスを、 $\text{PBS} + \text{Tween}$ および PBS で洗浄することにより水和する。必要に応じて、 Blockaid （ライフテクノロジーズ社）で基板をブロックする。必要に応じて、 Cas9 反応バッファーでフローセル全体を洗浄する。 $\text{Cas9} - \text{gRNA}$ を 37°C で予め複合体化させ、その後、フローセルに加え、 $30 \text{ 分} \sim 1 \text{ 時間}$ インキュベートする。反応バッファーなどのバッファーおよび $\text{PBS} + \text{Tween} 20$ および PBS で全体を洗浄することにより反応を停止させる。

20

【0130】

図 6 A および図 6 B で使用されているガイド RNA は、以下の、テールを有するセントロメア 16 の gRNA である。

【0131】

【化 2】

GACGCCUUCGUUGGAAACGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAUUUUUAAGGC
UAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUTCCTCTA
CCACCTACATCACTTATACATCTA

30

【0132】

テールへの蛍光標識プローブのハイブリダイゼーション

フローセルが水和されたままであるようにし、 $\text{Cas9} / \text{gRNA}$ が形成された後、 $200 \mu\text{l}$ のホルムアミド、 $20 \mu\text{l}$ の sds 、 $120 \mu\text{l}$ の blockaid 、 $40 \mu\text{l}$ の $20 \times \text{SSC}$ 、および $20 \mu\text{l}$ の水のハイブリダイゼーションバッファー中の、テールに対する DNA プローブを加えることにより複合体をイメージングする。

40

【0133】

テールのプロービングに用いた配列は、 $\text{TAGATGTATAA} + \text{GTGATGTAGGTGGTAGAGGA}$ である。

【0134】

これは 4°C で一晩置いてもよい。他のハイブリダイゼーション温度およびハイブリダイゼーションバッファー組成物も、プローブとテールのハイブリッドの熱安定性に応じて用いることができる。

【0135】

標識化は、 $\text{Atto} 647\text{N}$ 、 $\text{Atto} 655$ 、 $\text{Alexa} 647$ などの蛍光標識を用いて片方または両方の末端でなされ得る。適切な蛍光標識（例えば、 $\text{Atto} 6$

50

55) が用いられた場合、STORM方法により超分解能イメージングを行うことができる。

【0136】

テールへのプローブのハイブリダイゼーションおよびイメージング

ハイブリダイゼーションバッファー中のイメージング溶液にDNA PAINTイメージャープローブを加えて、超分解能に必要な確率論的なオンとオフのパターンを得る。テール上の配列に相補的な配列またはテールに結合するプローブ上の配列に相補的な、図6Aおよび図6Bおよび同様な実験で用いた、PAINT配列は、/5A1ex647N/TAGATGTATAAATAAATAAGGT/3A1exF647N、または/5ATT0647NN/TAGATGTATAAATAAATAA/3ATT0647NN/であった。

10

【0137】

イメージングは、全反射照明(Total Internal Reflection: TIRF)モードのニコン社のTIE倒立顕微鏡上で、633nm、640nm、または647nmのレーザー線およびCy3に適したフィルターブロックを用いて達成され、裏面入射型Andor Ixon X3 EMCCDカメラを用いて取り込まれる。

【0138】

超分解能イメージング

以下のイメージャー鎖であるP9イメージャー:ACCTTATTA、を用いてDNA PAINT法を行うことにより、図6Bに示されるような超分解能イメージングを行うことができる。これは、P9ハンドル(ドッキング配列)を含むテールに結合するか、P9ハンドル、すなわちTAAATAAGGT、を含むテールに既に結合しているプローブに結合する。DNA PAINTをイメージングするための好適なバッファーは、5mM Tris pH8、10mM MgCl₂、1mM EDTA pH8、および0.05% Tween-20である。ニコン社のNIS Elementソフトウェアを用いて15~30分間動画を撮影することができ、LabVIEWで書かれたDNA PAINTのImage Analysis画像解析コードを用いて超解像度画像を構築することができる(Jungmann et al Nano Lett., 2010, 10 (11), pp 4756-4761参照)。

20

【0139】

溶液中でのゲノムDNAへのCas9/gRNAの結合

30

(37℃で10分間プレインキュベートした)Cas9-gRNA複合体アセンブリーを、バッファー溶液の存在下でDNAに加え、37℃で1時間インキュベートする。必要に応じて、Cas9/gRNAが結合したDNAを精製する。その後、DNAの伸展が望まれる場合、反応液を0.5M MES溶液中に希釈し、gRNA/cas9複合体で修飾されたDNAをビニルシランカバーガラス表面上にコーミングする。図6Cでこのアプローチを用いた。

【0140】

複合体化したDNAの精製

用いるガイドRNAのサイズに応じて、複数の異なる精製方法を用いて標的DNA/gRNA/Cas9複合体を単離することができ、そのような方法としては、分子ふるい、アフィニティー精製(例えば、ストレプトアビジンビーズへのデスチオビオチンまたは切断可能なリンカーの結合の利用)、または透析膜が含まれる。

40

【0141】

Cas9ニック形成および標的シーケンシング

Cas9-gRNAが標的DNA上の特異的位置でdsDNA鋳型に結合する。標的DNAは天然ゲノムの形態であってよく、反応はインビボで行われる。標的DNAは、細胞中であってよく、あるいは、生物を表面に固定して、反応をin situで行う。これらの場合、ゲノムの空間的位置が保存されたままであることが好ましい。さらに、標的DNAは抽出されてもよく、反応はエクスピボで行われる。抽出された標的DNAは表面上または流体システム(例えば、ナノチャネル)中に固定化されてもよく、反応はエクスピ

50

ボで行われる。

【0142】

変異体ニッカーゼ（例えば、D10AまたはH840A変異のいずれかを有するCas9）を用いてgRNA/Cas9仲介ニック形成反応が行われる。図9参照。Cas9のRuvcドメインはD10A変異によって不活性化することができ、HNHドメインはH840A変異によって不活性化することができる。

【0143】

2つのニック形成機構の一方を用いることができ、1つはgRNAと塩基対形成するトップ鎖（top strand）、もう1つは置換される鎖であるボトム鎖（bottom strand）での機構である。D10A位の変異により、トップ鎖はニック形成されるが、ボトム鎖はニック形成されない。H840A位の変異により、ボトム鎖はニック形成されるが、トップ鎖はニック形成されない。プロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）の3bp上流でCas9（D10A）ニッカーゼによって切断が起こる。Cas9（H840A）切断はボトム鎖上の相補的位置で起こる。ゲノム中で多数出現する特異的な短い配列を認識するニックングエンドヌクレアーゼと比べて、gRNAは比較的長い認識配列でニック形成し、これはゲノム中で1度しか見出されないこともある。これは、ゲノム中の特異的固有配列の標的化に用いることができる。標的シーケンシングは以下のステップによって行うことができる。D10AニッカーゼまたはH840Aニッカーゼのいずれかを選択するステップ；シーケンシングする領域の近傍のガイドRNAを選択するステップ；gRNA/Cas9反応を行って、選択されたgRNAおよびCas9変異体と複合体を形成させるステップ；必要に応じて、Cas9/gRNA複合体を標的DNAから除去するステップ；適切なバッファー中へポリメラーゼおよび蛍光標識された可逆的ターミネーターヌクレオチドを加え、取込み、洗浄、および切断のシーケンシングサイクルを行うステップ。これにより標的位置をシーケンシングすることができる。

【0144】

いくつかの実施形態では、Cas9-gRNA複合体は、標的DNAからおおよび試料から完全に除去されてもよい。除去試薬は、界面活性剤（例えば、ドデシル硫酸ナトリウム）、有機化合物（例えば、尿素、塩化グアニジウム/チオシアナート）、アミド（例えば、ホルムアミド）、タンパク質分解酵素（例えば、プロテアーゼ）、物理的性質（例えば、温度）、またはこれらの組合せであってもよい。

【0145】

Cas9（D10A）を用いる場合、シーケンシングはPAM遺伝子座を通して進行し、遺伝子座の下流に進行し、PAMを含む鎖をシーケンシングする。Cas9（H840A）を用いる場合、シーケンシングはPAM遺伝子座の上流方向に進行し、PAM配列NGGに相補的な鎖をシーケンシングする。ガイドRNA配列のシーケンシングを回避するために、D10A変異体を選択することができる。目的の領域上に複数のガイドを選択することができる。

【0146】

合成による逐次シーケンシングを行う場合、取り込まれた各ヌクレオチドが可逆的ターミネーターを有し、各標的位置での1個のヌクレオチドの取込みの結果が検出され（好ましくは、TIRF照射およびCCD検出器またはCMOS検出器を用いて）、その後、ターミネーターおよび標識が除去され、各標的位置での次の塩基のためのサイクルが繰り返される。

【0147】

種々のイルミナ社のSBSキット（例えば、SBS Kit 2）をシーケンシングに用いることができ、以下の順番で試薬を添加してイメージングする。Universal Sequencing Buffer；Incorporation Mastermix；Universal Sequencing Buffer；IMAGING TARGETED LOCI；Universal Scan Mix；Cleavage Reagent Mastermix；Cleavage Wash Mix。イルミ

ナ社のキットの詳細はワールドワイドウェブサイトsupport.illumina.com/downloads/hiseq-rapid-sbs-kit-v2-reagent-prep-guide-15058772.htmlからダウンロードすることができる。ヌクレオチド上の4つの色素のうちの2つに532nmのレーザー、色素の他方2つに660nmのレーザーを用いることによりイメージングを行う。各レーザーにより励起される2つの各色素は、特異的なエミッションフィルターおよび各色素の特徴を決定するように設計されたアルゴリズムを用いることにより区別される。

【0148】

Genome Analyzer IIXなど、複数の異なるイルミナ社シーケンシング機器の1つを用いることができる。イルミナ社のフローセルホルダーならびに入口ポートおよび出口ポートと適合するフローセルフットプリントを用いることができる。あるいは、高開口数対物レンズ、レーザー、CCDカメラ、フルオロフォア選択的フィルター、およびシリンジポンプに基づく試薬交換システムまたは圧力駆動試薬交換システム、および加熱されたステージを具備した倒立顕微鏡を備えた自作のシステムを用いることができる。この自作のシステムは、イルミナ社が提供する以外の他のヌクレオチド／色素の組合せに適応させることができる。

【0149】

シーケンシングがリアルタイム反応（例えば、PacBioまたはStarlightシーケンシング）としてなされる場合、ヌクレオチドが取り込まれると、天然の脱離基である末端リン酸においてヌクレオチドは標識される。このような反応はCCDカメラまたはCMOSカメラで連続的にモニタリングされる。

【0150】

伸展DNA二本鎖上での標的シーケンシング

配列の線的な位置が保存されるように、（例えば、ゲルプラグ中での抽出を行うことにより）ゲノムDNAを細胞から抽出して、長い長さで維持することができる。これは、ゲノム中の配列の構成決定に重要な有用性がある。本明細書に記載のALK、BRCA、FSHM、およびHER2の例が示すように、ゲノムの構成中の構造の多様性（SV）が疾患につながり得る。しかし、白血病におけるBcr-ABLの転座などの特定のSVはGleevecなどの薬物によって標的化することができ、したがって、白血病患者がこの薬物によって標的化可能な転座を有するかどうかを決定することは重要である。

【0151】

好ましくは、シーケンシングは、例えば分子コーミングを用いて伸展DNA上でなされ、その結果、標的配列のゲノム中の直線状の構成（linear organization）を可視化することができる。標的領域は、目的の位置で結合するように設計されたgRNAおよびニック形成変異体Cas9を用い、ニック形成反応を行い、その後、ニックから伸長させることにより選択され得る。ニック形成反応は、DNAのコーミングの前に溶液中で行うことができる。あるいは、ニック形成反応は、DNAがコーミングされた後、コーミングされたDNA上でフローセルを用いて行うことができる。シーケンシング反応は、最初に取り込みバッファーによりDNAを水和およびプレコンディショニングし、その後、フローセル中にシーケンシング試薬を流すことにより進行する。その結果、標的領域の配列だけでなく、ゲノム中におけるその位置も知ることができる。これが重要である場合の例としては、gRNAに基づくシーケンシングの標的化が、転座のホットスポットであるゲノム中の配列を対象としているが、これがゲノム中のどこに転座しているかおよびこれがどの配列と融合しているかが未知の場合が挙げられる。

【0152】

in situ 標的シーケンシング

本明細書に記載の方法は、細胞または核内のゲノムの一部の空間的位置を決定し、そのような空間的位置が遺伝子制御およびゲノム機能にどのように影響するかを決定することに関する。特異的ゲノム配列の細胞中での空間的位置は、それらの配列に特異的なgRNAを用いて標的化することができる。固定された細胞中のゲノムDNA上でgRNA/Cas9仲介ニックが形成され、in situでゲノムDNAに対して蛍光に基づくシー

ケンシングが行われる。Lee et al, 2015: (Nat Protoc. 2015, 10(3):442-58)に記載するように、ガラス底のディッシュ上で細胞を成長させるか、または組織切片を当該技術分野で公知の方法によりマウントする。細胞は固定される（例えば、10%ホルマリンのPBS溶液を25℃で15分または100%メタノールを-20℃で20分使用）。PBSおよびトリトンX-100を用いてならびにPBSのみを用いて洗浄を行う。必要に応じて、尿素を加えて、ニック形成されたDNAからgRNA/Cas9を除去する。必要に応じて、RNaseを用いてRNAを除去する。

【0153】

細胞内のゲノムDNAの単一分子について直接シーケンシングを行うことができる。ポリメラーゼを用いてニック部位でヌクレオチドを取り込ませる。好ましくは、ヌクレオチドは、高い量子収率をもたらすフルオロフォアを用いた蛍光標識、例えばCy3Bまたは複数標識ヌクレオチドを有する。当該技術分野で公知の種々のストリンジェンシーの洗浄を用いて、非取込みヌクレオチドからのシグナルを低減する。単一分子イメージング法によりイメージングを行うが、細胞の一部だけが表面と接触するので、TIRFイメージングは取込みシグナルのサブフラクションにしかアクセスできない。共焦点顕微鏡またはライトシート顕微鏡を用いて、細胞および組織内の3次元空間上に分布しているシグナルにアクセスすることができる。特にシグナルが深い位置にある場合、多光子または二光子レーザー顕微鏡を用いてシグナルにアクセスする。そのような方法はバックグラウンドシグナルの低減にも有効である。

【0154】

PBS洗浄後、シーケンシング反応ミックスを加える前に、シーケンシング反応で用いるバッファーを試料のコンディショニングに用いる。使用されるプライマー、イメージング設備、および温度調節が利用可能かどうかに応じて、SOLIDケミストリー、Cyclicケミストリー、SBLケミストリー、または合成によるシーケンシングケミストリー、例えばイルミナ社のシーケンシングまたはLaserGen社のシーケンシングのいずれかが、ヌクレオチドの取込みならびに標識およびターミネーターの切断に適用される。各取込みステップの後、画像が撮られる。画像は処理されて、断続的シグナル(punctate signal)が生成する。各連続サイクルからの画像が記録される。各画像に基づいてベースコール(base call)が作成され、ベースコールがスタックされて各焦点の配列リードが提供される。多くの記録画像で同時に見られた配列をリード構築プロセスに含めるだけで、非特異的シグナルをフィルタリング除去(filter out)することができる。Bowtie 1.0または他の配列アラインメントアルゴリズムを用いてリードを参照に整理させ、ノイズまたは目的のものではないオフターゲット配列をさらにフィルタリング除去する。シーケンシングリードの別個の焦点を可視化することにより、細胞内の標的配列の空間的局在の情報が得られる。標的位置を標識するだけでなく、シーケンシングは、目的の領域内の配列変異(variant)およびその空間的位置を明らかにする可能性を有する。

【0155】

核酸重合体に沿ったgRNA/Cas9複合体のナノポア分析

SiN膜を作製し、透過型電子顕微鏡(TEM)を用いて直径20nmのナノポアをドリルする(Janssen, X. J. A.; Jonsson, M. P.; Plesa, C.; Soni, G. V.; Dekker C.; Dekker, N. H. Nanotechnology 2012, 23 (47), 475302)。その後、膜をポリジメチルシロキサン(PDMS)の層でペイントして、静電容量を低減し、シグナル・ノイズ比を改善する。膜によって隔てられた上部および底部のリザーバーを含むフローセル中に膜をマウントし、その後、2つのリザーバーに1M KCl、10mM Tris、1mM EDTA、pH8を満たす。核酸重合体は上部リザーバーに加えられ、電圧が上部リザーバー(-ve)と底部リザーバー(+ve)の間に印加され、ポアを通る実質的に線状の電気泳動的に駆動される核酸重合体の輸送が可能になる。電流は、Axopatch 200B増幅器およびDigidata 1322A DAQデジタイザーを備えたイオンチャンネル記録システムを用いて記録される。記録は、Transalyzer Matlabパッケージを用いて分析される(Plesa, C.; Dekker, C. Nanotechnology 2

015, 26 (8), 084003参照)。データは、核酸重合体がナノポアに入る際の電流遮断の増大、さらにその後の、gRNA/Cas9結合領域がポアの狭いくびれを通過する際の遮断の断続的増大について分析される。

【0156】

実施例 I I

Her2/Erbb2診断のためのCas9-gRNA複合体の作成

Her2 (Human Genome Organization Gene Nomenclature CommitteeによるErbb2としても知られる) 遺伝子配列が、種々のオンラインリポジトリ、例えばNCBIワールドワイドウェブサイトncbi.nlm.nih.gov/gene/2064で入手可能である。

10

【0157】

Her2配列を分析してdsDNAに沿ったPAMモチーフを見出す。好ましいモチーフは5'-GGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGG-3' (配列番号: 12) である。5' GGはT7 RNAポリメラーゼによる最適なRNA合成を提供する。3' N GGはCas9によって認識されるPAM配列である。間の17塩基のNは標的配列のものであり、高い特異性を提供する。方法は遺伝子変異 (すなわち、アイソフォーム) 間を区別できるので、エクソームが好ましい。

【0158】

標的配列を見出すための複数のプログラムがインターネット上で無料利用可能である。図10は、CHOPCHOPを用いた場合に提供される出力のダイアグラムを示す図である (Tessa G. Montague; Jose M. Cruz; James A. Gagnon; George M. Church; Eivind Valen. (2014). CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. Nucleic Acids Res. 42. W401-W407参照)。

20

【0159】

Her2の標的配列の部分的リストを表1に示す。この表はさらに、ヒトゲノム上の標的の位置、エキソンの番号、DNA鎖 (すなわち、センス (+) 対アンチセンス (-))、およびゲノム中のどこかにある二次的標的 (すなわち、ミスマッチ、MM) の潜在的数に関する情報を含む。

