

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-529103

(P2017-529103A)

(43) 公表日 平成29年10月5日(2017.10.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 45 頁)

(21) 出願番号	特願2017-535611 (P2017-535611)	(71) 出願人	301043487
(86) (22) 出願日	平成27年9月18日 (2015. 9. 18)		ザ・リージェンツ・オブ・ザ・ユニバーシ ティ・オブ・カリフォルニア
(85) 翻訳文提出日	平成29年5月22日 (2017. 5. 22)		The Regents of the University of Calif ornia
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/051074		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94 607, オークランド, フランクリン・ス トリート 1111番
(87) 国際公開番号	W02016/048842		
(87) 国際公開日	平成28年3月31日 (2016. 3. 31)	(74) 代理人	100121728
(31) 優先権主張番号	62/053, 595		弁理士 井関 勝守
(32) 優先日	平成26年9月22日 (2014. 9. 22)	(74) 代理人	100165803
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 金子 修平

最終頁に続く

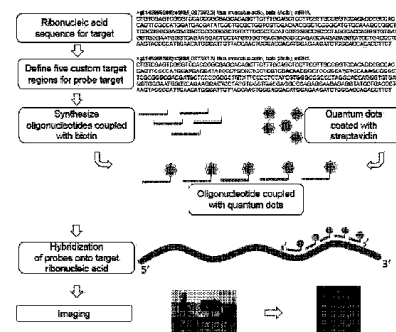
(54) 【発明の名称】 単分子RNA検出

(57) 【要約】

本発明は、少なくとも1つの標的核酸を検出する方法である。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの標的核酸は、単一の細胞内の単一のRNA分子である。いくつかの実施形態において、本件方法は量子ドットの使用に関する。一実施形態は、RNA（又は他のヌクレオチド）標的に結合できる2つ以上（いくつかの実施形態では少なくとも5つ）の核酸プローブを用いることを含む方法に関する。いくつかの実施形態において、本件方法は、1つ以上のRNA標的を検出するのに用いられ得る。いくつかの実施形態において、本件方法は、インビボでのRNAスプライシング及びRNA-RNA相互作用の単一分子解析をさらに含む。

【選択図】 図1

FIG. 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも 1 つの標的核酸を検出する方法であって、
前記少なくとも 1 つの標的核酸を、複数の異なる核酸プローブに接触することを備え、
前記複数の異なる核酸プローブは、該複数の異なる核酸プローブが前記少なくとも 1 つの標的核酸に結合する条件下で長波長の発光をする検出可能な少なくとも 1 つの要素に結合されていることを特徴とする方法。

【請求項 2】

前記少なくとも 1 つの検出可能な要素は、長波長の発光をする粒子を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記粒子は、量子ドットであることを特徴とする請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記標的核酸は、RNA を含むことを特徴とする請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記標的核酸は、単一の細胞内の単一の RNA 分子を含むことを特徴とする請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記複数の異なる核酸プローブは、5 以上の異なるプローブを含むことを特徴とする請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 7】

前記複数の異なる核酸プローブのそれぞれは、約 10 ～ 約 100 ヌクレオチド長であることを特徴とする請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記複数の異なる核酸プローブのそれぞれは、約 20 ～ 約 80 ヌクレオチド長であることを特徴とする請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記複数の異なるプローブのそれぞれは、約 30 ヌクレオチド長であることを特徴とする請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 10】

複数の前記標的核酸が検出されることを特徴とする請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

長波長の発光をする検出可能な少なくとも 1 つの要素と結合された核酸プローブ。

【請求項 12】

少なくとも 1 つの検出可能な前記要素は、長波長の発光をする粒子を含むことを特徴とする請求項 11 に記載の核酸プローブ。

【請求項 13】

前記粒子は、量子ドットであることを特徴とする請求項 12 に記載の核酸プローブ。

40

【請求項 14】

少なくとも 1 つの検出可能な前記要素は、前記核酸プローブに共有結合で結合されることを特徴とする請求項 11 ～ 13 のいずれか 1 項に記載の核酸プローブ。

【請求項 15】

約 10 ～ 約 100 ヌクレオチド長であることを特徴とする請求項 11 ～ 14 のいずれか 1 項に記載の核酸プローブ。

【請求項 16】

約 20 ～ 約 80 ヌクレオチド長であることを特徴とする請求項 11 ～ 15 のいずれか 1 項に記載の核酸プローブ。

【請求項 17】

50

約 30 ヌクレオチド長であることを特徴とする請求項 11～16 のいずれか 1 項に記載の核酸プローブ。

【請求項 18】

少なくとも 1 つの標的核酸にハイブリダイズできる複数の異なる核酸プローブを含むキットであって、

前記複数の異なる核酸プローブは、長波長の発光をする検出可能な少なくとも 1 つの要素に結合されていることを特徴とするキット。

【請求項 19】

前記少なくとも 1 つの検出可能な要素は、長波長の発光をする粒子を含むことを特徴とする請求項 18 に記載のキット。

【請求項 20】

前記粒子は、量子ドットであることを特徴とする請求項 19 に記載のキット。

【請求項 21】

前記少なくとも 1 つの検出可能な要素は、前記複数の異なる核酸プローブのそれぞれに共有結合されていることを特徴とする請求項 18～20 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 22】

複数の標的核酸を検出するための方法であって、

前記複数の標的核酸を複数の核酸プローブのセットと接触させることを備え、

前記核酸プローブのセットのそれぞれは、長波長の発光をする検出可能な少なくとも 1 つの要素に結合された複数の異なる核酸プローブを含み、

前記核酸プローブのセットのそれぞれは、異なる前記標的核酸にハイブリダイズし、

前記核酸プローブのセットのそれぞれは、長波長の発光をする検出可能な要素に結合され、

前記長波長は、前記核酸プローブの他のセットに結合された検出可能な要素の長波長の発光と区別可能であり、

前記接触は、前記複数の核酸プローブのセットが前記複数の標的核酸に結合する条件下で行われることを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願)

本願は、2014 年 9 月 22 日に出願され、発明の名称が「単分子 RNA 検出」である米国仮出願番号第 62/053595 号による優先権の利益を主張する。上記出願の開示の全体は、本明細書の全体に参照として明確に組み込まれる。

【0002】

(連邦政府資金による研究開発の記載)

本発明は、国立衛生研究所により付与された認可番号 N I H D P 2 - O D 0 0 7 4 1 7 に基づく政府支援で行われた。政府は、本発明における所定の権利を有する。

【0003】

(配列表、表、又はコンピュータプログラム表の参照)

本願は、電子フォーマットにおける配列表と共に提出されている。該配列表は、26 kb の大きさであり、2015 年 9 月 11 日に作成され、UCSD090-001W0_Sequence_Listing.TXT のファイル名で提供されている。該配列表の電子フォーマットにおける情報は、その全体が本明細書に参照として組み込まれる。

【0004】

(技術分野)

本発明は、少なくとも 1 つの標的核酸を検出するための方法及び組成物に関する。

【背景技術】

【0005】

標的核酸を検出するための従来の方法は、多大の数のプローブの使用を必要とし、又は高額である。従って、それに用いられる改良された方法及び組成物が有益である。

【発明の概要】

【0006】

本発明のいくつかの実施形態は、以下の番号付けされたパラグラフにおいて示される。

【0007】

1. 少なくとも1つの標的核酸を検出する方法であって、該少なくとも1つの標的核酸を複数の異なる核酸プローブに接触することを備え、前記複数の異なる核酸プローブは、該複数の異なる核酸プローブが前記少なくとも1つの標的核酸に結合する条件下における長波長の発光によって検出可能な少なくとも1つの要素に結合されている。

10

【0008】

2. 上記パラグラフ1の方法において、前記少なくとも1つの検出可能な要素は、長波長の発光をする粒子を含む。

【0009】

3. 上記パラグラフ2の方法において、前記粒子は、量子ドットである。

【0010】

4. 上記パラグラフ1～3のいずれかの方法において、前記標的核酸はRNAを含む。

【0011】

5. 上記パラグラフ1～4のいずれかの方法において、前記標的核酸は、単一の細胞内の単一のRNA分子を含む。

20

【0012】

6. 上記パラグラフ1～5のいずれかの方法において、前記複数の異なるプローブは、5以上の異なるプローブを含む。

【0013】

7. 上記パラグラフ1～6のいずれかの方法において、前記複数の異なるプローブのそれぞれは、約10～約100ヌクレオチド長である。

【0014】

8. 上記パラグラフ1～7のいずれかの方法において、前記複数の異なるプローブのそれぞれは、約20～約80ヌクレオチド長である。

【0015】

30

9. 上記パラグラフ1～8のいずれかの方法において、前記複数の異なるプローブのそれぞれは、約30ヌクレオチド長である。

【0016】

10. 上記パラグラフ1～9のいずれかの方法において、前記複数の標的核酸は検出される。

【0017】

11. 長波長の発光によって検出可能な少なくとも1つの要素と結合された核酸プローブ。

【0018】

12. 上記パラグラフ11の核酸プローブにおいて、少なくとも1つの検出可能な前記要素は、長波長の発光をする粒子を含む。

40

【0019】

13. 上記パラグラフ12の核酸プローブにおいて、前記粒子は量子ドットである。

【0020】

14. 上記パラグラフ11～13のいずれかの核酸プローブにおいて、少なくとも1つの検出可能な前記要素は、前記核酸プローブに共有結合で結合される。

【0021】

15. 上記パラグラフ11～14のいずれかの核酸プローブにおいて、前記核酸プローブは、約10～約100ヌクレオチド長である。

【0022】

50

16. 上記パラグラフ11～15のいずれかの核酸プローブにおいて、前記核酸プローブは、約20～約80ヌクレオチド長である。

【0023】

17. 上記パラグラフ11～16のいずれかの核酸プローブにおいて、前記核酸プローブは、約30ヌクレオチド長である。

【0024】

18. 少なくとも1つの標的核酸にハイブリダイズできる複数の異なる核酸プローブを含むキットであって、前記複数の異なる核酸プローブは、長波長の発光をすることで検出可能な少なくとも1つの要素に結合されている。

【0025】

19. 上記パラグラフ18のキットにおいて、前記少なくとも1つの検出可能な要素は、長波長で発光する粒子を含む。

【0026】

20. 上記パラグラフ19のキットにおいて、前記粒子は、量子ドットである。

【0027】

21. 上記パラグラフ18～20のいずれかのキットにおいて、前記少なくとも1つの検出可能な要素は、前記複数の異なる核酸プローブのそれぞれに共有結合されている。

【0028】

22. 複数の標的核酸を検出するための方法が提供され、前記方法は、前記標的核酸を複数の核酸プローブのセットと接触させることを備え、前記核酸プローブのセットのそれぞれは、長波長の発光をする検出可能な少なくとも1つの要素に結合された複数の異なる核酸プローブを含み、核酸プローブのセットのそれぞれは、異なる標的核酸にハイブリダイズし、また、核酸プローブのセットのそれぞれは、長波長で発光する検出可能な要素に結合され、該長波長は、核酸プローブの他のセットに結合された検出可能な要素の長波長の発光と区別可能であり、前記接触は、前記複数の核酸プローブのセットが前記複数の標的核酸に結合する条件下で行われる。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1】オリゴヌクレオチドとストレプトアビジンでコートされた量子ドットとの結合を示す図である。図1に示すように、淡い色の配列は、量子ドットで結合されたオリゴヌクレオチドプローブに相補的である。

【図2】スポット識別とリボ核酸の単分子のカウントのステップを示す。(A)は60倍の油浸対物レンズで得られた原画像(71のzスタックの29番目のスライス)である。スケールバーは約1μmを示す。(B)はLaplacian of Gaussianフィルタ後の画像が適用される。(C)はデコンボリューションされた画像であり、16ビットフォーマットに変換された画像である。(D)強度閾値規格による信号のデジタル識別を示す。

【図3】検出及びカウントされたスポットのデジタル3D再構成を示す。カウントされたスポットの視覚化について(A)は側面視を示し、(B)は上面視を示す。

【図4A】QD-smRNA-FISHを用いたRNA分子の定量を示し、(a)は量子ドットで標識されたプローブを有する単分子RNA-FISHを示す。図に示すように、淡い色の配列は、プローブに相補的である。

【図4B】QD-smRNA-FISHを用いたRNA分子の定量を示し、(b)は幹細胞中のActb RNA分子の定量を示す。図に示すように、複製1は13、14、15、19、22、23、27、30～33及び37の位置である。

【図4C-D】QD-smRNA-FISHを用いたRNA分子の定量を示し、(c)はActb遺伝子に関するsmRNA-FISH又はQD-smRNA-FISHのためのプローブの位置を示す。(d)は有機(Alexa555)及び無機(QD565)ダイで標識されたプローブから検出された信号(矢印)の共局在を示す。

【図5A】5Malat1及びSlc2a3遺伝子からのRNAの共局在の実験的証拠を示し、(a)はMalat1及びSlc2a3 RNAの共局在の仮説を試験するための二

10

20

30

40

50

重標識を示す。

【図5B-D】5Malat1及びSlc2a3遺伝子からのRNAの共局在の実験的証拠を示し、(b)はMalat1 RNA分子の定量を示す。(c)はSlc2a3 RNA分子の定量を示す。(d)はMalat1及びSlc2a3 RNAの共局在するRNA分子の定量を示す。図に示すように、グラフの下側にMalat1を示し、数字で示す領域はオーバーラップを示し、グラフの上側にSlc2a3を示す。

【図5E】5Malat1及びSlc2a3遺伝子からのRNAの共局在の実験的証拠を示し、(e)は異なるダイ及びフィルタで得られた代表的な画像であり、4つのスポット(矢印)の共局在を示す。

【図6】プローブ標識のための最適な混合物を試験するための量子ドット及びオリゴヌクレオチドの用量設定について示す。qDot625+Actbオリゴを赤のラベルで標識し、Actbオリゴを緑のラベルで標識した。qDot625+Actbオリゴ及びActbオリゴの移動は、ゲル上に示される。

【図7】進行性の蛍光の閾値でのスポットのカウントを示す。挿入されたグラフは、3つの連続的なカウントの第1のプラトー周辺のカウントである。17000~27000の任意蛍光単位を含む領域が挿入されたグラフに示され(左図、図7A)、30000~40000の任意蛍光単位を含む領域が挿入されたグラフに示される(右図、図7B)。

【図8A-B】Alexa555及びqDot565の励起及び発光の差を示し、(a)、(b)は、qDot及びAlexa555の励起波長が異なることを示す(bの刺激レーン)。

【図8C】Alexa555及びqDot565の励起及び発光の差を示し、(c)は対応する変換発光フィルタで得られたAlexa555及びqDot565のRNA-FISHシグナルを示す。

【図9A-B】qDot525シグナル及びqDot605シグナルの差を示す。qDot525及びqDot605の発光波長(実線)は分離され、左のピークがqDot525であり、右のピークがqDot605である。(a)は重なっていない範囲の発光フィルタの組合せを示す((b)の発光レーン)(FluorescenceSpectraViewer, Life Technologiesを用いて描画した)。

【図9C】qDot525シグナル及びqDot605シグナルの差を示す。qDot525及びqDot605の発光波長(実線)は分離され、左のピークがqDot525であり、右のピークがqDot605である。(c)は対応する変換発光フィルタで得られたqDot525及びqDot605のRNA-FISHシグナルを示す。

【図10A-B】二色smRNA-FISHを用いた共局在RNAを示し、(A)は、(1つのRNA分子にそれぞれ対応する)検出された全てのスポットのボクセル分布を示す。中央のドットは平均サイズである。エラーバーはサンプルの標準偏差である。(B)は、同定されたスポットの平均体積及び半径を示す。

【図10C-D】二色smRNA-FISHを用いた共局在RNAを示し、(C)は局在スポットの基準を示す。(D)は、2つの細胞をカバーする視野で同定された全てのスポットを示すグラフである。矢印は、異なる波長で蛍光を発光する色素を用いて表された共局在スポットを示す。1ピクセルは約107nmである。矢印は、Malat1とSc12a3との間の共局在を示す。

【図11】種々のサイズのCdTe量子ドットの蛍光スペクトルを示す。異なるサイズの量子ドットは、量子閉じ込めに従って異なる色の光を発する。

【発明を実施するための形態】

【0030】

(定義)

