(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-510206
(P2024-510206A)
(43)公表日　令和6年3月6日(2024.3.6)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C12N 15/09 (2006.01)		C12N	15/09	110	4B063
C12N 15/113 (2010.01)		C12N	15/113	ZZNA	
C12N 9/16 (2006.01)		C12N	9/16	Z	
C12Q 1/6869 (2018.01)		C12Q	1/6869	Z	
C12N 15/31 (2006.01)		C12N	15/31		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全179頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2023-555515(P2023-555515)
(86)(22)出願日　令和4年3月8日(2022.3.8)
(85)翻訳文提出日　令和5年11月1日(2023.11.1)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/019252
(87)国際公開番号　WO2022/192186
(87)国際公開日　令和4年9月15日(2022.9.15)
(31)優先権主張番号　63/158,492
(32)優先日　令和3年3月9日(2021.3.9)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/295,432
(32)優先日　令和3年12月30日(2021.12.30)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/162,775
最終頁に続く

(71)出願人　500358711
イルミナ インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92122 サンディエゴ イルミナ ウェイ 5200
(71)出願人　502279294
イルミナ ケンブリッジ リミテッド
英国シービー21・6ディエフ、ケンブリッジシャー、ケンブリッジ、グレート・アビントン、グランタ・パーク19番
(74)代理人　100097456
弁理士　石川 徹
(72)発明者　アンドリュー ケネディー
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92122 サン ディエゴ イルミナ ウェイ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＣＡＳ－ｇＲＮＡリボ核タンパク質を使用するゲノムライブラリー調製及び標的化エピジェネティックアッセイ

(57)【要約】
Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを使用するゲノムライブラリー調製、及び標的化エピジェネティックアッセイが本明細書に提供される。いくつかの組成物は、第１の種から、実質的に一本鎖ポリヌクレオチドのみを、第２の種から、実質的に二本鎖ポリヌクレオチドのみを、第２の二本鎖ポリヌクレオチドの末端にライゲーションされ、かつ第１の二本鎖ポリヌクレオチドのいずれの末端にも実質的にライゲーションされていない増幅プライマーを含む。いくつかの組成物は、配列を有する標的ポリヌクレオチドの第１及び第２の分子を含み、第１の分子は第１の部分配列に第１の末端を有し、第２の分子は第２の部分配列に第１の末端を有し、第１の部分配列は第２の部分配列と部分的にのみ重複する。いくつかの例は、標的ポリヌクレオチドと、増幅アダプターがカップリングされたトランスポザーゼにカップリングしたＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを含む第１の融合タンパク質とを含む組成物を提供する。Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰは、標的ポリヌクレオチド中の部分配列にハイブリダイズされ得る。

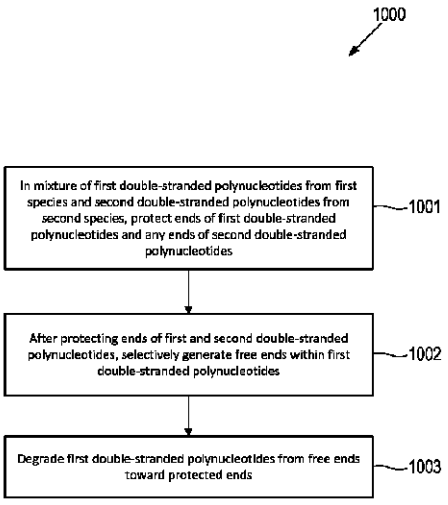


FIG. 1K

【特許請求の範囲】
【請求項１】
第１の種に由来する第１の二本鎖ポリヌクレオチドと第２の種に由来する第２の二本鎖ポリヌクレオチドとの混合物を処理する方法であって、前記方法は、
前記第１の二本鎖ポリヌクレオチドの末端及び前記第２の二本鎖ポリヌクレオチドの任意の末端を保護することと、
前記第１及び第２の二本鎖ポリヌクレオチドの末端を保護した後、前記第１の二本鎖ポリヌクレオチド内に自由末端を選択的に生成することと、
前記第１の二本鎖ポリヌクレオチドを前記自由末端から保護末端に向かって分解することと
を含む、方法。
【請求項２】
前記第１の二本鎖ポリヌクレオチド内に自由末端を選択的に生成することが、ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）を、前記第１の二本鎖ポリヌクレオチド内に存在し、かつ前記第２の二本鎖ポリヌクレオチド内に存在しない配列にハイブリダイズさせることと、前記Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰで前記配列を切断することとを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記配列が哺乳動物特異的反復要素を含む、請求項２に記載の方法。
【請求項４】
前記哺乳動物特異的反復要素がヒト特異的反復要素を含む、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
前記第１の二本鎖ヌクレオチドが、前記第１の種に由来する複数の染色体を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項６】
前記第２の種が、細菌、真菌、又はウイルスである、請求項１から５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７】
前記第１及び第２の二本鎖ポリヌクレオチドの末端を保護することが、ヘアピンアダプターを前記末端にライゲーションすることを含む、請求項１から６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８】
前記第１及び第２の二本鎖ポリヌクレオチドの末端を保護することが、前記末端を５’脱リン酸化することを含む、請求項１から６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９】
前記第１及び第２の二本鎖ポリヌクレオチドの末端を保護することが、前記末端に修飾塩基を付加することを含む、請求項１から６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０】
前記修飾塩基がホスホロチオエート結合を含む、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
前記修飾塩基がターミナルトランスフェラーゼを用いて付加される、請求項９又は１０に記載の方法。
【請求項１２】
前記第１の二本鎖ポリヌクレオチドを分解することが、エキソヌクレアーゼを使用して行われる、請求項１から１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３】
前記自由末端が３’末端を含む、請求項１から１２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４】
前記第１の二本鎖ポリヌクレオチドを分解することが、エキソヌクレアーゼＩＩＩを使用して行われる、請求項１３に記載の方法。

【請求項１５】
前記自由末端が５’末端を含む、請求項１から１２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６】
前記第１の二本鎖ポリヌクレオチドを分解することが、ラムダエキソヌクレアーゼを使用して行われる、請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
続いて、前記増幅アダプターを前記混合物中の任意の残りの二本鎖ポリヌクレオチドの末端にライゲーションすることを更に含む、請求項１から１６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１８】
前記増幅アダプターが固有の分子識別子（ＵＭＩ）を含む、請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】
続いて、前記二本鎖ポリヌクレオチドを増幅及び配列決定することを更に含む、請求項１７又は請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
前記第１の二本鎖ポリヌクレオチドが、二本鎖ＤＮＡを含む、請求項１から１９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２１】
前記第２の二本鎖ポリヌクレオチドが、二本鎖ＤＮＡを含む、請求項１から２０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２２】
前記第２の二本鎖ポリヌクレオチドが、環状ＤＮＡを含む、請求項１から２１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２３】
前記ＣａｓがＣａｓ９を含む、請求項１から２２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２４】
組成物であって、
第１の種に由来する第１の二本鎖ポリヌクレオチドであって、前記第１の二本鎖ポリヌクレオチドの末端は保護されている、第１の種に由来する第１の二本鎖ポリヌクレオチドと、
第２の種に由来する第２の二本鎖ポリヌクレオチドであって、前記第２の二本鎖ポリヌクレオチドの任意の末端は保護されている、第２の種に由来する第２の二本鎖ポリヌクレオチドと、
前記第１の二本鎖ポリヌクレオチド内に存在し、かつ前記第２の二本鎖ポリヌクレオチド内に存在しない配列にハイブリダイズしたＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）であって、前記Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰは、前記第１の二本鎖ポリヌクレオチド内に自由末端を選択的に生成するように配列を切断するためのものである、ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）と
を含む、組成物。
【請求項２５】
前記配列が哺乳動物特異的反復要素を含む、請求項２４に記載の組成物。
【請求項２６】
前記哺乳動物特異的反復要素がヒト反復要素を含む、請求項２５に記載の組成物。
【請求項２７】
前記第２の種が、細菌、真菌、又はウイルスである、請求項２４から２６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２８】
前記第１及び第２の二本鎖ポリヌクレオチドの末端が、ヘアピンアダプターを使用して保護されている、請求項２４から２７のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項２９】
第１及び第２の二本鎖ポリヌクレオチドの末端が、５’脱リン酸化を使用して保護されている、請求項２４から２８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３０】
前記第１及び第２の二本鎖ポリヌクレオチドの末端が、修飾塩基を使用して保護されている、請求項２４から２９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３１】
前記修飾塩基がホスホロチオエート結合を含む、請求項３０に記載の組成物。
【請求項３２】
前記自由末端が３’末端を含む、請求項２４から３１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３３】
前記自由末端が５’末端を含む、請求項２４から３１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３４】
前記第１の二本鎖ポリヌクレオチドが、二本鎖ＤＮＡを含む、請求項２４から３３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３５】
前記第２の二本鎖ポリヌクレオチドが、二本鎖ＤＮＡを含む、請求項２４から３４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３６】
前記第２の二本鎖ポリヌクレオチドが、環状ＤＮＡを含む、請求項２４から３５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３７】
前記ＣａｓがＣａｓ９を含む、請求項２４から３６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３８】
第１の種に由来する第１の二本鎖ポリヌクレオチドと第２の種に由来する第２の二本鎖ポリヌクレオチドとの混合物を処理する方法であって、前記方法は、
前記混合物中の前記第１の二本鎖ポリヌクレオチドを選択的に一本鎖にすることと、
続いて、増幅プライマーを前記混合物中の任意の残りの二本鎖ポリヌクレオチドに選択的にライゲーションすることと、
続いて、増幅プライマーがライゲーションされた前記混合物中の任意の二本鎖ポリヌクレオチドを増幅することと
を含む、方法。
【請求項３９】
組成物であって、
第１の種から、実質的に一本鎖ポリヌクレオチドのみと、
第２の種から、実質的に二本鎖ポリヌクレオチドのみと、
前記第２の二本鎖ポリヌクレオチドの末端にライゲーションされ、かつ前記第１の二本鎖ポリヌクレオチドのいずれの末端にも実質的にライゲーションされていない増幅プライマーと
を含む、組成物。
【請求項４０】
全ゲノム（ＷＧ）の断片を生成する方法であって、前記方法は、
前記ＷＧの第１のサンプル内で、
ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）の第１のセットを、おおよそ第１の塩基対数だけ互いに離間している前記ＷＧ内の第１の配列にハイブリダイズさせることと、
Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第２のセットを、おおよそ第２の塩基対数だけ互いに離間している前記ＷＧ内の第２の配列にハイブリダイズさせることと、
前記第１のサンプル内のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの前記第１及び第２のセットで前記第１及び第２の配列をそれぞれ切断して、各々が互いにおおよそ同じ数の塩基対をそれぞ