【0160】

【表 1】

表 1

	標的配列	ゲノム位置	エキソン	鎖	MM
1	GGGCGAGGAGGAGCCCCAGCGG	chr17:39700259	1	-	0
2	GGTGGCGGAGCATGTCCAGGTGG	chr17:39707039	2	-	0
3	GGTGGGTCTCGGGACTGGCAGGG	chr17:39707021	2	-	0
4	GGCAGCCCTGGTAGAGGTGGCGG	chr17:39707054	2	-	0
5	GGAGGCCCTGTGACAGGGGTGG	chr17:39708472	3	-	0
6	GGGCCTCCCCAGGAGGCCTGCGG	chr17:39708487	3	+	0
7	GGCCTCCCCAGGAGGCCTGCGGG	chr17:39708488	3	+	0
8	GGTGGCTGTGCCCCTGCAAGGG	chr17:39710106	6	+	0
9	GGGCAGTGGCCCCTTGCAGCGGG	chr17:39710116	6	-	0
10	GGGACAGGCAGTCACACAGCTGG	chr17:39710458	7	-	0
11	GGTTGTGCAGGGGGCAGACGAGG	chr17:39711962	8	-	0
12	GGGCATGGAGCACTTGCAGAGAG	chr17:39712335	9	+	0
13	GGAGCACTTGCAGAGAGGTGAGGG	chr17:39712341	9	+	0
14	GGAGCTGCTCTGGCTGGAGCGGG	chr17:39715307	10	-	0
15	GGAAGACGCTGAGGTCAGGCAGG	chr17:39715477	11	-	0
16	GGTGGGTGTTATGGTGGATGAGG	chr17:39715824	12	-	0
17	GGCTGGGGCTGCGCTCACTGAGG	chr17:39715781	12	+	0
18	GGTGCGGGTTCCGAAAGAGCTGG	chr17:39715875	12	-	0
19	GGCTGGGCATCAGCTGGCTGGGG	chr17:39715766	12	+	0
20	GGGCTGGGCATCAGCTGGCTGGG	chr17:39715765	12	+	0
21	GGAGGAATGCCGAGTACTGCAGG	chr17:39716410	13	+	0
22	GGCATTCCCTCCACGCACTCCTGG	chr17:39716398	13	-	0
23	GGCTGACACTCAGGGTGGCACGG	chr17:39716552	14	-	0
24	GGTCAGGTTTCACACCGCTGGGG	chr17:39717382	15	-	0
25	GGGCAGCGGGCCACGCAGAAGGG	chr17:39717362	15	-	0

10

20

30

【 0 1 6 1 】

【表 2】

表 1 (続き)

	標的配列	ゲノム位置	エキソン	鎖	MM
26	GGGGCAGCGGGCCACGCAGAAGG	chr17:39717363	15	-	0
27	GGTTGGCATTCTGCTGGTCTGTGG	chr17:39723346	17	+	0
28	GGAGAATGTGAAAATTCCAGTGG	chr17:39723932	19	+	0
29	GGGCATCTGCCTGACATCCACGG	chr17:39724776	20	+	0
30	GGATGTGCGGCTCGTACACAGGG	chr17:39725066	21	+	0
31	GGTGAACCGCCGGCGGAGAATGG	chr17:39725355	22	-	0
32	GGTCAGGGATCTCCCGGGCTGGG	chr17:39725759	23	-	0
33	GGATGACCACAAAGCGCTGGGGG	chr17:39726635	24	-	0
34	GGATGATTGACTCTGAATGTCTGG	chr17:39726565	24	+	0
35	GGTGTCTGAATTCTCCCGCATGG	chr17:39726605	24	+	0
36	GGACAGAAGAAGCCCTGCTGGGG	chr17:39726920	25	-	0
37	GGGGGACCTGGTGGATGCTGAGG	chr17:39726886	25	+	0
38	GGACGATGACATGGGGGACCTGG	chr17:39726874	25	+	0
39	GGTGGATGCTGAGGAGTATCTGG	chr17:39726895	25	+	0
40	GGCACCGCAGCTCATCTACCAGG	chr17:39726981	25	+	0
41	GGAGTATCTGGTACCCAGCAGG	chr17:39726907	25	+	0
42	GGACCATGCCCCAGCGCCCGGG	chr17:39726952	25	-	0
43	GGGTGCCAGTGGAGACCTGGGGG	chr17:39727344	26	-	0
44	GGCGGTGGGGACCTGACACTAGG	chr17:39727298	26	+	0
45	GGGGAGGCTTTGCAGCCCCTTGG	chr17:39727419	26	-	0
46	GGTCCTGGTCCCAGTAATAGAGG	chr17:39727933	27	-	0
47	GGGACCAGGACCCACCAGAGCGG	chr17:39727944	27	+	0
48	GGTGTCCCTTTGAAGGTGCTGGG	chr17:39727976	27	-	0
49	GGGGGCTGGGGCCGAACATCTGG	chr17:39727703	27	-	0
50	GGCCCAAGACTCTCTCCCCAGGG	chr17:39727782	27	+	0

10

20

30

【0162】

遺伝子の外側の領域も同様に容易に標的化できることに留意されたい。1 kb 末端から、30 kb、数十もしくは数百キロ塩基、または数メガ塩基の全長遺伝子であり得る、エキソンおよびイントロンなどの特異的領域が標的化される。

【0163】

配列標的は gRNA を作製するための鋳型として用いられる。これは、gRNA スキャフォールドに各標的配列を加えることを含む。アセンブリーモデルのダイアグラムを以下に示す。このアセンブリーは、high-fidelity DNA ポリメラーゼを用いた PCR を用いてなされる（融解温度（ T_m ）が記載されている）。簡潔に述べると、オリゴヌクレオチドを、業者から入手するか、研究室で合成する。2つのユニバーサルオリゴヌクレオチド、すなわち、T7 RNA ポリメラーゼ認識モチーフの一部をさらに含むフォワード PCR プライマーである Fwd-T7-gRNA；およびユニバーサル gRNA スキャフォールドである gRNA-split60 である。さらに、2つの可変オリゴヌクレオチド、すなわち、目的の標的に特異的な配列である Sp-gRNA-split60；およびマルチプレックス鎖検出のためのバーコードハンドルをさらに含むリバーズ PCR プライマーである Rev-B1-gRNA-18 である。

40

【0164】

この設計は、費用効率の高い gRNA の合成およびアセンブリーを可能にするが、ホスホラミダイトケミストリーにより合成されるオリゴヌクレオチドの最適な配列精度を実現

50

し、標識された実体がドッキングできるコードである様々な種類のバーコードハンドルを付加することができる。DNA 鋳型は、オリゴヌクレオチドアレイ合成装置などを用いて種々のスケールで合成することができ、または商業的に入手することができる。鋳型は、PCR によって増幅および再増幅して鋳型を生成および永続させることができ、これは新規合成より費用対効果が高い。

【0165】

図 11 に示されている例示的な PCR アセンブリーにかかる時間は 1 時間未満であり得る。PCR に続けて、鋳型 DNA に T7 RNA ポリメラーゼミックスを加えることによりインビトロ転写 (IVT) によって gRNA が合成される。この場合、より長い反応により、より多くの gRNA が得られる。使用回数の限定された Cas9-gRNA 迅速作製キットを 30 分以内に作製することができる。16 時間の反応進行で大量に作製することができる。IVT 後、DNA 鋳型を DNase I 処理で分解し、市販のカラム精製キットを用いることによりまたは酢酸アンモニウム存在下でのエタノール沈殿により、RNA を精製する。

【0166】

その後、バーコード化された gRNA をマグネシウムイオン存在下で Cas9 タンパク質と 1:1 の比率で複合体化させて Cas9-gRNA 複合体を形成させる。その後、試薬が用いられ得る。バーコードの解読を容易化するためのバーコードに結合する標識オリゴヌクレオチドである検出プローブもこの段階で加えてもよく、これは下流でのより速いハイブリダイゼーション検出法を可能にする。その決定は予想されるシグナル・ノイズ比に基づいてなされる。例えば、低いノイズが予想される場合（例えば、顕微鏡スライドの表面の染色体スプレッド上での Her2 の検出）、Cas9-gRNA-標識キットを、単に試料に加えて 37℃ で反応させればよい。未反応の複合体を洗浄し、試料をイメージングすることができる。あるキットは、遺伝子座をプロービングするのに必要な全ての Cas9-gRNA 複合体の集合 (ensemble) である。ある Cas9-gRNA-標識キットは、全ての予め標識された Cas9-gRNA の集合である。

【0167】

マルチプレックス検出のための Cas9-gRNA をコードするための例

1 または複数のコードまたはバーコードハンドル（プローブのドッキング部位）が gRNA に付加され得る。原理は、DNA 試料に会合した Cas9-gRNA 複合体のアイデンティティを決定することである。これは、gRNA ハンドルに特異的な検出可能な「デコーダー」プローブをハイブリダイズさせることによりなされる。gRNA ハンドルは、1 または複数のバーコードを含み得、バーコードは種々の方法で配置され得、例えば連続的にまたは互いに部分的に重複してスタッキングされる。後者により、マルチプレックスバーコードの全体的な長さの短縮が可能になり、所与の gRNA ハンドル長での多重化能力 (multiplexing capability) を向上させる。

【0168】

多重化能力は、バーコードの数に比例し、バーコードの組合せの数、すなわち、 $nCr = r(n+r-1)! / r!(n-1)!$ （式中、 n はバーコードの数であり、 r はバーコードが読まれるイベントの数である）に等しい。例えば、2 個のバーコード B1 および B2 を用いると、 $C=1$ および $P=2$ が得られ、合計 3 個のコードとなる (B1B1、B1B2、B2B2)。3 個のバーコードを用いると、10 個のコードが得られる。たった 5 個のバーコードで 126 個のコードを作製することができるが、10 個のバーコードにより合計 92378 個のコードが提供され、これはエクソームの調査に十分である。

【0169】

本明細書に記載のコード方法は以下に関する。遺伝子座 1 個につき 1 個のコードを割り当てることができ、これにより、単一アッセイにおいて複数の標的を同定することができる。所与の遺伝子座についてアイソフォーム 1 個につき 1 個のコードを割り当てることができ、これは多様性 (variation) の同定を可能にする。1 個の所与の遺伝子座に 2 個のコードを割り当てることができ、これにより所与の標的にシグナルアイデンティティの

共局在がもたらされ、標的アイデンティティの信頼度を向上させることができる。これは、バックグラウンドの高い試料の場合に利点となり、その場合、アッセイは同じ遺伝子座で両方のシグナルが検出された場合のみ陽性となる。1個の所与の遺伝子座に対して3個以上のコードを割り当てることができ、これも共局在を可能にするが、同定を改善し且つ分解能を向上させる特徴(signature)を提供する。例えば、2個の遺伝子座を2セットのC a s 9 - g R N Aで認識することができ、1番目の遺伝子座はバーコードB 1 B 2およびB 1 B 3でコードされ、2番目の遺伝子座はバーコードB 1 B 3およびB 1 B 4でコードされる。共通するB 1は、遺伝子座全体にわたる容易に検出可能なシグナルを提供する。より特異的にシグナルの位置にフォーカスすることができ、遺伝子座1に対する残りのバーコードB 2 B 3および遺伝子座2に対するB 3 B 4を検出することができる。

10

【0170】

ヒトゲノム中に2個以上存在しない12ヌクレオチド長配列のリストから作成した5個のバーコードのリストを表2に示す。

【0171】

【表3】

表2

バーコード	配列
B1	CGTCGATTACCA
B2	CCATACTCGTCG
B3	TCGATAGTACGT
B4	CGTACTGAACGA
B5	CGAAGTACTACG
B6	TCGTTACGACCA
B7	CCAGACGAATCG
B8	TCGAATAGTCGT
B9	CGTAACTAACGA
B10	CGAACAATCGTA

20

30

【0172】

12塩基のバーコードサイズは、様々な長さおよび融解温度の種々のプローブの設計を可能にするのに十分である。例えば、10～12マーのプローブは、特定のイオン濃度下(例えば、5 mM MgCl₂)でより安定な相互作用が可能であり、一方、依然として変性剤(例えば、50%ホルムアミド)を用いて除去可能である。8～9マーのプローブは、Jungmann R, Avendano MS, Woehrstein JB, Dai M, Shih WM, Yin P. Multiplexed 3D cellular super-resolution imaging with DNA-PAINT and Exchange-PAINT. Nat Metho ds. 2014 Mar;11(3):313-8)に記載のDNA-PAINT技術を用いた超分解能イメージングの実施を可能にする。

40

【0173】

バーコード特異的プローブは多くの種類のものであり得、アッセイに適応させることができる。例えば、プローブは、配列に対するオリゴヌクレオチド相補体であり得る。その他の例では、プローブは、パッドロックプローブのような、プローブの1つの領域がバーコードにハイブリダイズし、1または複数の領域が第2のプローブセットのための補助的ハイブリダイゼーションに役立つ、環状ssDNA鋳型からなっている。その後、環状プローブはローリングサークル増幅を用いて増幅されてもよく、これによりシグナル強度が高められる。その他の例では、ハイブリダイゼーションプローブは線状であり、二次プローブのための部位を含み、これはさらに二次または三次プローブなどのための部位

50

を含み、多分岐プローブ (hyperbranched probe) の自己アセンブリーを可能にし、これによりシグナル強度が高められる。ここで説明したプローブのほとんどは蛍光標識されるが、その他の例では、それらのプローブを、発色検出を可能にする分子に結合させ、例えば高密度の金ナノ粒子であれば、検出は比色検出であってもよく、さらに、核中の特異的領域への局在が視覚的に確認される。

【0174】

位置決めRGBコード (Locational RGB code) の例が図7に示されており、BRCA1再編成を蛍光バーコード化するためのgRNAを列挙する表3に示されているように、記載された色スキームに従ってガイドRNAテールがバーコード化される。Rは赤、Gは緑、Bは青である。バーコードは、予想される一連の (sequential) 色パターンを形成するように分けられている。このスキームでは、各バーコードが色と関連付けられ、すなわち3個のバーコード配列が作成される必要があり、その後、これらは色コードに従って組み合わせられる。例えば、gRNAコードがRの場合、バーコードRのみがgRNAテールに付加されなければならない、gRNAコードがRGBの場合、gRNAテールで3個のバーコード全てが組み合わせられる必要がある。バーコードは、それらのそれぞれの蛍光プローブの添加により検出され、実際の一連の色パターンが明らかになる。予想されない全てのパターンがゲノム再編成として同定される。

【0175】

【表 4】

表 3

名前	位置	位置決め		折り紙コード	
		コード	スポット 1	スポット 2	スポット 3
gRNA.BRCA1.1	5	R	RG	RGB	RG
gRNA.BRCA1.2	177	R	RG	RGB	RB
gRNA.BRCA1.3	317	R	RG	RGB	BG
gRNA.BRCA1.4	460	R	RG	RGB	R
gRNA.BRCA1.5	585	R	RG	RGB	G
gRNA.BRCA1.6	610	R	RG	RGB	B
gRNA.BRCA1.7	730	R	RG	RB	RGB
gRNA.BRCA1.8	738	R	RG	RB	RG
gRNA.BRCA1.9	792	R	RG	RB	BG
gRNA.BRCA1.10	827	R	RG	RB	R
gRNA.BRCA1.11	881	R	RG	RB	G
gRNA.BRCA1.12	906	R	RG	RB	B
gRNA.BRCA1.13	960	R	RG	BG	RGB
gRNA.BRCA1.14	1,048	R	RG	BG	RG
gRNA.BRCA1.15	1,220	R	RG	BG	RB
gRNA.BRCA1.16	1,310	R	RG	BG	R
gRNA.BRCA1.17	1,337	R	RG	BG	G
gRNA.BRCA1.18	1,403	R	RG	BG	B
gRNA.BRCA1.19	1,410	R	RG	R	RGB
gRNA.BRCA1.20	1,446	R	RG	R	RG
gRNA.BRCA1.21	1,459	R	RG	R	RB
gRNA.BRCA1.22	1,509	R	RG	R	BG
gRNA.BRCA1.23	1,561	R	RG	R	G
gRNA.BRCA1.24	1,647	R	RG	R	B
gRNA.BRCA1.25	1,667	R	RG	G	RGB
gRNA.BRCA1.26	1,675	R	RG	G	RG
gRNA.BRCA1.27	1,813	R	RG	G	RB
gRNA.BRCA1.28	2,118	R	RG	G	BG
gRNA.BRCA1.29	2,119	R	RG	G	R
gRNA.BRCA1.30	2,120	R	RG	B	RGB

10

20

30

【 0 1 7 6 】

【表 5】

表 3 (続き)

名前	位置	位置決め		折り紙コード	
		コード	スポット 1	スポット 2	スポット 3
gRNA.BRCA1.31	2,212	R	RG	B	RG
gRNA.BRCA1.32	2,304	R	RG	B	RB
gRNA.BRCA1.33	2,372	R	RG	B	BG
gRNA.BRCA1.34	2,533	R	RB	RGB	RG
gRNA.BRCA1.35	2,589	R	RB	RGB	RB
gRNA.BRCA1.36	2,609	R	RB	RGB	BG
gRNA.BRCA1.37	2,662	R	RB	RGB	R
gRNA.BRCA1.38	2,800	R	RB	RGB	G
gRNA.BRCA1.39	2,844	R	RB	RGB	B
gRNA.BRCA1.40	2,917	R	RB	RG	RGB
gRNA.BRCA1.41	2,951	R	RB	RG	RB
gRNA.BRCA1.42	3,012	R	RB	RG	BG
gRNA.BRCA1.43	3,110	R	RB	RG	R
gRNA.BRCA1.44	3,111	R	RB	RG	G
gRNA.BRCA1.45	3,112	R	RB	RG	B
gRNA.BRCA1.46	3,132	R	RB	BG	RGB
gRNA.BRCA1.47	3,333	R	RB	BG	RG
gRNA.BRCA1.48	3,362	R	RB	BG	RB
gRNA.BRCA1.49	3,363	R	RB	BG	R
gRNA.BRCA1.50	3,399	R	RB	BG	G
gRNA.BRCA1.51	3,877	R	RB	BG	B
gRNA.BRCA1.52	3,899	R	RB	R	RGB
gRNA.BRCA1.53	4,168	R	RB	R	RG
gRNA.BRCA1.54	4,174	R	RB	R	RB
gRNA.BRCA1.55	4,200	R	RB	R	BG
gRNA.BRCA1.56	4,401	R	RB	R	G
gRNA.BRCA1.57	4,408	R	RB	R	B
gRNA.BRCA1.58	4,422	R	RB	G	RGB
gRNA.BRCA1.59	4,453	R	RB	G	RG
gRNA.BRCA1.60	4,488	R	RB	G	RB

10

20

30

【 0 1 7 7 】

【表 6】

表 3 (続き)