以下の記載において、多くの用語が広く用いられる。以下の定義は、現存する選択肢の理解を促進する。

【0031】

本明細書で用いられる「1つの(a)」又は「1つの(an)」は、1つ又は1つより

10

20

30

40

50

も多いことを意味する。

【0032】

本明細書で用いられる「約」の用語は、値が、値を測定するために採用された方法における誤差の固有の差異、又は試験間に存在する差異を含むことを示す。

【0033】

本明細書で用いられる「核酸プローブ」は、デオキシリボ核酸（DNA）又はリボ核酸（RNA）等のポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により生成された断片、並びにライゲーション、切断、エンドヌクレアーゼの作用及びエキソヌクレアーゼの作用のいずれかにより生成された断片を意味し、それは標的核酸（すなわち、DNA標的又はRNA標的）の存在を検出するために用いられ得る。核酸プローブは、天然起源のヌクレオチド（DNA及びRNA等）、天然起源のヌクレオチドのアナログ（例えば天然起源ヌクレオチドのエナンチオマー型）又はその両方の組合せであるモノマーにより構成され得る。長波長で発光する量子ドット又は同等の粒子でラベルされる核酸プローブ又はハイブリダイゼーションプローブは、種々の微生物の核酸配列に存在する相補的な部分又は配列を同定するのに用いられ得る。核酸プローブは、可変長のDNA又はRNAの断片を含み得る。プローブのサイズは、約10、約20、約30、約40、約50、約60、約70、約80、約90、約100、約200、約300、約400、約500、約600、約700、約800、約900若しくは約1000塩基長、又は上記値のいずれか2つの間の長さの範囲であってもよい。標的核酸配列は、約10、約20、約30、約40、約50、約60、約70、約80、約90、約100、約200、約300、約400、約500、約600、約700、約800、約900若しくは約1000塩基長、又は上記値のいずれか2つの間の長さの範囲のサイズを含む。それは、プローブの配列に相補的な核酸配列（DNA標的又はRNA標的鎖）の存在を検出するために、DNA又はRNAサンプルに用いられ得る。それにより、プローブは、プローブと標的との間の相補性によりプローブと標的との塩基対を形成できる塩基配列を有する一本鎖核酸（DNA又はRNA）にハイブリダイズする。プローブは、まず（例えば加熱処理又は水酸化ナトリウムに曝露する等のアルカリ処理によって）一本鎖DNA（ssDNA）に変性され、その後標的ssDNA又はRNAにハイブリダイズされ得る。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの標的核酸を検出する方法が提供され、その方法は、前記少なくとも1つの標的核酸を、前記複数の異なる核酸プローブが前記少なくとも1つの標的核酸に結合する条件下で長波長発光をする少なくとも1つの検出可能な要素と結合する複数の異なる核酸プローブに接触させることを含む。いくつかの実施形態において、核酸はDNAである。いくつかの実施形態において、核酸はRNAである。いくつかの実施形態において、プローブは標的核酸鎖内の標的配列に結合する。

【0034】

本明細書において、「標的」又は「標的核酸」は、核酸プローブに相補的な核酸配列を意味する。いくつかの実施形態において、標的核酸は、単一の細胞内の単一のRNA分子を含む。いくつかの実施形態において、標的核酸は、細胞内に存在する、又は1つの細胞若しくは複数の細胞から得られる核酸サンプル内に存在する。いくつかの実施形態において、核酸プローブは、単一の標的核酸鎖における標的配列に相補的である。いくつかの実施形態において、標的核酸鎖はRNAである。いくつかの実施形態において、標的核酸鎖は、少なくとも1つの標的配列を含む。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの核酸プローブは、標的核酸鎖における少なくとも1つの標的配列に相補的である。

【0035】

「RNA」は、リボ核酸を意味し、遺伝子のコード、デコード、制御及び発現における種々の生物学的役割に参与する高分子である。RNAは、生物的反応を触媒する、遺伝子発現を制御する、又は細胞シグナルを検知して応答することにより、細胞内で積極的役割を果たす。メッセンジャーRNAは、リボソームにタンパク質配列の情報を輸送し、それはリボソームを通じて翻訳される。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの標的核酸を検出する方法を提供し、その方法は、前記少なくとも1つの標的核酸を、複数の異

なる核酸プローブが前記少なくとも1つの標的核酸に結合する条件下で長波長発光をする少なくとも1つの検出可能な要素に結合する複数の異なる核酸プローブに接触させることを含む。いくつかの実施形態において、標的核酸は、単一の細胞内の単一のRNA分子を含む。いくつかの実施形態において、その方法は、さらにインビボにおけるRNAスプライシング及びRNA-RNA相互作用の単分子解析を含む。

【0036】

「相補的」の用語は、相補的配列が参照ポリヌクレオチド配列の全て又は一部に相補的であることを意味する。例えば、ヌクレオチド配列5'-“CATTAG”-3'は、参照配列“CATTAG”に対応し、参照配列3'-“GTAATC”-5'に相補的である。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの標的核酸を検出する方法が提供され、その方法は、前記少なくとも1つの標的核酸を、複数の異なる核酸プローブが少なくとも1つの標的核酸に結合する条件下で長波長発光する少なくとも1つの検出可能な要素に結合する複数の異なる核酸プローブに接触させることを含む。いくつかの実施形態において、異なる核酸プローブは、少なくとも1つの標的核酸に相補的である。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの標的核酸は、DNA又はRNAである。いくつかの実施形態において、標的核酸はメッセンジャーRNA (mRNA) である。

【0037】

本明細書で記載される「粒子」は、ナノ結晶等の微小物を意味し、例えばそれは、長波長で発光することにより高エネルギー状態から低エネルギー状態に粒子崩壊され得る。本明細書に記載された所定の実施形態において、粒子は、約450nm、約500nm、約550nm、約600nm、約650nm、約700nm、約750nm、約800nm若しくは約850nm、又は上記値のいずれか2つの間の波長での長波長発光をする。

【0038】

「量子ドット」は、無機ナノ結晶半導体を意味する。量子ドットのサイズは、高度に調整可能な色スペクトルを可能にする発光された光の波長を反映する。量子ドットのサイズは調整可能であり、サイズの増大は、発光の波長範囲を増大し得る。従って、量子ドットは、粒子の高い比表面積の結果、特有な電子特性を示す。最も明確な結果はそれらの蛍光であり、それらのサイズにより決定される明確な色が生成される。量子ドットは、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約9、約10又は約11nmのサイズの範囲にあってもよい。本明細書に記載された所定の実施形態において、量子ドットは、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10若しくは約11nm、又は上記値のいずれか2つの間のサイズを含む。図11に示すように、例示的な量子ドットは、非常に狭い波長範囲内で発光し得るが、異なる波長で発光する異なるサイズの量子ドットを含む異なる核酸プローブと多重化又は組合せ可能な広いスペクトルに亘って励起される。図11に示すように、例示的な量子ドットは、450~850nmで発光し得る。量子ドットのサイズが大きくなるほど、その蛍光スペクトルはより赤くなる（より低いエネルギー）。反対に、小さいドットはより青い光で発光する（より高いエネルギー）。限定されることは無いが、下記表1は、発光ピーク及び発光色と例示的なサイズとの関連性を示す。

【0039】

【表 1】

サイズ (nm)	発光ピーク (nm)	色
2.2	495	青色
2.9	550	緑色
3.1	576	黄色
4.1	595	橙色
4.4	611	橙色
4.8	644	赤色
7.3	655	暗赤色

表 1：量子ドットのサイズと発光波長との関連性

10

【0040】

量子ドットの発光は、例えば450～850 nmの波長の長波長で見られる。いくつかの実施形態において、量子ドットは、約450 nm、約500 nm、約550 nm、約600 nm、約650 nm、約700 nm、約750 nm、約800 nm若しくは約850 nm、又は上記値のいずれか2つの間の波長での長波長発光をする。本明細書に記載された所定の実施形態において、量子ドットは、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10若しくは約11 nm、又は上記値のいずれか2つの間のサイズを含む。

20

【0041】

量子ドットは、種々の二元化合物により形成され得る。量子ドットは、以下に限定されないが、例えば硫化鉛、セレン化鉛、セレン化カドミウム、硫化カドミウム、ヒ化インジウム及びリン化インジウム等で構成され得る。本明細書に記載される所定の実施形態において、量子ドットは、硫化鉛、セレン化鉛、セレン化カドミウム、硫化カドミウム、ヒ化インジウム又はリン化インジウムを含む。

【0042】

標的配列に対するプローブのハイブリダイゼーションを検出するために、プローブは、長波長の発光をする量子ドット又は同等の粒子によってタグ化（又はラベル化）され得る。プローブに対して中程度から高度の相補性を有するDNA配列又はRNA転写物は、当業者に周知の画像化技術によりハイブリダイズされたプローブを可視化することにより検出される。中程度から高度の類似性を有する配列の検出は、ハイブリダイゼーション条件がどの程度の厳しさ（厳密性）かに依存し、例えば、高い厳密性は、高いハイブリダイゼーション温度やハイブリダイゼーションバッファ中の低い塩濃度等が適用され、これは高い類似性をもつ核酸配列同士のハイブリダイゼーションにのみ許容される。一方、低い厳密性は、低い温度や高い塩濃度が適用され、より低い類似性をもつ配列同士のハイブリダイゼーションの際に許容される。

30

40

【0043】

その方法に依存して、プローブは、アミド垂リン酸法を用いて合成され得る、又はPCR増幅若しくはクローニング（両方とも昔からある方法）により生成され且つラベル化され得る。例えば、プローブは、プローブのインビボでの安定性の増強のためにインビボで用いられ、RNAは好適に用いられず、代わりに、特にモルフォリノ誘導体等のRNAアナログが用いられ得る。DNAベース又はRNAベースプローブ分子は、例えば遺伝子ライブラリのスクリーニング、プロッティング法によるヌクレオチド配列の検出、並びに核酸及び組織マイクロアレイ等の他の遺伝子技術に用いられ得る。いくつかの実施形態において、プローブは、アミド垂リン酸法を用いて合成され得る、又はPCR増幅若しくはクローニングにより生成され且つラベル化され得る。いくつかの実施形態において、プロー

50

ブは、例えばモルフォリノ誘導体等のRNAアナログを含む。

【0044】

本明細書で定義される「発光スペクトル」は、高いエネルギー状態から低いエネルギー状態への変換を起こす原子又は分子により発射された電磁放射の周波数のスペクトルを意味する。

【0045】

(実施形態)

本開示は、少なくとも1つの標的核酸を検出するための方法である。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの標的核酸は、単一の細胞内の単一のRNA分子である。いくつかの実施形態において、その方法は、量子ドットの使用に関連する。いくつかの実施形態において、その方法は、約3分の1にまでコストを低減する。

【0046】

一実施形態は、RNA（又は他のヌクレオチド）標的に結合可能な2つ以上（いくつかの実施形態においては少なくとも5つ）の核酸プローブの使用を含む方法に関する。いくつかの実施形態において、核酸プローブは、約30ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態において、核酸プローブは、約10～約100ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態において、核酸プローブは、約5、約10、約20、約30、約40、約50、約60、約70、約80、約90、約100若しくは約110ヌクレオチド長、又は上記値のいずれか2つの間のヌクレオチド長である。いくつかの実施形態において、核酸プローブは、約20～約80ヌクレオチド長である。本明細書に記載される所定の実施形態において、核酸プローブは、約20、約30、約40、約50、約60、約70若しくは約80ヌクレオチド長、又は上記値のいずれか2つの間のヌクレオチド長である。いくつかの実施形態において、核酸プローブのそれぞれは、少なくとも1つの量子ドット（又は長波長の発光により特徴付けられる同等の粒子）を含む。いくつかの実施形態において、量子ドットは、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10若しくは約11nm、又は上記値のいずれか2つの間のサイズを含む。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの量子ドット又は長波長の発光により特徴付けられる同等の粒子は、約450nm、約500nm、約550nm、約600nm、約650nm、約700nm、約750nm、約800nm若しくは約850nm、又は上記値のいずれか2つの間の波長での長波長発光をする。

【0047】

いくつかの実施形態において、上記方法は、1つ以上のRNA標的を検出するために用いられ得る。いくつかの実施形態において、上記方法は、さらに、インビボでのRNAスプライシング及びRNA-RNA相互作用の単一分子解析を含む。

【0048】

現在の方法は、約20ntを含み、蛍光色素に結合された約40の核酸プローブの使用に依拠する。現在の色素は制限された発光スペクトルを有するため、このような多数のプローブが必要となる。これにより、約1500USD/ RNA標的のコストが生じる。量子ドット（QD）の使用は、それら固有の「点滅」のため、以前にはこの問題を解決するとは考えられていなかった。従って、使用中に、サンプルを観察する際にQDが発光しない約10%の機会がある。しかしながら、いくつかの実施形態において、上記問題は、同一の標的に複数のQDラベル化プローブ（好ましくは約5つ）を用いることにより回避される。これは、所定のRNA標的に結合された5つのQDによるものであり、全てのQDが同時に発光しない機会は約1/5である。これは、プローブの数を約40から約5に低減する。また、プローブ標的の特異性及び信号雑音比を増大し得る。

【0049】

いくつかの実施形態において、上記方法は、複数のRNA標的の評価を同時に可能とする。これは、現在における複数のRNA標的の同時評価が困難であり、高価な顕微鏡の使用が必要であることから有利である。いくつかの実施形態において、その方法は、細胞イメージング研究室で一般に用いられる比較的到高価でない顕微鏡の使用を許容する。い

くつかの実施形態において、その方法は、1つ以上のRNA標的の検出に用いられ得る。いくつかの実施形態において、その方法は、インビボでのRNAスプライシング及びRNA-RNA相互作用の単一分子解析をさらに含む。

【0050】

本件方法のいくつかの態様は、単一細胞内の単一RNAの検出を含む。いくつかの実施形態において、その方法は、マイクロアレイ技術と共に用いられ得る。

【0051】

いくつかの実施形態において、その方法は、単一細胞内の単一RNAを検出し、いずれかの遺伝子のRNA転写物をデジタル的に定量する。いくつかの実施形態において、その方法は、1つ以上のRNA標的を検出するのに用いられ得る。いくつかの実施形態において、その方法は、インビボでのRNAスプライシング及びRNA-RNA相互作用の単一分子解析をさらに含む。いくつかの実施形態において、その細胞は、真核細胞又は原核細胞である。いくつかの実施形態において、その細胞は真核細胞であり、その細胞はヒト細胞、ガン細胞、マクロファージ、リンパ球、腫瘍細胞、前ガン細胞又は小グリア細胞である。一つの細胞内におけるRNA又はDNAの存在による遺伝子発現の追跡に用いられ得るその分析に依存して、その細胞型は、疾病や疾病の進行を分析するために、又はその細胞内における多数の標的核酸の存在若しくは欠損により特定の疾病を予測するために、検出に用いられ得る。いくつかの実施形態において、その方法は、顕微鏡による可視化及び定量化のために、量子ドットでラベルされた一本鎖DNAオリゴヌクレオチドとRNA標的とのハイブリダイゼーションを使用する。以前には量子ドットは、周知の点滅問題のため、単一分子研究を可能にするものと考えられていなかった。いくつかの実施形態において、この問題は低減され又は克服され得る。いくつかの実施形態において、その方法は、単一分子RNA-FISHのための有機色素及び数倍ものオリゴヌクレオチドを用いる技術と比較して、コストを3分の1に低減し、検出をより明確且つ容易にし、さらにより信頼性の高い信号が得られる。いくつかの実施形態において、量子ドットは、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10若しくは約11nm、又は上記値のいずれか2つの間のサイズを含む。いくつかの実施形態において、量子ドットは、約450nm、約500nm、約550nm、約600nm、約650nm、約700nm、約750nm、約800nm若しくは約850nm、又は上記値のいずれか2つの間の波長での長波長発光をする。

【0052】

所定の遺伝子の科学的発見の大半は、その転写を研究することにより得られる。この生物学的減少（遺伝子転写）から得られた情報は、コード配列の構造からタンパク質レベルでの潜在的相互作用までの遺伝子機能に関連する重要なパラメータを推測するのに用いられる。遺伝子発現の情報の大半は、細胞集団（例えば細胞培養液又は組織サンプル）から収集されてきたが、広い領域又は研究では個々の細胞に注意が向いている。結果として、構成や組織における単一の細胞の重要性は、研究者及び資金源から注目を得ている。いくつかの実施形態において、その方法は、所望の遺伝子の転写レベルを得ることをさらに含む。いくつかの実施形態において、所望の遺伝子の転写レベルを得ることは、疾病や疾病の進行を分析するために、又はその細胞内における多数の標的核酸の存在若しくは欠損により特定の疾病を予測するために用いられ得る。

【0053】

非常に重要ではあるが、単一細胞の遺伝子発現を研究することは、技術的課題を伴う。現在、1つの技術のみが、技術的偏りが導入されること無く、単一細胞の遺伝子発現の情報を得ることを可能とする(Raj, A., Peskin, C.S., Tranchina, D., Vargas, D.Y., and Tyagi, S.(2006). Stochastic mRNA synthesis in mammalian cells. PLoS Biol. 4, e309)。この技術は、蛍光in situハイブリダイゼーションであり、近年の技術的改善は、研究者らに、顕微鏡を用いて所望の遺伝子のリボ核酸の単一分子を画像化することを可能とした(Raj, A., van den Bogaard, P., Rifkin, S.A., van Oudenaarden, A., and Tyagi, S. (2008). Imaging individual mRNA molecules using multiple singly labeled probes

. Nat. Methods 5, 877-879; Batish, M., Raj, A., and Tyagi, S.(2011). Single molecule imaging of RNA in situ. Methods Mol. Biol. 714, 3-13.Raj, A., and Tyagi, S. (2010). Detection of individual endogenous RNATranscripts in situ using multiple singly labeled probes. Methods Enzymol. 472,365-386; Shaffer, S.M., Wu, M.-T., Levesque, M.J., and Raj, A. (2013). TurboFISH: A Method for Rapid Single Molecule RNA FISH. PLoS One 8, e75120)。この利点は遺伝子発現の研究に大きなステップを与えたが、いくつかの実施形態における本件方法及び組成物は、上記現在の方法と比較してより低いコストでリボ核酸の単一分子の標的検出について、より大きく改善する。