れ有するＷＧ断片の第１のセットを生成することと
を含む、方法。
【請求項４１】
前記第１の塩基対数が、前記第２の塩基対数とおおよそ同じである、請求項４０に記載の方法。
【請求項４２】
前記第１の塩基対数が約１００～約２０００であり、前記第２の塩基対数が約１００～約２０００である、請求項４０又は４１に記載の方法。
【請求項４３】
前記第１の塩基対数が約５００～約７００であり、前記第２の塩基対数が約５００～約７００である、請求項４２に記載の方法。
【請求項４４】
前記ＷＧ断片の第１のセットの前記ＷＧ断片内の塩基対数が、約２０％未満変動する、請求項４０から４３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４５】
前記ＷＧの第２のサンプル内で、
前記Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１のセットを前記ＷＧ内の第１の配列にハイブリダイズさせることと、
前記Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第２のセットを前記ＷＧ内の第２の配列にハイブリダイズさせることと、
Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第３のセットを、おおよそ第３の塩基対数だけ互いに離間している前記ＷＧ内の第３の配列にハイブリダイズさせることと、
前記Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１、第２、及び第３のセットで前記第１、第２、及び第３の配列をそれぞれ切断して、各々が互いにおおよそ同じ数の塩基対を有するＷＧ断片の第２のセットを生成することと
を更に含む、請求項４０から４４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４６】
前記第３の塩基対数が、前記第１の塩基対数と異なる、請求項４５に記載の方法。
【請求項４７】
前記第３の塩基対数が、前記第２の塩基対数と異なる、請求項４５又は請求項４６に記載の方法。
【請求項４８】
前記第３の塩基対数が約１００～約２０００である、請求項４５から４７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４９】
前記第３の塩基対数が約２００～約４００である、請求項４８に記載の方法。
【請求項５０】
前記ＷＧ断片の第２のセットの前記ＷＧ断片内のおおよその塩基対数が、前記ＷＧ断片の第１のセットの前記ＷＧ断片内のおおよその塩基対数とは異なる、請求項４５から４９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５１】
前記ＷＧ断片の第２のセットの前記ＷＧ断片内の塩基対数が、約２０％未満変動する、請求項４５から５０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５２】
前記ＷＧの第３のサンプル内で、
前記Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１、第２、又は第３のセットを、前記ＷＧ内の第１、第２、又は第３の配列にそれぞれハイブリダイズさせることと、
前記Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１、第２、又は第３のセットで前記第１、第２、又は第３の配列をそれぞれ切断して、各々が互いにおおよそ同じ数の塩基対を有する前記ＷＧ断片の第３のセットを生成することと

を更に含む、請求項４５から５１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５３】
前記ＷＧ断片の第３のセットの前記ＷＧ断片内のおおよその塩基対数が、前記ＷＧ断片の第１のセットの前記ＷＧ断片内のおおよその塩基対数と異なる、請求項５２に記載の方法。
【請求項５４】
前記ＷＧ断片の第３のセットの前記ＷＧ断片内のおおよその塩基対数が、前記ＷＧ断片の第２のセットの前記ＷＧ断片内のおおよその塩基対数とは異なる、請求項５２又は請求項５３に記載の方法。
【請求項５５】
前記ＷＧ断片の第３のセットの前記ＷＧ断片内の塩基対数が、約２０％未満変動する、請求項５２から５４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５６】
増幅アダプターを、前記ＷＧ断片の第３のセットの前記ＷＧ断片の末端にライゲーションすることと、
前記増幅アダプターがライゲーションされた前記ＷＧ断片の第３のセットの前記ＷＧ断片のアンプリコンを生成することと、
前記ＷＧ断片の第３のセットの前記ＷＧ断片のアンプリコンを配列決定することと
を更に含む、請求項５２から５５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５７】
前記ＷＧ断片の第２及び第３のセットの前記ＷＧ断片のアンプリコンを、配列決定のために一緒に混合する、請求項５６に記載の方法。
【請求項５８】
前記ＷＧ断片の第１及び第３のセットの前記ＷＧ断片のアンプリコンを、増幅及び配列決定のために一緒に混合する、請求項５６又は請求項５７に記載の方法。
【請求項５９】
前記ＷＧ断片の第３のセットの前記ＷＧ断片内の塩基対数が、約１００～約１０００である、請求項５２から５８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６０】
前記ＷＧ断片の第３のセットの前記ＷＧ断片内の塩基対数が、約５００～約７００である、請求項５２から５９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６１】
前記Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第３のセットが、少なくとも約１，０００，０００個の異なるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを含む、請求項５２から６０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６２】
増幅アダプターを、前記ＷＧ断片の第２のセットの前記ＷＧ断片の末端にライゲーションすることと、
前記増幅アダプターがライゲーションされた前記ＷＧ断片の第２のセットの前記ＷＧ断片のアンプリコンを生成することと、
前記ＷＧ断片の第２のセットの前記ＷＧ断片のアンプリコンを配列決定することと
を更に含む、請求項４５から６１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６３】
前記ＷＧ断片の第１及び第２のセットの前記ＷＧ断片のアンプリコンを、増幅及び配列決定のために一緒に混合する、請求項６２に記載の方法。
【請求項６４】
前記ＷＧ断片の第２のセットの前記ＷＧ断片内の塩基対数が、約１００～約１０００である、請求項４５から６３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６５】
前記ＷＧ断片の第２のセットの前記ＷＧ断片内の塩基対数が、約１００～約２００であ

る、請求項４０から６４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６６】
増幅アダプターを、前記ＷＧ断片の第１のセットの前記ＷＧ断片の末端にライゲーションすることと、
前記増幅アダプターがライゲーションされた前記ＷＧ断片の第１のセットの前記ＷＧ断片のアンプリコンを生成することと、
前記ＷＧ断片の第１のセットの前記ＷＧ断片のアンプリコンを配列決定することと
を更に含む、請求項４０から６５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６７】
前記増幅アダプターが固有の分子識別子（ＵＭＩ）を含む、請求項４０から６６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６８】
前記ＷＧ断片の第１のセットの前記ＷＧ断片内の塩基対数が、約１００～約１０００である、請求項４０から６７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６９】
前記ＷＧ断片の第１のセットの前記ＷＧ断片内の塩基対数が、約２００～約４００である、請求項４０から６８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７０】
前記Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１のセットが、少なくとも約１，０００，０００個の異なるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを含む、請求項４０から６９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７１】
Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの前記第２のセットが、少なくとも約１，０００，０００個の異なるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを含む、請求項４０から７０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７２】
前記ＷＧが二本鎖ＤＮＡを含む、請求項４０から７１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７３】
前記ＣａｓがＣａｓ９を含む、請求項４０から７２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７４】
組成物であって、
全ゲノム（ＷＧ）のサンプルと、
おおよそ第１の塩基対数だけ互いに離間している前記ＷＧ内の第１の配列にハイブリダイズされたＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）の第１のセットと、
おおよそ第２の塩基対数だけ互いに離間している前記ＷＧ内の第２の配列にハイブリダイズされたＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第２のセットと
を含み、
前記Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１及び第２のセットはそれぞれ、前記サンプル内の第１及び第２の配列を切断して、各々が互いにおおよそ同じ数の塩基対を有するＷＧ断片を生成するためのものである、組成物。
【請求項７５】
前記第１の塩基対数が、前記第２の塩基対数とおおよそ同じである、請求項７４に記載の組成物。
【請求項７６】
前記第１の塩基対数が約１００～約２０００であり、前記第２の塩基対数が約１００～約２０００である、請求項７４又は請求項７５に記載の組成物。
【請求項７７】
前記第１の塩基対数が約５００～約７００であり、前記第２の塩基対数が約５００～約７００である、請求項７６に記載の組成物。