名前	位置	位置決め		折り紙コード	
		コード	スポット 1	スポット 2	スポット 3
gRNA.BRCA1.61	4,489	R	RB	G	BG
gRNA.BRCA1.62	4,528	R	RB	G	R
gRNA.BRCA1.63	4,691	R	RB	G	B
gRNA.BRCA1.64	4,752	R	RB	B	RGB
gRNA.BRCA1.65	4,777	R	RB	B	RG
gRNA.BRCA1.66	4,831	R	RB	B	RB
gRNA.BRCA1.67	4,919	R	RB	B	BG
gRNA.BRCA1.68	4,955	R	RB	B	R
gRNA.BRCA1.69	5,016	R	RB	B	G
gRNA.BRCA1.70	5,123	R	BG	RGB	RG
gRNA.BRCA1.71	5,146	R	BG	RGB	RB
gRNA.BRCA1.72	5,191	R	BG	RGB	BG
gRNA.BRCA1.73	5,282	R	BG	RGB	R
gRNA.BRCA1.74	5,448	R	BG	RGB	G
gRNA.BRCA1.75	5,473	R	BG	RGB	B
gRNA.BRCA1.76	5,675	R	BG	RG	RGB
gRNA.BRCA1.77	5,774	R	BG	RG	RB
gRNA.BRCA1.78	5,808	R	BG	RG	BG
gRNA.BRCA1.79	5,843	R	BG	RG	R
gRNA.BRCA1.80	5,958	R	BG	RG	G
gRNA.BRCA1.81	6,492	R	BG	RG	B
gRNA.BRCA1.82	6,493	R	BG	RB	RGB
gRNA.BRCA1.83	6,642	R	BG	RB	RG
gRNA.BRCA1.84	6,903	R	BG	RB	BG
gRNA.BRCA1.85	6,996	R	BG	RB	R
gRNA.BRCA1.86	7,027	R	BG	RB	G
gRNA.BRCA1.87	7,347	R	BG	RB	B
gRNA.BRCA1.88	7,431	R	BG	R	RGB
gRNA.BRCA1.89	7,444	R	BG	R	RG
gRNA.BRCA1.90	7,453	R	BG	R	RB

10

20

30

【 0 1 7 8 】

【表 7】

表 3 (続き)

名前	位置	位置決め		折り紙コード	
		コード	スポット 1	スポット 2	スポット 3
gRNA.BRCA1.91	7,474	R	BG	R	BG
gRNA.BRCA1.92	7,479	R	BG	R	G
gRNA.BRCA1.93	7,489	R	BG	R	B
gRNA.BRCA1.94	7,490	R	BG	G	RGB
gRNA.BRCA1.95	7,510	R	BG	G	RG
gRNA.BRCA1.96	7,511	R	BG	G	RB
gRNA.BRCA1.97	7,720	R	BG	G	BG
gRNA.BRCA1.98	7,721	R	BG	G	R
gRNA.BRCA1.99	7,997	R	BG	B	RGB
gRNA.BRCA1.100	8,022	R	BG	B	RG
gRNA.BRCA1.101	8,200	R	BG	B	RB
gRNA.BRCA1.102	8,258	R	BG	B	BG
gRNA.BRCA1.103	8,279	R	BG	B	R
gRNA.BRCA1.104	8,380	R	R	RGB	RG
gRNA.BRCA1.105	8,544	R	R	RGB	RB
gRNA.BRCA1.106	8,556	R	R	RGB	BG
gRNA.BRCA1.107	8,702	G	R	RGB	R
gRNA.BRCA1.108	8,859	G	R	RGB	G
gRNA.BRCA1.109	8,990	G	R	RG	RGB
gRNA.BRCA1.110	9,079	G	R	RG	RB
gRNA.BRCA1.111	9,080	G	R	RG	BG
gRNA.BRCA1.112	9,315	G	R	RG	R
gRNA.BRCA1.113	9,339	G	R	RG	G
gRNA.BRCA1.114	9,407	G	R	RG	B
gRNA.BRCA1.115	9,539	G	R	RB	RGB
gRNA.BRCA1.116	9,814	G	R	RB	RG
gRNA.BRCA1.117	9,835	G	R	RB	BG
gRNA.BRCA1.118	10,035	G	R	RB	R
gRNA.BRCA1.119	10,047	G	R	RB	G
gRNA.BRCA1.120	10,107	G	R	RB	B

10

20

30

【 0 1 7 9 】

【表 8】

表 3 (続き)

名前	位置	位置決め		折り紙コード	
		コード	スポット 1	スポット 2	スポット 3
gRNA.BRCA1.121	10,152	G	R	BG	RGB
gRNA.BRCA1.122	10,201	G	R	BG	RG
gRNA.BRCA1.123	10,303	G	R	BG	RB
gRNA.BRCA1.124	10,478	G	R	BG	R
gRNA.BRCA1.125	10,545	G	R	BG	G
gRNA.BRCA1.126	10,548	G	R	BG	B
gRNA.BRCA1.127	10,549	G	R	G	RGB
gRNA.BRCA1.128	10,551	G	R	G	RG
gRNA.BRCA1.129	10,760	G	R	G	RB
gRNA.BRCA1.130	10,866	G	R	G	BG
gRNA.BRCA1.131	10,874	G	R	B	RG
gRNA.BRCA1.132	10,894	G	R	B	RB
gRNA.BRCA1.133	10,990	G	R	B	BG
gRNA.BRCA1.134	10,997	G	G	RGB	RG
gRNA.BRCA1.135	11,082	G	G	RGB	RB
gRNA.BRCA1.136	11,117	G	G	RGB	BG
gRNA.BRCA1.137	11,137	G	G	RGB	R
gRNA.BRCA1.138	11,151	G	G	RGB	G
gRNA.BRCA1.139	11,172	G	G	RGB	B
gRNA.BRCA1.140	11,602	G	G	RG	RGB
gRNA.BRCA1.141	11,796	G	G	RG	RB
gRNA.BRCA1.142	11,804	G	G	RG	BG
gRNA.BRCA1.143	12,424	G	G	RG	R
gRNA.BRCA1.144	12,737	G	G	RG	G
gRNA.BRCA1.145	12,878	G	G	RB	RGB
gRNA.BRCA1.146	12,922	G	G	RB	RG
gRNA.BRCA1.147	12,977	G	G	RB	BG
gRNA.BRCA1.148	12,998	G	G	RB	R
gRNA.BRCA1.149	13,156	G	G	RB	G
gRNA.BRCA1.150	13,178	G	G	RB	B

10

20

30

【 0 1 8 0 】

【表 9】

表 3 (続き)

名前	位置	位置決め		折り紙コード	
		コード	スポット 1	スポット 2	スポット 3
gRNA.BRCA1.151	13,219	G	G	BG	RGB
gRNA.BRCA1.152	13,483	G	G	BG	RG
gRNA.BRCA1.153	13,578	G	G	BG	RB
gRNA.BRCA1.154	13,637	G	G	BG	R
gRNA.BRCA1.155	13,741	G	G	BG	G
gRNA.BRCA1.156	13,831	G	G	R	RGB
gRNA.BRCA1.157	13,997	G	G	R	RG
gRNA.BRCA1.158	14,306	G	G	R	RB
gRNA.BRCA1.159	14,476	G	G	R	BG
gRNA.BRCA1.160	14,501	G	G	B	RB
gRNA.BRCA1.161	14,522	G	G	B	BG
gRNA.BRCA1.162	14,575	G	B	RGB	RG
gRNA.BRCA1.163	14,587	G	B	RGB	RB
gRNA.BRCA1.164	15,033	G	B	RGB	BG
gRNA.BRCA1.165	15,219	G	B	RG	RGB
gRNA.BRCA1.166	15,222	G	B	RG	RB
gRNA.BRCA1.167	15,475	G	B	RG	BG
gRNA.BRCA1.168	15,522	G	B	RG	R
gRNA.BRCA1.169	15,579	G	B	RB	RGB
gRNA.BRCA1.170	15,818	G	B	RB	RG
gRNA.BRCA1.171	15,901	G	B	RB	BG
gRNA.BRCA1.172	16,111	G	B	RB	R
gRNA.BRCA1.173	16,136	G	B	BG	RGB
gRNA.BRCA1.174	16,448	G	B	BG	RG
gRNA.BRCA1.175	16,595	G	B	BG	RB
gRNA.BRCA1.176	16,688	G	B	BG	R
gRNA.BRCA1.177	16,747	G	B	R	RGB
gRNA.BRCA1.178	16,748	G	B	R	BG
gRNA.BRCA1.179	16,918	G	B	G	RG
gRNA.BRCA1.180	16,974	G	B	G	RB

10

20

30

【 0 1 8 1 】

【表 1 0】

表 3 (続き)

名前	位置	位置決め	折り紙コード		
		コード	スポット 1	スポット 2	スポット 3
gRNA.BRCA1.181	17,418	G	B	G	BG
gRNA.BRCA1.182	17,422	G	RGB	RG	RGB
gRNA.BRCA1.183	17,589	G	RGB	RG	RB
gRNA.BRCA1.184	17,669	G	RGB	RG	BG
gRNA.BRCA1.185	18,262	G	RGB	RG	R
gRNA.BRCA1.186	18,269	G	RGB	RG	G
gRNA.BRCA1.187	18,970	G	RGB	RG	B
gRNA.BRCA1.188	18,971	G	RGB	RB	RGB
gRNA.BRCA1.189	19,005	G	RGB	RB	RG
gRNA.BRCA1.190	19,026	G	RGB	RB	BG
gRNA.BRCA1.191	19,289	G	RGB	RB	R
gRNA.BRCA1.192	19,392	G	RGB	RB	G
gRNA.BRCA1.193	19,445	G	RGB	RB	B
gRNA.BRCA1.194	19,545	G	RGB	BG	RGB
gRNA.BRCA1.195	19,570	G	RGB	BG	RG
gRNA.BRCA1.196	19,818	G	RGB	BG	RB
gRNA.BRCA1.197	19,819	G	RGB	BG	R
gRNA.BRCA1.198	19,839	G	RGB	BG	G
gRNA.BRCA1.199	20,595	G	RGB	BG	B
gRNA.BRCA1.200	20,810	G	RGB	R	RGB
gRNA.BRCA1.201	20,952	G	RGB	R	RG
gRNA.BRCA1.202	20,988	G	RGB	R	RB
gRNA.BRCA1.203	21,054	G	RGB	R	BG
gRNA.BRCA1.204	21,075	G	RGB	R	G
gRNA.BRCA1.205	21,352	G	RGB	G	RGB
gRNA.BRCA1.206	21,440	G	RGB	G	RG
gRNA.BRCA1.207	21,499	G	RGB	G	RB
gRNA.BRCA1.208	21,506	G	RGB	G	BG
gRNA.BRCA1.209	21,581	G	RGB	G	R
gRNA.BRCA1.210	21,592	G	RGB	B	RGB

10

20

30

【 0 1 8 2 】

【表 1 1】

表 3 (続き)

名前	位置	位置決め		折り紙コード	
		コード	スポット 1	スポット 2	スポット 3
gRNA.BRCA1.211	22,366	G	RGB	B	RG
gRNA.BRCA1.212	22,373	G	RGB	B	RB
gRNA.BRCA1.213	22,729	B	RGB	B	BG
gRNA.BRCA1.214	22,760	B	RGB	B	G
gRNA.BRCA1.215	22,824	B	RB	RGB	RG
gRNA.BRCA1.216	22,849	B	RB	RGB	RB
gRNA.BRCA1.217	23,339	B	RB	RGB	BG
gRNA.BRCA1.218	23,739	B	RB	RGB	R
gRNA.BRCA1.219	24,253	B	RB	RGB	G
gRNA.BRCA1.220	24,443	B	RB	RGB	B
gRNA.BRCA1.221	24,530	B	RB	RG	RGB
gRNA.BRCA1.222	24,877	B	RB	RG	RB
gRNA.BRCA1.223	24,878	B	RB	RG	BG
gRNA.BRCA1.224	24,927	B	RB	RG	R
gRNA.BRCA1.225	25,105	B	RB	RG	G
gRNA.BRCA1.226	25,350	B	RB	RG	B
gRNA.BRCA1.227	25,368	B	RB	BG	RGB
gRNA.BRCA1.228	25,472	B	RB	BG	RG
gRNA.BRCA1.229	25,525	B	RB	BG	RB
gRNA.BRCA1.230	25,614	B	RB	BG	R
gRNA.BRCA1.231	25,693	B	RB	BG	G
gRNA.BRCA1.232	25,852	B	RB	BG	B
gRNA.BRCA1.233	25,936	B	RB	R	RGB
gRNA.BRCA1.234	25,972	B	RB	R	RG
gRNA.BRCA1.235	26,984	B	RB	R	RB
gRNA.BRCA1.236	27,130	B	RB	R	BG
gRNA.BRCA1.237	27,155	B	RB	R	G
gRNA.BRCA1.238	27,252	B	RB	G	RGB
gRNA.BRCA1.239	27,256	B	RB	G	RG
gRNA.BRCA1.240	27,431	B	RB	G	RB

10

20

30

【 0 1 8 3 】

【表 1 2】

表 3 (続き)

名前	位置	位置決め		折り紙コード		
		コード	スポット 1	スポット 2	スポット 3	
gRNA.BRCA1.241	27,447	B	RB	G	BG	
gRNA.BRCA1.242	27,452	B	RB	G	R	
gRNA.BRCA1.243	27,610	B	RB	B	RGB	
gRNA.BRCA1.244	27,631	B	RB	B	RG	
gRNA.BRCA1.245	27,682	B	RB	B	RB	
gRNA.BRCA1.246	27,722	B	RB	B	BG	10
gRNA.BRCA1.247	28,262	B	RB	B	R	
gRNA.BRCA1.248	28,287	B	RB	B	G	
gRNA.BRCA1.249	28,400	B	BG	RGB	RG	
gRNA.BRCA1.250	28,425	B	BG	RGB	RB	
gRNA.BRCA1.251	28,464	B	BG	RGB	BG	
gRNA.BRCA1.252	28,581	B	BG	RGB	R	
gRNA.BRCA1.253	28,817	B	BG	RGB	G	
gRNA.BRCA1.254	28,958	B	BG	RGB	B	
gRNA.BRCA1.255	28,983	B	BG	RG	RGB	20
gRNA.BRCA1.256	29,080	B	BG	RG	RB	
gRNA.BRCA1.257	29,202	B	BG	RG	BG	
gRNA.BRCA1.258	29,516	B	BG	RG	R	
gRNA.BRCA1.259	30,531	B	BG	RG	G	
gRNA.BRCA1.260	30,964	B	BG	RG	B	
gRNA.BRCA1.261	30,989	B	BG	RB	RGB	
gRNA.BRCA1.262	31,104	B	BG	RB	RG	
gRNA.BRCA1.263	31,374	B	BG	RB	BG	
gRNA.BRCA1.264	31,469	B	BG	RB	R	
gRNA.BRCA1.265	31,486	B	BG	RB	G	30
gRNA.BRCA1.266	31,547	B	BG	RB	B	
gRNA.BRCA1.267	31,698	B	BG	R	RGB	
gRNA.BRCA1.268	32,906	B	BG	R	RG	
gRNA.BRCA1.269	32,942	B	BG	R	RB	
gRNA.BRCA1.270	32,973	B	BG	R	BG	

【 0 1 8 4 】

【表 1 3】

表 3 (続き)

名前	位置	位置決め		折り紙コード	
		コード	スポット 1	スポット 2	スポット 3
gRNA.BRCA1.271	33,121	B	BG	R	G
gRNA.BRCA1.272	33,128	B	BG	R	B
gRNA.BRCA1.273	33,335	B	BG	G	RGB
gRNA.BRCA1.274	33,496	B	BG	G	RG
gRNA.BRCA1.275	33,994	B	BG	G	RB
gRNA.BRCA1.276	34,521	B	BG	G	BG
gRNA.BRCA1.277	34,751	B	BG	G	R
gRNA.BRCA1.278	34,892	B	BG	B	RGB
gRNA.BRCA1.279	34,917	B	BG	B	RG
gRNA.BRCA1.280	34,988	B	BG	B	RB
gRNA.BRCA1.281	35,188	B	BG	B	BG
gRNA.BRCA1.282	35,232	B	BG	B	R
gRNA.BRCA1.283	35,330	B	R	RGB	RG
gRNA.BRCA1.284	35,366	B	R	RGB	RB
gRNA.BRCA1.285	35,445	B	R	RGB	BG
gRNA.BRCA1.286	35,931	B	R	RGB	R
gRNA.BRCA1.287	36,116	B	R	RGB	G
gRNA.BRCA1.288	36,134	B	R	RGB	B
gRNA.BRCA1.289	36,764	B	R	RG	RGB
gRNA.BRCA1.290	36,884	B	R	RG	RB
gRNA.BRCA1.291	36,905	B	R	RG	BG
gRNA.BRCA1.292	37,050	B	R	RG	R
gRNA.BRCA1.293	37,334	B	R	RG	G
gRNA.BRCA1.294	37,867	B	R	RB	RGB
gRNA.BRCA1.295	38,007	B	R	RB	RG
gRNA.BRCA1.296	38,032	B	R	RB	BG
gRNA.BRCA1.297	38,275	B	R	RB	R
gRNA.BRCA1.298	38,325	B	R	RB	G
gRNA.BRCA1.299	38,470	B	R	RB	B
gRNA.BRCA1.300	38,471	B	R	BG	RGB

10

20

30

【 0 1 8 5 】

【表 1 4】

表 3 (続き)

名前	位置	位置決め		折り紙コード	
		コード	スポット 1	スポット 2	スポット 3
gRNA.BRCA1.301	38,472	B	R	BG	RG
gRNA.BRCA1.302	38,825	B	R	BG	RB
gRNA.BRCA1.303	38,842	B	R	BG	R
gRNA.BRCA1.304	39,099	B	R	BG	G
gRNA.BRCA1.305	39,109	B	R	BG	B
gRNA.BRCA1.306	39,114	B	R	G	RGB
gRNA.BRCA1.307	39,115	B	R	G	RG
gRNA.BRCA1.308	39,786	B	R	G	RB
gRNA.BRCA1.309	39,801	B	R	G	BG
gRNA.BRCA1.310	39,865	B	R	B	RGB
gRNA.BRCA1.311	40,010	B	R	B	RG
gRNA.BRCA1.312	40,054	B	R	B	RB
gRNA.BRCA1.313	40,221	B	G	RGB	RG
gRNA.BRCA1.314	40,663	B	G	RGB	RB
gRNA.BRCA1.315	40,927	B	G	RGB	BG
gRNA.BRCA1.316	41,058	B	G	RGB	R
gRNA.BRCA1.317	41,059	B	G	RGB	G
gRNA.BRCA1.318	41,341	B	G	RG	RGB
gRNA.BRCA1.319	41,688	B	G	RG	RB
gRNA.BRCA1.320	42,346	RG	G	RG	BG
gRNA.BRCA1.321	42,400	RG	G	RG	R
gRNA.BRCA1.322	42,753	RG	G	RG	G
gRNA.BRCA1.323	42,862	RG	G	RG	B
gRNA.BRCA1.324	42,870	RG	G	RB	RGB
gRNA.BRCA1.325	42,891	RG	G	RB	RG
gRNA.BRCA1.326	42,912	RG	G	RB	BG
gRNA.BRCA1.327	42,943	RG	G	RB	R
gRNA.BRCA1.328	42,952	RG	G	RB	G
gRNA.BRCA1.329	42,964	RG	G	RB	B
gRNA.BRCA1.330	43,471	RG	G	BG	RGB

10

20

30

【 0 1 8 6 】

【表 1 5】

表 3 (続き)