【0054】

いくつかの実施形態において、量子ドットと結合した複数の異なる核酸プローブを用いた蛍光in situハイブリダイゼーションにより核酸の単一分子を検出する方法を提供する。例えば、いくつかの実施形態において、量子ドットと結合した5つの異なる核酸プローブが用いられる。いくつかの実施形態において、量子ドットは、核酸プローブに共有結合され得る。いくつかの実施形態において、量子ドットと結合した核酸プローブは、単一分子を検出するのに用いられ得る。量子ドットと結合するオリゴヌクレオチドは、新規の技術と共に（培養細胞又は組織中の）RNAの数をカウントするのに用いられ得る。いくつかの実施形態において、その方法は、標的分子（RNA等）に1つ以上（所定の数）の量子ドットをもたらす。例えば、いくつかの実施形態において、複数の量子ドットは、他の信号のそれぞれを補完して、標的分子の近くにもたらされ、従って「点滅」の際の信号消失を「相殺」する。点滅によって生じる量子ドットの信号の消失は、分子の検出及び定量のためにそれらを適用するための障壁となっていた。

【0055】

量子ドットは、当業者に周知の種々の技術により、核酸プローブにコンジュゲートされ得る。以下に限定されないが、量子ドットは、EDC及びN-ヒドロキシコハク酸イミド（NHS）(Choi et al. In situ visualization of gene expression usingpolymer-coated quantum-dot-DNA conjugates. Small 2009; 5:2085e91; incorporatedby reference in its entirety)、アミド架橋の形成を介して量子ドット表面に結合するためのDNAのアミン修飾体、並びにストレプトアビジンにコーティングされた量子ドットに結合するためのオリゴヌクレオチドのビオチン化物(Kim et al., Conjugation of DNA to Streptavidin-coated Quantum Dots forthe Real-time Imaging of Gene Transfer into Live Cells, NSTI-Nanotech 2004,www.nsti.org, ISBN 0-9728422-9-2 Vol. 3, 2004;これらの内容は参照として本願明細書に組み込まれる。)の存在下で核酸プローブにコンジュゲートされ得る。いくつかの実施形態において、量子ドットは、EDC及びN-ヒドロキシコハク酸イミド（NHS）の存在下で核酸にコンジュゲートされる。いくつかの実施形態において、量子ドットは、アミド架橋の形成を介して量子ドット表面に結合するための核酸のアミン修飾体によって、核酸にコンジュゲートされる。いくつかの実施形態において、量子ドットは、ストレプトアビジンにコーティングされた量子ドットに結合するための核酸のビオチン化によって、核酸にコンジュゲートされる。いくつかの実施形態において、核酸プローブは、標的核酸配列に相補的であり、プローブは、QDに共有結合されたリンカー核酸をさらに含む。いくつかの実施形態において、リンカーDNAは、アニーリングの際の量子ドットの動きを自由にできて、さらに、QDのサイズがアニーリングを妨げる場合にはアニーリングサイトから量子ドットを離すことを可能とする。アニーリング条件を改善する方法がさらに実行可能であり、当業者に周知である。例えば、標的結合サイトに相補的でない短いリンカーは、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9若しくは約10の核酸、又は上記値のいずれか2つの間の数の核酸を含む。上記核酸プローブのいくつかの実施形態において、そのプローブは核酸リンカーをさらに含み、その核酸リンカーは標的結合サイトに相補的ではなく、その核酸リンカーは、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9若しくは約10の核酸、又は上記値のいずれか2つの間の数の核酸を含み、QDはその核酸リンカーに共有結合される。

【0056】

(予め設定された) 少数の異なる核酸プローブの使用により、核酸の少なくとも1つの特定の配列にハイブリダイズすることを設計され、それは、量子ドットに結合され、標的核酸の単一分子の検出を可能とする。いくつかの実施形態において、予め設定された数(例えば5つ以上)の量子ドットの累積的蛍光は、ラベルに用いられ、分子標的の検出及び定量に用いられる。

【0057】

以前の量子ドットでラベル化されたプローブを用いる蛍光in situハイブリダイゼーションは、オリゴヌクレオチド毎に1つの量子ドット分子のみで画像化することに依拠していた(Yang, H., Wanner, I.B., Roper, S.D., and Chaudhari, N. (1999). An optimized method for in situ hybridization with signal amplification that allows the detection of rare mRNAs. *J. Histochem. Cytochem.* 47, 431-446; Chan, P., Yuen, T., Ruf, F., Gonzalez-maesó, J., & Sealfon, S. C. (2005). Method for multiplex cellular detection of mRNAs using quantum dot fluorescent in situ hybridization. *Nucleic acids research*, 33(18), 1-8. doi:10.1093/nar/gnl162; Choi, Y., Kim, H. P., Hong, S. M., Ryu, J. Y., Han, S. J., & Song, R. (2009). In situ Visualization of Gene Expression Using Polymer-Coated Quantum-Dot - DNA Conjugates. *Small*, 5(18), 2085-2091. doi:10.1002/smll.200900116; Akita, H., Umetsu, Y., Kurihara, D., & Harashima, H. (2011). Dual imaging of mRNA and protein production: An investigation of the mechanism of heterogeneity in cationic lipid-mediated transgene expression. *International Journal of Pharmaceutics*, 415, 218-220. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.05.051; Ioannou, A., Eleftheriou, I., Lubatti, A., Charalambous, A., & Skourides, P. A. (2012). High-resolution whole-mount in situ hybridization using Quantum Dot nanocrystals. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2012, 627602. doi:10.1155/2012/627602)。この方法は、量子ドットが断続的に蛍光を発光する固有の特性を有するため、光の励起により発光状態のオン/オフを示すので、標的の単一のリボ核酸を画像化するのに有効ではなく(Wu, S., Zhao, X., Zhang, Z., and Xie, H. (2006). Quantum-Dot-Labeled DNA Probes for Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) in the Microorganism *Escherichia coli*. 1062-1067; Smith, A.M., Duan, H., Mohs, A.M., and Nie, S. (2008). Bioconjugated quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60, 1226-1240)。This phenomenon, so called blinking, has been observed at different intervals at the order of deciseconds (Wu, S., Zhao, X., Zhang, Z., and Xie, H. (2006). Quantum-Dot-Labeled DNA Probes for Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) in the Microorganism *Escherichia coli*. 1062-1067; Friedrich, M., Nozadze, R., Gan, Q., Zelman-femiak, M., Ermolayev, V., Wagner, T.U., and Harms, G.S. (2009). Biochemical and Biophysical Research Communications Detection of single quantum dots in model organisms with sheet illumination microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 390, 722-727)、1つのプローブとハイブリダイズされた単一分子のリボ核酸の安定した画像化のために1つの量子ドットの使用は非実際的である。結果として、単一の分子は、光励起に従って画像化される又はされず、リボ核酸分子の正確なカウンティングが妥協される。

【0058】

現在のリボ核酸の単一分子の画像化及び検出は、有機色素でラベル化された約40のプローブ(20ヌクレオチド長)の使用に依拠する。いくつかの実施形態において、量子ドットによりラベル化された予め設定された少数(例えば5以上)のプローブは、単一のリボ核酸分子の画像化を達成するのに用いられる。いくつかの実施形態において、プローブは、約30ヌクレオチド長であってもよいが、本明細書で記載される使用に適合されるいずれの長さも用いられ得る。いくつかの実施形態において、プローブは、約10、約20、約30、約40、約50、約60、約70、約80、約90若しくは約100ヌクレオチド長、又は上記値のいずれか2つの間のヌクレオチド長である。いくつかの実施形態において、上記方法は、現在用いられる方法(有機色素に基づく方法等)と比較して、単一

分子の検出のコストを数分の1に低減する。2つの会社から得られたオリゴヌクレオチド合成のコスト見積りは、いくつかの実施形態において、リボ核酸の標的毎にオリゴヌクレオチド合成のコストを約5分の1に低減可能である（値について下記表2を参照）。

【0059】

【表2】

表2：2つの別の会社から見積られたオリゴヌクレオチド合成のコスト。なお、5つのオリゴのビオチンラベルと40個のオリゴのアミノラベルとの間に、コスト間の差異が約5倍である。

会社A
スケール 100 nmol

40個のオリゴのアミノラベル化

Nオリゴ	x	長さ (塩基)	x USD/塩基 =	オリゴのコスト
40	\$	20.00	\$ 0.55	\$ 440.00
Nオリゴ	x	アミノ修飾	x	= ラベル化のコスト
40	\$	28.00		\$ 1,120.00
合計 (USD)				\$ 1,560.00

5つのオリゴのビオチンラベル化

Nオリゴ	x	長さ (塩基)	x USD/塩基 =	オリゴのコスト
5		30	\$ 0.55	\$ 82.50
Nオリゴ	x	ビオチン修飾	x	= ラベル化のコスト
5	\$	45.00		\$ 225.00
合計 (USD)				\$ 307.50

10

20

30

会社B
スケール50nmol

40個のオリゴのアミノラベル化

Nオリゴ	x	長さ (塩基)	x	USD/塩基	オリゴのコスト
40		20		\$ 0.40	\$ 320.00
Nオリゴ	x	アミノ修飾	x	=	ラベル化のコスト
40		\$ 20.00			\$ 800.00
合計 (USD)					\$ 1,120.00

10

5つのオリゴのビオチンラベル化

Nオリゴ	x	長さ (塩基)	x	USD/塩基	オリゴのコスト
5		30		\$ 0.40	\$ 60.00
Nオリゴ	x	ビオチン修飾	x	=	ラベル化のコスト
5		\$ 35.00			\$ 175.00
合計 (USD)					\$ 235.00

20

【0060】

いくつかの実施形態において、上記方法は、有機色素に基づく方法よりも小さいRNAを検出することが可能である。これは、有機色素に基づく方法が、RNAに対して、40個のオリゴの同時のハイブリダイゼーションに十分な長さを必要とするためであり、一方、本明細書に記載された所定の実施形態は、単に2つ又はそれ以上のプローブのハイブリダイゼーションが必要なかであるため、より短いRNAの検出が可能である。いくつかの実施形態において、上記方法は、小さいRNAを検出可能であり、その小さいRNAのサイズは、約10nt、約20nt、約30nt、約40nt、約50nt、約60nt、約70nt、約80nt、約90nt、約100nt、約110nt、約120nt、約130nt、約140nt、約150nt、約160nt、約170nt、約180nt、約190nt若しくは約200nt、又は上記値のいずれか2つの間のサイズである。

30

【0061】

いくつかの実施形態において、本件方法は、他の方法と比較してより低いコストで単一分子のリボ核酸の画像化及び検出を達成するために、少数のプローブと共に光安定性の無機蛍光色素（量子ドット）を使用する。

【0062】

量子ドットを用いた蛍光in situハイブリダイゼーションによりリボ核酸の標的検出法の現在の最先端(Yang, H., Wanner, I.B., Roper, S.D., and Chaudhari, N. (1999). An optimized method for insitu hybridization with signal amplification that allows the detection of rare mRNAs. J. Histochem. Cytochem. 47, 431-446; Chan, P., Yuen, T., Ruf, F., Gonzalez-maeso, J., & Sealson, S. C. (2005). Method for multiplex cellular detection of mRNAs using quantum dot fluorescent in situ hybridization. Nucleic acids research, 33(18), 1-8. doi:10.1093/nar/gnl162; Choi, Y., Kim, H. P., Hong, S. M., Ryu, J. Y., Han, S. J., & Song, R. (2009). In situ Visualization of Gene Expression Using Polymer-Coated Quantum-Dot - DNA Conjugates. Small, 5(18), 2085-2091. doi:10.1002/sml.200900116; Akita, H., Umetsu, Y., Kurihara, D., & Harashima, H. (2011). Dual imaging of mRNA and protein production: An investigation of the mechanism of heterogeneity in cationic lipid-mediated transgene expression.

40

50

International Journal of Pharmaceutics, 415, 218-220.doi:10.1016/j.ijpharm.2011.05.051; Ioannou, A., Eleftheriou, I., Lubatti, A., Charalambous, A., & Skourides, P. A. (2012). High-resolution whole-mount insitu hybridization using Quantum Dot nanocrystals. Journal of biomedicine & biotechnology, 2012, 627602. doi:10.1155/2012/627602)は、単一分子又は単一細胞の分析における検出を達成できない、又は達成に近づくことさえできない。これらの方法は、全体として多くの細胞及び多くのRNAの全体の信号の粗い定量を目的としていた。これらの方法は、大きい技術的変動を受けるため、正確な定量を保証するものとみなされない。

【0063】

単一分子のリボ核酸の標的検出における現在の最先端は、有機色素（例えばCy3、Cy5又は他の購入可能な代替品）に結合された複数の短いオリゴヌクレオチド（40～48個のオリゴ、20ヌクレオチド長）の使用に基づく(Raj, A., van den Bogaard, P., Rifkin, S. A., van Oudenaarden, A., & Tyagi, S. (2008). Imaging individual mRNA molecules using multiple singly labeled probes. Nature methods, 5(10), 877-9. doi:10.1038/nmeth.1253; Batish, M., Raj, A., & Tyagi, S. (2011). Single molecule imaging of RNA in situ. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 714, 3-13. doi:10.1007/978-1-61779-005-8_1; Raj, A., & Tyagi, S. (2010). Detection of individual endogenous RNA transcripts in situ using multiple singly labeled probes. Methods in enzymology, 472, 365-86. doi:10.1016/S0076-6879(10)72004-8; Shaffer, S. M., Wu, M.-T., Levesque, M. J., & Raj, A. (2013). Turbo FISH: A Method for Rapid Single Molecule RNA FISH. PloS one, 8(9), e75120. doi:10.1371/journal.pone.0075120).

【0064】

本件発明のいくつかの実施形態は、量子ドットに結合された予め設定された数（例えば5以上）の異なる核酸プローブを用いる。いくつかの実施形態において、各プローブは、標的リボ核酸に相補的な30ヌクレオチドの配列を用いて設計及び合成される。いくつかの実施形態において、特注のプローブが、各ヌクレオチドの5'末端に結合されたビオチンと共に合成された。それでもなお、ビオチンリンカーがプローブのいずれかの位置に配置され得ることが好ましいであろう。例えば、いくつかの実施形態において、ビオチンリンカーは、プローブの5'末端及び／又は3'末端に付けられ得る。いくつかの実施形態において、プローブは核酸リンカーを含み、そのリンカーは標的結合サイトに相補的ではなく、その核酸リンカーは、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9若しくは約10の核酸、又は上記値のいずれか2つの間の数の核酸を含み、その核酸リンカーは量子ドットに共有結合される。いくつかの実施形態において、量子ドットは、約450nm、約500nm、約550nm、約600nm、約650nm、約700nm、約750nm、約800nm若しくは約850nm、又は上記値のいずれか2つの間の波長での長波長発光をする。いくつかの実施形態において、量子ドットは、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10若しくは約11nm、又は上記値のいずれか2つの間のサイズを含む。

【0065】

本明細書に記載された所定の実施形態において、ストレプトアビジンでコーティングされた量子ドットは、会社から購入された。量子ドットは、オリゴヌクレオチドの混合物を含むμチューブに加えられた。試験は、0.5μMのオリゴヌクレオチド毎に1μMの量子ドットの比率で行われた。そうではあるが、量子ドットとプローブとが混合された組成物のそれぞれは、適切な比率で試験されることが好ましい。コンジュゲーションは、室温（24℃）で30分間行われた。量子ドット及びオリゴヌクレオチドの溶液は、ハイブリダイゼーションに適するバッファーで混合され、その溶液は接着細胞を含むカバーガラスに接触するように滴下された。蛍光in situハイブリダイゼーションのための固定及び透過化方法の2つの異なるプロトコールは、コンジュゲート化プローブを用いて試験された。ハイブリダイゼーションは、a)細胞をパラホルムアルデヒドで固定し、triton 1xで透過化する、又はb)細胞をメタノールで固定及び透過化する、のいずれかを用いて成功

した。

【0066】

本明細書に記載のように、本件方法のいくつかの実施形態を使用すると、アクチンβ遺伝子の単一分子リボ核酸が、量子ドットと結合した5つのオリゴヌクレオチドを用いた蛍光in situハイブリダイゼーションにより、マウスのインビトロ培養幹細胞で有効に検出された。

【0067】

単一分子RNA-FISHは、多くの研究室で用いられて益々有名となっている技術である。この技術の主要な欠点は、その多大なコストであり、そのコストは一遺伝子当たり約1500USドルである。そのようなコストで数ダース又は数百の遺伝子を研究することは研究室にとって困難である。いくつかの実施形態において、本件方法は、一遺伝子当たり500USドル未満にコストを低減し、単一分子RNA-FISH市場の急速な拡大に用いられ得る。

【0068】

単一細胞のRNA定量は、急速に市場が拡大している。まず、単一細胞分析に政府支出が向いていることは明らかである。NIH単独で2012年～2017年に単一細胞分析で9千万USドル以上の初期投資が計画された(www.nih.gov/news/health/oct2012/nibib-15.htm)。NIHの所長室は、単一細胞プロジェクトのための共同資金を設け(www.commonfund.nih.gov/singlecell/)、それは、より大きい投資を伴う。産業部門から、単一細胞分析がガン、幹細胞及び神経分析になる。結局、細胞不均一性は、これらの分析の中心課題である。これらの急速な注目から、単一分子RNA検出のためのプローブに対して高い需要が生じるであろう。