【請求項７８】
前記ＷＧ断片内の塩基対数が約２０％未満変動する、請求項７４から７７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項７９】
前記ＷＧ断片内の塩基対数が、約１００塩基対～約１０００塩基対である、請求項７４から７８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項８０】
前記ＷＧ断片内の塩基対数が、約２００塩基対～約４００塩基対である、請求項７４から７９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項８１】
前記Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１のセットが、少なくとも約１，０００，０００個の異なるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを含む、請求項７４から８０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項８２】
Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの前記第２のセットが、少なくとも約１，０００，０００個の異なるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを含む、請求項７４から８１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項８３】
前記ＷＧが二本鎖ＤＮＡを含む、請求項７４から８２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項８４】
前記ＣａｓがＣａｓ９を含む、請求項７４から８３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項８５】
組成物であって、
全ゲノム（ＷＧ）のサンプルと、
おおよそ第１の塩基対数だけ互いに離間している前記ＷＧ内の第１の配列にハイブリダイズされたＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）の第１のセットと、
おおよそ第２の塩基対数だけ互いに離間している前記ＷＧ内の第２の配列にハイブリダイズされたＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第２のセットと、
おおよそ第３の塩基対数だけ互いに離間している前記ＷＧ内の第３の配列にハイブリダイズされたＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第３のセットと
を含み、
前記Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１、第２及び第３のセットはそれぞれ、前記サンプル内の第１、第２、及び第３の配列を切断して、各々が互いにおおよそ同じ数の塩基対を有するＷＧ断片を生成するためのものである、組成物。
【請求項８６】
前記第１の塩基対数が、前記第２の塩基対数とおおよそ同じである、請求項８５に記載の組成物。
【請求項８７】
前記第１の塩基対数が約１００～約２０００であり、第２の塩基対数が約１００～約２０００であり、第３の塩基対数が約１００～約２０００である、請求項８５又は請求項８６に記載の組成物。
【請求項８８】
前記第１の塩基対数が約５００～約７００であり、前記第２の塩基対数が約５００～約７００であり、前記第３の塩基対数が約２００～約４００である、請求項８７に記載の組成物。
【請求項８９】
前記第３の塩基対数が、前記第１の塩基対数と異なる、請求項８５から８８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項９０】

前記第３の塩基対数が、前記第２の塩基対数と異なる、請求項８５から８９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項９１】
前記ＷＧ断片内の塩基対数が約２０％未満変動する、請求項８５から９０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項９２】
前記ＷＧ断片内の塩基対数が約１００～約１０００である、請求項８５から９１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項９３】
前記ＷＧ断片内の塩基対数が約１００～約２００である、請求項９２に記載の組成物。
【請求項９４】
前記Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１のセットが、少なくとも約１，０００，０００個の異なるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを含む、請求項８５から９３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項９５】
Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの前記第２のセットが、少なくとも約１，０００，０００個の異なるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを含む、請求項８５～９４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項９６】
前記Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第３のセットが、少なくとも約１，０００，０００個の異なるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを含む、請求項８５から９５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項９７】
前記ＷＧが二本鎖ＤＮＡを含む、請求項８５から９６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項９８】
前記ＣａｓがＣａｓ９を含む、請求項８５から９７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項９９】
全ゲノム（ＷＧ）の断片を生成する方法であって、前記方法は、
ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）のセットを、おおよそ塩基対数だけ互いに離間している前記ＷＧ内の配列にハイブリダイズさせることと、
前記配列を前記Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのセットでそれぞれ切断して、各々が互いにおおおよそ同じ数の塩基対を有するＷＧ断片のセットを生成することと
を含む、方法。
【請求項１００】
前記塩基対数が約１００～約１０００である、請求項９９に記載の方法。
【請求項１０１】
前記塩基対数が、約５００～約７００、又は約２００～約４００、又は約１００～約２００である、請求項９９又は請求項１００に記載の方法。
【請求項１０２】
前記ＷＧ断片のセットの前記ＷＧ断片内の塩基対数が、約２０％未満変動する、請求項９９から１０１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０３】
前記ＷＧ断片のセットの前記ＷＧ断片内の塩基対数が、約１００～約１０００である、請求項９９から１０２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０４】
前記ＷＧ断片のセットの前記ＷＧ断片内の塩基対数が、約１００～約２００、又は約２００～約４００、又は約５００～約７００である、請求項９９～１０３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０５】

増幅アダプターを、前記ＷＧ断片のセットの前記ＷＧ断片の末端にライゲーションすることと、
前記増幅アダプターがライゲーションされた前記ＷＧ断片のセットの前記ＷＧ断片のアンプリコンを生成することと、
前記ＷＧ断片のセットの前記ＷＧ断片のアンプリコンを配列決定することと
を更に含む、請求項９９から１０４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０６】
前記増幅アダプターが固有の分子識別子（ＵＭＩ）を含む、請求項１０５に記載の方法。
【請求項１０７】
前記ＷＧが二本鎖ＤＮＡを含む、請求項９９から１０６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０８】
前記ＣａｓがＣａｓ９を含む、請求項９９から１０７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０９】
組成物であって、
全ゲノム（ＷＧ）のサンプルと、及び
おおよそ塩基対数だけ互いに離間しているＷＧ内の配列にハイブリダイズされたＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）のセットと
を含み、
前記Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのセットはそれぞれ、前記サンプル内の配列を切断して、各々が互いにおおよそ同じ数の塩基対を有するＷＧ断片を生成するためのものである、組成物。
【請求項１１０】
前記塩基対数が約１００～約１０００である、請求項１０９に記載の組成物。
【請求項１１１】
前記塩基対数が、約５００～約７００、又は約２００～約４００、又は約１００～約２００である、請求項１０９又は請求項１１０に記載の組成物。
【請求項１１２】
前記ＷＧ断片のセットの前記ＷＧ断片内の塩基対数が、約２０％未満変動する、請求項１０９から１１１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１１３】
前記ＷＧ断片のセットの前記ＷＧ断片内の塩基対数が、約１００～約１０００である、請求項１０９から１１２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１１４】
前記ＷＧ断片のセットの前記ＷＧ断片内の塩基対数が、約１００～約２００、又は約２００～約４００、又は約５００～約７００である、請求項１０９～１１３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１１５】
前記ＷＧが二本鎖ＤＮＡを含む、請求項１０９から１１４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１１６】
前記ＣａｓがＣａｓ９を含む、請求項１０９から１１５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１１７】
各々が互いにおおよそ同じ数の塩基対を有する少なくとも約１，０００，０００個のＷＧ断片のセットを含み得る、組成物。
【請求項１１８】
前記塩基対数が約１００～約２００である、請求項１１７に記載の組成物。
【請求項１１９】

前記塩基対数が約２００～約４００である、請求項１１７に記載の組成物。
【請求項１２０】
前記塩基対数が約５００～約７００である、請求項１１７に記載の組成物。
【請求項１２１】
前記ＷＧが二本鎖ＤＮＡを含む、請求項１１７から１２０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１２２】
前記ＷＧ断片のセットの前記ＷＧ断片内の塩基対数が、約２０％未満変動する、請求項１１７から１２１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１２３】
前記ＷＧ断片のセットの前記ＷＧ断片内の塩基対数が、約１０％未満変動する、請求項１１７から１２２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１２４】
前記ＷＧ断片のセットの前記ＷＧ断片内の塩基対数が、約５％未満変動する、請求項１１７から１２３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１２５】
請求項９９から１０８のいずれか一項に記載の方法を使用して調製される、請求項１１７から１２４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１２６】
配列を有する標的ポリヌクレオチドの分子を切断する方法であって、前記方法は、
流体中で、前記標的ポリヌクレオチドの第１及び第２の分子を、複数の第１及び第２のＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）と接触させることと、
前記第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つを前記第１の分子中の第１の部分配列にハイブリダイズさせることと、
前記第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つを前記第２の分子中の第２の部分配列にハイブリダイズさせることであって、前記第２の部分配列が前記第１の部分配列と部分的にのみ重複する、ことと、
前記第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つによって、前記第１の分子中の前記第２の部分配列への前記第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのいずれかのハイブリダイゼーションを阻害することと、
前記第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つによって、前記第２の分子中の前記第１の部分配列への前記第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのいずれかのハイブリダイゼーションを阻害することと、
前記第１の部分配列において前記第１の分子を切断することと、
前記第２の部分配列において前記第２の分子を切断することと
を含む、方法。
【請求項１２７】
前記第１の分子における切断部が、前記標的ポリヌクレオチドの配列中で、前記第２の分子における切断部とは異なる位置にある、請求項１２６に記載の方法。
【請求項１２８】
前記第１の分子における切断部が、前記標的ポリヌクレオチドの配列中で、約２塩基対～約１０塩基対だけ前記第２の分子における切断部からオフセットしている、請求項１２６又は請求項１２７に記載の方法。
【請求項１２９】
前記第１の分子を、前記第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つを使用して切断し、前記第２の分子を、前記第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つを使用して切断する、請求項１２６から１２８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３０】
前記標的ポリヌクレオチドが二本鎖ＤＮＡを含む、請求項１２６から１２９のいずれか