名前	位置	位置決め		折り紙コード	
		コード	スポット 1	スポット 2	スポット 3
gRNA.BRCA1.331	43,514	RG	G	BG	RG
gRNA.BRCA1.332	43,594	RG	G	BG	RB
gRNA.BRCA1.333	43,783	RG	G	BG	R
gRNA.BRCA1.334	44,610	RG	G	BG	G
gRNA.BRCA1.335	44,956	RG	G	R	RGB
gRNA.BRCA1.336	45,085	RG	G	R	RG
gRNA.BRCA1.337	45,408	RG	G	R	RB
gRNA.BRCA1.338	45,642	RG	G	R	BG
gRNA.BRCA1.339	45,834	RG	G	B	RGB
gRNA.BRCA1.340	45,939	RG	G	B	BG
gRNA.BRCA1.341	46,018	RG	B	RGB	RG
gRNA.BRCA1.342	46,057	RG	B	RGB	RB
gRNA.BRCA1.343	46,159	RG	B	RGB	BG
gRNA.BRCA1.344	46,184	RG	B	RGB	G
gRNA.BRCA1.345	46,866	RG	B	RG	RGB
gRNA.BRCA1.346	47,006	RG	B	RG	RB
gRNA.BRCA1.347	47,161	RG	B	RG	BG
gRNA.BRCA1.348	47,295	RG	B	RG	G
gRNA.BRCA1.349	47,316	RG	B	RB	RGB
gRNA.BRCA1.350	47,624	RG	B	RB	RG
gRNA.BRCA1.351	48,296	RG	B	RB	BG
gRNA.BRCA1.352	48,417	RG	B	RB	R
gRNA.BRCA1.353	48,597	RG	B	BG	RGB
gRNA.BRCA1.354	48,709	RG	B	BG	RG
gRNA.BRCA1.355	48,741	RG	B	BG	RB
gRNA.BRCA1.356	49,338	RG	B	BG	G
gRNA.BRCA1.357	49,509	RG	B	R	RG
gRNA.BRCA1.358	49,850	RG	B	R	BG
gRNA.BRCA1.359	50,036	RG	B	G	RG
gRNA.BRCA1.360	50,332	RG	B	G	RB

10

20

30

【 0 1 8 7 】

【表 16】

表3 (続き)

名前	位置	位置決め		折り紙コード	
		コード	スポット 1	スポット 2	スポット 3
gRNA.BRCA1.361	50,553	RG	RGB	RG	RGB
gRNA.BRCA1.362	50,611	RG	RGB	RG	RB
gRNA.BRCA1.363	50,725	RG	RGB	RG	BG
gRNA.BRCA1.364	51,015	RG	RGB	RG	R
gRNA.BRCA1.365	51,082	RG	RGB	RG	G
gRNA.BRCA1.366	51,519	RG	RGB	RG	B
gRNA.BRCA1.367	51,797	RG	RGB	RB	RGB
gRNA.BRCA1.368	51,939	RG	RGB	RB	RG
gRNA.BRCA1.369	51,964	RG	RGB	RB	BG
gRNA.BRCA1.370	52,106	RG	RGB	RB	R
gRNA.BRCA1.371	52,142	RG	RGB	RB	G
gRNA.BRCA1.372	52,240	RG	RGB	RB	B
gRNA.BRCA1.373	52,265	RG	RGB	BG	RGB
gRNA.BRCA1.374	52,396	RG	RGB	BG	RG
gRNA.BRCA1.375	52,687	RG	RGB	BG	RB
gRNA.BRCA1.376	52,906	RG	RGB	BG	R
gRNA.BRCA1.377	53,519	RG	RGB	BG	G
gRNA.BRCA1.378	54,362	RG	RGB	BG	B
gRNA.BRCA1.379	54,794	RG	RGB	R	RGB
gRNA.BRCA1.380	54,956	RG	RGB	R	RG
gRNA.BRCA1.381	54,957	RG	RGB	R	RB
gRNA.BRCA1.382	54,976	RG	RGB	R	BG
gRNA.BRCA1.383	55,494	RG	RGB	R	G
gRNA.BRCA1.384	55,623	RG	RGB	G	RGB
gRNA.BRCA1.385	55,661	RG	RGB	G	RG
gRNA.BRCA1.386	55,668	RG	RGB	G	RB
gRNA.BRCA1.387	55,678	RG	RGB	G	BG
gRNA.BRCA1.388	56,191	RG	RGB	G	R
gRNA.BRCA1.389	56,192	RG	RGB	B	RGB
gRNA.BRCA1.390	56,200	RG	RGB	B	RG

10

20

30

【 0 1 8 8 】

【表 1 7】

表 3 (続き)

名前	位置	位置決め		折り紙コード	
		コード	スポット 1	スポット 2	スポット 3
gRNA.BRCA1.391	57,155	RG	RGB	B	RB
gRNA.BRCA1.392	57,180	RG	RGB	B	BG
gRNA.BRCA1.393	57,839	RG	RGB	B	R
gRNA.BRCA1.394	57,864	RG	RGB	B	G
gRNA.BRCA1.395	58,010	RG	RG	RGB	RG
gRNA.BRCA1.396	58,204	RG	RG	RGB	RB
gRNA.BRCA1.397	58,282	RG	RG	RGB	BG
gRNA.BRCA1.398	58,325	RG	RG	RGB	R
gRNA.BRCA1.399	58,449	RG	RG	RGB	G
gRNA.BRCA1.400	58,474	RG	RG	RGB	B
gRNA.BRCA1.401	58,672	RG	RG	RB	RGB
gRNA.BRCA1.402	58,835	RG	RG	RB	RG
gRNA.BRCA1.403	59,401	RG	RG	RB	BG
gRNA.BRCA1.404	59,800	RG	RG	RB	R
gRNA.BRCA1.405	59,983	RG	RG	RB	G
gRNA.BRCA1.406	60,099	RG	RG	RB	B
gRNA.BRCA1.407	60,227	RG	RG	BG	RGB
gRNA.BRCA1.408	60,231	RG	RG	BG	RG
gRNA.BRCA1.409	60,248	RG	RG	BG	RB
gRNA.BRCA1.410	60,252	RG	RG	BG	R
gRNA.BRCA1.411	61,036	RG	RG	BG	G
gRNA.BRCA1.412	61,740	RG	RG	BG	B
gRNA.BRCA1.413	61,926	RG	RG	R	RGB
gRNA.BRCA1.414	62,214	RG	RG	R	RG
gRNA.BRCA1.415	62,304	RG	RG	R	RB
gRNA.BRCA1.416	62,672	RG	RG	R	BG
gRNA.BRCA1.417	62,820	RG	RG	R	G
gRNA.BRCA1.418	63,273	RG	RG	R	B
gRNA.BRCA1.419	63,414	RG	RG	G	RGB
gRNA.BRCA1.420	63,439	RG	RG	G	RG

10

20

30

【 0 1 8 9 】

【表 18】

表3 (続き)

名前	位置	位置決め		折り紙コード	
		コード	スポット1	スポット2	スポット3
gRNA.BRCA1.421	63,505	RG	RG	G	RB
gRNA.BRCA1.422	64,068	RG	RG	G	BG
gRNA.BRCA1.423	64,187	RG	RG	G	R
gRNA.BRCA1.424	64,302	RG	RG	G	B
gRNA.BRCA1.425	64,404	RG	RG	B	RGB
gRNA.BRCA1.426	64,411	RG	RG	B	RG
gRNA.BRCA1.427	64,455	RB	RG	B	RB
gRNA.BRCA1.428	64,479	RB	RG	B	BG
gRNA.BRCA1.429	64,500	RB	RG	B	R
gRNA.BRCA1.430	65,444	RB	RG	B	G
gRNA.BRCA1.431	65,692	RB	BG	RGB	RG
gRNA.BRCA1.432	65,759	RB	BG	RGB	RB
gRNA.BRCA1.433	66,292	RB	BG	RGB	BG
gRNA.BRCA1.434	66,442	RB	BG	RGB	R
gRNA.BRCA1.435	66,751	RB	BG	RGB	G
gRNA.BRCA1.436	66,897	RB	BG	RGB	B
gRNA.BRCA1.437	66,922	RB	BG	RG	RGB
gRNA.BRCA1.438	67,204	RB	BG	RG	RB
gRNA.BRCA1.439	67,370	RB	BG	RG	BG
gRNA.BRCA1.440	67,444	RB	BG	RG	R
gRNA.BRCA1.441	67,977	RB	BG	RG	G
gRNA.BRCA1.442	68,830	RB	BG	RG	B
gRNA.BRCA1.443	68,873	RB	BG	RB	RGB
gRNA.BRCA1.444	68,912	RB	BG	RB	RG
gRNA.BRCA1.445	69,130	RB	BG	RB	BG
gRNA.BRCA1.446	69,271	RB	BG	RB	R
gRNA.BRCA1.447	69,436	RB	BG	RB	G
gRNA.BRCA1.448	69,925	RB	BG	RB	B
gRNA.BRCA1.449	70,004	RB	BG	R	RGB
gRNA.BRCA1.450	70,147	RB	BG	R	RG

10

20

30

【0190】

【表 19】

表 3 (続き)

名前	位置	位置決め	折り紙コード		
		コード	スポット 1	スポット 2	スポット 3
gRNA.BRCA1.451	70,290	RB	BG	R	RB
gRNA.BRCA1.452	70,432	RB	BG	R	BG
gRNA.BRCA1.453	70,467	RB	BG	R	G
gRNA.BRCA1.454	70,754	RB	BG	R	B
gRNA.BRCA1.455	70,800	RB	BG	G	RGB
gRNA.BRCA1.456	70,924	RB	BG	G	RG
gRNA.BRCA1.457	71,133	RB	BG	G	RB
gRNA.BRCA1.458	71,158	RB	BG	G	BG
gRNA.BRCA1.459	71,397	RB	BG	G	R
gRNA.BRCA1.460	71,398	RB	BG	B	RGB
gRNA.BRCA1.461	71,773	RB	BG	B	RG
gRNA.BRCA1.462	71,798	RB	BG	B	RB
gRNA.BRCA1.463	71,915	RB	BG	B	BG
gRNA.BRCA1.464	72,051	RB	BG	B	R
gRNA.BRCA1.465	73,315	RB	BG	B	G
gRNA.BRCA1.466	73,457	RB	R	RGB	RG
gRNA.BRCA1.467	73,797	RB	R	RGB	RB
gRNA.BRCA1.468	73,909	RB	R	RGB	BG
gRNA.BRCA1.469	73,951	RB	R	RGB	R
gRNA.BRCA1.470	74,973	RB	R	RGB	G
gRNA.BRCA1.471	74,998	RB	R	RGB	B
gRNA.BRCA1.472	75,052	RB	R	RG	RGB
gRNA.BRCA1.473	75,139	RB	R	RG	RB
gRNA.BRCA1.474	75,148	RB	R	RG	BG
gRNA.BRCA1.475	75,175	RB	R	RG	R
gRNA.BRCA1.476	75,837	RB	R	RG	G
gRNA.BRCA1.477	75,851	RB	R	RB	RGB
gRNA.BRCA1.478	75,926	RB	R	RB	RG
gRNA.BRCA1.479	75,927	RB	R	RB	BG
gRNA.BRCA1.480	76,170	RB	R	RB	R

10

20

30

【 0 1 9 1 】

【表 20】

表 3 (続き)

名前	位置	位置決め		折り紙コード	
		コード	スポット 1	スポット 2	スポット 3
gRNA.BRCA1.481	76,487	RB	R	RB	G
gRNA.BRCA1.482	77,242	RB	R	RB	B
gRNA.BRCA1.483	77,401	RB	R	BG	RGB
gRNA.BRCA1.484	77,803	RB	R	BG	RG
gRNA.BRCA1.485	77,970	RB	R	BG	RB
gRNA.BRCA1.486	78,230	RB	R	BG	R
gRNA.BRCA1.487	78,231	RB	R	BG	G
gRNA.BRCA1.488	78,277	RB	R	G	RGB
gRNA.BRCA1.489	78,625	RB	R	G	RG
gRNA.BRCA1.490	78,933	RB	R	G	RB
gRNA.BRCA1.491	78,958	RB	R	G	BG
gRNA.BRCA1.492	79,186	RB	R	B	RG
gRNA.BRCA1.493	79,211	RB	R	B	RB
gRNA.BRCA1.494	79,475	RB	G	RGB	RG
gRNA.BRCA1.495	79,600	RB	G	RGB	RB
gRNA.BRCA1.496	79,654	RB	G	RGB	BG
gRNA.BRCA1.497	79,679	RB	G	RGB	R
gRNA.BRCA1.498	79,998	RB	G	RGB	G
gRNA.BRCA1.499	80,198	RB	G	RGB	B
gRNA.BRCA1.500	80,737	RB	G	RG	RGB
gRNA.BRCA1.501	80,877	RB	G	RG	RB
gRNA.BRCA1.502	80,902	RB	G	RG	BG
gRNA.BRCA1.503	80,986	RB	G	RG	R
gRNA.BRCA1.504	81,300	RB	G	RG	G
gRNA.BRCA1.505	81,339	RB	G	RB	RGB
gRNA.BRCA1.506	81,479	RB	G	RB	RG
gRNA.BRCA1.507	81,765	RB	G	RB	BG
gRNA.BRCA1.508	81,907	RB	G	RB	R
gRNA.BRCA1.509	81,932	RB	G	RB	G
gRNA.BRCA1.510	82,467	RB	G	RB	B

10

20

30

【 0 1 9 2 】

【表 2 1】

表 3 (続き)

名前	位置	位置決め	折り紙コード		
		コード	スポット 1	スポット 2	スポット 3
gRNA.BRCA1.511	82,513	RB	G	BG	RGB
gRNA.BRCA1.512	82,521	RB	G	BG	RG
gRNA.BRCA1.513	82,522	RB	G	BG	RB
gRNA.BRCA1.514	82,537	RB	G	BG	R
gRNA.BRCA1.515	82,729	RB	G	BG	G
gRNA.BRCA1.516	82,919	RB	G	R	RGB
gRNA.BRCA1.517	83,157	RB	G	R	RG
gRNA.BRCA1.518	83,334	RB	G	R	RB
gRNA.BRCA1.519	83,681	RB	G	R	BG
gRNA.BRCA1.520	84,189	RB	G	B	RGB
gRNA.BRCA1.521	84,452	RB	G	B	BG
gRNA.BRCA1.522	84,618	RB	B	RGB	RG
gRNA.BRCA1.523	85,185	RB	B	RGB	RB
gRNA.BRCA1.524	85,276	RB	B	RGB	BG
gRNA.BRCA1.525	85,394	RB	B	RG	RGB
gRNA.BRCA1.526	85,527	RB	B	RG	RB
gRNA.BRCA1.527	85,571	RB	B	RG	BG
gRNA.BRCA1.528	85,596	RB	B	RG	R
gRNA.BRCA1.529	85,683	RB	B	RG	G
gRNA.BRCA1.530	85,936	RB	B	RB	RGB
gRNA.BRCA1.531	85,955	RB	B	RB	RG
gRNA.BRCA1.532	86,055	RB	B	RB	BG
gRNA.BRCA1.533	86,194	GB	B	BG	RGB
gRNA.BRCA1.534	86,303	GB	B	BG	RG
gRNA.BRCA1.535	86,310	GB	B	BG	RB
gRNA.BRCA1.536	86,697	GB	B	BG	R
gRNA.BRCA1.537	86,810	GB	B	R	RGB
gRNA.BRCA1.538	86,840	GB	B	R	RG
gRNA.BRCA1.539	86,960	GB	B	R	BG
gRNA.BRCA1.540	87,126	GB	B	G	RG

10

20

30

【 0 1 9 3 】

【表 2 2】

表 3 (続き)

名前	位置	位置決め		折り紙コード	
		コード	スポット 1	スポット 2	スポット 3
gRNA.BRCA1.541	87,199	GB	B	G	BG
gRNA.BRCA1.542	87,247	GB	RGB	RG	RGB
gRNA.BRCA1.543	87,355	GB	RGB	RG	RB
gRNA.BRCA1.544	88,350	GB	RGB	RG	BG
gRNA.BRCA1.545	88,419	GB	RGB	RG	R
gRNA.BRCA1.546	88,446	GB	RGB	RG	G
gRNA.BRCA1.547	88,455	GB	RGB	RG	B
gRNA.BRCA1.548	88,543	GB	RGB	RB	RGB
gRNA.BRCA1.549	88,597	GB	RGB	RB	RG
gRNA.BRCA1.550	88,604	GB	RGB	RB	BG
gRNA.BRCA1.551	88,622	GB	RGB	RB	R
gRNA.BRCA1.552	88,720	GB	RGB	RB	G
gRNA.BRCA1.553	88,902	GB	RGB	RB	B
gRNA.BRCA1.554	88,909	GB	RGB	BG	RGB
gRNA.BRCA1.555	88,927	GB	RGB	BG	RG
gRNA.BRCA1.556	88,955	GB	RGB	BG	RB
gRNA.BRCA1.557	88,960	GB	RGB	BG	R
gRNA.BRCA1.558	88,998	GB	RGB	BG	G
gRNA.BRCA1.559	89,029	GB	RGB	BG	B
gRNA.BRCA1.560	89,153	GB	RGB	R	RGB
gRNA.BRCA1.561	89,207	GB	RGB	R	RG
gRNA.BRCA1.562	89,351	GB	RGB	R	RB
gRNA.BRCA1.563	89,515	GB	RGB	R	BG
gRNA.BRCA1.564	90,439	GB	RGB	R	G
gRNA.BRCA1.565	90,440	GB	RGB	G	RGB
gRNA.BRCA1.566	90,441	GB	RGB	G	RG
gRNA.BRCA1.567	90,462	GB	RGB	G	RB
gRNA.BRCA1.568	90,700	GB	RGB	G	BG
gRNA.BRCA1.569	90,736	GB	RGB	G	R
gRNA.BRCA1.570	90,914	GB	RGB	G	B

10

20

30

【 0 1 9 4 】

【表 2 3】

表 3 (続き)

名前	位置	位置決め		折り紙コード	
		コード	スポット 1	スポット 2	スポット 3
gRNA.BRCA1.571	91,209	GB	RGB	B	RGB
gRNA.BRCA1.572	91,284	GB	RGB	B	RG
gRNA.BRCA1.573	91,323	GB	RGB	B	RB
gRNA.BRCA1.574	91,424	GB	RGB	B	BG
gRNA.BRCA1.575	91,460	GB	RGB	B	R
gRNA.BRCA1.576	91,603	GB	RG	RGB	RG
gRNA.BRCA1.577	91,678	GB	RG	RGB	RB
gRNA.BRCA1.578	91,710	GB	RG	RGB	BG
gRNA.BRCA1.579	92,123	GB	RG	RGB	R
gRNA.BRCA1.580	92,226	GB	RG	RGB	G
gRNA.BRCA1.581	92,269	GB	RG	RGB	B
gRNA.BRCA1.582	92,347	GB	RG	RB	RGB
gRNA.BRCA1.583	92,363	GB	RG	RB	RG
gRNA.BRCA1.584	92,368	GB	RG	RB	BG
gRNA.BRCA1.585	92,384	GB	RG	RB	R
gRNA.BRCA1.586	92,520	GB	RG	RB	G
gRNA.BRCA1.587	92,536	GB	RG	RB	B
gRNA.BRCA1.588	92,540	GB	RG	BG	RGB
gRNA.BRCA1.589	92,541	GB	RG	BG	RG
gRNA.BRCA1.590	92,557	GB	RG	BG	RB
gRNA.BRCA1.591	92,604	GB	RG	BG	R
gRNA.BRCA1.592	92,690	GB	RG	BG	G
gRNA.BRCA1.593	92,820	GB	RG	BG	B
gRNA.BRCA1.594	92,899	GB	RG	R	RGB
gRNA.BRCA1.595	92,914	GB	RG	R	RG
gRNA.BRCA1.596	92,935	GB	RG	R	RB
gRNA.BRCA1.597	92,936	GB	RG	R	BG
gRNA.BRCA1.598	92,957	GB	RG	R	G
gRNA.BRCA1.599	92,978	GB	RG	R	B
gRNA.BRCA1.600	92,979	GB	RG	G	RGB