【0069】

所定の遺伝子の科学的発見の大半は、その発現を研究することにより得られる。遺伝子転写から得られる情報は、コード配列の構造からタンパク質レベルでの潜在的相互作用までの遺伝子機能に関する重要なパラメータを推測するのに用いられる。遺伝子発現の相互作用の大半は、細胞集団（例えば細胞培養液又は組織サンプル）から収集されてきたが、広い領域又は研究では個々の細胞に注意が向いている。近年における正常組織及び疾病組織における細胞不均一性の認識は、単一細胞における正確なRNA検出及び定量の重要性にさらに興味が集中する。

【0070】

遺伝子転写物の正確な定量は、技術的課題を伴う。用いられる方法の大半は、リアルタイムqPCR(Valleron W, Laprevotte E, Gautier EF, Quelen C, Demur C, et al. (2012) Specific small nucleolar RNA expression profiles in acute leukemia. *Leukemia* 26: 2052-2060)、遺伝子発現マイクロアレイ(Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270: 467-470)、及びRNAシーケンシング(Chu Y, Corey DR (2012) RNA sequencing: platform selection, experimental design, and data interpretation. *Nucleic Acid Ther* 22: 271-274)を含む遺伝子の転写物のコピー数（カウント）を近似するように設計される。技術的偏りは、近似の生化学的又は生物物理学的ステップの際に、必然的に導入される。さらに、単一細胞レベルでのRNA定量は、更なる課題を含む。単一細胞分析のためのほとんどの方法は、測定の前にRNAの増幅を必要とし、それは、Nanostring nCounter（図3を参照(Nanostring (2014) nCounter Single Cell Gene Expression))、SMART-seq(Ramskold D, Luo S, Wang YC, Li R, Deng Q, et al. (2012) Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells. *Nat Biotechnol* 30: 777-782)、及びFluidigm C1-BioMark(Moignard V, Macaulay IC, Swiers G, Buettner F, Schutte J, et al. (2013) Characterization of transcriptional networks in blood stem and progenitor cells using high-throughput single-cell gene expression analysis. *Nat Cell Biol* 15: 363-372)を含む。RNA増幅ステップは、これらの測定方法におけ

る技術的偏りに加える。我々の知る限り、単一細胞におけるRNAコピー数を確実にカウントできるのはただ1つの技術のみである(Raj A, Peskin CS, Tranchina D, Vargas DY, Tyagi S (2006) Stochastic mRNA synthesis in mammalian cells. *PLoS biology* 4: e309)。単一分子RNAの蛍光in situハイブリダイゼーション(s mRNA-FISH)技術は、遺伝子のいずれのRNA分子も可視化し、RNA分子を直接的にカウントできる(Batish M, Raj A, Tyagi S (2011) Single molecule imaging of RNA in situ. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ) 714: 3-13; Raj A, van den Bogaard P, Rifkin SA, van Oudenaarden A, Tyagi S (2008) Imaging individual mRNA molecules using multiple singly labeled probes. *Nature methods* 5: 877-879; Shaffer SM, Wu M-T, Levesque MJ, Raj A (2013) Turbo FISH: A Method for Rapid Single Molecule RNA FISH. *PloS one* 8: e75120)。このキーとなる機能は、このデジタル技術(s mRNA-FISH)を、他の近似技術と区別する。さらに、s mRNA-FISHは、単一細胞におけるRNA分子を定量するための増幅を必要とせず、単一細胞分析における技術的偏りの主要な原因を排除する。

【0071】

標準s mRNA-FISHの主要な制限は、多数のオリゴヌクレオチドプローブを必要とすることである。その技術は、いずれのRNA分子に対して40程度の有機蛍光分子(色素)を付けるために、遺伝子毎に約40のオリゴヌクレオチドプローブを必要とし、RNA分子は信号を蓄積し、明らかにバックグラウンドが上昇する。従来の器具(蛍光顕微鏡)に基づいて、この技術は、雑音から信号を分離することが困難であるため、より少ないプローブで行うことができない。そのプローブの数は、超解像度の画像化のための器具が入手可能である場合に低減可能である(Lubeck E, Cai L (2012) Single-cell systems biology by super-resolution imaging and combinatorial labeling. *Nat Methods* 9: 743-748)。しかしながら、そのような器具は約500000USドルのコストがかかり、研究室の大半が入手できない。以後、我々は、本文において、入手可能な器具として通常の蛍光顕微鏡のことも論じる。本明細書に記載された所定の実施形態において、蛍光顕微鏡は、標的核酸の検出に用いられる。本明細書に記載された所定の実施形態において、本件方法は、インビボでのRNAスプライシング及びRNA-RNA相互作用の単一分子解析をさらに含む。

【0072】

多数のプローブを必要とすることは、複数の欠点を有する。まず、標準s mRNA-FISHは、比較的にかさいRNA分子又はRNA分子における特定の標的となる小さい領域を試験することができない。40程度のプローブは、標的に同時に付着可能とするために非重複でなければならず、それは、最低でも1000塩基長の標的配列を必要とする。しかしながら、50%以上のヒトmRNA分子は、1000塩基よりも短い(図4を参照、Takahashi H, Lassmann T, Murata M, Carninci P (2012) 5' end-centered expression profiling using cap-analysis gene expression and next-generation sequencing. *Nat Protoc* 7: 542-561)。さらに、約75%のヒトlncRNAは、1000塩基よりも短く、snRNA及びtRNAは通常70~95塩基であり、snRNAは約150塩基である。総合すれば、ヒトのトランスクリプトームは、主に70~1000塩基長のRNA分子からなり、それは、標準s mRNA-FISHにより試験できない。RNA分子が1000塩基よりも長いとしても、全体の転写物がハイブリダイゼーションに利用可能であることは考えられない。RNA分子の種々の部分は、タンパク質により(Ray D, Kazan H, Cook KB, Weirauch MT, Najafabadi HS, et al. (2013) A compendium of RNA-binding motifs for decoding gene regulation. *Nature* 499:172-177)、又は強く束ねられること(Tripathi V, Ellis JD, Shen Z, Song DY, Pan Q, et al. (2010) The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Mol Cell* 39: 925-938)により結合され得て、プローブハイブリダイゼーションに利用可能な部分を大幅に低減する。さらに、RNA分子のタンパク質結合部分は、多くの場合に知られていないため、プローブの断片のハイブリダイズの失敗

が、偽陰性として生じる。同じ理由で、その技術は、特に、RNA分子の特定の領域（1000塩基未満）を研究することができない。結果として、標準smRNA-FISHは、RNA-RNA相互作用又はRNAスプライシングを研究するのに用いることができない。本明細書におけるいくつかの実施形態において、少なくとも1つの標的核酸を検出するための方法が提供され、その方法は、少なくとも1つの標的核酸を複数の異なる核酸プローブに接触させることを含み、その複数の異なる核酸プローブは、該複数の異なる核酸プローブが前記少なくとも1つの標的核酸に結合する条件下で長波長の発光をする検出可能な少なくとも1つの要素に結合されている。いくつかの実施形態において、一つの標的核酸はRNAである。いくつかの実施形態において、RNAは、70～1000塩基を含む。いくつかの実施形態において、RNAは、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900若しくは1000塩基、又は上記値のいずれか2つの間の数の塩基を含む。いくつかの実施形態において、その方法は、インビボでのRNAスプライシング及びRNA-RNA相互作用の単一分子解析をさらに含む。

10

【0073】

第2に、40個のオリゴヌクレオチド（それぞれ25塩基）を合成するためのコストは、（一遺伝子毎に）約370USドルである。そのコストは、複数の遺伝子を試験するためには急速に増大するであろう。

【0074】

第3に、複数の遺伝子を平行して試験することは困難である。これは2つの理由による。異なる蛍光色素が、それぞれの遺伝子に必要なとされる。しかしながら、異なる有機色素は、大幅に異なる光安定性を示し(Lichtman JW, Conchello JA (2005) Fluorescence microscopy. Nat Methods2: 910-919; Panchuk-Voloshina N, Haugland RP, Bishop-Stewart J, Bhalgat MK, Millard PJ, et al. (1999) Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates. J Histochem Cytochem 47:1179-1188)、一定レベルで信号を得ることが困難である。有機色素の発光は、通常、ロングテール分布となり、他の色素からの信号のコンタミネーション（漏れ）を排除することが困難である。複数の遺伝子を平行して試験することが必要である場合の、その2つの問題を解決することは非常に困難である。2色RNA-FISHが試みられているが、我々は複数の遺伝子の転写コピー数を平行して正確にカウントすることが成功したという報告を知らない。さらに、漏れ及び光安定性の度合いの差の問題がある。

20

30

【0075】

いくつかの実施形態では、単一分子の検出及びカウントのために、量子ドットでラベル化された一本鎖DNAオリゴヌクレオチドとRNA標的とのハイブリダイゼーションを用いてQD-smRNA-FISHを示す。本明細書のいくつかの実施形態において、QD-smRNA-FISHのための方法が提供され、その方法は、単一分子の検出及びカウントのために、量子ドットでラベル化された一本鎖DNAオリゴヌクレオチドとRNA標的とのハイブリダイズすることを含む。量子ドットは、有機色素と比較してより優れた光安定性及びより強い蛍光発光性を有する(Resch-Genger U, Grabolle M, Cavaliere-Jaricot S, Nitschke R, Nann T(2008) Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. Nature methods5: 763-775)。我々が知る限り、これは、量子ドットが単一分子をカウントするのに用いられる初めてのことである。また、量子ドットが個々のRNA分子を可視化するために用いられる初めてのことである。量子ドットはタンパク質分子の画像化に用いられていたが(Zrazhevskiy P, Gao X (2013) Quantum dot imaging platform for single-cell molecular profiling. Nat Commun 4: 1619; Smith AM, Nie S (2012) Compact quantum dots for single-molecule imaging. J Vis Exp.)、量子ドットが単一分子のカウントに適用可能でないことは、一般に認められていた。これは、信号が途切れる、周知の「点滅」の問題によるものである(Medintz IL, Uyeda HT, Goldman ER, Mattoussi H (2005) Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. Nat Mater 4: 435-446; Roch N, Florens S, Bouchiat V, Wernsdorfer W, Balestro F (2008) Quan

40

50

tum phasetransition in a single-molecule quantum dot. Nature 453: 633-637)。画像化の際に量子ドットが単一分子のラベルに用いられていたとしても、量子ドットの無作為のサブセットは見え、単一分子の無作為のサブセットは検出できないであろう。

【0076】

本明細書に記載された所定の実施形態において、QD-smRNA-FISHが提供され、その方法は、単一分子の検出及びカウントのために、量子ドットでラベル化された一本鎖DNAオリゴヌクレオチドとRNA標的とのハイブリダイズすることを含む。いくつかの実施形態において、量子ドットは、単一分子のカウントのために用いられる。いくつかの実施形態において、量子ドットは、見えないRNA分子を可視化するために適用される。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの量子ドット又は長波長発光により特徴付けられる同等の粒子は、約450nm、約500nm、約550nm、約600nm、約650nm、約700nm、約750nm、約800nm若しくは約850nm、又は上記値のいずれか2つの間の波長での長波長発光をする。いくつかの実施形態において、量子ドットは、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10若しくは約11nm、又は上記値のいずれか2つの間のサイズを含む。いくつかの実施形態において、その方法は、インビボにおけるRNAスプライシング及びRNA-RNA相互作用の単一分子解析をさらに含む。

10

【0077】

この問題を解決するためのアイデアを生み出した。このアイデアは、各標的分子に複数の量子ドットを付けることにより、それらの信号が、単一の量子ドットのいずれかの中断した信号を補完というものである。従って、標的分子の累積的な信号は、途切れないであろう。いずれのときの画像獲得でも、いずれの分子も失われないであろう。本明細書における一実施形態の実験的検証において、5つのプローブを用いたQD-smRNA-FISHは、43個のプローブを用いた標準smRNA-FISHと同じようにRNA分子を同定した。必要なプローブの数の低減は、80~1000塩基のRNAを試験することができ、それは、標準RNA-FISHでは試験できない。従って、上記QD-smRNA-FISHの方法論を用いることで、予想外の効果が得られた。また、インビボでのRNAスプライシング及びRNA-RNA相互作用の単一分子解析を可能とする。さらに、QD-smRNA-FISHは、平行して複数の遺伝子を分析するための単純な方法を提供する。最後に重要なことは、オリゴの合成にコストがかかるため、この方法は数分の1に試薬コストを低減する。

20

30

【0078】

いくつかの実施形態において、少なくとも1つの標的核酸を検出するための方法が提供され、その方法は、少なくとも1つの標的核酸を複数の異なる核酸プローブに接触させることを含み、その複数の異なる核酸プローブは、該複数の異なる核酸プローブが前記少なくとも1つの標的核酸に結合する条件下で長波長の発光をする検出可能な少なくとも1つの要素に結合されている。いくつかの実施形態において、その方法は、インビボでのRNAスプライシング及びRNA-RNA相互作用の単一分子解析をさらに含む。

【0079】

RNA-RNA相互作用の機能は不明なところが多いが、複数のレベルの分子特性間の相互作用は、その存在が大きな興味をもたらす。このRNA-RNA相互作用の追求の増大は、研究者にmRNA-RNA相互作用を特徴付けるための重要な手段を開発させ(Chi SW, Zang JB, Mele A, Darnell RB (2009) Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps. Nature 460: 479-486; Helwak A, Kudla G, Dudnakova T, Tollervey D (2013) Mapping the human miRNA interactome by CLASH reveals frequent noncanonical binding. Cell 153: 654-665). Despite limited evidence (Batista PJ, Chang HY (2013) Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease. Cell 152: 1298-1307)、長い非コードRNA (lncRNA) が遺伝子発現の転写後調節のためにタンパク質コードRNA (mRNA) と相互作用する仮説が立てられた(Amaral PP, Dinger ME, Mercer TR, Mattick JS (2008) The eukaryotic genome as an RNA machine

40

50

. Science 319: 1787-1789)。そのためにも、計算モデルが、lncRNA-mRNA 対の仮説駆動型予測のための手段を提供していたが(Kato Y, Sato K, Hamada M, Watanabe Y, Asai K, et al. (2010) RactIP:fast and accurate prediction of RNA-RNA interaction using integer programming. Bioinformatics 26: i460-466; Wenzel A, Akbasli E, Gorodkin J (2012) RIsearch:fast RNA-RNA interaction search using a simplified nearest-neighbor energy model. Bioinformatics 28: 2738-2746)、未だ RNA-RNA 相互作用を検証するための実験的アプローチは発明されていない。相互作用をする RNA 同士は、細胞内において物理的に互いに近接するという原理を用いて、本明細書で記載された実施形態は、RNA-RNA 相互作用を画像化及び可視化するための QD-smRNA-FISH を適用することにより、RNA-RNA 相互作用の計算予測と実験的証明との間の溝を埋めるために用いられ得ることを提示する。

10

【0080】

(結果)

QD-smRNA-FISH 技術の開発

特定の所望する RNA を標的にする複数の QD ラベル化プローブを設計した (図 4 a)。標的 mRNA の配列を配列番号 59 に提示する (Genbank 受入番号 gi 145966868 も参照、本開示は参照として本明細書に組み込まれる)。本明細書における QD-smRNA-FISH 試験の全てにおいて、一遺伝子毎に 5 つのオリゴヌクレオチドを用いた。各オリゴヌクレオチドは、25~30 塩基で設計し、5' 末端に付けられた一つのビオチンを含むように合成した (IDT、表 2)。QD は、ストレプトアビジン (Invitrogen) でコーティングされているので、ラベル化は、1 μ M の QD 毎に 0.5 μ M のオリゴヌクレオチドの比率で、室温で 30 分間の条件で行った (図 6)。QD-smRNA-FISH のためのハイブリダイゼーション及び画像化のプロトコールは、標準 smRNA-FISH のハイブリダイゼーションプロトコール (Shaffer SM, Wu M-T, Levesque MJ, Raj A (2013) Turbo FISH: A Method for Rapid Single Molecule RNA FISH. PloS one 8: e75120) (Methods, Supplementary Text) から、試薬及びパラメータの多くの変化を試験することにより最適化した。プローブのハイブリダイゼーション及び画像化の後、生画像を、LoG (Laplacian of Gaussian) フィルタを最初に適用することによって、ImageJ (Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nature methods 9: 671-675) で加工し (Sage D, Neumann FR, Hediger F, Gasser SM, Unser M (2005) Automatic tracking of individual fluorescence particles: application to the study of chromosome dynamics. IEEE transactions on image processing: a publication of the IEEE Signal Processing Society 14: 1372-1383)、その後、3D 表示された信号スポットをカウントした (Bolte S, Cordelières FP (2006) A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. Journal of microscopy 224: 213-232) (方法欄)。最終のカウントが用いられた閾値に無反応であることが観察される (図 7)。