一項に記載の方法。
【請求項１３１】
前記Ｃａｓが、Ｃａｓ９又はｄＣａｓ９を含む、請求項１２６から１３０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３２】
前記流体中で、前記標的ポリヌクレオチドの第１及び第２の分子を複数の第３及び第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰと接触させることと、
前記第３のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つを前記第１の分子中の第３の部分配列にハイブリダイズさせることと、
前記第３のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つによって、前記第１の分子中の第４の部分配列への前記第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのいずれかのハイブリダイゼーションを阻害することであって、前記第４の部分配列が前記第３の部分配列と部分的にのみ重複する、ことと、
前記第３のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つを使用して前記第３の部分配列において前記第１の分子を切断して、第１の断片を生成することと
を更に含む、請求項１２６から１３１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３３】
前記流体中で、前記標的ポリヌクレオチドの第１及び第２の分子を複数の第３及び第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰと接触させることと、
前記第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つを前記第１の分子中の第４の部分配列にハイブリダイズさせることと、
前記第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つによって、前記第１の分子中の前記第３の部分配列への前記第３のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのいずれかのハイブリダイゼーションを阻害することと、
前記第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つを使用して前記第４の部分配列において前記第１の分子を切断して、第１の断片を生成することと
を更に含む、請求項１２６から１３２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３４】
前記第３のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つを前記第２の分子中の前記第３の部分配列にハイブリダイズさせることと、
前記第３のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つによって、前記第２の分子中の前記第４の部分配列への前記第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのいずれかのハイブリダイゼーションを阻害することと、
前記第３のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つを使用して前記第３の部分配列において前記第２の分子を切断して、第２の断片を生成することと
を更に含む、請求項１３２又は１３３に記載の方法。
【請求項１３５】
前記第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つを前記第２の分子中の第４の部分配列にハイブリダイズさせることと、
前記第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つによって、前記第２の分子中の前記第３の部分配列への前記第３のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのいずれかのハイブリダイゼーションを阻害することと、
前記第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つを使用して前記第４の部分配列において前記第２の分子を切断して、第２の断片を生成することと
を更に含む、請求項１３２又は１３３に記載の方法。
【請求項１３６】
前記第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つ及び前記第３又は第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つが前記第１の分子にハイブリダイズしている間に、前記第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つと前記第３又は第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つとの間にない前記第１の分子の任意の部分を分解することを更に含む、請

求項１３２から１３５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３７】
前記第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つ及び前記第３又は第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つが前記第２の分子にハイブリダイズしている間に、前記第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つと前記第３又は第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つとの間にない前記第２の分子の任意の部分を分解することを更に含む、請求項１３４から１３６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３８】
前記分解がエキソヌクレアーゼＩＩＩ又はエキソヌクレアーゼＶＩＩを使用して行われる、請求項１３６又は請求項１３７に記載の方法。
【請求項１３９】
前記第１の分子を、前記第３又は第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つを使用して切断し、前記第２の分子を、前記第３又は第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つを使用して切断する、請求項１３４から１３８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４０】
前記第１及び第２の断片が、互いに異なる塩基対数を含む、請求項１３４から１３９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４１】
前記第１の断片が約１００塩基対～約１０００塩基対の長さを有し、前記第２の断片が約１００塩基対～約１０００塩基対の長さを有する、請求項１３４から１４０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４２】
前記第１の断片が約５００塩基対～約７００塩基対の長さを有し、前記第２の断片が約５００塩基対～約７００塩基対の長さを有する、請求項１３４から１４１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４３】
前記第１の断片が約２００塩基対～約４００塩基対の長さを有し、前記第２の断片が約２００塩基対～約４００塩基対の長さを有する、請求項１３４から１４２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４４】
前記第１の断片が約１００塩基対～約２００塩基対の長さを有し、前記第２の断片が約１００塩基対～約２００塩基対の長さを有する、請求項１３４から１４３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４５】
標的ポリヌクレオチドを配列決定する方法であって、前記方法は、
請求項１３４から１４４のいずれか一項に記載の方法を使用して、前記標的ポリヌクレオチドの第１及び第２の断片を生成することと、
増幅アダプターを前記第１及び第２の断片の末端にライゲーションすることと、
前記増幅アダプターがライゲーションされた前記第１及び第２の断片のアンプリコンをそれぞれ生成することと、
前記第１及び第２の断片のアンプリコンを配列決定することと
を含む、方法。
【請求項１４６】
前記第１、第２、第３、及び第４の部分配列を使用することと、前記第１の断片のアンプリコンを前記第１の分子に由来するものとして同定することと、前記第２の断片のアンプリコンを前記第２の分子に由来するものとして同定することとを更に含む、請求項１４５に記載の方法。
【請求項１４７】
前記アンプリコンを生成する前に、固有の分子識別子（ＵＭＩ）を前記第１及び第２の断片の末端にライゲーションすることと、

前記ＵＭＩを使用することと、前記第１の断片のアンプリコンを前記第１の分子に由来するものとして同定することと、前記第２の断片のアンプリコンを前記第２の分子に由来するものとして同定することとを更に含む、請求項１４５又は１４６に記載の方法。
【請求項１４８】
前記ＵＭＩは、前記増幅アダプターと同じ操作で、前記第１及び第２の断片の末端にカップリングされ、ライゲーションされる、請求項１４７に記載の方法。
【請求項１４９】
組成物であって、
配列を有する標的ポリヌクレオチドの第１及び第２の分子と、
複数の第１及び第２のＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）と
を含み、
前記第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つが、前記第１の分子中の第１の部分配列にハイブリダイズしており、前記第１の分子中の第２の部分配列への前記第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちのいずれかのハイブリダイゼーションを阻害し、前記第２の部分配列が前記第１の部分配列と部分的にのみ重複しており、
前記第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つが、前記第２の分子中の第２の部分配列にハイブリダイズしており、前記第２の分子中の第１の部分配列への第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのいずれかのハイブリダイゼーションを阻害する、組成物。
【請求項１５０】
前記第１の分子における切断部が、前記標的ポリヌクレオチドの配列中で、前記第２の分子における切断部とは異なる位置にある、請求項１４９に記載の組成物。
【請求項１５１】
前記第１の分子における切断部が、前記標的ポリヌクレオチドの配列中で、約２塩基対～約１０塩基対だけ前記第２の分子における切断部からオフセットしている、請求項１４９又は請求項１５０に記載の組成物。
【請求項１５２】
前記第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つが、前記第１の分子を切断するためのものであり、前記第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つが、前記第２の分子を切断するためのものである、請求項１４９から１５１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１５３】
前記標的ポリヌクレオチドが二本鎖ＤＮＡを含む、請求項１４９から１５２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１５４】
前記Ｃａｓが、Ｃａｓ９又はｄＣａｓ９を含む、請求項１４９から１５３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１５５】
複数の第３及び第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ
を更に含み、
前記第３のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つが、前記第１の分子中の前記第３の部分配列にハイブリダイズしており、前記第１の分子中の前記第４の部分配列への前記第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのいずれかのハイブリダイゼーションを阻害し、前記第３の部分配列において前記第１の分子を切断して第１の断片を生成するためのものであり、前記第４の部分配列が前記第３の部分配列と部分的にのみ重複している、請求項１４９から１５４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１５６】
複数の第３及び第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ
を更に含み、
前記第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つが、前記第１の分子中の前記第４の部分配列にハイブリダイズしており、前記第１の分子中の前記第３の部分配列への前記第

３のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのいずれかのハイブリダイゼーションを阻害し、前記第４の部分配列において前記第１の分子を切断して第１の断片を生成するためのものであり、前記第４の部分配列が前記第３の部分配列と部分的にのみ重複している、請求項１４９から１５４のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項１５７】

前記第３のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つが、前記第２の分子中の前記第３の部分配列にハイブリダイズしており、前記第２の分子中の前記第４の部分配列への前記第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのいずれかのハイブリダイゼーションを阻害し、前記第３の部分配列において前記第２の分子を切断して第２の断片を生成するためのものである、請求項１５５又は１５６のに記載の組成物。

【請求項１５８】

前記第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つが、前記第２の分子中の前記第４の部分配列にハイブリダイズしており、前記第２の分子中の前記第３の部分配列への前記第３のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのいずれかのハイブリダイゼーションを阻害し、前記第４の部分配列において前記第２の分子を切断して第２の断片を生成するためのものである、請求項１５５又は１５６のに記載の組成物。

【請求項１５９】

前記第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つと前記第３又は第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つとの間にない前記第１の分子の任意の部分を分解するためのエキソヌクレアーゼを更に含む、請求項１５５から１５８のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項１６０】

前記第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つと前記第３又は第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つとの間にない前記第２の分子の任意の部分を分解するためのエキソヌクレアーゼを更に含む、請求項１５７から１５９のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項１６１】