10

20

30

【 0 1 9 5 】

【表 2 4】

表 3 (続き)

名前	位置	位置決め		折り紙コード	
		コード	スポット 1	スポット 2	スポット 3
gRNA.BRCA1.601	93,001	GB	RG	G	RG
gRNA.BRCA1.602	93,022	GB	RG	G	RB
gRNA.BRCA1.603	93,029	GB	RG	G	BG
gRNA.BRCA1.604	93,045	GB	RG	G	R
gRNA.BRCA1.605	93,067	GB	RG	B	RGB
gRNA.BRCA1.606	93,088	GB	RG	B	RG
gRNA.BRCA1.607	93,107	GB	RG	B	RB
gRNA.BRCA1.608	93,108	GB	RG	B	BG
gRNA.BRCA1.609	93,123	GB	RG	B	G
gRNA.BRCA1.610	93,134	GB	RB	RGB	RG
gRNA.BRCA1.611	93,140	GB	RB	RGB	RB
gRNA.BRCA1.612	93,141	GB	RB	RGB	BG
gRNA.BRCA1.613	93,173	GB	RB	RGB	R
gRNA.BRCA1.614	93,364	GB	RB	RGB	G
gRNA.BRCA1.615	93,611	GB	RB	RGB	B
gRNA.BRCA1.616	93,612	GB	RB	RG	RGB
gRNA.BRCA1.617	93,774	GB	RB	RG	RB
gRNA.BRCA1.618	93,999	GB	RB	RG	BG
gRNA.BRCA1.619	94,032	GB	RB	RG	R
gRNA.BRCA1.620	94,130	GB	RB	RG	G
gRNA.BRCA1.621	94,341	GB	RB	RG	B
gRNA.BRCA1.622	94,367	GB	RB	BG	RGB
gRNA.BRCA1.623	94,388	GB	RB	BG	RG
gRNA.BRCA1.624	94,406	GB	RB	BG	RB
gRNA.BRCA1.625	94,429	GB	RB	BG	R
gRNA.BRCA1.626	94,511	GB	RB	BG	G
gRNA.BRCA1.627	94,577	GB	RB	BG	B
gRNA.BRCA1.628	94,608	GB	RB	R	RGB
gRNA.BRCA1.629	94,644	GB	RB	R	RG
gRNA.BRCA1.630	94,645	GB	RB	R	RB

【 0 1 9 6 】

10

20

30

【表 2 5】

表 3 (続き)

名前	位置	位置決め		折り紙コード	
		コード	スポット 1	スポット 2	スポット 3
gRNA.BRCA1.631	94,666	GB	RB	R	BG
gRNA.BRCA1.632	94,674	GB	RB	R	G
gRNA.BRCA1.633	94,712	GB	RB	R	B
gRNA.BRCA1.634	94,713	GB	RB	G	RGB
gRNA.BRCA1.635	94,725	GB	RB	G	RG
gRNA.BRCA1.636	94,803	GB	RB	G	RB
gRNA.BRCA1.637	94,804	GB	RB	G	BG
gRNA.BRCA1.638	94,816	GB	RB	G	R
gRNA.BRCA1.639	94,850	RGB	RB	G	B
gRNA.BRCA1.640	94,904	RGB	RB	B	RGB
gRNA.BRCA1.641	94,905	RGB	RB	B	RG
gRNA.BRCA1.642	94,922	RGB	RB	B	RB
gRNA.BRCA1.643	94,923	RGB	RB	B	BG
gRNA.BRCA1.644	94,965	RGB	RB	B	R
gRNA.BRCA1.645	94,966	RGB	RB	B	G
gRNA.BRCA1.646	94,982	RGB	R	RGB	RG
gRNA.BRCA1.647	94,991	RGB	R	RGB	RB
gRNA.BRCA1.648	95,012	RGB	R	RGB	BG
gRNA.BRCA1.649	95,018	RGB	R	RGB	R
gRNA.BRCA1.650	95,033	RGB	R	RGB	G
gRNA.BRCA1.651	95,038	RGB	R	RG	RGB
gRNA.BRCA1.652	95,039	RGB	R	RG	RB
gRNA.BRCA1.653	95,636	RGB	R	RG	BG
gRNA.BRCA1.654	95,714	RGB	R	RG	R
gRNA.BRCA1.655	95,802	RGB	R	RG	G
gRNA.BRCA1.656	95,856	RGB	R	RB	RGB
gRNA.BRCA1.657	95,881	RGB	R	RB	RG
gRNA.BRCA1.658	96,183	RGB	R	RB	BG
gRNA.BRCA1.659	96,409	RGB	R	RB	R
gRNA.BRCA1.660	96,593	RGB	R	RB	G

【 0 1 9 7 】

10

20

30

【表 2 6】

表 3 (続き)

名前	位置	位置決め	折り紙コード		
		コード	スポット 1	スポット 2	スポット 3
gRNA.BRCA1.661	96,594	RGB	R	RB	B
gRNA.BRCA1.662	96,879	RGB	R	BG	RGB
gRNA.BRCA1.663	97,267	RGB	R	BG	RG
gRNA.BRCA1.664	97,461	RGB	R	BG	RB
gRNA.BRCA1.665	97,550	RGB	R	BG	R
gRNA.BRCA1.666	97,586	RGB	R	BG	G
gRNA.BRCA1.667	98,126	RGB	R	G	RGB
gRNA.BRCA1.668	98,248	RGB	R	G	RG
gRNA.BRCA1.669	98,443	RGB	R	G	RB
gRNA.BRCA1.670	99,499	RGB	R	G	BG
gRNA.BRCA1.671	99,578	RGB	R	B	RGB
gRNA.BRCA1.672	99,858	RGB	R	B	RB
gRNA.BRCA1.673	99,989	RGB	R	B	BG
gRNA.BRCA1.674	100,077	RGB	G	RGB	RG
gRNA.BRCA1.675	100,078	RGB	G	RGB	RB
gRNA.BRCA1.676	100,252	RGB	G	RGB	BG
gRNA.BRCA1.677	100,253	RGB	G	RGB	R
gRNA.BRCA1.678	100,267	RGB	G	RGB	G
gRNA.BRCA1.679	100,333	RGB	G	RG	RGB
gRNA.BRCA1.680	100,512	RGB	G	RG	RB
gRNA.BRCA1.681	100,551	RGB	G	RG	BG
gRNA.BRCA1.682	100,672	RGB	G	RG	R
gRNA.BRCA1.683	100,697	RGB	G	RG	G
gRNA.BRCA1.684	100,848	RGB	G	RG	B
gRNA.BRCA1.685	100,884	RGB	G	RB	RGB
gRNA.BRCA1.686	100,942	RGB	G	RB	RG
gRNA.BRCA1.687	101,036	RGB	G	RB	BG
gRNA.BRCA1.688	101,094	RGB	G	RB	R
gRNA.BRCA1.689	101,186	RGB	G	RB	G
gRNA.BRCA1.690	101,204	RGB	G	RB	B

10

20

30

【 0 1 9 8 】

【表 27】

表3 (続き)

名前	位置	位置決め		折り紙コード	
		コード	スポット1	スポット2	スポット3
gRNA.BRCA1.691	101,219	RGB	G	BG	RGB
gRNA.BRCA1.692	101,286	RGB	G	BG	RG
gRNA.BRCA1.693	101,483	RGB	G	BG	RB
gRNA.BRCA1.694	101,488	RGB	G	BG	R
gRNA.BRCA1.695	101,709	RGB	G	BG	G
gRNA.BRCA1.696	101,841	RGB	G	BG	B
gRNA.BRCA1.697	101,844	RGB	G	R	RGB
gRNA.BRCA1.698	101,845	RGB	G	R	RG
gRNA.BRCA1.699	101,846	RGB	G	R	RB
gRNA.BRCA1.700	101,909	RGB	G	R	BG
gRNA.BRCA1.701	101,972	RGB	B	RGB	RG
gRNA.BRCA1.702	102,080	RGB	B	RGB	RB
gRNA.BRCA1.703	102,348	RGB	B	RGB	BG
gRNA.BRCA1.704	102,360	RGB	B	RG	RGB
gRNA.BRCA1.705	102,471	RGB	B	RG	RB
gRNA.BRCA1.706	102,654	RGB	B	RG	BG
gRNA.BRCA1.707	102,655	RGB	B	RB	RGB
gRNA.BRCA1.708	102,823	RGB	B	RB	RG
gRNA.BRCA1.709	102,882	RGB	B	RB	BG
gRNA.BRCA1.710	102,889	RGB	B	RB	G
gRNA.BRCA1.711	102,981	RGB	B	BG	RGB
gRNA.BRCA1.712	103,008	RGB	B	BG	RG
gRNA.BRCA1.713	103,018	RGB	B	BG	RB
gRNA.BRCA1.714	103,039	RGB	B	BG	R
gRNA.BRCA1.715	103,059	RGB	B	R	RG
gRNA.BRCA1.716	103,143	RGB	B	R	BG
gRNA.BRCA1.717	103,168	RGB	B	G	RG
gRNA.BRCA1.718	103,438	RGB	RGB	RG	RGB
gRNA.BRCA1.719	103,446	RGB	RGB	RG	RB
gRNA.BRCA1.720	103,459	RGB	RGB	RG	BG

【0199】

10

20

30

【表 2 8】

表 3 (続き)

名前	位置	位置決め		折り紙コード	
		コード	スポット 1	スポット 2	スポット 3
gRNA.BRCA1.721	103,472	RGB	RGB	RG	R
gRNA.BRCA1.722	103,555	RGB	RGB	RG	G
gRNA.BRCA1.723	103,559	RGB	RGB	RB	RGB
gRNA.BRCA1.724	103,606	RGB	RGB	RB	RG
gRNA.BRCA1.725	103,670	RGB	RGB	RB	BG
gRNA.BRCA1.726	103,699	RGB	RGB	RB	R
gRNA.BRCA1.727	103,700	RGB	RGB	RB	G
gRNA.BRCA1.728	103,738	RGB	RGB	RB	B
gRNA.BRCA1.729	103,755	RGB	RGB	BG	RGB
gRNA.BRCA1.730	103,756	RGB	RGB	BG	RG
gRNA.BRCA1.731	103,769	RGB	RGB	BG	RB
gRNA.BRCA1.732	103,790	RGB	RGB	BG	R
gRNA.BRCA1.733	103,811	RGB	RGB	BG	G
gRNA.BRCA1.734	103,824	RGB	RGB	R	RGB
gRNA.BRCA1.735	103,880	RGB	RGB	R	RG
gRNA.BRCA1.736	103,881	RGB	RGB	R	RB
gRNA.BRCA1.737	104,232	RGB	RGB	R	BG
gRNA.BRCA1.738	104,563	RGB	RGB	G	RGB
gRNA.BRCA1.739	104,659	RGB	RGB	G	RG
gRNA.BRCA1.740	105,115	RGB	RGB	G	RB
gRNA.BRCA1.741	105,270	RGB	RGB	G	BG

【0 2 0 0】

もう 1 つの例では、折り紙コード (Origami Code) (Nat Chem. 2012 Oct;4(10):832-9 参照) を用いる; 図 8 参照。核酸折り紙法は当業者に公知である。gRNA テールを表 3 に記載の折り紙複数色スキームに従ってバーコード化する。バーコードは予想される一連の gRNA パターンを形成するように分けられる。このスキームでは、折り紙は gRNA テールプローブである。各折り紙複数色プローブが gRNA に特異的な結合部を有し、すなわち、741 個の折り紙プローブにつき、741 個のユニークな gRNA テール配列がある。ある折り紙複数色プローブは蛍光標識の結合位置を 3 個有し、高分解能または超分解能イメージングにより、スポット 1、スポット 2、スポット 3 に物理的に分解することができる。各スポットは、それに関連する種々の色コードを有する。これらのコードの組合せにより、折り紙複数色プローブのアイデンティティが提供される。

【0 2 0 1】

gRNA バーコードは、それらのそれぞれの蛍光標識折り紙複数色プローブの添加によって検出される。実際の一連の gRNA パターンが明らかになる。予想されない全てのパターンがゲノム再編成として同定される。遺伝子座の領域を分離する位置決め RGB コードの例と比べて、折り紙コードは単一 gRNA レベルで分離することができ、ゲノム領域または遺伝子座の編成のはるかに高度で詳細な同定を可能にする。

【0 2 0 2】

Her2 アッセイ

全ての浸潤性乳癌に *in situ* ハイブリダイゼーション技術を用いた Her2 状態の決定が推奨される。現在認められている臨床診断法の最近の総説に、種々の臨床アッセイの現在の課題がハイライトされている (参考文献: Franchet C, Filleron T, Cayre A, Mounie E, Penault-Llorca F, Jacquemier J, Macgrogan G, Arnould L, Lacroix-Triki

M. Instant-quality fluorescence in-situ hybridization as a new tool for HER2 testing in breast cancer: a comparative study. Histopathology. 2014 Jan;64(2):274-83)。

【0203】

利用可能な現行のアッセイに関する複数の課題が報告されている。その1つとして、従来のFISHはプロセスが非常に長く、ハイブリダイゼーション用の試料調製（脱パラフィン、前処理、ペプシン消化、変性）に通常1日かかり、12～24時間の非常に長いハイブリダイゼーションが行われ、翌日、ハイブリダイゼーションを徹底的に洗浄し、可視化が行われる。

【0204】

本明細書に記載の例示的な態様では、方法は、試料の前処理、ペプシン消化、または変性のいずれも必要としない。Cas9-gRNA複合体は、固定試料中の天然二本鎖DNAに容易且つ特異的にハイブリダイズすることができる。さらにハイブリダイズしていない複合体は容易に洗い流される。したがって、プロセス全体を1日以内に行うことができる。このタイムラインは、通常FISHアッセイの前に行われるHer2免疫組織化学アッセイと同等である。さらに、このコード方法は、IHCおよびCas9-gRNA FISHの両方を同時に進行させることができる。

【0205】

アッセイ間の精度および差異も問題として報告されている。しばしば1年続く乳癌処置の高いコストを考慮すると、間違った処置はかなりの社会的および経済的影響を生じる。本明細書に記載のある態様では、Cas9-gRNAが、重複性および共局在を提供するようにコードされる。陽性試料は、異常と比較して区別することができる。さらに、本明細書に記載の方法は、試料の再プロービングが可能であり、すなわち、Cas9-gRNAは標的DNAに結合させたまま、プローブを除去することができ、よりストリンジェントな条件下で新たなラウンドのプロービングを行うことができる。

【0206】

現行のFISHアッセイには数百ドルかかる（参照文献：ワールドワイドウェブサイト ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2706184/）。これは一部には、場合によってはインターカレーション蛍光分子を有する大きなベクターに挿入された非常に長いDNAコピー（PathVision）であるもしくは高価なペプチド核酸（PNA）プローブ（pharmDx）である、プローブに用いられる材料のため、またはDNAプローブ（INFORM）を検出するための抗体および二次抗体の使用のためである。本明細書に記載の方法は、コストを、FISHアッセイの前に行われる通常のHer2 ICH検査（約100ドル）と同等にする。Cas9は、細菌起源のタンパク質であり、安価な細菌系から効率的に発現および精製される。これは市販もされている。オリゴヌクレオチドアレイ合成装置を用いたgRNA鋳型の合成は、現在DNAを合成する最も安価な方法である（0.0004ドル／塩基、商業価格）。アレイ合成後、PCRを用いてオリゴヌクレオチドを増幅することができ、これにより、安価に無限に再増幅可能なgRNA鋳型のプールが作成される。インビトロ転写が非常に効率的であり、DNA分子当たり500～1000 RNA分子が産生される。

【0207】

Her2アッセイは、17番染色体の比率として細胞当たりのHer2遺伝子座の平均コピー数をレポートする。17番染色体の最も一般的なレポーターは、セントロメア領域のαサテライト反復を標的化する。これは、比較的よく特徴解析されている領域であり、最大1000個の単量体反復を含む（Waye JS, Willard HF. Structure, organization, and sequence of alpha satellite DNA from human chromosome 17: evidence for evolution by unequal crossing-over and an ancestral pentamer repeat shared with the human X chromosome. Mol Cell Biol. 1986 Sep;6(9):3156-65参照）。反復は本明細書に記載のCas9-gRNA法に特によく適している。この場合、わずかな数の異なるgRNAのみが必要とされる。表4にgRNA標的のリストを示す。このリストは、他のCEP

10

20

30

40

50

17プローブの基礎となるよく特徴付けられているD17Z1遺伝子座から抽出した。このリストは、O'Keefe CL, Warburton PE, Matera AGに報告されているような変異体もカバーする。αサテライトDNA変異体のためのオリゴヌクレオチドプローブは、FISHにより相同染色体を区別することができる。Hum Mol Genet. 1996 Nov;5(11):1793-9)。しかし、本明細書に記載の方法を用いれば、Cas9は通常その5'末端近くの1～2個のミスマッチを許容するので、たった11個のgRNAを用いてそれらの反復の大部分を標的化することができる(表5)。

【0208】

【表29】

表4

標的名	標的配列
CEN17.1	GAGCGCTTTCAGGCCTGTGGTGG
CEN17.2	GAGGGCTTTGAGGCCTGTGGTGG
CEN17.3	GAGGGCTTTGTGGTTTGTGGTGG
CEN17.4	GGAATCTGCAAGTGGATATGTGG
CEN17.5	GTGTTGAAACTCTCTTTTGTGG
CEN17.6	GTTTCCAATCACTCTTTGTGTGG
CEN17.7	GTTTGGAACACTCTTGTGTGG
CEN17.8	GTTTTGAAACTCTCTTCTGTGG
CEN17.9	ACACTGCTCTATCCATAGGAGG
CEN17.10	AGATATTTGGACCGCTCTGAGG
CEN17.11	AGCGCTTTCAGGCCTGTGGTGG
CEN17.12	AGGAATGTTCAACTCTGTGAGG
CEN17.13	AGGGCTTTGAGGCCTGTGGTGG
CEN17.14	AGGGCTTTGTGGTTTGTGGTGG
CEN17.15	CATCACAGAGAAGCTTCTGAGG
CEN17.16	CTGCATTCAACTCACAGTGTGG
CEN17.17	GAAAGGAAAGTTCAACTCGGGG
CEN17.18	GAATCTGCAAGTGGATATGTGG
CEN17.19	GAATGCAAACATCACGAAGAGG
CEN17.20	GCATATTTGGACCTCTTTGAGG
CEN17.21	GCTTCTGTTTAGTTCTGTGCGG
CEN17.22	GCTTCTGTTTAGTTCTGTGCGG
CEN17.23	GGACATTTGGAGGGCTTTGAGG
CEN17.24	GGACGTTTGGAGGGCTTTGTGG
CEN17.25	GGAGATTTGGAGCGCTTTGAGG
CEN17.26	GGATATTTAGGCCTCTCTGAGG
CEN17.27	GGATATTTGGACCACTCTGTGG
CEN17.28	GGATATTTGGACCTCTCTGAGG
CEN17.29	GGGATCATTGCACTCTTTGAGG
CEN17.30	TACTACCATAGGCCTAAAGCGG