20

30

【0081】

【表 3】

表3：QD-s mRNA-FISH試験に用いられたオリゴヌクレオチド

遺伝子 名	受入番号	付着物	オリゴヌクレオチド5'-3'	CG%
<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	TCTCAAACATGATCTGGGTCATCTTTTCAC (配列番号 1)	40.0
<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	GTTGGCATAGAGGTCTTTACGGATGTCAAC (配列番号 2)	46.7
<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	CAATGATCTTGATCTTCATGGTGCTAGGAG (配列番号 3)	43.3
<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	TTTTGTCAAAGAAAGGGTGTAAAACGCAGC (配列番号 4)	40.0
<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	CGTTCAGTTTTTAAATCCTGAGTCAAAAG (配列番号 5)	36.7
<i>Malat1</i>	NR_002847.2	5' ビオチン	AAGGTCTCACATCACACACTCACT (配列番号 6)	45.8
<i>Malat1</i>	NR_002847.2	5' ビオチン	CAAAGAACAGACATGACCTGAAGT (配列番号 7)	41.6
<i>Malat1</i>	NR_002847.2	5' ビオチン	TTCTAATAGCAGCAGATTGGAACAG (配列番号 8)	40.0
<i>Malat1</i>	NR_002847.2	5' ビオチン	AACAACCACTACTCCAAACACTTG (配列番号 9)	41.6
<i>Malat1</i>	NR_002847.2	5' ビオチン	CTCAACACTCAGCCTGTTACTCAT (配列番号 10)	45.8
<i>Scd2a3</i>	NM_011401.4	5' ビオチン	TAGCCACAATACAGACAAAGCTCAT (配列番号 11)	44
<i>Scd2a3</i>	NM_011401.4	5' ビオチン	CTCAAAGAAGGCTACGTAGATCAAG (配列番号 12)	47.8
<i>Scd2a3</i>	NM_011401.4	5' ビオチン	AGAAAGTTGGAGGTCCAGTTACAA (配列番号 13)	40.0
<i>Scd2a3</i>	NM_011401.4	5' ビオチン	CGTCCTTGAAGATTCTGTTGAGTA (配列番号 14)	44.0
<i>Scd2a3</i>	NM_011401.4	5' ビオチン	CCTATCATATGCAGGGTTCTCCT (配列番号 15)	41.6

【0082】

QD-s mRNA-FISH 信号の連続性

QD-s mRNA-FISH の発光の断続性を試験した。Actb mRNA のための 5 つのハイブリダイゼーションプローブを設計し（図 3）、QD と結合させた。プローブハイブリダイゼーションの後、同一の試験サンプルの 50 個の画像を、2 つの画像収集の間において 1 秒間隔で得た。分析の単純化のために、各画像は、1 つの焦点面（スタック）でのみ得た。マルチスタック画像は、スタックのいずれかの獲得の際に信号を発するように RNA 分子のより大きな機会を与えるため、より厳密な試験となる。50 個の画像のいずれかにおいて、スポットが存在し、累積的な信号が途切れないという我々の理論が確認された。

【0083】

QD-s mRNA-FISH と標準 s mRNA-FISH との比較

RNA 分子を定量するための QD-s mRNA-FISH の能力を試験した。マルチス

10

20

30

40

50

タック画像を、上記と同様のハイブリダイズされたサンプルで得た。画像処理の後、画像化された細胞（ $N = 82$ ）毎に 11 ± 9 （平均値±標準偏差）*Actb* mRNA 分子を同定した（図 4 b）。この実施形態である QD-s mRNA-FISH を用いた RNA 分子のブローピングの正確さを評価するために、同一の RNA を標的にする色素及びプローブの異なるセットを用いてスポットの共局在を比較するための 43 個のプローブを設計し、*Alexa555* でラベル化した（表 4、図 4 c）。5 つのプローブを用いた QD-s mRNA-FISH は、*Alexa555* でラベル化された 43 個のプローブが同定したスポットとほとんど同じように同定できた（図 5 d）。観察された共局在は、複数の色素が異なる波長で励起されるため、フィルタ間で色素のクロスイメージングが生じない（方法欄、表 5、図 8）。従って、5 つのプローブを用いて行われた QD-s mRNA-FISH は、有機色素でラベル化された 43 個のプローブを用いた s mRNA-FISH と同等の正確さを達成した。従って、QD-s mRNA-FISH は、有機色素でラベル化された 43 個のプローブを用いた s mRNA-FISH を用いた場合と比較して、より有効であるといった驚くべき効果を引き起こすといえる。

【0084】

【表 4】

遺伝子名	受入番号	付着物	オリゴヌクレオチド 5'-3'	CG %
<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	TGCAAAGAAGCTGTGCTCGC (配列番号 16)	55
<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	TGTGGACCGCAACGAAGGA (配列番号 17)	60
<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	ATATCGTCATCCATGGCGAA (配列番号 18)	45
<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	ACGATGGAGGGGAATACAGC (配列番号 19)	55
<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	CACATAGGAGTCCTTCTGAC (配列番号 20)	50
<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	GTACTTCAGGGTCAGGATAC (配列番号 21)	50
<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	GTTGGTAACAATGCCATGTT (配列番号 22)	40
<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	ACACGCAGCTCATTGTAGAA (配列番号 23)	45
<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	TGATCTGGGTCATCTTTTCA (配列番号 24)	40
<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	GGGGTGTGAAGGTCTCAAA (配列番号 25)	50
<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	CTGGATGGCTACGTACATGG (配列番号 26)	55
<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	AGAGGCATACAGGGACAGCA (配列番号 27)	55
<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	CATCACAATGCCTGTGGTAC (配列番号 28)	50
<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	TCGTAGATGGGCACAGTGTG (配列番号 29)	55
<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	ATGGCGTGAGGGAGAGCATA (配列番号 30)	55

<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	ATCTTCATGAGGTAGTCTGT (配列番号 31)	40	
<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	CTGTGGTGGTGAAGCTGTAG (配列番号 32)	55	
<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	TTGATGTCACGCACGATTTC (配列番号 33)	45	
<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	ATCTCCTGCTCGAAGTCTAG (配列番号 34)	50	
<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	TAGTTTCATGGATGCCACAG (配列番号 35)	45	10
<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	GGTCTTTACGGATGTCAACG (配列番号 36)	50	
<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	GACAGCACTGTGTTGGCATA (配列番号 37)	50	
<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	TGGGTACATGGTGGTACCAC (配列番号 38)	55	
<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	AGAGCAGTAATCTCCTTCTG (配列番号 39)	45	20
<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	GATCTTCATGGTGCTAGGAG (配列番号 40)	50	
<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	GCTCAGGAGGAGCAATGATC (配列番号 41)	55	
<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	CCGATCCACACAGAGTACTT (配列番号 42)	50	
<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	ACAGTGAGGCCAGGATGGAG (配列番号 43)	60	
<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	GATCCACATCTGCTGGAAGG (配列番号 44)	55	30
<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	ACTCATCGTACTCCTGCTTG (配列番号 45)	50	
<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	TAGAAGCACTTGCGGTGCAC (配列番号 46)	55	

<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	AACGCAGCTCAGTAACAGTC (配列番号 47)	50
<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	GGTTTTGTCAAAGAAAGGGT (配列番号 48)	40
<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	TTCACCGTTCAGTTTTTAA (配列番号 49)	35
<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	ATGTTTGCTCCAACCAACTG (配列番号 50)	45
<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	TCAGCCACATTTGTAGAACT (配列番号 51)	40
<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	CCTGTAACCACTTATTTCAT (配列番号 52)	35
<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	CTTTTGGGAGGGTGAGGGAC (配列番号 53)	60
<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	CACAGAAGCAATGCTGTCAC (配列番号 54)	50
<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	AAAAAGGGAGGCCTCAGACC (配列番号 55)	55
<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	GACCAAAGCCTTCATACATC (配列番号 56)	45
<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	TTGGTCTCAAGTCAGTGTAC (配列番号 57)	45
<i>Actb</i>	NM_007393.3	5' ビオチン	GTGTAAGGTAAGGTGTGCA (配列番号 58)	50

10

20

【 0 0 8 5 】

【 表 5 】

30

表 5 : 画像化に用いられたキューブの特異性

励起		発光		色素
波長	帯域幅	波長	帯域幅	
545	25	605	70	Alexa 555
425	50	525	30	qDot 525
425	50	565	30	qDot 565
425	50	605	30	qDot 605

40

【 0 0 8 6 】

Q D - s m R N A - F I S H を用いた R N A - R N A 相互作用の試験

マウス胚性幹 (m E S) 細胞内で M a l a t 1 l n c R N A と S l c 2 a 3 m R N A とが互いに相互作用するといった仮説が立てられた。従って、細胞質内で 2 つの遺伝子の転写物の共局在について試験するために、両方の R N A を標的にする二重プロービング Q D - s m R N A - F I S H 試験を行った (図 5 a)。27 の E 1 4 m E S 細胞を分析し、それぞれ 7.6 及び 4.5 分子の M a l a t 1 及び S l c 2 a 3 R N A (図 5 b、図 5 c) を定量した。約 1.7 の M a l a t 1 / S l c 2 a 3 の転写物間の分子の比率は、q P C R 測定で観察した場合 (M a l a t 1 / S l c 2 a 3 が約 5.1) よりもわずかに低かった。この少しの不一致は、核内における M a l a t 1 転写物の q P C R の定量による可

50

能性があり(Hutchinson JN, Ensminger AW, Clemson CM, Lynch CR, Lawrence JB, et al.(2007) A screen for nuclear transcripts identifies two linked noncoding RNAs associated with SC35 splicing domains. BMC genomics 8: 39)、一方、我々のQ D - s m R N A - F I S Hは細胞質内の転写物を標的とする。興味深いことに、Q D - s m R N A - F I S Hは、マウスE S細胞の細胞質内における豊富なM a l a t 1が変動しやすいことを示す。M a l a t 1の転写物カウントは1 ~ 2 4の範囲である一方、S l c 2 a 3の範囲は2 ~ 7であった(図5 b、図5 c)。

【0087】

次に、同一の細胞内におけるM a l a t 1とS l c 2 a 3とのハイブリダイゼーション、共局在を示す信号があるか否かを問題とした。2つのR N A分子の共局在を、異なる色素によりラベル化された2つの別のスポットの質量中心が、x、y、zの各座標において2ピクセル(214nm)よりも近いかな否かで決定した(図9)(Ghavi-Helm Y, Klein F A, Pakozdi T, Ciglar L, Noordermeer D, et al.(2014) Enhancer loops appear stable during development and are associated with paused polymerase. Nature 512: 96-100.)。M a l a t 1又はS l c 2 a 3を発現する27の細胞のうち10の細胞が、両方の遺伝子の重複するR N A分子を含んでいた。全体として、16対の共局在R N A分子を検出し(図5 d)、1つの細胞で1 ~ 3の範囲で起こっていた(図5 e)。両方の遺伝子のR N A分子は細胞質中で無作為の分布を示し、従って、異なる色素でラベル化された2つのスポットの発生は無作為事象でないことが推測された(p 値 = 4×10^{-40} 、超幾何試験)。従って、四次構造における異なる遺伝子からのR N A分子の相互作用についての実験的証明が得られた。

【0088】

(検討)

この新規技術の本質的なアイデアは、量子ドットのセットにおける無作為の信号の断続性の補完を開発することである。オン状態又はオフ状態で維持する量子ドットの時間間隔は、ミリ秒から秒の範囲である(Durisic N, Wiseman PW, Grutter P, Heyes CD (2009) A common mechanism underlies the dark fraction formation and fluorescence blinking of quantum dots. ACS Nano 3: 1167-1175; Yao J, Larson DR, Vishwasrao HD, Zipfel WR, Webb WW (2005) Blinking and nonradiant dark fraction of water-soluble quantum dots in aqueous solution. Proc Natl Acad Sci U S A 102: 14284-14289)。通常、量子ドットは、オン状態で半分以上の時間を費やす(33. Durisic N, Wiseman PW, Grutter P, Heyes CD (2009) A common mechanism underlies the dark fraction formation and fluorescence blinking of quantum dots. ACS Nano 3: 1167-1175; Yao J, Larson DR, Vishwasrao HD, Zipfel WR, Webb WW (2005) Blinking and nonradiant dark fraction of water-soluble quantum dots in aqueous solution. Proc Natl Acad Sci U S A 102: 14284-14289; Frantsuzov PA, Volkan-Kacso S, Janko B (2013) Universality of the fluorescence intermittency in nanoscale systems: experiment and theory. Nano Lett 13:402-408)。異なる量子ドットの断続的な発光が独立していると仮定すると、所定の時点で、5つの量子ドットに付着されたR N A分子が蛍光信号を発しない確率は、約0.03 ($1/2^5$)。通常の画像獲得は、異なる時点で15以上の焦点面(スタック)をスキャンするため、R N A分子が3つの連続的なスタックで検出されない確率は $10^{-4} \sim 10^{-6}$ のオーダーであり、単一の細胞内でR N A分子をカウントする場合において極めて少ない。必要であれば、Q D - s m R N A - F I S Hサンプルは、複数回画像化されてもよく、これにより、量子ドットがオフ状態で集まる確率を完全に排除する。経験的に、50の連続的に得られた画像のいずれかの単一のスタックでさえ、オフ状態で集まることは見られなかった(systemsbio.ucsd.edu/qdsmrnafish/)、この開示は本願明細書に参照として組み込まれる)。さらに、Q D - s m R N A - F I S Hは、連続的な信号を用いたs m R N A - F I S Hと同一の標的を同定した(図4 c)。まとめると、一般的な考えとは逆に、量子ドットが単一分子をカウントするのに用いられ得ることを、理論的に導き出し、実験的に確認した。

【0089】

QD-smRNA-FISHの主要な利点は、より少ないオリゴヌクレオチドプローブに依存していることである。一遺伝子毎に約370USDから46USDへのコスト削減の効果がある。より重要なことは、1000以下の塩基を有するRNA分子を標的にすることができることである。そのようなRNA分子はRNAの大半を含み、従来のsmRNA-FISHにより試験されるものとしては短すぎる。同じ理由で、QD-smRNA-FISHは、RNA分子の特定の領域を標的にすることについて特有の利点を有する。これは、RNAスプライシング及びRNA-RNA相互作用の単一分子解析を可能とする。

【0090】

QD-smRNA-FISHの他の利点は、複数の遺伝子のRNA生成物を平行して試験することの適用性である。これは、2つの理由で困難な課題となっていた。まず、「色素及び蛍光タンパク質はここ数十年の間、蛍光イメージングの中心であったが、それらの蛍光は、個々の分子を観察することを必要とする高い光子束の基では不安定であり、信号の完全な消失前に数秒間のみ観察できるように発する」(Smith AM, Nie S (2012) Compact quantum dots for single-molecule imaging. J Vis Exp.)。異なる遺伝子を標的にするのに必要な他の色素は、第1色素(遺伝子)をスキャンする際に光が退色し得る。ナノ結晶は、有機色素よりも光安定性が高く(Resch-Genger U, Grabolle M, Cavaliere-Jaricot S, Nitschke R, Nann T(2008) Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. Nature methods5: 763-775; Lee LY, Ong SL, Hu JY, Ng WJ, Feng Y, et al. (2004) Use of semiconductor quantum dots for photostable immunofluorescence labeling of *Cryptosporidium parvum*. Appl Environ Microbiol 70: 5732-5736)、同一の試験サンプルのスキャンを繰り返すことを可能とする。第2に、有機色素は、特に3つ以上の異なる色素が共に用いられる際に、互いにコンタミネーションし得る。これに対して、量子ドットは、特定の蛍光スペクトルのプロファイルを有し、それらの全ては、蛍光強度の狭いガウス分布を有する(Resch-Genger U, Grabolle M, Cavaliere-Jaricot S, Nitschke R, Nann T(2008) Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. Nature methods5: 763-775)。この機能は、一つの試験において、複数の量子ドットの多重化の基礎を形成する。さらに、発光のスペクトル位置は、粒子サイズに従って調整可能である(Resch-Genger U, Grabolle M, Cavaliere-Jaricot S, Nitschke R, Nann T(2008) Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. Nature methods5: 763-775)。一つの特定の波長のために用いられる粒子のサイズは非常に類似するので、発光曲線の幅も狭くなる。商業的QDにおいて、強度の大半は、標的波長の周囲100nmの範囲内で発光される。最適なフィルタの選択と組み合わせられた特定のQDの蛍光の狭い発光は、同一細胞内で異なる色素を用いて複数の標的をプローブする試験において、QDの使用を奨励する。試験は、2つの異なる波長を標的とするQDの間の信号の明確な区別により、細胞の二重プロービングを示した(Jaiswal JK, Mattoussi H, Mauro JM, Simon SM (2003) Long-term multiplexed imaging of live cells using quantum dot bioconjugates. Nature biotechnology 21: 47-51; Wu X, Liu H, Liu J, Haley KN, Treadway JA, et al. (2003) Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. Nature biotechnology 21: 41-46)。さらなる多重化は、3つの波長(Han M, Gao X, Su JZ, Nie S (2001) Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules. Nature biotechnology 19: 631-635)又は4つの波長(Goldman ER, Clapp AR, Anderson GP, Uyeda HT, Mauro JM, et al. (2004) Multiplexed toxin analysis using four colors of quantum dot fluororeagents. Anal Chem 76: 684-688)を標的とするQDを用いて可能とする。

【0091】

(方法)