前記エキソヌクレアーゼが、エキソヌクレアーゼＩＩＩ又はエキソヌクレアーゼＶＩＩを含む、請求項１５９又は請求項１６０に記載の組成物。

【請求項１６２】

前記第３又は第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つが、前記第１の分子を切断するためのものであり、前記第３又は第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つが、前記第２の分子を切断するためのものである、請求項１５８から１６１のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項１６３】

前記第１及び第２の断片が、互いに異なる塩基対数を含む、請求項１５８から１６２のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項１６４】

前記第１の断片が約１００塩基対～約１０００塩基対の長さを有し、前記第２の断片が約１００塩基対～約１０００塩基対の長さを有する、請求項１５８から１６３のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項１６５】

前記第１の断片が約５００塩基対～約７００塩基対の長さを有し、前記第２の断片が約５００塩基対～約７００塩基対の長さを有する、請求項１５８～１６４のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項１６６】

前記第１の断片が約２００塩基対～約４００塩基対の長さを有し、前記第２の断片が約２００塩基対～約４００塩基対の長さを有する、請求項１５８から１６４のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項１６７】

前記第１の断片が約１００塩基対～約２００塩基対の長さを有し、前記第２の断片が約１００塩基対～約２００塩基対の長さを有する、請求項１５８から１６４のいずれか一項

に記載の組成物。
【請求項１６８】
組成物であって、
配列を有する標的ポリヌクレオチドの第１及び第２の分子
を含み、
前記第１の分子は、第１の部分配列に第１の末端を有し、
前記第２の分子は、第２の部分配列に第１の末端を有し、前記第１の部分配列は、前記第２の部分配列と部分的にのみ重複する、組成物。
【請求項１６９】
前記第１の分子における前記第１の末端が、前記標的ポリヌクレオチドの配列中で、前記第２の分子の第１の末端とは異なる位置にある、請求項１６８に記載の組成物。
【請求項１７０】
前記第１の分子における前記第１の末端が、前記標的ポリヌクレオチドの配列中、約２塩基対～約１０塩基対だけ前記第２の分子の第１の末端からオフセットしている、請求項１６８又は請求項１６９に記載の組成物。
【請求項１７１】
前記第１の分子が、第３の部分配列に第２の末端を更に有し、
前記第２の分子が、前記第３の部分配列又は第４の部分配列に第２の末端を更に有し、前記第３の部分配列が、前記第４の部分配列と部分的にのみ重複する、請求項１６８から１７０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１７２】
前記第１の分子における前記第２の末端が、前記標的ポリヌクレオチドの配列中で、前記第２の分子の第２の末端とは異なる位置にある、請求項１７１に記載の組成物。
【請求項１７３】
前記第１の分子における前記第２の末端が、前記標的ポリヌクレオチドの配列中、約２塩基対～約１０塩基対だけ前記第２の分子の第２の末端からオフセットしている、請求項１７１又は請求項１７２に記載の組成物。
【請求項１７４】
前記標的ポリヌクレオチドが二本鎖ＤＮＡを含む、請求項１６８から１７３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１７５】
前記第１及び第２の分子が、互いに異なる塩基対数を含む、請求項１６８から１７４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１７６】
前記第１の分子が約１００塩基対～約１０００塩基対の長さを有し、前記第２の分子が約１００塩基対～約１０００塩基対の長さを有する、請求項１６８から１７５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１７７】
前記第１の断片が約５００塩基対～約７００塩基対の長さを有し、前記第２の断片が約５００塩基対～約７００塩基対の長さを有する、請求項１６８から１７６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１７８】
前記第１の断片が約２００塩基対～約４００塩基対の長さを有し、前記第２の断片が約２００塩基対～約４００塩基対の長さを有する、請求項１６８から１７６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１７９】
前記第１の断片が約１００塩基対～約２００塩基対の長さを有し、前記第２の断片が約１００塩基対～約２００塩基対の長さを有する、請求項１６８から１７６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１８０】

配列を有する標的ポリヌクレオチドの断片を生成する方法であって、前記方法は、
流体中で、前記標的ポリヌクレオチドを第１及び第２の融合タンパク質と接触させることであって、
前記第１の融合タンパク質は、第１の増幅アダプターがカップリングされた第１のトランスポザーゼにカップリングした第１のＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）を含み、
前記第２の融合タンパク質は、第２の増幅アダプターがカップリングされた第２のトランスポザーゼにカップリングした第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを含む、ことと、
前記第１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの活性を促進し、前記第１及び第２のトランスポザーゼの活性を阻害しながら、
前記第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを前記標的ポリヌクレオチド中の第１の部分配列にハイブリダイズさせることと、
前記第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを前記標的ポリヌクレオチド中の第２の部分配列にハイブリダイズさせることと、次いで、
前記第１及び第２のトランスポザーゼの活性を促進しながら、
前記第１のトランスポザーゼを使用して、前記第１の増幅アダプターを前記標的ポリヌクレオチド中の第１の位置に付加することと、
前記第２のトランスポザーゼを使用して、前記標的ポリヌクレオチド中の第２の位置に前記第２の増幅アダプターを付加することと
含む、方法。

【請求項１８１】
前記流体の第１の条件を使用して、前記Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの活性が促進され、トランスポザーゼの活性が阻害される、請求項１８０記載の方法。

【請求項１８２】
前記流体の前記第１の条件が、前記Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの活性のために十分な量のカルシウムイオン、マンガンイオン、又はカルシウムイオンとマンガンイオンとの両方の存在を含む、請求項１８１記載の方法。

【請求項１８３】
前記流体の前記第１の条件が、前記トランスポザーゼの活性のために十分な量のマグネシウムイオンが存在しないことを含む、請求項１８１又は請求項１８２に記載の方法。

【請求項１８４】
前記流体の第２の条件を使用して、前記トランスポザーゼの活性を促進させる、請求項１８０から１８３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１８５】
前記流体の第２の条件が、前記トランスポザーゼの活性のために十分な量のマグネシウムイオンが存在しないことを含む、請求項１８４に記載の方法。

【請求項１８６】
前記第１の融合タンパク質のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰが前記第１の部分配列にハイブリダイズし、前記第２の融合タンパク質のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰが前記第２の部分配列にハイブリダイズしている間に、前記第１の融合タンパク質のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰと前記第２の融合タンパク質のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰとの間にない前記標的ポリヌクレオチドの任意の部分を分解することを更に含む、請求項１８０から１８５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１８７】
前記分解がエキソヌクレアーゼＩＩＩ又はエキソヌクレアーゼＶＩＩを使用して行われる、請求項１８８に記載の方法。

【請求項１８８】
前記標的ポリヌクレオチドを前記第１及び第２の融合タンパク質から遊離させて、一方の末端に前記第１の増幅アダプターを有し、他方の末端に前記第２の増幅アダプターを有する前記標的ポリヌクレオチドの断片を提供することを更に含む、請求項１８０から１８

７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１８９】
前記遊離は、プロテイナーゼＫ、ドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）、又はプロテイナーゼＫとＳＤＳとの両方を使用して行われる、請求項１８８に記載の方法。
【請求項１９０】
前記断片が、約１００塩基対～約１０００塩基対の長さを有する、請求項１８８又は請求項１８９に記載の方法。
【請求項１９１】
前記断片が、約５００塩基対～約７００塩基対の長さを有する、請求項１８８から１９０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１９２】
前記断片が、約２００塩基対～約４００塩基対の長さを有する、請求項１８８から１９０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１９３】
前記断片が、約１００塩基対～約２００塩基対の長さを有する、請求項１８８から１９０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１９４】
前記ＣａｓがｄＣａｓ９を含む、請求項１８０から１９３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１９５】
前記トランスポザーゼがＴｎ５を含む、請求項１８０から１９４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１９６】
前記第１の増幅アダプターがＰ５アダプターを含み、前記第２の増幅アダプターがＰ７アダプターを含む、請求項１８０から１９５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１９７】
前記第１の増幅アダプターが第１の固有の分子識別子（ＵＭＩ）を含み、前記第２の増幅アダプターが第２のＵＭＩを含む、請求項１８０から１９６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１９８】
前記第１の位置が前記第１の部分配列の約１０塩基以内であり、前記第２の位置が前記第２の部分配列の約１０塩基以内である、請求項１８０から１９７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１９９】
前記第１及び第２の融合タンパク質の各々において、前記Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰが、共有結合を介して前記トランスポザーゼにカップリングされる、請求項１８０から１９８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２００】
前記第１及び第２の融合タンパク質の各々において、前記Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰが、非共有結合を介して前記トランスポザーゼにカップリングされる、請求項１８０から１９８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２０１】
前記Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰが、抗体に共有結合的にカップリングされ、前記トランスポザーゼは、前記抗体が非共有結合的にカップリングされる抗原に共有結合的にカップリングされるか、又は前記Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰは、抗原に共有結合的にカップリングされ、前記トランスポザーゼは、前記抗原が非共有結合的にカップリングされる抗体に共有結合的にカップリングされる、請求項２００に記載の方法。
【請求項２０２】
前記Ｃａｓ－ｇＲＮＡが、前記ｇＲＮＡと前記第１又は第２の増幅アダプターとの間のハイブリダイゼーションを介してトランスポザーゼに非共有結合的にカップリングされる