【0209】

【表 3 0】
表 4 (続き)

標の名	標の配列
CEN17.31	TATTTGTAGAATGTGCAAGTGG
CEN17.32	TCCAAAGACATCTTCGGAGAGG
CEN17.33	TCCAACGAAATCCTCAGAGAGG
CEN17.34	TCCAACGAAATCCTCAGAGAGG
CEN17.35	TCCAACGAAATCCTCAGAGCGG
CEN17.36	TCCAACGAAATCTTCAAAGAGG
CEN17.37	TCCAACGAAATGCTCAGAGAGG
CEN17.38	TCGAACGAAGGACACAGAGTGG
CEN17.39	TCGAACGAAGGCCACAGAGTGG
CEN17.40	TCTGCAAGTGGACATTTGGAGG
CEN17.41	TCTGCAAGTGGACGTTTGGAGG
CEN17.42	TGGAGCGCTTTCAGGCCTGTGG
CEN17.43	TGGAGGGCTTTGAGGCCTGTGG
CEN17.44	TGGAGGGCTTTGTGGTTTGTGG
CEN17.45	TGTTGAAACTCTCTTTTGTGG
CEN17.46	TTGTTGTGGAATGTGCAAGTGG
CEN17.47	TTTCCAATCACTCTTTGTGTGG
CEN17.48	TTTCTGTGGCATCTGCAAGGGG
CEN17.49	TTTGGAACACTCTTGTTGTGG
CEN17.50	TTTGTGTAGAATCTGCAAGTGG
CEN17.51	TTTGTGTGGAATCTGCAAGTGG
CEN17.52	TTTTCGTAGTGTCTACAAGTGG
CEN17.53	TTTTGAAACTCTCTTTCTGTGG
CEN17.54	TTTTTCCAGAACTGCAAGTGG
CEN17.55	TTTTTCTAGAATCTGCAAGTGG
CEN17.56	TTTTTGCAGGATCTACAAGTGG
CEN17.57	TTTTTGTACAATCTACAAGTGG
CEN17.58	TTTTTGTAGAACTGCAAGGGG
CEN17.59	TTTTTGTAGAACTGCAAGTGG
CEN17.60	TTTTTGTAGGATCTGCAAGTGG
CEN17.61	TTTTTGTGGAATCTGCAAGTGG

10

20

30

40

【 0 2 1 0 】

【表 3 1】
表 5

gRNA 名	gRNA 標的配列
Cen17gRNA.1	GAGGGCTTTGAGGCCTGTGG
Cen17gRNA.2	GTGTTGAAACTCTCTTTTGTG
Cen17gRNA.3	GACACTGCTCTATCCATAGG
Cen17gRNA.4	GAGGGCTTTGAGGCCTGTGG
Cen17gRNA.5	GGAATCTGCAAGTGGATATG
Cen17gRNA.6	GGCATATTTGGACCTCTTTG
Cen17gRNA.7	GTACTACCATAGGCCTAAAG
Cen17gRNA.8	GTCCAACGAAATCCTCAGAG
Cen17gRNA.9	GTCTGCAAGTGGACATTTGG
Cen17gRNA.10	GTTGTTGTGGAATGTGCAAG
Cen17gRNA.11	GTTTGTGTAGAATCTGCAAG

10

【0 2 1 1】

20

さらに、本明細書に記載の方法は、アレル変異体のスクリーニングが可能であり、これは個別化医療において必須の情報であり、処置に影響を与え得る。例えば、Her 2 変異体 I 6 5 5 V が乳癌処置としてのタモキシフェンの効率低下に関わっており、考慮されるべきである (Chang NW, Chen DR, Chen FN, Lin C, Wu CT. HER2 codon 655 G-allele is associated with reductions in plasma high-density lipoprotein levels in breast cancer patients treated with tamoxifen. J Investig Med. 2011 Dec;59(8):1252-7. doi: 10.231/JIM.0b013e3182354923 参照)。2つの同定された gRNA 標的を変異体の同定に用いることができる (標的 1: T C T G A C G T C C A T C A T C T C T G C G G (配列番号: 1 4 5) および標的 2: G C C A A C C A C C G C A G A G A T G A T G G (配列番号: 1 4 6))。アレル特異的バーコードと共に4個の gRNA のセット (標的 1 個につき 2 個) を用いることにより、標準的な Her 2 アッセイの一部として、イソロインアレル (A T C) とバリンアレル (G T C) を識別する方法が提供される。

30

【0 2 1 2】

17 番染色体のその他の領域も標的化できると理解される。例えば、Top 2 A が Her 2 遺伝子座の近くに位置しており、Her 2 と一緒に増幅することが観察されており、これも適切な処置の選択に影響し得る。Smith K, Houlbrook S, Greenall M, Carmichael J, Harris AL. Topoisomerase II alpha co-amplification with erbB2 in human primary breast cancer and breast cancer cell lines: relationship to m-AMSA and mitoxantrone sensitivity. Oncogene. 1993 Apr;8(4):933-8 参照。

【0 2 1 3】

40

Her 2 / CEN 17 をスクリーニングするための FISH プロトコルの例を以下に記載する。同じ試料に対して免疫組織化学および FISH アッセイの両方を行う場合、細胞または組織試料を、顕微鏡に適合する支持体 (例えば、清浄なボロシリケート顕微鏡スライドまたは顕微鏡カバースリップ) 上で 10% パラホルムアルデヒドの PBS 溶液中で、4℃で 1~16 時間固定する。あるいは、試料は 100% メタノール中で、-20℃で 20 分~1 時間固定することができる (メタノールは、多くのタンパク質を抽出しつつ、試料中の DNA をより効率的に保持する)。パラフィン包埋組織切片を、スライドに固定する前に脱パラフィンすべきであり、これは通常、キシレン中で 5 分インキュベートした後、エタノールで 2 回、水で 1 回洗浄することにより達成される。その後、固定された試料を PBST (PBS バッファーおよび 0.5% Tween-20) で 1 回洗浄し、その

50

後、0.5%トリトンX-100を含むPBSと5分間インキュベートする。その後、試料をPBSTで洗浄し、Cas9-gRNA-標識複合体混合物を、PBSTおよび5mM MgCl₂中の試料に加え、37℃で2~16時間インキュベートする（すなわち、ミックスは、Her2およびCEN17に対するセットの両方ならびに同定のためのそれらのそれぞれの標識を含む）。インキュベーション後、PBST中で37℃にて3回洗浄することにより非結合Cas9を除去する。試料は、褪色防止封入剤およびDAPI（例えば、DAPIを含むProLongまたはVectaShield）を用いてマウントされ、封入される。試料は油浸63倍対物レンズを用いてイメージングされる。あるいは、試料は、光から保護して4℃に維持した場合、数週間安定である。その後、腫瘍領域中の少なくとも20個の核をカウントし、その各々について、Her2およびCEN17局在焦点の数を記録する。Her2とCEN17の比率が計算されてもよく、2013 ASCO/CAPガイダンス（Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JM, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, Hayes DF; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. J Clin Oncol. 2013 Nov 1;31(31):3997-4013参照）に定められているような現行の診療に準拠して報告される。

10

【0214】

20

実施例 I I I

図1は、マウス胚性線維芽細胞の核のメジャーサテライト領域およびマイナーサテライト領域ならびにテロメア領域のin situ Cas9-gRNAプロービングに関する。蛍光標識UTPを用いて、マウスメジャーサテライト反復（Cy5）、マイナーサテライト反復（Alexa-488）、およびテロメア（Cy3）を標的化するための3種のgRNAを合成した（図1の説明：（A）メジャーサテライト、（B）マイナーサテライト、（C）テロメア、（D）ゲノムDNAのDAPI染色、および（E）重ね合わせ写真）。本明細書に記載のプロトコールに従って、gRNAをCas9と複合体化させた後、PFA固定試料に加えた。パターンは、これらの標的で予想されるプロービング（Guenatri M, Bailly D, Maison C, Almouzni G. Mouse centric and pericentric satellite repeats form distinct functional heterochromatin. J Cell Biol. 2004 Aug 16;166(4):493-505参照）と一致する。63倍/1.40油浸対物レンズならびに各蛍光チャンネルに適したLED光源およびフィルターを備えたツァイス社のAxio Observer Z1で写真を撮影した。図1に関連する説明：A、メジャーサテライト；B、マイナーサテライト；C、テロメア；DNAのDAPI染色；E、重ね合わせ。

30

【0215】

実施例 I V

図2は、図1の対照実験に関する。図1と同様のCas9プロービングプロトコールを用いて、マウスメジャーサテライト反復（Cy5）、マイナーサテライト反復（Alexa-488）、およびテロメア（Cy3）を標的化する一般的に使用されるFISHオリゴヌクレオチドを用いた。DNAのDAPI染色（D）を除いて、他の蛍光シグナルは、図1で取り込まれた写真より拡散しており、顕微鏡上でコンストラクトを強くする必要があった。（図2の説明：（A）メジャーサテライト、（B）マイナーサテライト、（C）テロメア、（D）ゲノムDNAのDAPI染色、および（E）重ね合わせ写真）。変性がないことで、これらのFISHオリゴは、その標的へのハイブリダイズが妨げられ、さらに核の外側で凝集した。63倍/1.40油浸対物レンズならびに各蛍光チャンネルに適したLED光源およびフィルターを備えたツァイス社のAxio Observer Z1で写真を撮った。図1に関連する説明：A、メジャーサテライト；B、マイナーサテライト；C、テロメア；DNAのDAPI染色；E、重ね合わせ。

40

【0216】

50

実施例 V

図 3 は、天然 Cas 9 の結合活性および切断が独立しており、マグネシウムイオンの有無に依存することを示す、Cas 9-gRNA ゲルシフトおよび切断アッセイに関する。以下のように調製した反応液：2 pmol のヌクレアーゼ活性 Cas 9 (NEB 社)、2 pmol の合成 Grna (位置 L22116 のラムダ DNA を標的化)、および 0.2 pmol の 2 kb PCR 増幅 DNA 断片 (ラムダ DNA L21333-L23332 由来) を混合し、5 mM MgCl₂ の存在下 (レーン 1) またはマグネシウム非存在下 (レーン 2) で、37℃ で 1 時間インキュベートした。レーン 1 は、マグネシウム存在下での二次切断産物を示しており、レーン 2 は、切断産物が存在しないが、複合体がまだ結合していることにより生じる小さな上側へのシフトを示している。レーン 3 およびレーン 4 は、Cas 9 タンパク質を反応液から省いたこと以外は、それぞれレーン 1 および 2 と同様の条件下で行われた。レーン 3 および 4 では切断およびシフトは観察されなかった。

【0217】

実施例 VI

図 4 A ~ 図 4 L は、gRNA テールバーコードおよびプロービングの例に関する。図 4 A は、Cas 9 タンパク質 (1)、および突出テトラループ (tetraloop) (3) とバーコードを有する突出 gRNA テール (4) とを有する複合体化した gRNA (2) を示している。バーコードは、検出可能な部分または標識 (6) を有する、ハイブリダイゼーションプローブ (5) により検出される。図 4 B は、gRNA テールが 2 個以上のバーコードによってコードされ得ることを示す図である。図 4 B には 2 個のバーコードが描かれており (4 および 7)、これらは、検出可能な部分または標識 (6) を有するそれらの各ハイブリダイゼーションプローブ (5 および 8) によって検出することができる。図 4 C 中、ハイブリダイゼーションプローブは、シグナルを増幅するために、複数の検出可能な部分または標識 (9) を有し得る。図 4 D 中、検出可能な部分は、直接検出可能でなくともよく (10)、検出可能な部分への特異的親和性を有する、二次的な検出可能な薬剤 (11) の使用が必要であってもよい。この二次的薬剤は、検出されているシグナルを検出または増幅するための、検出可能な部分または標識 (12) を有する。図 4 E ~ 図 4 I は、ローリングサークル増幅を介して gRNA テールをプロービングする方法を示す図である。図 4 E は、Cas 9 タンパク質 (1)、および突出テトラループ (3) とバーコード (4) を有する gRNA テールとを有する複合体化した gRNA (2) を示している。バーコードの検出は、バーコードに対する親和性をプローブの 1 つの領域に有し、標識プローブがハイブリダイズする標的部位 (14) を別の領域に有する、環状ハイブリダイゼーションプローブ (13) によりなされる。図 4 F は、環状プローブ (13) が、gRNA テール (16) を伸長させるためのローリングサークル増幅ポリメラーゼ (15) の鋳型としての機能を果たし得ることを示している。図 4 G は、ローリングサークル増幅により、多様な密接して局在する標識プローブハイブリダイズ標的部位 (18) を有する、局在する増幅されたハイブリダイゼーションプローブ (17) が形成されることを示している。図 4 H は、検出可能なプローブ (19) を添加することによりシグナル増幅 gRNA テールプローブ (20) を生じさせることによって、標識プローブハイブリダイズ標的部位を検出可能にできることを示す図である。図 4 I は、図 4 H と同様のローリングサークル増幅されたプローブ (20) を示す図であり、gRNA バーコードに環状プローブがハイブリダイズせずに生成および標識 (21) されることにより、gRNA 自体の上でのローリングサークル増幅および標識ステップが避けられる。この gRNA から離れて生成されるプローブは、図 4 A に示されているような gRNA テールのバーコード領域 (4) に領域 (5) を介してハイブリダイズすることができる。図 4 J ~ 図 4 L は、核酸自己アセンブリを介して gRNA テールをプロービングする方法を示す図である。図 4 J は、核酸プローブのお互いへの連続的な線状アセンブリを示す図である。バーコードハイブリダイズ領域 (5)、アセンブリ領域 (21)、および標識 (6) で構成される第 1 の断片が最初に gRNA テールバーコード (図 4 A、4) にハイブリダイズする。21 または 22 または 23 に部分的に相補的な標識アセンブリ断片 (22 および 23) の混合物が加え

10

20

30

40

50

られ、反応液中に部分的に相補的な断片が存在する限り、これらは自己アセンブルする。ここでは構造の一部だけが描かれている。これは、以前に記載されているハイブリダイゼーション連鎖反応（HCR）と同様である。Dirks RM, Pierce NA. Triggered amplification by hybridization chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Oct 26;101(43):15275-8参照。図4Kは、多分岐核酸プローブデンドリマー構造自己アセンブリーを示す図である。バーコードハイブリダイズ領域（5）、アセンブリー領域（24）、および標識（6）で構成される第1の断片が最初にgRNAテールバーコード（図4A、4）にハイブリダイズする。24または25または26に部分的に相補的である標識されたアセンブリー断片（24、25、および26）の混合物が加えられ、反応液中に部分的に相補的な断片が存在する限り、これらは多分岐構造へと自己アセンブルする。ここでは構造の一部だけが描かれている。この種の核酸デンドリマーは以前に報告されている。Li Y, Tseng YD, Kwon SY, D'Espaux L, Bunch JS, McEuen PL, Luo D. Controlled assembly of dendrimer-like DNA. *Nat Mater*. 2004 Jan;3(1):38-42参照。図4Lは、シグナルを直線的に増幅するための核酸プローブの分岐部のアセンブリーを示す図である。バーコードハイブリダイズ領域（5）、アセンブリー領域（27）で構成される第1の断片が最初にgRNAテールバーコード（図4A、4）にハイブリダイズする。27または29または30に部分的に相補的な標識されたアセンブリー断片（29および30）の混合物が加えられ、これらは自己アセンブルすることができる。検出可能なプローブ（28）が、反応液中に部分的に相補的な断片が存在する限り、アセンブリー断片（27）および（30）の一部にハイブリダイズすることができる。ここでは構造の一部だけが描かれている。これは以前に報告されている分岐DNA（bDNA）と同様である。Collins ML, Irvine B, Tyner D, Fine E, Zayati C, Chang C, Horn T, Ahle D, Detmer J, Shen LP, Kolberg J, Bushnell S, Urdea MS, Ho DD. A branched DNA signal amplification assay for quantification of nucleic acid targets below 100 molecules/ml. *Nucleic Acids Res*. 1997 Aug 1;25(15):2979-84参照。

【0218】

検出可能な部分（例えば、6、9、10、12）は、蛍光、化学発光もしくは発色、または共鳴などの複数の検出手段を提供できると理解される。ハイブリダイゼーションプローブ（例えば、5、8、9、14）は、DNA、RNA、修飾DNA、修飾RNAなどの種々の核酸コンポーネントで作製され得ると理解される。

【0219】

実施例VII

図5Aは、ラテラルフロー検査システムの表面に結合しているCas9-gRNA複合体に関する。調べられるDNAの集団がシステム上にローディングされ、ラテラルフローによりこれが検査ゾーンに移動され、そこで標的特異的Cas9-gRNAが特異的DNAに結合する。残りのDNAはアッセイの末端まで流れ続け、対照ゾーンで捕捉されるが、標的DNAは検査ゾーンでCas9-gRNA複合体に結合したままである。DNA検出は、核酸染色によって、またはDNAへの検出可能なプローブのハイブリダイゼーションによって、またはDNAへの検出可能なプローブの共有結合によって、または検出可能な部分を有する特異的オリゴヌクレオチドプライマーもしくはユニバーサルオリゴヌクレオチドプライマー存在下でのDNAの酵素増幅（例えば、等温増幅）によって行うことができる。ラテラルフローアッセイでしばしば使用される検出可能な部分としては、金ナノ粒子または銀ナノ粒子が含まれる。その他の部分、例えばビオチン、ジゴキシゲニン、ジニトロフェニル、フルオレセインが、二次的な検出剤と組み合わせて一般的に使用される（例えば、ビオチン、ジゴキシゲニン、ジニトロフェニル、またはフルオレセインに特異的な、金または銀でコーティングされた抗体）。図5Bは、疎水性または電荷など、DNAまたはタンパク質を保持するための異なる特性を有する2つの材料を用いたラテラルフローシステムに関する。例えば、ニトロセルロース膜は、DNAよりもタンパク質を選択的に保持し、一方、ナイロン膜はタンパク質よりDNAに結合する。検査対象のDNA集団をローディングすると、Cas9-gRNA複合体が標的DNAに結合する。DNAに

結合した Cas 9 は、検査ゾーンで DNA 保持膜によって保持されるが、非結合 Cas 9 は通過して、対照ゾーンでタンパク質保持膜に結合する。DNA と共に Cas 9 - gRNA 複合体を検出するための検出を行う。gRNA は本明細書に記載の方法によりプロービングされる。あるいは、Cas 9 タンパク質自体が部分（例えば、金ナノ粒子、銀ナノ粒子、ビオチン、ジゴキシゲニン、ジニトロフェニル、フルオレセイン）を有していてもよい。図 5 C は、調べられる DNA の集団が最初に分子相互作用（例えば、電荷、疎水性、共有結合性相互作用、または親和性相互作用、例えばビオチン-ストレプトアビジン）により検査ゾーンの表面で捕捉される、ラテラルフローシステムに関する。その後、Cas 9 - gRNA を、検査ゾーンで表面に捕捉された標的 DNA に結合させる。残りの未反応 Cas 9 - gRNA は通過して、対照ゾーンで捕捉される。DNA と共に Cas 9 - gRNA 複合体を検出するための検出を行う。gRNA は本明細書に記載の方法でプロービングされる。あるいは、Cas 9 タンパク質自体が部分（例えば、金ナノ粒子、銀ナノ粒子、ビオチン、ジゴキシゲニン、ジニトロフェニル、フルオレセイン）を有していてもよい。