オリゴヌクレオチドを5'末端にビオチンを付着させて合成した(表2、表3、IDT)。オリゴヌクレオチドと、ストレプトアビジンに結合された色素とを、1µMの色素に

対して $0.5 \mu\text{M}$ のオリゴヌクレオチドの比率で、室温で 30 分間インキュベートすることによりラベル化を行った (図 6)。ES 細胞を、ポリ-d-リジン ($5 \mu\text{M}$ 、Sigma) 及びラミニン ($0.01 \text{ mg}/\mu\text{l}$ 、Sigma) で予めコーティングされたガラス底のマイクロチャンバ (1.5、Lab Teck) に播種した。2 時間のインキュベートの後に、細胞をヌクレアーゼが入っていない PBS で洗浄し、 -20°C のメタノールで透過化した。FISH 試験を、確立された smRNA-FISH プロトコルの修正版を用いて行った (Shaffer SM, Wu M-T, Levesque MJ, Raj A (2013) Turbo FISH: A Method for Rapid Single Molecule RNA FISH. PloS one 8: e75120)。ハイブリダイゼーションを、約 $15 \mu\text{M}$ のオリゴヌクレオチドを含むハイブリダイゼーションバッファを用いて、 40°C で 30 分間行った。過剰なプローブ及び色素を、 37°C で 30 分間の洗浄 (SSC 2×、ホルムアルデヒド 10%) を 2 度行って除去した。その後、細胞を SSC 2×バッファ (pH 7.5) で画像化した。

【0092】

広視野蛍光イメージングを、用いた色素に適するキューブ (表 4、Chroma)、及び 60 倍の油浸対物レンズ (NA=1.4、Olympus) を備えた Olympus IX83 倒立顕微鏡で行った。画像を、z 軸において $0.2 \mu\text{m}$ の間隔で ORCA-R2CCD カメラ (Hamamatsu) を用いて得た。

【0093】

イメージングの後に、生画像スタックを ImageJ で加工した (Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, et al. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. Nature methods 9: 676-682)。まず、LoG (Laplacian of Gaussian) フィルタを適用し (Sage D, Neumann FR, Hediger F, Gasser SM, Unser M (2005) Automatic tracking of individual fluorescence particles: application to the study of chromosome dynamics. IEEE transactions on image processing: a publication of the IEEE Signal Processing Society 14: 1372-1383)、z スタック全体を検討した。その画像の黒と白との値を反転させ、その後、16 ビット値をグレイの深度に変換した。次に、3D レンダリングされた単一のスポットを、500 蛍光任意単位の増大する閾値間隔でカウントした (Bolte S, Cordelières FP (2006) A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. Journal of microscopy 24: 213-232) (図 7)。さらに、それらの体積 (ボクセル) を $8 \sim 125$ ピクセル³ の範囲にあるとして、スポットが RNA 分子を表しているとみなした。各画像スタックにおけるスポットの数を、3 つの連続的な同等のカウントの閾値間隔で得た (図 7)。このプラトーを超える選択された蛍光強度が、一単位のオーダーで同定されたスポットの数を低減し、実際のスポットを同定しない機会を潜在的に増大することを観察した。この基準は、画像のバックグラウンドに関わらず、信頼できるスポットの定量を可能とする。

【0094】

カウントに加えて、データを、スポットの x-y-z それぞれの質量中心において収集した。異なる色素でラベル化された 2 つの異なるスポットにおける質量中心が、x、y 及び z 座標のそれぞれにおいて 2 ピクセル (214 nm) よりも近い場合に、2 つの RNA 分子の共局在が推測される (図 10)。

【0095】

ハイブリダイゼーション及び画像化のプロトコルを最適化に導くための以下の原理を用いた。

【0096】

オリゴヌクレオチドの長さ及び数

smRNA-FISH の以前のプロトコルでは、所望の遺伝子を標的とする 20 塩基長の 12 個以上のオリゴヌクレオチドを用いていた。本件では、25~30 塩基長の 5 個のオリゴヌクレオチドを用いた。1 つの mRNA 分子に対応するスポットの信号検出は、RNA 分子をプロービングするオリゴヌクレオチドに結合された各色素の累積的な蛍光強度による。QD は、有機色素に比較して蛍光強度が大きい (Resch-Genger et al., 2008)、プローブの数はかなり低減される。25~30 塩基長の 5 つのオリゴヌクレオチド

を用いることは、蛍光スポットをバックグラウンドと見分けることを可能とし、それは通常、散在された単一のQ Dを含む。以前の研究では、30塩基長の5つのオリゴヌクレオチドが、比較的によく多くのRNA分子を定量する際に、感度と特異性との間の適切なバランスを達成することを示した(Religio et al., 2002)。

【0097】

Q Dとオリゴヌクレオチドとの適切な比率の検討

量子ドットとオリゴヌクレオチドとの適切な比率を見つけるための試験について、Q Dでラベル化されたオリゴヌクレオチドを最大にするために行った。また、それは、オリゴヌクレオチドとQ Dとが接触していない数を低減する。非ラベル化オリゴヌクレオチドは、プローブサイトにおいて競合し、RNA分子に結合しても蛍光を発光しない。オリゴヌクレオチドにコンジュゲートされていないQ Dは、洗い流されず、バックグラウンドの増大に寄与し得る。

【0098】

10～50 μ Mのプローブ濃度

現在のturbo fishプロトコルでは、30秒から10分の範囲で、400 μ Mの濃度でプローブをハイブリダイズする。この現在のプロトコルでは、各ヌクレオチドが10～50 μ Mの濃度で行われる。用いられるプローブは、10分の1よりも少ない濃度であり、試験毎における我々のコストを最適化する。これを補うために、ハイブリダイゼーションの時間が延長され得る。

【0099】

ハイブリダイゼーション時間

ハイブリダイゼーションバッファ中のプローブが少ないため、ハイブリダイゼーション時間を30秒から30分に延長した。さらに、Q Dは有機色素よりも大きく(Resch-Genger et al., 2008)、細胞を透過するのに構造的により長い時間を必要とし得る。

【0100】

洗浄時間

Q Dは、有機色素よりも大きく、細胞組織を出るのに長い時間がかかり得るため、プローブを30分間洗浄した。

【0101】

上述から、本開示の種々の実施形態は、説明のために本明細書に記載されたものであり、種々の変更が、本開示の範囲及び精神から逸脱しない範囲でなされ得ると考えられるであろう。従って、本明細書に開示された種々の実施形態は、以下の特許請求の範囲により示された実際の範囲及び精神に限定されると意図されない。

【0102】

(追加の実施形態)

いくつかの実施形態において、少なくとも1つの標的核酸を検出する方法が提供され、その方法は、前記少なくとも1つの標的核酸を、複数の異なる核酸プローブに接触することを備え、前記複数の異なる核酸プローブは、該複数の異なる核酸プローブが前記少なくとも1つの標的核酸に結合する条件下で長波長の発光をする検出可能な少なくとも1つの要素に結合されている。いくつかの実施形態において、前記少なくとも1つの検出可能な要素は、長波長の発光をする粒子を含む。いくつかの実施形態において、複数の異なる核酸プローブは、少なくとも1つの標的核酸のための少なくとも1つのプローブを含む。いくつかの実施形態において、異なり且つ区別可能な長波長で発光する検出要素に結合されたプローブのセットのそれぞれを含む複数のプローブのセットは、複数の標的核酸を検出するために用いられ得る。いくつかの実施形態において、核酸プローブは、1つの核酸鎖におけるプローブに相補的な固有の配列に向かう。いくつかの実施形態において、異なるプローブは、1つの標的核酸鎖における異なる固有の標的核酸配列を標的とする。いくつかの実施形態において、複数の異なる核酸プローブは、少なくとも1つ又は2つの標的核酸のための少なくとも2つのプローブを含む。いくつかの実施形態において、複数の異なる核酸プローブは、少なくとも1つ、2つ又は3つの標的核酸のための少なくとも3つの

プローブを含む。いくつかの実施形態において、複数の異なる核酸プローブは、少なくとも1つ、2つ、3つ又は4つの標的核酸のための少なくとも4つのプローブを含む。いくつかの実施形態において、複数の異なる核酸プローブは、少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ又は5つの標的核酸のための少なくとも5つのプローブを含む。いくつかの実施形態において、複数の異なる核酸プローブは、少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ又は6つの標的核酸のための少なくとも6つのプローブを含む。いくつかの実施形態において、複数の異なる核酸プローブは、少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ又は7つの標的核酸のための少なくとも7つのプローブを含む。いくつかの実施形態において、複数の異なる核酸プローブは、少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ又は8つの標的核酸のための少なくとも8つのプローブを含む。いくつかの実施形態において、複数の異なる核酸プローブは、少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ又は9つの標的核酸のための少なくとも9つのプローブを含む。いくつかの実施形態において、複数の異なる核酸プローブは、少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ又は10個の標的核酸のための少なくとも10個のプローブを含む。いくつかの実施形態において、複数の異なる核酸プローブは、5つ以上の異なるプローブを含む。いくつかの実施形態において、前記複数の異なるプローブのそれぞれは、約10、約20、約30、約40、約50、約60、約70、約80、約90若しくは約100ヌクレオチド長、又は上記値のいずれか2つの間のヌクレオチド長である。いくつかの実施形態において、量子ドットは、約450nm、約500nm、約550nm、約600nm、約650nm、約700nm、約750nm、約800nm若しくは約850nm、又は上記値のいずれか2つの間の波長での長波長発光をする。本明細書に記載された所定の実施形態において、量子ドットは、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10若しくは約11nm、又は上記値のいずれか2つの間のサイズを含む。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの検出可能な要素は、長波長発光をする粒子を含む。いくつかの実施形態において、前記粒子は量子ドットである。いくつかの実施形態において、前記標的核酸はRNAを含む。いくつかの実施形態において、前記標的核酸は、単一細胞内の単一のRNA分子を含む。いくつかの実施形態において、前記複数の異なるプローブは、5つ以上の異なるプローブを含む。いくつかの実施形態において、前記複数の異なるプローブは、約10～約100ヌクレオチド長である。いくつかの実子啓太において、前記複数の異なるプローブは、約10、約20、約30、約40、約50、約60、約70、約80、約90若しくは約100ヌクレオチド長、又は上記値のいずれか2つの間のヌクレオチド長である。いくつかの実施形態において、前記複数の異なるプローブは、約20～約80ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態において、前記複数の異なるプローブは、約30ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態において、複数の標的核酸が検出される。いくつかの実施形態において、核酸プローブはさらに核酸リンカーを含み、前記リンカーは標的結合サイトに相補的ではなく、前記核酸リンカーは、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9若しくは約10個の核酸、又は上記値のいずれか2つの間の核酸を含み、前記核酸リンカーは量子ドットに共有結合される。いくつかの実施形態において、プローブと標的核酸との接触は、約0.5分、約1分、約5分、約10分、約20分、約30分若しくは約40分、又は上記値のいずれか2つの間の時間で行われる。いくつかの実施形態において、その方法は、少なくとも1つの標的核酸をハイブリダイゼーション又は接触させて後に、プローブを30分間洗い流すことをさらに含む。いくつかの実施形態において、プローブは、約10、約20、約30、約40若しくは約50μM、又は上記値のいずれか2つの間の濃度である。いくつかの実施形態において、その方法はインビボでのRNAスプライシング及びRNA-RNA相互作用の単一分子解析をさらに含む。

【0103】

いくつかの実施形態において、核酸プローブが提供される。核酸プローブは、長波長発光をする少なくとも1つの検出可能な要素と結合され得る。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの検出可能な要素は、長波長発光をする粒子を含む。いくつかの実施形

態において、前記粒子は量子ドットである。いくつかの実施形態において、粒子は、約 450 nm、約 500 nm、約 550 nm、約 600 nm、約 650 nm、約 700 nm、約 750 nm、約 800 nm 若しくは約 850 nm、又は上記値のいずれか 2 つの間の波長での長波長発光をする。いくつかの実施形態において、粒子又は量子ドットは、約 1、約 2、約 3、約 4、約 5、約 6、約 7、約 8、約 9、約 10 若しくは約 11 nm、又は上記値のいずれか 2 つの間のサイズを含む。いくつかの実施形態において、少なくとも 1 つの検出可能な要素は、核酸プローブに共有結合される。いくつかの実施形態において、量子ドットは、EDC 及び N-ヒドロキシコハク酸イミド (NHS) の存在下で核酸プローブにコンジュゲートされる。いくつかの実施形態において、量子ドットは、アミド架橋の形成を介して量子ドット表面に結合するための核酸のアミン修飾体によって、核酸にコンジュゲートされる。いくつかの実施形態において、量子ドットは、ストレプトアビジンにコーティングされた量子ドットに結合するための核酸のビオチン化によって、プローブにコンジュゲートされる。いくつかの実施形態において、核酸プローブは、標的核酸配列に相補的であり、プローブは、QD に共有結合されたリンカー核酸をさらに含む。いくつかの実施形態において、リンカー DNA は、アニーリングの際の量子ドットの動きを自由にできて、さらに、QD のサイズがアニーリングを妨げる場合にはアニーリングサイトから量子ドットを離すことを可能とする。いくつかの実施形態において、核酸プローブは、約 10 ~ 約 100 ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態において、核酸プローブは、約 10、約 20、約 30、約 40、約 50、約 60、約 70、約 80、約 90 若しくは約 100 ヌクレオチド長、又は上記値のいずれか 2 つの間のヌクレオチド長である。いくつかの実施形態において、核酸プローブは、約 20 ~ 約 80 ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態において、前記核酸プローブは約 30 ヌクレオチド長である。

【0104】

いくつかの実施形態において、キットが提供される。キットは、少なくとも 1 つの標的核酸に少なくとも 1 つのハイブリダイズされ得る複数の異なる核酸プローブを備え、前記複数の異なる核酸プローブは、複数の異なる核酸プローブのそれぞれは、長波長の発光をする検出可能な少なくとも 1 つの要素に結合されている。いくつかの実施形態において、少なくとも 1 つの検出可能な要素は、長波長発光をする粒子を含む。いくつかの実施形態において、粒子は、約 450 nm、約 500 nm、約 550 nm、約 600 nm、約 650 nm、約 700 nm、約 750 nm、約 800 nm 若しくは約 850 nm、又は上記値のいずれか 2 つの間の波長での長波長発光をする。いくつかの実施形態において、粒子は、

【0105】

約 1、約 2、約 3、約 4、約 5、約 6、約 7、約 8、約 9、約 10 若しくは約 11 nm、又は上記値のいずれか 2 つの間のサイズを含む。いくつかの実施形態において、粒子は量子ドットである。いくつかの実施形態において、少なくとも 1 つの検出可能な要素は、複数の異なる核酸プローブのそれぞれに共有結合される。いくつかの実施形態において、量子ドットは、EDC 及び N-ヒドロキシコハク酸イミド (NHS) の存在下で核酸プローブにコンジュゲートされる。いくつかの実施形態において、量子ドットは、アミド架橋の形成を介して量子ドット表面に結合するための核酸のアミン修飾体によって、核酸にコンジュゲートされる。いくつかの実施形態において、量子ドットは、ストレプトアビジンにコーティングされた量子ドットに結合するための核酸のビオチン化によって、プローブにコンジュゲートされる。いくつかの実施形態において、核酸プローブは、標的核酸配列に相補的であり、プローブは、QD に共有結合されたリンカー核酸をさらに含む。

【0106】

いくつかの実施形態において、複数の標的核酸を検出する方法が提供され、その方法は、前記複数の標的核酸を複数の核酸プローブのセットと接触させることを備え、前記核酸プローブのセットのそれぞれは、長波長の発光をする検出可能な少なくとも 1 つの要素に結合された複数の異なる核酸プローブを含み、前記核酸プローブのセットのそれぞれは、異なる前記標的核酸にハイブリダイズし、前記核酸プローブのセットのそれぞれは、長波

長の発光をする検出可能な要素に結合され、前記長波長は、前記核酸プローブの他のセットに結合された検出可能な要素の長波長の発光と区別可能であり、前記接触は、前記複数の核酸プローブのセットが前記複数の標的核酸に結合する条件下で行われる。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの検出可能な要素は、長波長の発光をする粒子を含む。いくつかの実施形態において、前記粒子は量子ドットである。いくつかの実施形態において、標的核酸はRNAを含む。いくつかの実施形態において、標的核酸はDNAを含む。いくつかの実施形態において、標的核酸は、単一細胞内の単一RNA分子を含む。いくつかの実施形態において、標的核酸は、単一細胞内における単一DNA分子を含む。いくつかの実施形態において、複数の異なるプローブは5以上の異なるプローブを含む。いくつかの実施形態において、複数の異なるプローブは、約10～約100ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態において、複数の異なるプローブは、約20～約80ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態において、複数の異なるプローブのそれぞれは、約30ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態において、複数の標的核酸が検出される。

10

【0107】

本明細書において、以下に挙げられた参考文献のそれぞれの開示は、参照として本明細書に組み込まれる。

【0108】

(参考文献)

1. Medintz IL, Uyeda HT, Goldman ER, Mattoussi H (2005) Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nat Mater* 4: 435-446.
2. Valleron W, Laprevotte E, Gautier EF, Quelen C, Demur C, et al. (2012) Specific small nucleolar RNA expression profiles in acute leukemia. *Leukemia* 26:2052-2060.
3. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270: 467-470.
4. Chu Y, Corey DR (2012) RNA sequencing: platform selection, experimental design, and data interpretation. *Nucleic Acid Ther* 22: 271-274.
5. Nanostring (2014) nCounter Single Cell Gene Expression.
6. Ramskold D, Luo S, Wang YC, Li R, Deng Q, et al. (2012) Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells. *Nat Biotechnol* 30: 777-782.
7. Moignard V, Macaulay IC, Swiers G, Buettner F, Schutte J, et al. (2013) Characterization of transcriptional networks in blood stem and progenitor cells using high-throughput single-cell gene expression analysis. *Nat Cell Biol* 15:363-372.
8. Raj A, Peskin CS, Tranchina D, Vargas DY, Tyagi S (2006) Stochastic mRNA synthesis in mammalian cells. *PLoS biology* 4: e309.
9. Batish M, Raj A, Tyagi S (2011) Single molecule imaging of RNA in situ. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ) 714: 3-13.
10. Raj A, van den Bogaard P, Rifkin SA, van Oudenaarden A, Tyagi S (2008) Imaging individual mRNA molecules using multiple singly labeled probes. *Nature methods* 5: 877-879.
11. Shaffer SM, Wu M-T, Levesque MJ, Raj A (2013) Turbo FISH: A Method for Rapid Single Molecule RNA FISH. *PloS one* 8: e75120.
12. Lubeck E, Cai L (2012) Single-cell systems biology by super-resolution imaging and combinatorial labeling. *Nat Methods* 9: 743-748.
13. Takahashi H, Lassmann T, Murata M, Carninci P (2012) 5' end-centered expression profiling using cap-analysis gene expression and next-generation sequencing. *Nat Protoc* 7: 542-561.
14. Ray D, Kazan H, Cook KB, Weirauch MT, Najafabadi HS, et al. (2013) A compendium of RNA-binding motifs for decoding gene regulation. *Nature* 499: 172-177.