、請求項２００に記載の方法。
【請求項２０３】
前記Ｃａｓ－ｇＲＮＡが、前記ｇＲＮＡと前記トランスポザーゼ内のオリゴヌクレオチドとの間のハイブリダイゼーションを介して前記トランスポザーゼに非共有結合的にカップリングされる、請求項２００に記載の方法。
【請求項２０４】
前記第１の融合タンパク質において、前記第１の部分配列にハイブリダイズするｇＲＮＡの一部が、約１５～約１８ヌクレオチドの長さを有し、
前記第２の融合タンパク質において、前記第２の部分配列にハイブリダイズするｇＲＮＡの一部が、約１５～約１８ヌクレオチドの長さを有する、請求項１８０から２０３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２０５】
前記第１及び第２の融合タンパク質が、前記標的ポリヌクレオチドに対しておおよそ化学量論比である、請求項１８０から２０４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２０６】
前記標的ポリヌクレオチドが二本鎖ＤＮＡを含む、請求項１８０から２０５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２０７】
標的ポリヌクレオチドを配列決定する方法であって、前記方法は、
請求項１８８から２０６又は２９４から３０２のいずれか一項に記載の方法を使用して前記標的ポリヌクレオチドの断片を生成することと、
前記断片のアンプリコンを生成することと、
アンプリコンを配列決定することと
を含む、方法。
【請求項２０８】
組成物であって、
配列を有する標的ポリヌクレオチドと、
第１の増幅アダプターがカップリングされた第１のトランスポザーゼにカップリングした第１のＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）を含む第１の融合タンパク質であって、前記第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰが前記標的ポリヌクレオチド中の第１の部分配列にハイブリダイズされている、第１の融合タンパク質と
を含む、組成物。
【請求項２０９】
第２の増幅アダプターがカップリングされた第２のトランスポザーゼにカップリングした第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを含む第２の融合タンパク質であって、前記第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰが前記標的ポリヌクレオチド中の第２の部分配列にハイブリダイズされている、第２の融合タンパク質と
を更に含む、請求項２０８に記載の組成物。
【請求項２１０】
前記第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの活性を促進し、前記第１のトランスポザーゼの活性を阻害する条件を有する流体を更に含む、請求項２０８又は請求項２０９に記載の組成物。
【請求項２１１】
前記流体の条件が、前記第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの活性のために十分な量のカルシウムイオン、マンガンイオン、又はカルシウムイオンとマンガンイオンとの両方の存在を含む、請求項２１０に記載の組成物。
【請求項２１２】
前記流体の条件が、前記第１のトランスポザーゼの活性のために十分な量のマグネシウムイオンが存在しないことを含む、請求項２１０又は請求項２１１に記載の組成物。

【請求項２１３】
前記第１のトランスポザーゼの活性を促進する条件を有する流体を更に含み、前記第１のトランスポザーゼが前記第１の増幅アダプターを前記標的ポリヌクレオチド中の第１の位置に付加する、請求項２０８又は請求項２０９に記載の組成物。
【請求項２１４】
前記第２のトランスポザーゼを使用して、前記標的ポリヌクレオチド中の第２の位置に前記第２の増幅アダプターを付加する、請求項２１３に記載の組成物。
【請求項２１５】
前記流体の条件が、前記第１のトランスポザーゼの活性のために十分な量のマグネシウムイオンが存在することを含む、請求項２１４に記載の組成物。
【請求項２１６】
前記標的ポリヌクレオチドを前記第１及び第２の融合タンパク質から遊離させて、一方の末端に前記第１の増幅アダプターを有し、他方の末端に前記第２の増幅アダプターを有する前記標的ポリヌクレオチドの断片を提供するための薬剤を更に含む、請求項２１４に記載の組成物。
【請求項２１７】
前記薬剤が、プロテイナーゼＫ、ドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）、又はプロテイナーゼＫとＳＤＳとの両方を含む、請求項２１６に記載の組成物。
【請求項２１８】
前記断片が、約１００塩基対～約１０００塩基対の長さを有する、請求項２１６又は請求項２１７に記載の組成物。
【請求項２１９】
前記断片が、約５００塩基対～約７００塩基対の長さを有する、請求項２１６から２１８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２２０】
前記断片が、約２００塩基対～約４００塩基対の長さを有する、請求項２１６から２１８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２２１】
前記断片が、約１００塩基対～約２００塩基対の長さを有する、請求項２１６から２１８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２２２】
前記第１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの間にない前記標的ポリヌクレオチドの任意の部分を分解するためのエキソヌクレアーゼを更に含む、請求項２０９から２２１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２２３】
前記エキソヌクレアーゼが、エキソヌクレアーゼＩＩＩ又はエキソヌクレアーゼＶＩＩを含む、請求項２２２に記載の組成物。
【請求項２２４】
前記ＣａｓがｄＣａｓ９を含む、請求項２０８から２２３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２２５】
前記トランスポザーゼがＴｎ５を含む、請求項２０８から２２４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２２６】
前記第１のアダプターがＰ５アダプターを含み、前記第２のアダプターがＰ７アダプターを含む、請求項２０９から２２５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２２７】
前記第１の増幅アダプターが第１の固有の分子識別子（ＵＭＩ）を含み、前記第２の増幅アダプターが第２のＵＭＩを含む、請求項２０９から２２６のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項２２８】
前記第１の位置が前記第１の部分配列の約１０塩基以内であり、前記第２の位置が前記第２の部分配列の約１０塩基以内である、請求項２０９から２２７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２２９】
前記第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰが、共有結合を介して前記第１のトランスポザーゼにカップリングされている、請求項２０８から２２８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２３０】
前記第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰが、非共有結合を介して前記第１のトランスポザーゼにカップリングされている、請求項２０８から２２９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２３１】
前記第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰが、抗体に共有結合的にカップリングされ、第１のトランスポザーゼは、前記抗体が非共有結合的にカップリングされる抗原に共有結合的にカップリングされるか、又は前記第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰが、抗原に共有結合的にカップリングされ、第１のトランスポザーゼは、前記抗原が非共有結合的にカップリングされる抗体に共有結合的にカップリングされる、請求項２３０に記載の組成物。
【請求項２３２】
前記第１のＣａｓ－ｇＲＮＡが、前記ｇＲＮＡと前記第１の増幅アダプターとの間のハイブリダイゼーションを介して前記第１のトランスポザーゼに非共有結合的にカップリングされている、請求項２３１に記載の組成物。
【請求項２３３】
前記第１のＣａｓ－ｇＲＮＡが、前記ｇＲＮＡと前記第１のトランスポザーゼ内のオリゴヌクレオチドとの間のハイブリダイゼーションを介して前記第１のトランスポザーゼに非共有結合的にカップリングされている、請求項２３１に記載の組成物。
【請求項２３４】
前記第１の融合タンパク質において、前記第１の部分配列にハイブリダイズするｇＲＮＡの一部が、約１５～約１８ヌクレオチドの長さを有する、請求項２０８から２３３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２３５】
前記第１の融合タンパク質が、前記標的ポリヌクレオチドに対しておおよそ化学量論比である、請求項２０８から２３４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２３６】
前記標的ポリヌクレオチドが二本鎖ＤＮＡを含む、請求項２０８から２３５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２３７】
標的ポリヌクレオチドのそれぞれの遺伝子座にカップリングしたタンパク質を特徴付ける方法であって、前記方法は、
前記標的ポリヌクレオチドを、第１及び第２のＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）と接触させることと、
前記第１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを前記標的ポリヌクレオチド中の第１及び第２の部分配列にそれぞれハイブリダイズさせることであって、前記タンパク質が前記第１及び第２の部分配列間の前記標的ポリヌクレオチドのそれぞれの遺伝子座にカップリングされている、ことと、
前記第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを使用して前記第１の部分配列において前記標的ポリヌクレオチドを切断し、前記第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを使用して前記第２の部分配列において前記標的ポリヌクレオチドを切断して断片を形成することであって、前記タンパク質が前記断片のそれぞれの遺伝子座にカップリングされている、ことと、
対応するオリゴヌクレオチドを使用して、前記断片のそれぞれの遺伝子座にカップリングした前記タンパク質の各々をそれぞれ標識することと、