10

【0220】

実施例 V I I I

ガイド RNA / Cas 9 複合体を用いた標的 DNA のプロービング

ガイド RNA をインビトロで設計、調製、発現、および精製した。一本鎖 DNA (ssDNA) オリゴヌクレオチドを合成する (IDT 社または CustomArray 社のチップ)。これらのオリゴはインビトロ RNA 合成のための T7 転写開始部位、およびプロービングに用いられる 3' 末端テールを形成するための伸長部を含む。T7 RNA 合成を行い、RNA を精製する。

20

【0221】

ある態様では、伸長された配列またはテールは、DNA-Paint を用いた超分解能イメージング (2.7 nm の分解能を達成することができ、これは 8 DNA 塩基であるので、Cas 9 のフットプリント 20 bp より小さい) を達成するために、立体障害が最小限になるようにならびに複雑さおよび自由エネルギーが低くなるように設計される。設計されたガイド RNA は、長さが 9 塩基長で異なる配列の A、T、および C 塩基を含む (G は含まない)、20 種の異なる Paint ドッキング部位を有し、Paint プローブは相補的配列にフルオロフォアがプラスされたものである。

30

【0222】

イメージング間にプローブを洗い流して新しいプローブをローディングすることにより、フルオロフォア当たり 20 種のプローブを達成することができ、すなわち、フルオロフォア 1 個につき 20 種の異なる gRNA をイメージングすることができる。したがって、4 個のフルオロフォアで 80 種の gRNA を識別することができる。

【0223】

ガイド RNA 構造の一実施形態は、(5' → 3') gRNA-UUUUU-Paint ドックである。このガイド RNA 配列は、通常 SpCas9 と共に使用される一本鎖ガイド RNA の最小の長さである。

【0224】

高分解能イメージングのために、伸長された配列またはテールは、立体障害が最小になるようにならびに複雑さおよび自由エネルギーが低くなるように設計される。しかし、高分解能イメージングでは、より長いアニーリング領域が使用される。伸長された配列またはテールの構造は、配列特異的オリゴでプロービングできるバーコードとして働くことができるか、またはパッドロックプローブとして働くことができ、続けてローリングサークル増幅を行うことができる。

40

【0225】

SpCas9 を大腸菌中で発現させた。ギブソンの等温アセンブリーを用いて、大腸菌中での発現に適したプラスミド中に、Cas9 コード遺伝子をアセンブルおよびクローニングする。誘導後、細胞を溶解し、タンパク質を精製する。

50

【0226】

細胞を溶解することにより標的DNAを得、それ以上調製しなかった。したがって、試料は、染色体起源および染色体外起源（例えば、プラスミド）のDNAの混合物を含む。

【0227】

Cas9をgRNAと混合し、Cas9、gRNA、および標的核酸が複合体を形成するのに十分な時間（約15分）、DNA試料に加え、その後、検出プローブを加える。その後、イメージングデータを取得する（数秒～数分）。

【0228】

ナノポア検出では、Cas9-gRNA複合体が、計画された間隔でdsDNA断片上に結合する。その後、DNAを、ナノポア（またはナノギャップ電極）の中をまたはその近傍に移行させる。電流の変化を測定する。すなわち、dsDNAは特定の電流で移動するが、DNAに結合した複合体は電流を一部ブロックし、これを電流スパイクとして記録することができる。経時的なこれらのスパイクイベントを分析することにより、標的DNA上のCas9/gRNAの位置を推測し、ガイドRNA設計に基づく予測位置と比較することができる。

【0229】

上記方法を用いて、複数の標的を一度に検出し、DNA標的の性質、例えばセントロメアの反復領域、それらの反復に連結した染色体のアイデンティティ、（細菌ゲノムまたはプラスミドに含まれる）薬剤耐性遺伝子の同定、可動配列（例えば、トランスポゾン、薬剤耐性カセット）、疾患関連遺伝子の特異的アレル（例えば、癌遺伝子、自己免疫、神経変性）の同定などに関する情報することができる。

【0230】

実施例IX

ガイドRNA/Cas9複合体を用いた標的DNAのプロベイング

Michalet et al (Dynamic Molecular Combining, Science 1999)に従い、ヒトゲノムDNA（ノバジェン社）を0.5M MESバッファーpH5.5で約0.2ng/μlに希釈し、ビニルシランコーティングされた基板（ゲノミックビジョン社、パリ）上での分子コーミングを行った。簡潔に述べると、これは、ラングミュアプロジェクト（Langmuir-Blodgett）のセットアップと同様に、ビニルシランコーティングされたカバーガラスをDNA含有溶液中に浸し、その後、固定された速度でこれを引き上げることを含む。これは、「後退メニスカス」の機構により基板上にDNAを伸展させる働きをした。DNAが溶液から完全に引き上げられた際、これを10,000マイクロジュール/平方センチメートルでUV架橋結合した。これにより、表面上で一方向的に整列された大量のDNAが得られた。注意深くDNA調製した場合、YOYO-1などのDNA染色を用いてメガベースの長さのDNAを可視化することができる。

【0231】

基板上で伸展されたゲノムDNAをバッファーで湿らせた後、（37度で10分間のプレインキュベーションにより）予め形成させたgRNA/cas9（NEB社）複合体を基板に加え、1時間反応させた。その後、過剰な複合体を洗い流した。ガイドRNAは、セントロメア配列に相補的な部分を有するように設計し、ガイドの3'末端は、プローブ配列に相補的なテール核酸配列を有するように設計した。任意の所望のゲノム配列に対してガイドRNAを設計できることが当業者には容易に理解されよう。ガイドRNAおよびテール配列、プロモーターおよび終止シグナル配列を含む配列（IDT社）をインビトロ転写システムで用いて、鋳型からプローブ配列に相補的なテール配列を有するガイドRNAを合成した。Zymo社のclean/concentratorを用いて、プローブ配列に相補的なテール配列を有するガイドRNAを精製した。その後、転写されたRNAを、前述したようにCas9とインキュベートした後、伸展DNAに加えた。

【0232】

その後、スライドをBLOCKAID（インビトロジェン社）で処理した。その後、gRNA配列上のテールに対する相補性を有する16ntのDNAプローブを非ストリンジ

ェントな条件下（4×SSC、50%ホルムアミド、Blockaid）で複合体と反応させた。使用したプローブは両末端をAtto 657N色素で標識した（インビトロジェン社のカスタム合成オーダー）。ハイブリダイゼーション反応を4℃で一晩置いた。その後、スライドを洗浄して過剰な色素を除去し、TIRF顕微鏡でイメージングした。

【0233】

DNA標的は二本鎖のままであったので、Atto647Nのイメージングの前または後で、YOYO-1色素で染色することができた。ガイドRNA上の標識は赤色レーザーおよび適切なフィルターを用いて検出し、DNA染色は青色レーザーおよび適切なフィルターを用いて検出した。イメージングは広視野TIRF顕微鏡によりなされた。

【0234】

図6Aは、表面上で伸長されたまたは予め伸展された二本鎖ヒトゲノムDNA（線）に結合させた、セントロメア特異的ガイドRNA（gRNA）／Cas9複合体（点）の結果を示す画像である。図6Bは、ヒトセントロメアDNA（灰色）へのgRNA／Cas9（点）の結合の超解像度画像である。

【0235】

図6Aに示されているように、プローブにより、概算でゲノムの約1%を構成するセントロメアDNAが標的化された。複数の視野を調べたところ、図6Aに示されているように、線に沿った関連するプローブ標識の点がある視野がしばしば見られた。DNA染色により、スライドが、線に沿った関連する標識を示さない多くの伸展DNA分子を有することが示され、これにより、本明細書に記載の方法により、検出可能なgRNA／Cas9複合体を用いて、複数の核酸を含む試料内の特定の標的核酸を同定できることが実証された。

【0236】

CRISPR／CAS9バッファーは、20mM HEPES、100mM NaCl、5mM MgCl₂、0.1mM EDTAを含み、25℃でpH6.5であった。ハイブリダイゼーションバッファーは、200μlの「neat」ホルムアミド、20μlの10%SDS、120μlのblockaid、40μlの20×ssc、および20μlの水を含んでいた。使用したCas9は、終濃度25～30nMのS. pyogenesのCas9ヌクレアーゼ（NEB社）であった。使用した標識オリゴ（IDT社）濃度は約800nMであった。

【0237】

図6Cは、インビトロでのCas9結合アッセイに関する。全長ラムダDNA（約48kb）を、単独のまたはCRISPR-gRNAと複合体化したCas9でプロービングし、ビニルシラン官能化ガラス表面上で伸展させた。その後、Cas9をフィコエリトリンコンジュゲート抗体（濃）で標識し、DNAをYOYO-1（薄）で標識した。画像は、TIRFモードで100倍／1.47油浸対物レンズを用いてライカ社のDM1600上で取得した。

【0238】

実施例X

図7は、BRCA1遺伝子座に適用された位置決め赤-緑-青（RGB）バーコード化システムに関する。BRCA1遺伝子およびBRCA2遺伝子内の大きな再編成は、男女両方において乳癌および卵巣癌感受性の重要なマーカーである。再編成は、癌の発症リスクおよび適切な処置についての情報をもたらし得る。[Judkins T, Rosenthal E, Arnell C, Burbidge LA, Geary W, Barrus T, Schoenberger J, Trost J, Wenstrup RJ, Roa BB. Clinical significance of large rearrangements in BRCA1 and BRCA2. Cancer. 2012 Nov 1;118(21):5210-6.; Liede A, Karlan BY, Narod SA. Cancer risks for male carriers of germline mutations in BRCA1 or BRCA2: a review of the literature. J Clin Oncol. 2004 Feb 15;22(4):735-42]。これらの大きな再編成の範囲は非常に広く、これらの再編成の特徴解析には通常、PCR増幅DNAのサンガーシーケンシングが用いられる。本発明者らのgRNA／Cas9プロービング戦略は、遺伝子座に沿った特異的な色パ

10

20

30

40

50

ターン（表 3、位置決めコード）を用いて、B R C A 遺伝子座の全長を高密度（100 bp 当たり約 1 個のプロービング部位）で標識する。その遺伝子座内の再編成された任意の領域について、色パターンが変化し、これらの大きな再編成を同定することができる。本発明者らのアプローチは、シーケンシングに代わる簡便な選択肢を提供する。本発明者らのアプローチはさらに、急性骨髄性白血病などのその他の癌、B u s h y 症候群（Bushy syndrome）などの発達障害、および自閉症などの神経発達疾患におけるその他の同様な再編成を検出するために用いられる。本アプローチを適用できる別のカテゴリーの再編成としては、免疫細胞受容体の V D J 組換えが挙げられる。

【0239】

実施例 X I

図 8 は、g R N A / c a s 9 複合体に標的化される特異的位置に適用された D N A 折り紙バーコードに関する。各バーコードは、g R N A が標的化する位置に固有である。B R C A 1 遺伝子および B R C A 2 遺伝子は、サンガーシーケンシングでのみ検出可能な、より小さな挿入および欠失を含む様々な大きさのゲノム再編成を受け易い。本発明者らの g R N A / C a s 9 プロービング戦略は、各 g R N A / C a s 9 標的部位に固有のバーコードを用いて、高密度（100 bp 当たり約 1 個のプロービング部位）で各 B R C A 遺伝子座の全長を標識する。このバーコードは、以前に報告されているように蛍光折り紙バーコードの形態をとる [Lin C, Jungmann R, Leifer AM, Li C, Levner D, Church GM, Shih WM, Yin P. Submicrometre geometrically encoded fluorescent barcodes self-assembled from DNA. Nat Chem. 2012 Oct;4(10):832-9]。各バーコードを解読することにより（表 3、折り紙コード）、各 g R N A / C a s 9 および遺伝子座上のその位置が同定され、これは、遺伝子座内の再編成された領域、欠失、および挿入に関する情報を提供する。このレベルの分解能は、適切な癌の処置を決定する際に医師が考慮に入れることができる。本発明者らのアプローチは、シーケンシングに代わる選択肢を提供する。本発明者らのアプローチは、その他の癌、発達障害、および神経発達疾患における他の同様な再編成の検出にも用いられる。本アプローチを適用できる別のカテゴリーの再編成としては、免疫細胞受容体の V D J 組換えが挙げられる。

【0240】

実施例 X I I

図 9 A ~ 図 9 B は、g R N A / C a s 9 ニックからのポリメラーゼ伸長に関する。図 9 A は、g R N A および C a s 9 の D 1 0 A 変異体によって切断される標的 D N A のトップ鎖（top strand）を示している。図 9 B は、g R N A および C a s 9 の H 8 4 0 A 変異体によって切断される標的 D N A のボトム鎖（bottom strand）を示している。曲がった矢印は、ニックからのプライマー伸長の方向を示している。プライマー伸長を用いて、標的領域を標識するか、または標的領域のシーケンシングを開始することができる。本発明者らの g R N A / C a s 9 ニックおよびシーケンシングアプローチは、ゲノム上でシーケンシング開始部位を正確に標的化して配置することができる。簡潔に述べると、g R N A / C a s 9 ニッカーゼは、目的の標的位置で D N A 鎖にニックを形成する。その後、g R N A / C a s 9 が、界面活性剤、変性剤、または温度などの複数の方法のいずれかにより外される。その後、鎖置換活性を有する D N A ポリメラーゼおよび標識された d N T P を加えることにより、ニック部位から D N A を伸長させる。この g R N A / C a s 9 ニック開始法は多数の目的のゲノム領域に適用することができる。反復領域、例えばセントロメア D N A は、多数の短い反復のため、本質的にシーケンシングおよびアラインメントが難しい。ゲノム再編成は、しばしば、より小さな変異を含む。さらに、多くのゲノム再編成は特徴解析が不十分であり、再編成または融合の位置は未知である。

【0241】

実施例 X I I I

図 10 は P A M 部位を見つけるために C H O P C H O P を用いた場合に得られる出力のダイアグラムである。C H O C H O P は、所与の遺伝子座上の g R N A / C a s 9 標的およびオフターゲットを見つけてスコア化するための多くのオンラインツールで利用される

アルゴリズムの1つである [Tessa G. Montague; Jose M. Cruz; James A. Gagnon; George M. Church; Eivind Valen. (2014). CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. *Nucleic Acids Res.* 42. W401-W407]。このダイアグラムは Her 2 エキソン上の標的サーチの図示的输出を表している。小さい三角形は、Her 2 エキソン上の gRNA/Cas9 標的部位を表す。標的配列のリストを抽出し、オフターゲットがないまたは少ない標的のみを維持するように整理した後、gRNAを設計するために用いることができる。このツールは他の遺伝子座の gRNA/Cas9 標的を見つけるために用いられる。イントロンおよびエキソンの両方または遺伝子座の外側の標的を見つけるために他のツールを用いることができる。

【0242】

10

実施例 XIV

図11は、high-fidelityポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いたガイドRNAのインビトロ転写のためのDNA鋳型のアセンブリーに関する。この戦略は、2個のユニバーサルオリゴヌクレオチドである、インビトロ転写のための T7 RNAポリメラーゼ認識モチーフの部分を含みフォワードPCRプライマーである、Fwd-T7-gRNA; および gRNA スキャフォールドである gRNA. split 60 に基づく。さらに2種類の特異的オリゴヌクレオチドである、目的の標的に特異的な配列である Sp. gRNA. split 60; およびマルチプレックス検出のためのバーコードハンドルをさらに含むリバースPCRプライマーである Rev-B1-gRNA. 18 もある。示唆される融解温度(Tm)も記載されている。この設計は、費用対効果が高く、増幅エラーを最小限に抑え、小スケールまたは大スケールのオリゴヌクレオチドに適している。DNA鋳型は、一度増幅すれば、PCRで再増幅して鋳型を作製および永続化することができ、これは新規合成より費用対効果が高い。PCRアセンブリーに要する時間は1時間未満である。PCR後、鋳型DNAに T7 RNAポリメラーゼミックスを加えることによりインビトロ転写(IVT)により gRNA を合成する。

20

【0243】

実施例 XV

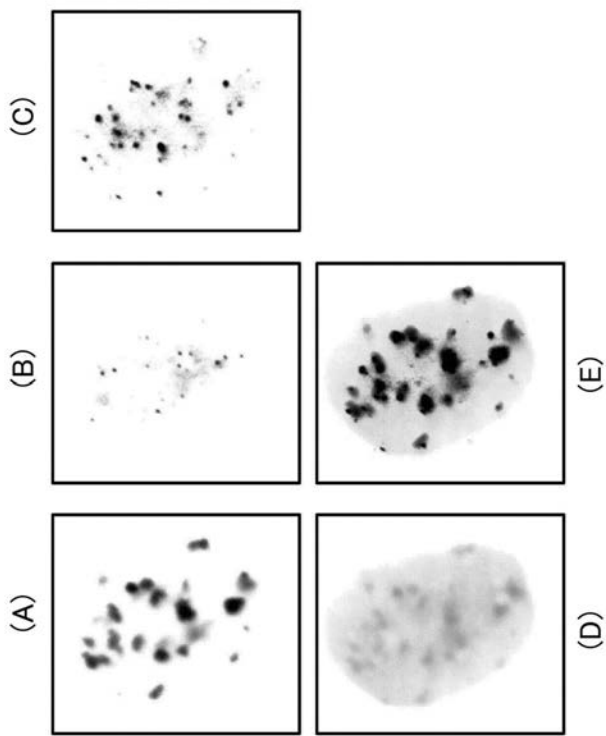
図12はALK転座のCas9-gRNA標的化の模式図である。この図は、2つの融合領域が知られている場合に、特異的バーコードを有する gRNA/Cas9 を用いることにより融合の発生率を検出できることを示している。ALK遺伝子座は、染色体内および染色体間の両方の再編成および逆位を受け易い。臨床的な結果が有害である7種のそのような再編成が知られている [Solomon B, Varella-Garcia M, Camidge DR. ALK gene rearrangements: a new therapeutic target in a molecularly defined subset of non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2009 Dec;4(12):1450-4]。本発明者らの gRNA/Cas9 プロービング戦略は、各遺伝子座に関連する色を用いて、特異的座領域を高密度(100bpあたり約1個のプロビング部位)で標識する。この戦略は、遺伝子融合および逆位の検出に有用である。2つの標識された遺伝子座が隣接する場合、それらのそれぞれの標識が共局在シグナルとして検出される。再編成の場合、2つのシグナルはもはや共局在せず、かなり離れている。逆位の場合、シグナルは共局在しないが、まだ同じ近傍にある。信頼性を高めるためには、(ALK染色体再編成による)遺伝子融合の場合、またはALK逆位の場合に、異なる共局在の組合せを提供する第3の遺伝子座を標識する。そのようなALK欠損の検出は、未分化大細胞リンパ腫(ALK-NPM1融合)、肺腺癌(ALK-EML4の融合および逆位)、および特定の小児神経芽細胞腫などの複数の癌の同定に重要である。特定のALK再編成に対しては治療法が存在する。複数のその他の疾患が遺伝子融合により特徴付けられており、本発明者らのアプローチに適している。遺伝子融合標的のいくつかの例としては、ABL1-BCR、AML1-RUNX1T1、AML1-ETV6、BCL-2-IGH、BCL-2-MLT、C-Myc-IGH、COL1A1-PDGFB、CycD1-IGH、ETV6-TRKC、ETV6-JAK、FLI1-EWS、PAX8-PPARG、PML-NR1B1、TCR-RBTN2、SS18-SSXが挙げられる。