20

30

40

50

15. Tripathi V, Ellis JD, Shen Z, Song DY, Pan Q, et al. (2010) The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Mol Cell* 39: 925-938.
16. Lichtman JW, Conchello JA (2005) Fluorescence microscopy. *Nat Methods* 2: 910-919.
17. Panchuk-Voloshina N, Haugland RP, Bishop-Stewart J, Bhalgat MK, Millard PJ, et al. (1999) Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates. *J Histochem Cytochem* 47: 1179-1188.
18. Resch-Genger U, Grabolle M, Cavaliere-Jaricot S, Nitschke R, Nann T (2008) Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nature methods* 5: 763-775. 10
19. Zrazhevskiy P, Gao X (2013) Quantum dot imaging platform for single-cell molecular profiling. *Nat Commun* 4: 1619.
20. Smith AM, Nie S (2012) Compact quantum dots for single-molecule imaging. *J Vis Exp*.
21. Roch N, Florens S, Bouchiat V, Wernsdorfer W, Balestro F (2008) Quantum phase transition in a single-molecule quantum dot. *Nature* 453: 633-637.
22. Chi SW, Zang JB, Mele A, Darnell RB (2009) Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps. *Nature* 460: 479-486.
23. Helwak A, Kudla G, Dudnakova T, Tollervey D (2013) Mapping the human microRNA interactome by CLASH reveals frequent noncanonical binding. *Cell* 153: 654-665. 20
24. Batista PJ, Chang HY (2013) Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease. *Cell* 152: 1298-1307.
25. Amaral PP, Dinger ME, Mercer TR, Mattick JS (2008) The eukaryotic genome as a noncoding RNA machine. *Science* 319: 1787-1789.
26. Kato Y, Sato K, Hamada M, Watanabe Y, Asai K, et al. (2010) RactIP: fast and accurate prediction of RNA-RNA interaction using integer programming. *Bioinformatics* 26: i460-466.
27. Wenzel A, Akbasli E, Gorodkin J (2012) Rsearch: fast RNA-RNA interaction search using a simplified nearest-neighbor energy model. *Bioinformatics* 28: 2738-2746. 30
28. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods* 9: 671-675.
29. Sage D, Neumann FR, Hediger F, Gasser SM, Unser M (2005) Automatic tracking of individual fluorescence particles: application to the study of chromosome dynamics. *IEEE transactions on image processing : a publication of the IEEE Signal Processing Society* 14: 1372-1383.
30. Bolte S, Cordelières FP (2006) A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of microscopy* 224: 213-232.
31. Hutchinson JN, Ensminger AW, Clemson CM, Lynch CR, Lawrence JB, et al. (2007) A screen for nuclear transcripts identifies two linked noncoding RNAs associated with SC35 splicing domains. *BMC genomics* 8: 39. 40
32. Ghavi-Helm Y, Klein FA, Pakozdi T, Ciglar L, Noordermeer D, et al. (2014) Enhancer loops appear stable during development and are associated with paused polymerase. *Nature* 512: 96-100.
33. Durisic N, Wiseman PW, Grutter P, Heyes CD (2009) A common mechanism underlies the dark fraction formation and fluorescence blinking of quantum dots. *ACS Nano* 3: 1167-1175.
34. Yao J, Larson DR, Vishwasrao HD, Zipfel WR, Webb WW (2005) Blinking and nonradiant dark fraction of water-soluble quantum dots in aqueous solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 14284-14289. 50

35. Frantsuzov PA, Volkan-Kacso S, Janko B (2013) Universality of the fluorescence intermittency in nanoscale systems: experiment and theory. *Nano Lett* 13: 402-408.
36. Lee LY, Ong SL, Hu JY, Ng WJ, Feng Y, et al. (2004) Use of semiconductor quantum dots for photostable immunofluorescence labeling of *Cryptosporidium parvum*. *Appl Environ Microbiol* 70: 5732-5736.
37. Jaiswal JK, Mattoussi H, Mauro JM, Simon SM (2003) Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates. *Nature biotechnology* 21:47-51.
38. Wu X, Liu H, Liu J, Haley KN, Treadway JA, et al. (2003) Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nature biotechnology* 21: 41-46.
39. Han M, Gao X, Su JZ, Nie S (2001) Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules. *Nature biotechnology* 19: 631-635.
40. Goldman ER, Clapp AR, Anderson GP, Uyeda HT, Mauro JM, et al. (2004) Multiplexed toxin analysis using four colors of quantum dot fluororeagents. *Anal Chem* 76: 684-688.
41. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, et al. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods* 9:676-682.
42. Religio, Biase F., Huang N., and Zhong S., (2012) Quantum dot based single molecule RNA-FISH for counting RNA molecules and visualizing RNA interactions. (Supplementary text)
43. Raj, A., Peskin, C.S., Tranchina, D., Vargas, D.Y., and Tyagi, S. (2006). Stochastic mRNA synthesis in mammalian cells. *PLoS Biol.* 4, e309.
44. Raj, A., van den Bogaard, P., Rifkin, S.A., van Oudenaarden, A., and Tyagi, S. (2008). Imaging individual mRNA molecules using multiple singly labeled probes. *Nat. Methods* 5, 877-879.
45. Batish, M., Raj, A., and Tyagi, S. (2011). Single molecule imaging of RNA in situ. *Methods Mol. Biol.* 714, 3-13. Raj, A., and Tyagi, S. (2010). Detection of individual endogenous RNA transcripts in situ using multiple singly labeled probes. *Methods Enzymol.* 472, 365-386.
46. Shaffer, S.M., Wu, M.-T., Levesque, M.J., and Raj, A. (2013). Turbo FISH: A method for Rapid Single Molecule RNA FISH. *PLoS One* 8, e75120.
47. Yang, H., Wanner, I.B., Roper, S.D., and Chaudhari, N. (1999). An optimized method for in situ hybridization with signal amplification that allows the detection of rare mRNAs. *J. Histochem. Cytochem.* 47, 431-446.
48. Chan, P., Yuen, T., Ruf, F., Gonzalez-maeso, J., & Sealfon, S. C. (2005). Method for multiplex cellular detection of mRNAs using quantum dot fluorescent in situ hybridization. *Nucleic acids research*, 33(18), 1-8. doi:10.1093/nar/gni162
49. Choi, Y., Kim, H. P., Hong, S. M., Ryu, J. Y., Han, S. J., & Song, R. (2009). In situ Visualization of Gene Expression Using Polymer-Coated Quantum-Dot - DNA Conjugates. *Small*, 5(18), 2085-2091. doi:10.1002/smll.200900116
50. Akita, H., Umetsu, Y., Kurihara, D., & Harashima, H. (2011). Dual imaging of mRNA and protein production: An investigation of the mechanism of heterogeneity in cationic lipid-mediated transgene expression. *International Journal of Pharmaceutics*, 415, 218-220. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.05.051
51. Ioannou, A., Eleftheriou, I., Lubatti, A., Charalambous, A., & Skourides, P. A. (2012). High-resolution whole-mount in situ hybridization using Quantum Dot nanocrystals. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2012, 627602. doi:10.1155/2012

/627602

52. Wu, S., Zhao, X., Zhang, Z., and Xie, H. (2006). Quantum-Dot-Labeled DNA Probes for Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) in the Microorganism *Escherichia coli*. 1062-1067.
53. Smith, A.M., Duan, H., Mohs, A.M., and Nie, S. (2008). Bioconjugated quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60, 1226-1240.
54. Friedrich, M., Nozadze, R., Gan, Q., Zelman-femiak, M., Ermolayev, V., Wagner, T.U., and Harms, G.S. (2009). Biochemical and Biophysical Research Communications Detection of single quantum dots in model organisms with sheet illumination microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 390, 722-727. 10
55. Yang, H., Wanner, I.B., Roper, S.D., and Chaudhari, N. (1999). An optimized method for in situ hybridization with signal amplification that allows the detection of rare mRNAs. *J. Histochem. Cytochem.* 47, 431-446.
56. Chan, P., Yuen, T., Ruf, F., Gonzalez-maeso, J., & Sealfon, S. C. (2005). Method for multiplex cellular detection of mRNAs using quantum dot fluorescent in situ hybridization. *Nucleic acids research*, 33(18), 1-8. doi:10.1093/nar/gni162
57. Choi, Y., Kim, H. P., Hong, S. M., Ryu, J. Y., Han, S. J., & Song, R. (2009). In situ Visualization of Gene Expression Using Polymer-Coated Quantum-Dot - DNA Conjugates. *Small*, 5(18), 2085-2091. doi:10.1002/sml.200900116 20
58. Akita, H., Umetsu, Y., Kurihara, D., & Harashima, H. (2011). Dual imaging of mRNA and protein production: An investigation of the mechanism of heterogeneity in cationic lipid-mediated transgene expression. *International Journal of Pharmaceutics*, 415, 218-220. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.05.051
59. Ioannou, A., Eleftheriou, I., Lubatti, A., Charalambous, A., & Skourides, P. A. (2012). High-resolution whole-mount in situ hybridization using Quantum Dot nanocrystals. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2012, 627602. doi:10.1155/2012/627602
60. Raj, A., van den Bogaard, P., Rifkin, S. A., van Oudenaarden, A., & Tyagi, S. (2008). Imaging individual mRNA molecules using multiple singly labeled probes. *Nature methods*, 5(10), 877-9. doi:10.1038/nmeth.1253 30
61. Batish, M., Raj, A., & Tyagi, S. (2011). Single molecule imaging of RNA in situ. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 714, 3-13. doi:10.1007/978-1-61779-005-8_1
62. Raj, A., & Tyagi, S. (2010). Detection of individual endogenous RNA transcripts in situ using multiple singly labeled probes. *Methods in enzymology*, 472, 365-86. doi:10.1016/S0076-6879(10)72004-8
63. Shaffer, S. M., Wu, M.-T., Levesque, M. J., & Raj, A. (2013). Turbo FISH: A method for Rapid Single Molecule RNA FISH. *PloS one*, 8(9), e75120. doi:10.1371/journal.pone.0075120 40
64. Yang, H., Wanner, I.B., Roper, S.D., and Chaudhari, N. (1999). An optimized method for in situ hybridization with signal amplification that allows the detection of rare mRNAs. *J. Histochem. Cytochem.* 47, 431-446.
65. Chan, P., Yuen, T., Ruf, F., Gonzalez-maeso, J., & Sealfon, S. C. (2005). Method for multiplex cellular detection of mRNAs using quantum dot fluorescent in situ hybridization. *Nucleic acids research*, 33(18), 1-8. doi:10.1093/nar/gni162
66. Choi, Y., Kim, H. P., Hong, S. M., Ryu, J. Y., Han, S. J., & Song, R. (2009). In situ Visualization of Gene Expression Using Polymer-Coated Quantum-Dot - DNA Conjugates. *Small*, 5(18), 2085-2091. doi:10.1002/sml.200900116
67. Akita, H., Umetsu, Y., Kurihara, D., & Harashima, H. (2011). Dual imaging of 50

mRNA and protein production: An investigation of the mechanism of heterogeneity in cationic lipid-mediated transgene expression. *International Journal of Pharmaceutics*, 415, 218-220. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.05.051

68. Ioannou, A., Eleftheriou, I., Lubatti, A., Charalambous, A., & Skourides, P. A. (2012). High-resolution whole-mount in situ hybridization using QuantumDot nanocrystals. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2012, 627602. doi:10.1155/2012/627602

69. Raj, A., van den Bogaard, P., Rifkin, S. A., van Oudenaarden, A., & Tyagi, S. (2008). Imaging individual mRNA molecules using multiple singly labeled probes. *Nature methods*, 5(10), 877-9. doi:10.1038/nmeth.1253

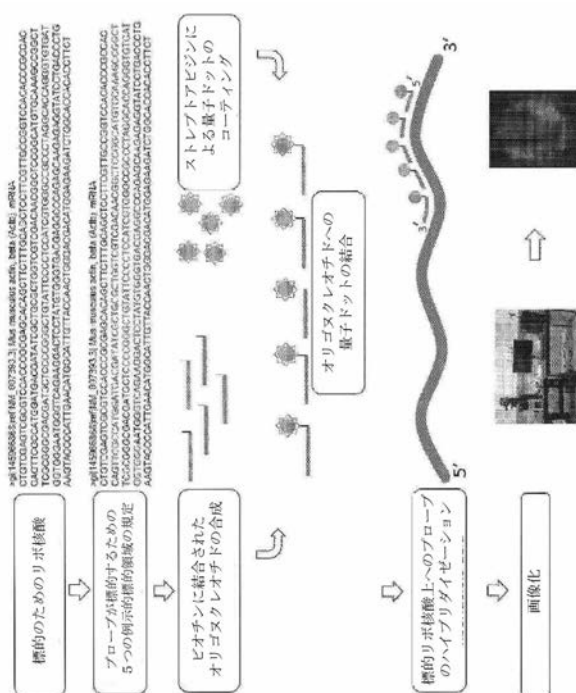
70. Batish, M., Raj, A., & Tyagi, S. (2011). Single molecule imaging of RNA in situ. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 714, 3-13. doi:10.1007/978-1-61779-005-8_1

71. Raj, A., & Tyagi, S. (2010). Detection of individual endogenous RNA transcripts in situ using multiple singly labeled probes. *Methods in enzymology*, 472, 365-86. doi:10.1016/S0076-6879(10)72004-8

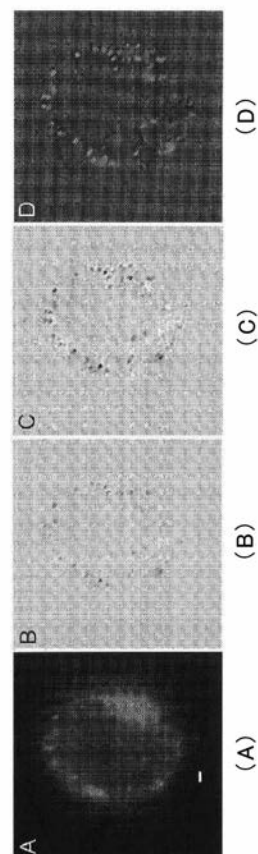
72. Shaffer, S. M., Wu, M.-T., Levesque, M. J., & Raj, A. (2013). Turbo FISH: A method for Rapid Single Molecule RNA FISH. *PloS one*, 8(9), e75120. doi:10.1371/journal.pone.0075120.