対応するオリゴヌクレオチドを配列決定することと
を含む、方法。
【請求項２３８】
前記対応するオリゴヌクレオチドを使用して前記断片のそれぞれの遺伝子座にカップリングしたタンパク質の各々をそれぞれ標識する前に前記断片を濃縮することを更に含む、請求項２３７に記載の方法。
【請求項２３９】
前記断片が前記第１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを介してタグにカップリングされるように、前記第１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰがそれぞれタグにカップリングされており、
前記濃縮が、
前記第１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを介して前記タグにカップリングした前記断片を、タグパートナーにカップリングした基材と接触させ、
前記タグを前記タグパートナーにカップリングさせて前記断片を前記基材にカップリングすることと、
前記基材にカップリングされていない前記標的ポリヌクレオチドの任意の部分を除去することと
を含む、請求項２３８に記載の方法。
【請求項２４０】
前記対応するオリゴヌクレオチドを使用して前記タンパク質を同定することを更に含む、請求項２３７から２３９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２４１】
前記対応するオリゴヌクレオチドを使用して前記遺伝子座を同定することを更に含む、請求項２３７から２４０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２４２】
前記対応するオリゴヌクレオチドを使用して前記タンパク質を定量化することを更に含む、請求項２３７から２４１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２４３】
前記対応するオリゴヌクレオチドを使用して前記タンパク質の各々をそれぞれ標識することが、
前記断片を、異なるタンパク質に特異的な抗体の混合物と接触させることであって、前記抗体の各々が、対応するオリゴヌクレオチドにカップリングされている、ことと、
前記断片のそれぞれの遺伝子座にカップリングした前記タンパク質に特異的である混合物中の任意の抗体について、それらの抗体及び前記対応するオリゴヌクレオチドをそれらのタンパク質にカップリングさせることと
を含む、請求項２３７から２４２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２４４】
複数のタンパク質が前記遺伝子座のそれぞれ１つにカップリングされており、前記混合物中の複数の抗体がその遺伝子座において前記タンパク質にカップリングされている、請求項２４３に記載の方法。
【請求項２４５】
前記対応するオリゴヌクレオチドを配列決定することが、前記対応するオリゴヌクレオチドをビーズアレイにハイブリダイズさせることを含む、請求項２４３又は請求項２４４に記載の方法。
【請求項２４６】
前記対応するオリゴヌクレオチドを配列決定することが、前記対応するオリゴヌクレオチドに対して合成による配列決定を行うことを含む、請求項２４３又は請求項２４４に記載の方法。
【請求項２４７】
前記対応するオリゴヌクレオチドが、固有の分子識別子（ＵＭＩ）を含む、請求項２４

３から２４６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２４８】
前記対応するオリゴヌクレオチドのそれぞれの存在を使用して前記タンパク質を同定することを含む、請求項２４３から２４７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２４９】
前記対応するオリゴヌクレオチドのそれぞれの量を使用して前記タンパク質を定量化することを含む、請求項２４３から２４８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２５０】
前記対応するオリゴヌクレオチドを使用して前記タンパク質の各々をそれぞれ標識することが、
前記断片を複数のトランスポザーゼと接触させることであって、前記トランスポザーゼの各々が対応するオリゴヌクレオチドにカップリングされている、ことと、
前記断片のそれぞれの遺伝子座にカップリングした前記タンパク質によって、前記遺伝子座において前記トランスポザーゼの活性を阻害することと、
前記遺伝子座以外の位置で、トランスポザーゼを使用して、前記対応するオリゴヌクレオチドを前記断片に付加することと
を含む、請求項２３７から２４２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２５１】
前記対応するオリゴヌクレオチドを配列決定することが、前記対応するオリゴヌクレオチドが付加された前記断片に対して合成による配列決定を行うことを含む、請求項２５０に記載の方法。
【請求項２５２】
前記対応するオリゴヌクレオチドの断片内のそれぞれの位置を使用して、前記タンパク質のそれぞれの遺伝子座を同定することを含む、請求項２５０又は請求項２５１に記載の方法。
【請求項２５３】
前記トランスポザーゼが前記断片を部分断片に分割し、前記合成による配列決定が前記部分断片に対して行われる、請求項２５０から２５２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２５４】
前記対応するオリゴヌクレオチドが増幅アダプターを含む、請求項２５０から２５３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２５５】
前記増幅アダプターがＰ５アダプター及びＰ７アダプターを含む、請求項２５４に記載の方法。
【請求項２５６】
前記増幅アダプターが固有の分子識別子（ＵＭＩ）を含む、請求項２５４又は請求項２５５に記載の方法。
【請求項２５７】
前記ＣａｓがＣａｓ９を含む、請求項２３７から２５６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２５８】
前記断片が、約１００塩基対～約１０００塩基対の長さを有する、請求項２３７から２５７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２５９】
前記断片が、約５００塩基対～約７００塩基対の長さを有する、請求項２３７から２５８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２６０】
前記断片が、約２００塩基対～約４００塩基対の長さを有する、請求項２３７から２５９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２６１】
前記断片が、約１００塩基対～約２００塩基対の長さを有する、請求項２３７から２６

０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２６２】
前記標的ポリヌクレオチドが二本鎖ＤＮＡを含む、請求項２３７から２６１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２６３】
組成物であって、
標的ポリヌクレオチドの断片であって、タンパク質が前記断片のそれぞれの遺伝子座にカップリングされている、標的ポリヌクレオチドの断片と、
異なるタンパク質に特異的な抗体の混合物であって、前記抗体の各々が、対応するオリゴヌクレオチドにカップリングされている、抗体の混合物と
を含み、
前記断片のそれぞれの遺伝子座にカップリングした前記タンパク質に特異的である前記混合物中の任意の抗体について、それらの抗体及び前記対応するオリゴヌクレオチドが、それらのタンパク質にカップリングされている、組成物。
【請求項２６４】
複数のタンパク質が前記遺伝子座のそれぞれ１つにカップリングされ、前記混合物中の複数の抗体がその遺伝子座において前記タンパク質にカップリングされる、請求項２６３に記載の方法。
【請求項２６５】
前記対応するオリゴヌクレオチドが、固有の分子識別子（ＵＭＩ）を含む、請求項２６３又は請求項２６４に記載の組成物。
【請求項２６６】
前記対応するオリゴヌクレオチドのそれぞれの存在が、前記タンパク質を同定するために使用可能である、請求項２６３から２６５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２６７】
前記対応するオリゴヌクレオチドのそれぞれの量が、前記タンパク質を定量化するために使用可能である、請求項２６３から２６６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２６８】
前記断片が、約１００塩基対～約１０００塩基対の長さを有する、請求項２６３から２６７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２６９】
前記断片が、約５００塩基対～約７００塩基対の長さを有する、請求項２６３から２６８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２７０】
前記断片が、約２００塩基対～約４００塩基対の長さを有する、請求項２６３から２６８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２７１】
前記断片が、約１００塩基対～約２００塩基対の長さを有する、請求項２６３から２６８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２７２】
前記標的ポリヌクレオチドが二本鎖ＤＮＡを含む、請求項２６３から２７１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２７３】
組成物であって、
標的ポリヌクレオチドの断片であって、タンパク質が前記断片のそれぞれの遺伝子座にカップリングされている、標的ポリヌクレオチドの断片と、
複数のトランスポザーゼであって、前記トランスポザーゼの各々が対応するオリゴヌクレオチドにカップリングされている、複数のトランスポザーゼと、
前記遺伝子座において前記トランスポザーゼの活性を阻害する前記断片のそれぞれの遺伝子座にカップリングしたタンパク質と、

前記遺伝子座以外の位置で前記断片に前記対応するオリゴヌクレオチドを付加するトランスポザーゼと
を含む、組成物。
【請求項２７４】
前記対応するオリゴヌクレオチドの断片内のそれぞれの位置が、前記タンパク質のそれぞれの遺伝子座を同定するために使用可能である、請求項２７３に記載の組成物。
【請求項２７５】
前記トランスポザーゼが前記断片を部分断片に分割する、請求項２７３又は請求項２７４に記載の組成物。
【請求項２７６】
前記対応するオリゴヌクレオチドが増幅アダプターを含む、請求項２７３から２７５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２７７】
前記増幅アダプターがＰ５アダプター及びＰ７アダプターを含む、請求項２７６に記載の組成物。
【請求項２７８】
前記増幅アダプターが固有の分子識別子（ＵＭＩ）を含む、請求項２７６又は請求項２７７に記載の組成物。
【請求項２７９】
前記トランスポザーゼがＴｎ５を含む、請求項２７３から２７８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２８０】
前記断片が、約１００塩基対～約１０００塩基対の長さを有する、請求項２７３から２７９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２８１】
前記断片が、約５００塩基対～約７００塩基対の長さを有する、請求項２７３から２８０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２８２】
前記断片が、約２００塩基対～約４００塩基対の長さを有する、請求項２７３から２８０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２８３】
前記断片が、約１００塩基対～約２００塩基対の長さを有する、請求項２７３から２８０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２８４】
前記標的ポリヌクレオチドが二本鎖ＤＮＡを含む、請求項２７３から２８３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２８５】
組成物であって、
複数の部分配列を有する標的ポリヌクレオチドと、
ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）にカップリングしたＳｈＣＡＳＴ（Ｓｃｙｔｏｎｅｍａ ｈｏｆｍａｎｎｉ ＣＲＩＳＰＲ関連トランスポザーゼ）を各々含む複数の複合体であって、前記ＳｈＣＡＳＴが、前記複合体にカップリングした増幅アダプターを有する、複数の複合体と
を含み、
前記複合体の各々は、前記標的ポリヌクレオチド中の前記部分配列のうちの対応する１つにハイブリダイズされている、組成物。
【請求項２８６】
前記部分配列への前記複合体のハイブリダイゼーションを促進し、かつ前記トランスポザーゼの活性を阻害する条件を有する流体を更に含む、請求項２８５に記載の組成物。
【請求項２８７】