30

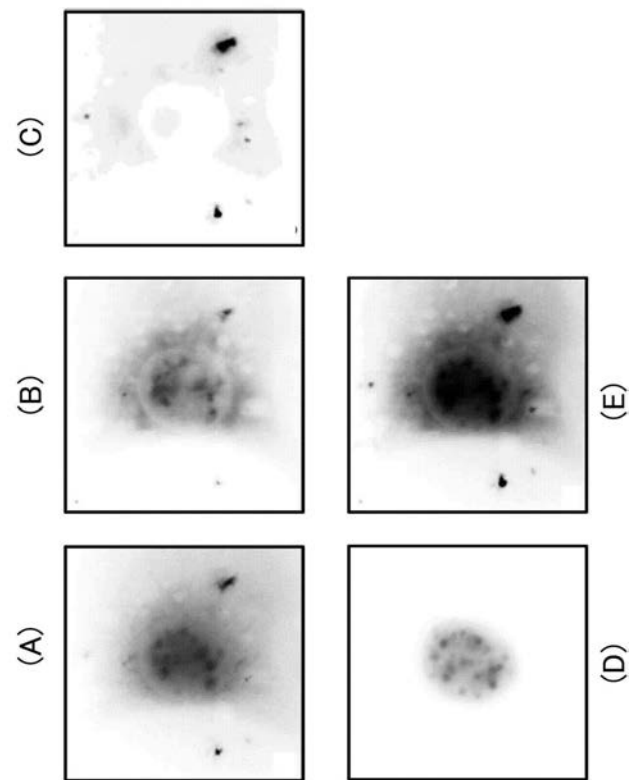
40

50

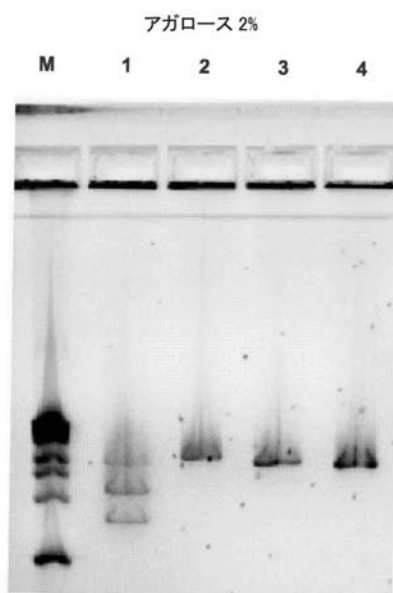
【図 1】



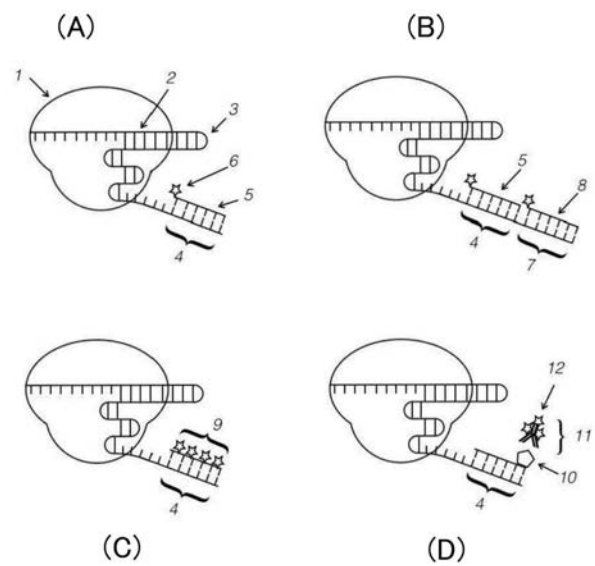
【図 2】



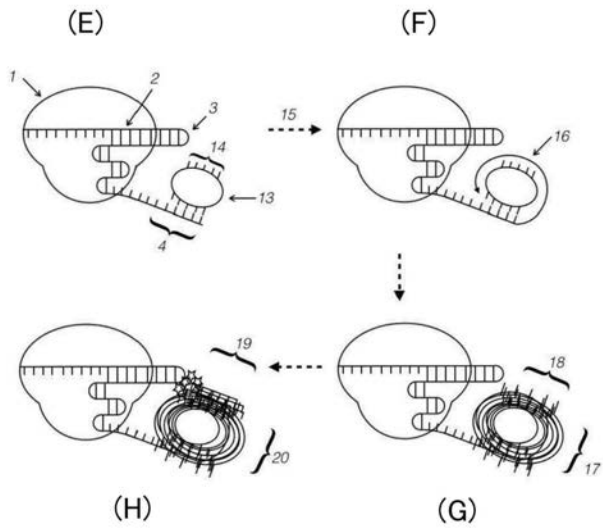
【図 3】



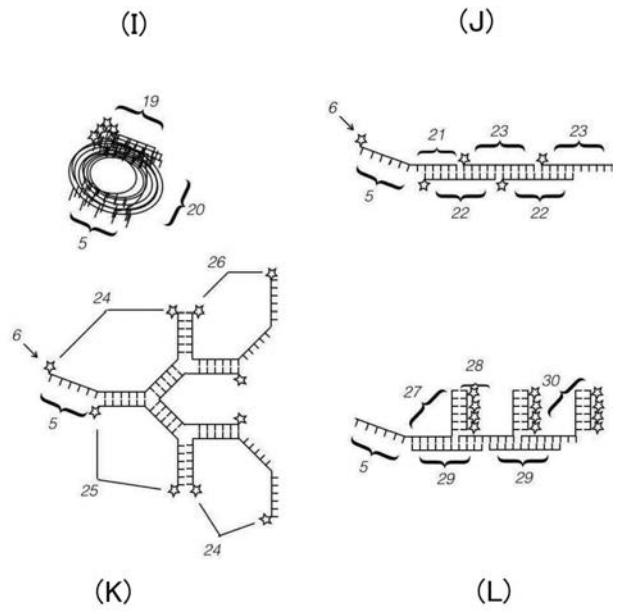
【図 4 - 1】



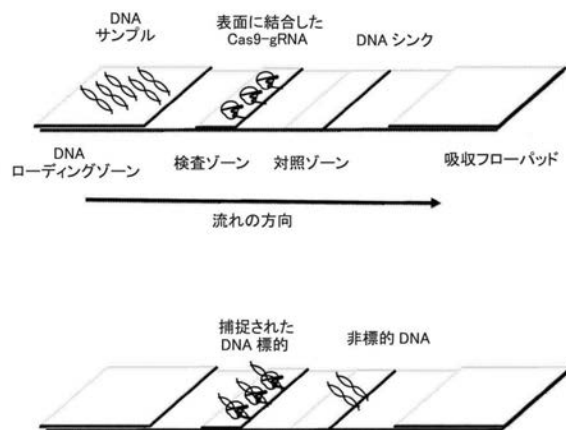
【図 4 - 2】



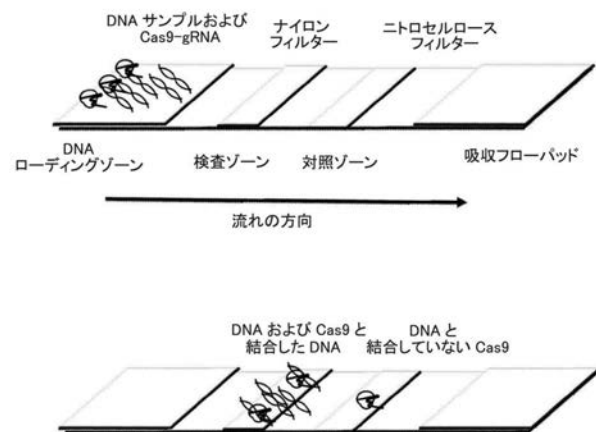
【図 4 - 3】



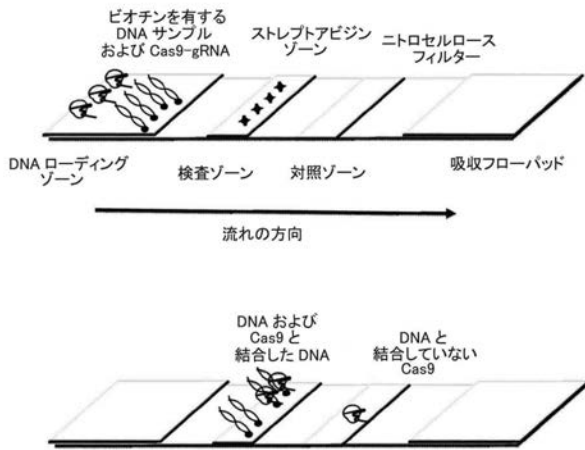
【図 5 A】



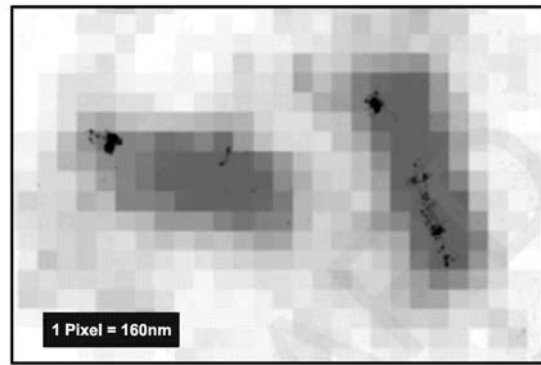
【図 5 B】



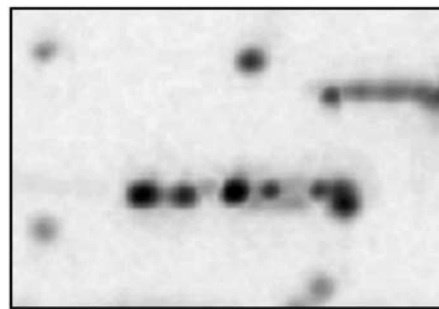
【図 5 C】



【図 6 B】



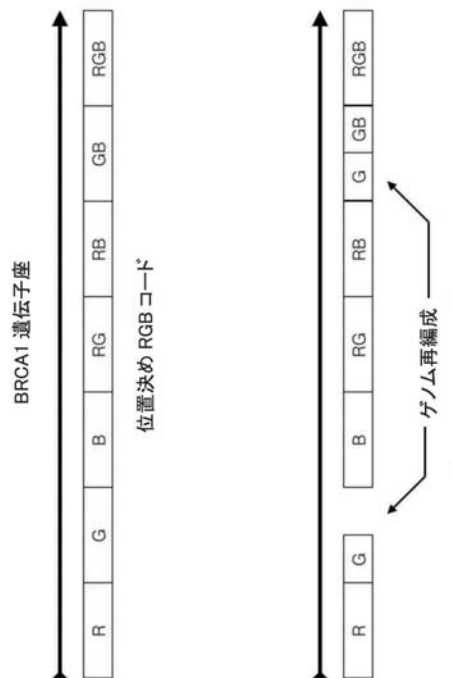
【図 6 C】



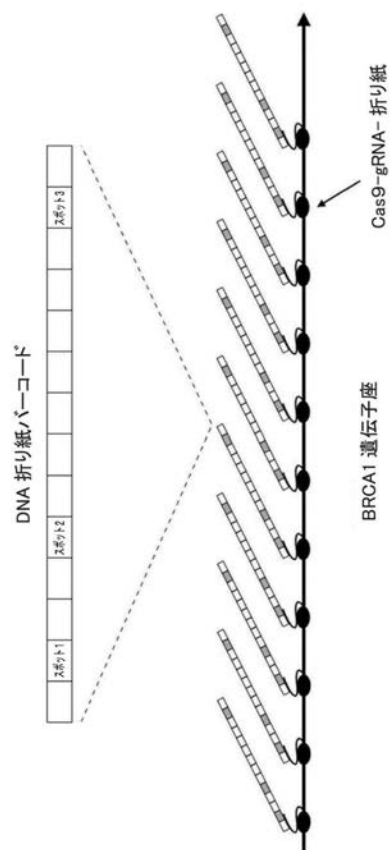
【図 6 A】



【図 7】



【図 8】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US15/45805

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12P 19/34; C12Q 1/68; C07H 21/02 (2016.01) CPC - C12P 19/34; C07H 21/04; C12Q 1/6869 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): C12P 19/34; C12Q 1/68; C07H 21/02 (2016.01) CPC: C12P 19/34; C12N 15/10, 15/09; C07H 21/04, 21/02, 21/00; C12Q 1/6869, 1/6806, 1/68		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Patseer (US, EP, WO, JP, DE, GB, CN, FR, KR, ES, AU, IN, CA, INPADOC, RU, AT, CH, TH, BR, PH); Pubmed; EBSCO; Google/Google Scholar/Google Patents: cas9, CRISPR, nickase, 'nicking mutant', D10A, H840A, 'guide RNA', gRNA, sgRNA, crRNA, primer, extension, detection, identification, label, tag, 'rolling circle', nucleotide, 'nucleic acid', DNA, RNA, sequencing, fluorescent, target		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2014/0186958 A1 (ZHANG, F et al.) July 03, 2014; figures 1, 2A; paragraphs [0033]-[0049], [0126]-[0132], [0171]	75, 76
A		1-15
Y	WO 2013/188522 A2 (GENENTECH, INC.) December 19, 2013; page 15, line 7 to page 16, line 9	75
Y	NALLUR, G et al. Signal Amplification By Rolling Circle Amplification On DNA Microarrays. Nucleic Acids Res. 01 December 2001, Vol. 29, No. 23; E118; page 1, second column, second paragraph; page 6, Figure 5A; DOI: 10.1093/nar/29.23.e118.	76
A	HSU, PD et al. DNA Targeting Specificity Of RNA-Guided CAS9 Nucleases. Nat Biotechnol. September 2013, Vol. 31, No. 9; pages 827-832; page 827, first column, first paragraph to page 827, second column, third paragraph; page 828, first column, first paragraph; page 833, second column, fourth paragraph; DOI: 10.1038/nbt.2647.	1-15
A	US 2009/0099041 A1 (CHURCH, GM et al.) April 16, 2009; paragraphs [0014], [0050], [0062]	1-15
P, Y	WO 2015/116686 A1 (AGILENT TECHNOLOGIES, INC.) August 06, 2015; abstract	1-15, 75, 76
P, Y	WO 2015/048690 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) April 02, 2015; abstract	1-15, 75, 76
P, Y	US 2014/0357523 A1 (AGILENT TECHNOLOGIES, INC.) December 04, 2014; abstract	1-15, 75, 76
P, Y	WO 2014/189628 A1 (CARIBOU BIOSCIENCES, INC.) November 27, 2014; abstract	1-15, 75, 76
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 January 2016 (22.01.2016)		Date of mailing of the international search report 20 MAY 2016
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US15/45805

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

-***Please See Supplemental Page-***

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Group I: Claims 1-15, 75, 76

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US15/45805

-Continued from Box No. III: Observations Where Unity of Invention Is Lacking:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: Claims 1-15, 75 and 76 are directed toward a method of sequencing a target nucleic acid sequence comprising contacting the target nucleic acid sequence with a guide RNA sequence having a portion complementary to the target nucleic acid sequence and a Cas9 protein, wherein the guide RNA and the Cas9 protein co-localize to the target nucleic acid sequence to form a complex, and wherein the Cas9 protein is a Cas9 nickase which nicks a strand of the target nucleic acid and wherein primer extension is initiated from the nick to form a growing chain.

Group II: Claims 18-19 are directed toward a method of detecting a target nucleic acid sequence comprising contacting the target nucleic acid sequence with a guide RNA sequence having a portion complementary to the target nucleic acid sequence and a Cas9 protein, wherein the guide RNA and the Cas9 protein co-localize to the target nucleic acid sequence to form a complex, wherein the guide RNA includes a 3' tail nucleic acid sequence, hybridizing a detectable probe sequence to the 3' tail sequence, and detecting the detectable probe sequence thereby detecting the target nucleic acid sequence.

Group III: Claims 20-34 are directed toward a method of detecting a target nucleic acid sequence comprising contacting the target nucleic acid sequence with a guide RNA sequence having a portion complementary to the target nucleic acid sequence and a Cas9 protein, wherein the guide RNA and the Cas9 protein co-localize to the target nucleic acid sequence to form a complex, and wherein the target nucleic acid is analyzed as a linear string.

Group IV: Claims 35-74 are directed toward a method of detecting a target nucleic acid sequence comprising contacting the target nucleic acid sequence with a guide RNA sequence having a portion complementary to the target nucleic acid sequence and a Cas9 protein, wherein the guide RNA and the Cas9 protein co-localize to the target nucleic acid sequence to form a complex, wherein the target nucleic acid traverses through or past a nanopore or nanogap, thereby detecting the target nucleic acid sequence.

The inventions listed as Groups I-IV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical features of Group I include a Cas9 nickase, not present in any other Group; the special technical features of Group II include a 3' tail nucleic acid sequence hybridized to a probe, not present in any other Group; the special technical features of Group III include wherein the target nucleic acid is analyzed as a linear string, not present in any other Group; the special technical features of Group IV include a nanopore or nanogap, not present in any other Group.

Groups I-IV share the technical features including: a method of detecting a target nucleic acid sequence comprising contacting the target nucleic acid sequence with a guide RNA sequence having a portion complementary to the target nucleic acid sequence and a Cas9 protein, wherein the guide RNA and the Cas9 protein co-localize to the target nucleic acid sequence to form a complex.

However, these shared technical features are previously disclosed by the publication entitled 'DNA Targeting Specificity Of RNA-Guided CAS9 Nucleases' by Hsu, et al. (hereinafter 'Hsu').

Hsu discloses a method of detecting a target nucleic acid sequence (targeting SpCas9 to genomic loci; page 827, column 1, paragraph 1) comprising contacting the target nucleic acid sequence with a guide RNA sequence (hybridizing tracrRNA to a genomic locus; page 827, column 1, paragraph 1) having a portion complementary to the target nucleic acid sequence (hybridizing tracrRNA to a genomic locus; page 827, column 1, paragraph 1, page 828, column 2, paragraph 3) and a Cas9 protein (and SpCas9; page 827, column 1, paragraph 1), wherein the guide RNA and the Cas9 protein co-localize to the target nucleic acid sequence to form a complex (wherein the Cas9 becomes associated with the CRISPR RNA; page 827, column 1, paragraph 1).

Since none of the special technical features of the Groups I-IV inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Hsu publication, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. M A T L A B

(72)発明者 ヴィニョー、 フレドリック

アメリカ合衆国 0 1 7 2 1 マサチューセッツ州 アッシュランド サドバリー ロード 1 0
3

(72)発明者 ミル、 カリム ユー.

アメリカ合衆国 0 2 1 3 8 マサチューセッツ州 ケンブリッジ エルムウッド アヴェニュー
3 0

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA13 QA19 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR56 QS25 QS34
QX02