10

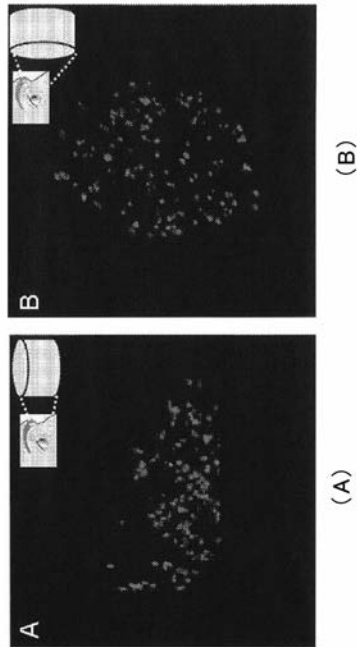
【図 1】



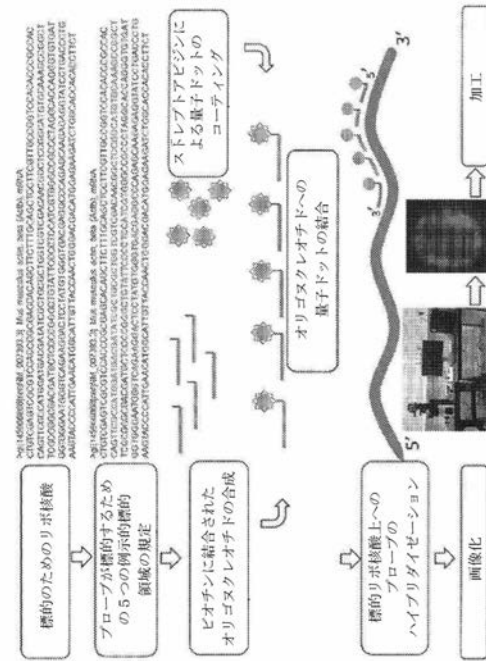
【図 2】



【 図 3 】

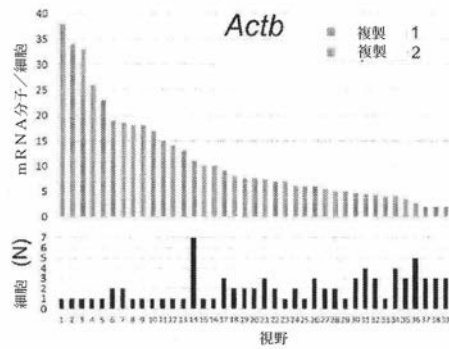


【図 4 A】



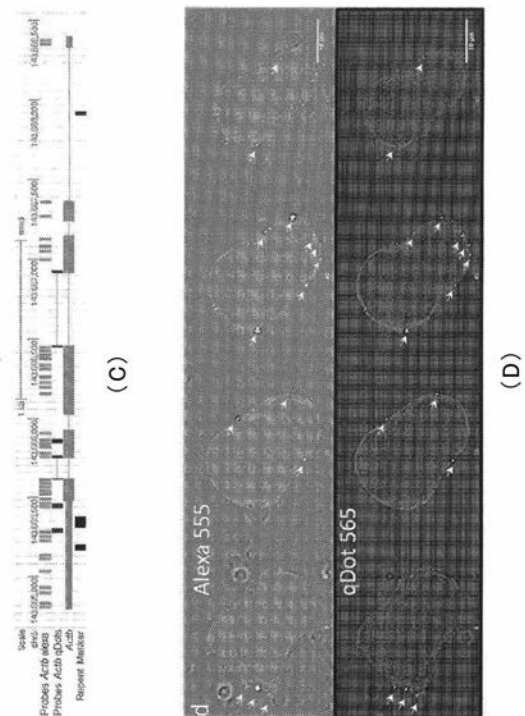
(A)

【図 4 B】

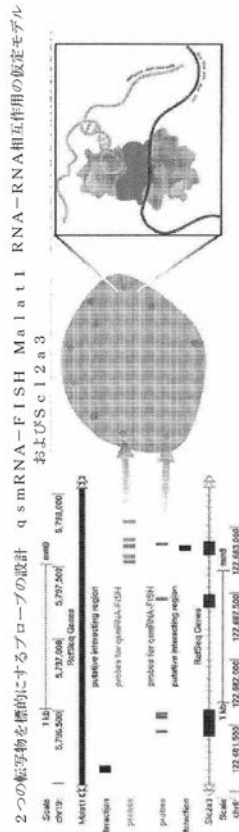


(B)

【図 4 C - D】

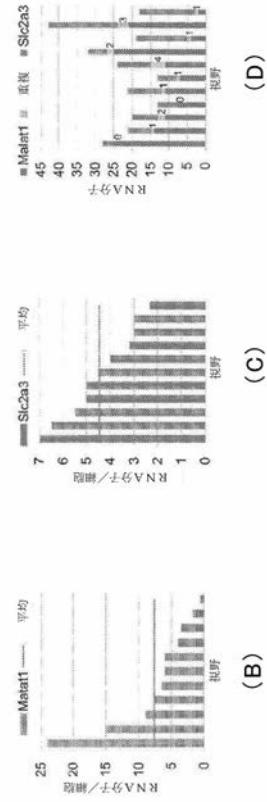


【図 5 A】

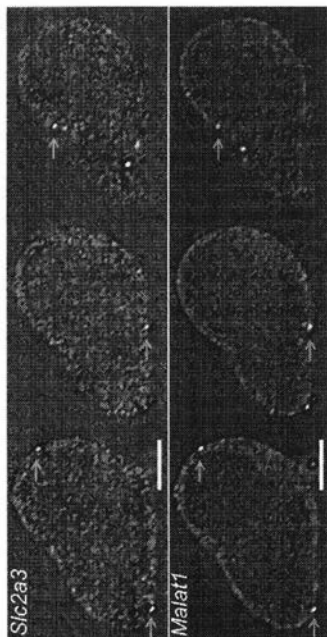


(A)

【図 5 B - D】

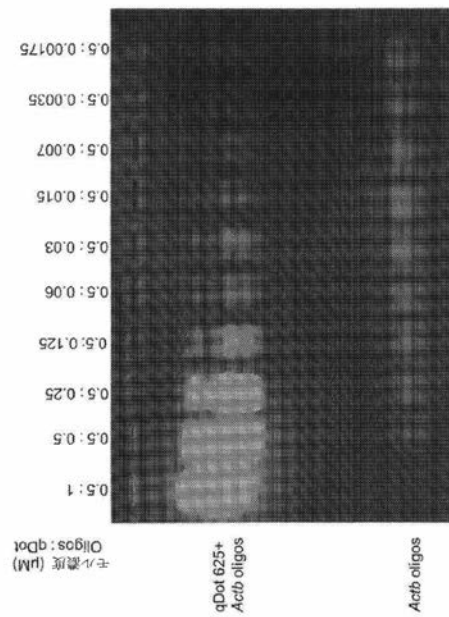


【図 5 E】

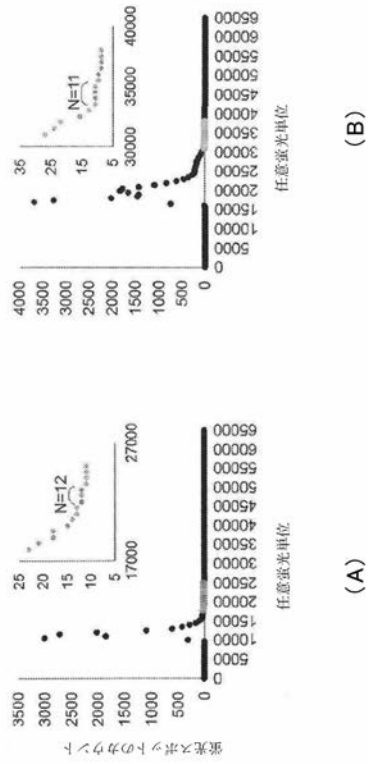


(E)

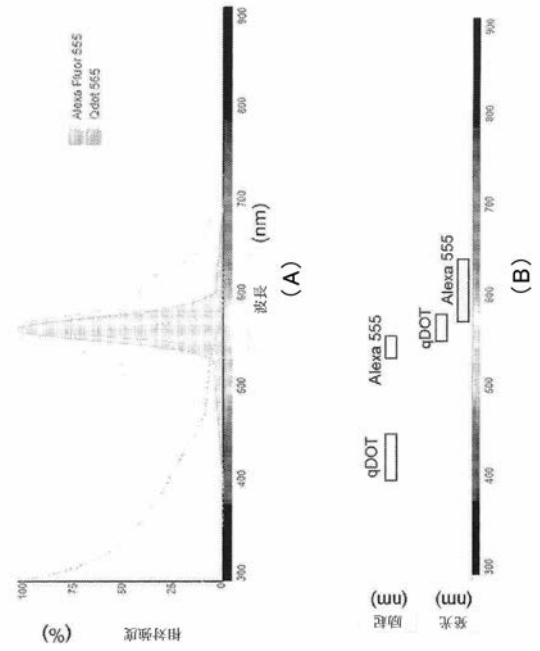
【図 6】



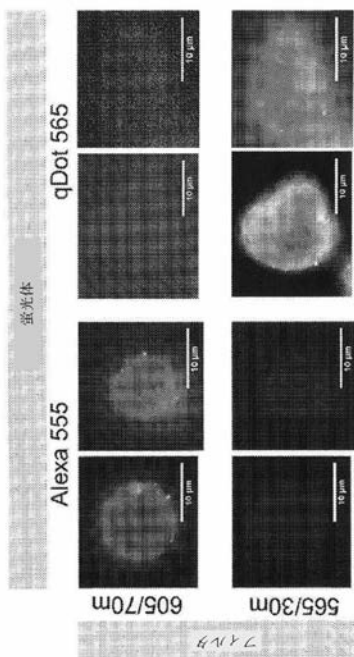
【図 7】



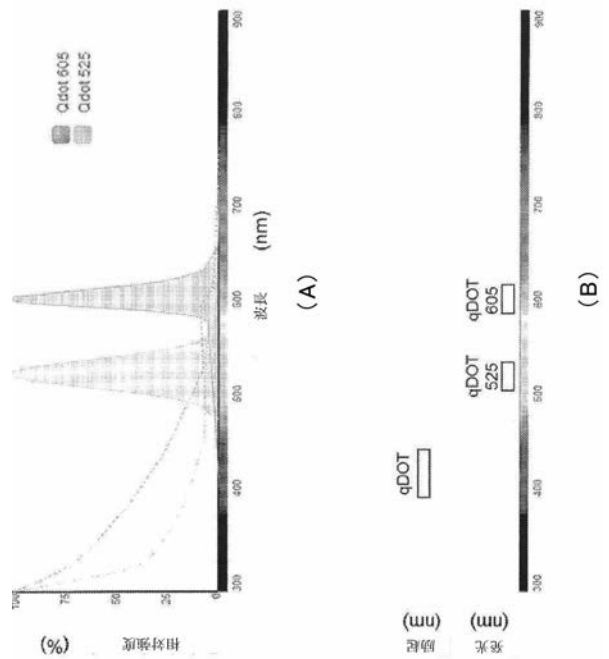
【図 8 A - B】



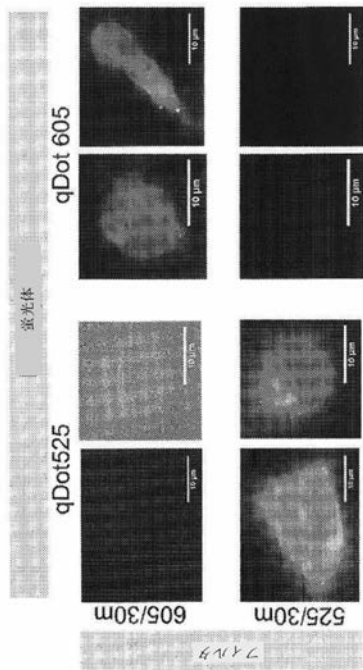
【図 8 C】



【図 9 A - B】

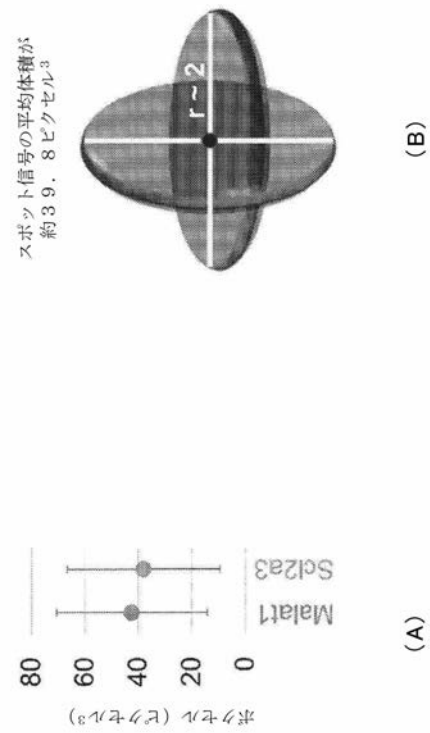


【図 9 C】

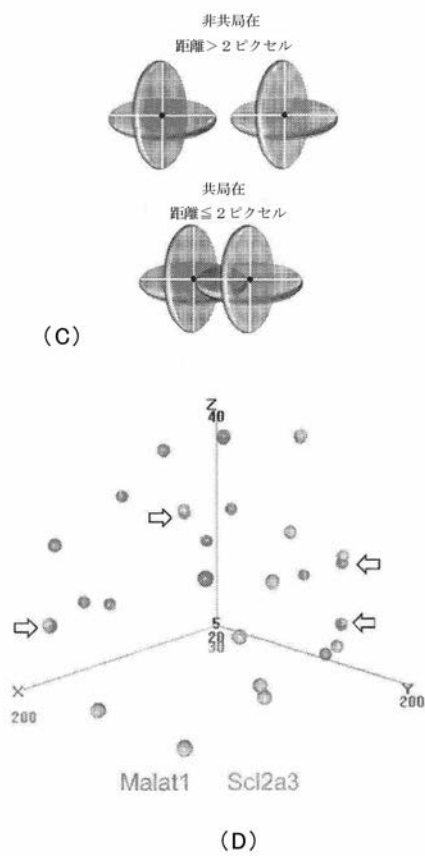


(C)

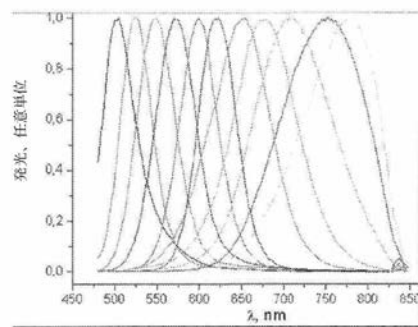
【図 10 A - B】



【図 10 C - D】



【図 11】



【配列表】

2017529103000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2015/051074																		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12Q 1/68 (2015.01) CPC - C12Q 1/6816 (2015.11) 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) - C12Q 1/00, 1/68; G01N 21/62, 21/63, 21/64 (2015.01) CPC - C12Q 1/68, 1/6813, 1/6816; G01N 21/64, 21/6428 (2015.11) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - C12Q 1/68, 1/6813, 1/6816; G01N 21/64, 21/6428 (2015.11) (keyword delimited) USPC - 506/7, 9, 13, 15, 16 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Orbit, Google Patents, PubMed, Google Search terms used: detect ma nucleic acid probes high wavelength emission particle bind target detectable component quantum dot covalent link hybridize																				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Category*</th> <th style="width: 60%;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="width: 30%;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 2011/156434 A2 (FIREFLY BIOWORKS, INC.) 15 December 2011 (15.12.2011) entire document</td> <td>1-4, 11-14, 18-22</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 8,148,512 B2 (DIMITROV) 03 April 2012 (03.04.2012) entire document</td> <td>1-4, 11-14, 18-22</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 8,058,415 B2 (LU et al) 15 November 2011 (15.11.2011) entire document</td> <td>1-4, 11-14, 18-22</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2010/0304358 A1 (NIE et al) 02 December 2010 (02.12.2010) entire document</td> <td>1-4, 11-14, 18-22</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>BIENKO et al. "A versatile genome-scale PCR-based pipeline for high-definition DNA FISH," Nature Methods, 23 December 2012 (23.12.2012), Vol. 10, Iss. 2, Pgs. 122-124. entire document</td> <td>1-4, 11-14, 18-22</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	WO 2011/156434 A2 (FIREFLY BIOWORKS, INC.) 15 December 2011 (15.12.2011) entire document	1-4, 11-14, 18-22	A	US 8,148,512 B2 (DIMITROV) 03 April 2012 (03.04.2012) entire document	1-4, 11-14, 18-22	A	US 8,058,415 B2 (LU et al) 15 November 2011 (15.11.2011) entire document	1-4, 11-14, 18-22	A	US 2010/0304358 A1 (NIE et al) 02 December 2010 (02.12.2010) entire document	1-4, 11-14, 18-22	A	BIENKO et al. "A versatile genome-scale PCR-based pipeline for high-definition DNA FISH," Nature Methods, 23 December 2012 (23.12.2012), Vol. 10, Iss. 2, Pgs. 122-124. entire document	1-4, 11-14, 18-22
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
X	WO 2011/156434 A2 (FIREFLY BIOWORKS, INC.) 15 December 2011 (15.12.2011) entire document	1-4, 11-14, 18-22																		
A	US 8,148,512 B2 (DIMITROV) 03 April 2012 (03.04.2012) entire document	1-4, 11-14, 18-22																		
A	US 8,058,415 B2 (LU et al) 15 November 2011 (15.11.2011) entire document	1-4, 11-14, 18-22																		
A	US 2010/0304358 A1 (NIE et al) 02 December 2010 (02.12.2010) entire document	1-4, 11-14, 18-22																		
A	BIENKO et al. "A versatile genome-scale PCR-based pipeline for high-definition DNA FISH," Nature Methods, 23 December 2012 (23.12.2012), Vol. 10, Iss. 2, Pgs. 122-124. entire document	1-4, 11-14, 18-22																		
☐ 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 16 November 2015		Date of mailing of the international search report 22 DEC 2015																		
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 Blaine Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774																		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2015/051074

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☒ forming part of the international application as filed:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2015/051074

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 5-10, 15-17
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:

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.:

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.

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

(72)発明者 ゾン, シェン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92130 サンディエゴ カミニート・マンダーノ 55
56

(72)発明者 ビアセ, フェルナンド
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92122 サンディエゴ レボン・ドライブ 3357
アパート 203

Fターム(参考) 4B063 QA01 QQ20 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR56 QR66 QS32 QS36
QX02