前記流体の条件が、前記トランスポザーゼの活性のために十分な量のマグネシウムイオンが存在しないことを含む、請求項２８６に記載の組成物。
【請求項２８８】
前記トランスポザーゼの活性を促進する条件を有する流体を更に含み、前記トランスポザーゼが、前記標的ポリヌクレオチド中の位置に増幅アダプターを付加する、請求項２８５に記載の組成物。
【請求項２８９】
前記流体の条件が、前記トランスポザーゼの活性のために十分な量のマグネシウムイオンが存在することを含む、請求項２８８に記載の組成物。
【請求項２９０】
前記ＳｈＣＡＳＴがＣａｓ１２ｋを含む、請求項２８５から２８９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２９１】
前記トランスポザーゼが、Ｔｎ５又はＴｎ７様トランスポザーゼを含む、請求項２８５から２９０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２９２】
前記アダプターが、Ｐ５アダプター及びＰ７アダプターのうちの少なくとも１つを含む、請求項２８５から２９１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２９２】
前記標的ポリヌクレオチドが二本鎖ＤＮＡを含む、請求項２８５から２９２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２９３】
前記ｇＲＮＡ及び前記トランスポザーゼのうちの少なくとも１つがビオチン化されており、前記組成物が、ビオチン化されている前記ｇＲＮＡ及びトランスポザーゼのうちの少なくとも１つがカップリングしているストレプトアビジンでコーティングされたビーズを更に含む、請求項２８５から２９２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２９４】
第１のタグが前記第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰにカップリングされ、第２のタグが前記第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰにカップリングされる、請求項１８０から２０６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２９５】
前記第１のタグを基材にカップリングした第１のタグパートナーにカップリングすることと、前記第２のタグを基材にカップリングした第２のタグパートナーにカップリングすることとを更に含む、請求項２９４に記載の方法。
【請求項２９６】
前記カップリングが、前記第１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰがそれぞれ前記第１及び第２の部分配列にハイブリダイズされた後に行われる、請求項２９５に記載の方法。
【請求項２９７】
前記第１及び第２のタグがそれぞれ前記第１及び第２のタグパートナーに付加された後に、第１及び増幅アダプターが付加される、請求項２９５又は請求項２９６に記載の方法。
【請求項２９８】
前記第１及び第２のタグがビオチンを含む、請求項２９４から２９７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２９９】
前記第１及び第２のタグパートナーがストレプトアビジンを含む、請求項２９８に記載の方法。
【請求項３００】
前記基材がビーズを含む、請求項２９５から２９９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３０１】
前記Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰがＣａｓ１２　ｋを含む、請求項２９４から３００のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３０２】
前記トランスポザーゼが、Ｔｎ５又はＴｎ７様トランスポザーゼを含む、請求項２９４から３０１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３０３】
前記第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰにカップリングした第１のタグを更に含む、請求項２０８から２３６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３０４】
基材と、前記基材及び前記第１のタグにカップリングした第１のタグパートナーとを更に含む、請求項３０３に記載の組成物。
【請求項３０５】
前記第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰにカップリングした第１のタグと、前記第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰにカップリングした第２のタグとを更に含む、請求項２０９から２３６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３０６】
基材と、前記基材及び前記第１のタグにカップリングした第１のタグパートナーと、前記基材及び前記第２のタグにカップリングした第２のタグパートナーとを更に含む、請求項３０５に記載の組成物。
【請求項３０７】
前記第１及び第２のタグがビオチンを含む、請求項３０６に記載の組成物。
【請求項３０８】
前記第１及び第２のタグパートナーがストレプトアビジンを含む、請求項３０７に記載の組成物。
【請求項３０９】
前記基材がビーズを含む、請求項３０３から３０８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３１０】
前記Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰがＣａｓ１２ｋを含む、請求項３０３から３０９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３１１】
前記トランスポザーゼが、Ｔｎ５又はＴｎ７様トランスポザーゼを含む、請求項３０３から３０９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３１２】
二本鎖ポリヌクレオチドの断片を生成する方法であって、前記方法は、
前記二本鎖ポリヌクレオチドを基材にカップリングさせることと、
第１及び第２のＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）ニッカーゼを、前記二本鎖ポリヌクレオチド中の第１及び第２の部分配列にそれぞれハイブリダイズさせることであって、
前記第１の部分配列は、前記二本鎖ポリヌクレオチドの第１の鎖に沿った標的配列の３’側であり、
前記第２の部分配列は、前記二本鎖ポリヌクレオチドの第２の鎖に沿った前記標的配列の３’側である、ことと、
前記第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰニッカーゼを使用して、前記第１の部分配列において前記第１の鎖を切断することと、
前記第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰニッカーゼを使用して、前記第２の部分配列において前記第２の鎖を切断することと
ポリメラーゼを使用して、前記それぞれの切断部から前記第１及び第２の鎖を伸長させ、前記基材から前記標的配列を溶出させることと、
前記溶出された標的配列を配列決定することと

を含む、方法。
【請求項３１３】
前記基材がビーズを含む、請求項３１２に記載の方法。
【請求項３１４】
前記二本鎖ポリヌクレオチドの３’末端がタグにカップリングされており、前記基材はタグパートナーにカップリングされており、前記カップリングが、前記タグを前記タグパートナーにカップリングすることを含む、請求項３１２又は請求項３１３に記載の方法。
【請求項３１５】
前記タグがビオチンを含み、前記タグパートナーがストレプトアビジンを含む、請求項３１４に記載の方法。
【請求項３１６】
前記第１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰニッカーゼが、Ｃａｓ９を含む、請求項３１２から３１５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３１７】
前記ポリメラーゼが鎖置換ポリメラーゼを含む、請求項３１２から３１６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３１８】
前記ポリメラーゼがＶｅｎｔ又はＢｓｕを含む、請求項３１７に記載の方法。
【請求項３１９】
前記ポリメラーゼが５’エキソヌクレアーゼ活性を有する、請求項３１２から３１６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３２０】
前記ポリメラーゼが、Ｔａｑ、Ｂｓｔ、又はＤＮＡポリメラーゼＩを含む、請求項３１９に記載の方法。
【請求項３２１】
前記二本鎖ポリヌクレオチドが、配列決定ライブラリーの一部を含む、請求項３１２から３２０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３２２】
前記溶出された標的配列に配列決定アダプターを付加することを更に含む、請求項３１２から３２１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３２３】
組成物であって、
基材にカップリングした二本鎖ポリヌクレオチドと、
前記二本鎖ポリヌクレオチド中の第１及び第２の部分配列にそれぞれハイブリダイズした第１及び第２のＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）ニッカーゼと
を含み、
前記第１の部分配列は、前記二本鎖ポリヌクレオチドの第１の鎖に沿った標的配列の３’側であり、
前記第２の部分配列は、前記二本鎖ポリヌクレオチドの第２の鎖に沿った前記標的配列の３’側である、組成物。
【請求項３２４】
前記基材がビーズを含む、請求項３２３に記載の組成物。
【請求項３２５】
前記二本鎖ポリヌクレオチドの３’末端がタグにカップリングされており、前記基材は前記タグにカップリングしたタグパートナーにカップリングされている、請求項３２３又は３２４に記載の組成物。
【請求項３２６】
前記タグがビオチンを含み、前記タグパートナーがストレプトアビジンを含む、請求項３２５に記載の組成物。

【請求項３２７】
前記第１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰニッカーゼが、Ｃａｓ９を含む、請求項３２３から３２６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３２８】
前記二本鎖ポリヌクレオチドが、配列決定ライブラリーの一部を含む、請求項３２３から３２７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３２９】
二本鎖ポリヌクレオチドの断片を生成する方法であって、前記方法は、
第１及び第２の複合体を二本鎖ポリヌクレオチド中の第１及び第２の部分配列にそれぞれハイブリダイズさせることであって、
前記第１及び第２の複合体の各々は、増幅アダプターにカップリングしたＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）を含む、ことと、
前記ハイブリダイズされた第１及び第２の複合体の増幅アダプターを、前記二本鎖ポリヌクレオチドの第１及び第２の末端にそれぞれライゲーションすることと、
前記二本鎖ポリヌクレオチドから前記第１及び第２の複合体のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを除去することと、
前記増幅アダプターがライゲーションされた前記二本鎖ポリヌクレオチドを配列決定することと
を含む、方法。
【請求項３３０】
前記第１の部分配列が、前記二本鎖ポリヌクレオチドの第１の鎖に沿った標的配列の３’側であり、前記第２の部分配列は、前記二本鎖ポリヌクレオチドの第２の鎖に沿った標的配列の３’側である、請求項３２９に記載の方法。
【請求項３３１】
前記増幅アダプターがＹ字型である、請求項３２９又は３３０に記載の方法。
【請求項３３２】
各複合体が、前記Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを前記増幅アダプターにカップリングするリンカーを更に含む、請求項３２９から３３１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３３３】
前記リンカーが、前記Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのＣａｓにカップリングされる、請求項３３２に記載の方法。
【請求項３３４】
前記リンカーが前記ｇＲＮＡにカップリングされる、請求項３３２に記載の方法。
【請求項３３５】
前記リンカーが、タンパク質、ポリヌクレオチド、又はポリマーを含む、請求項３３２から３３４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３３６】
前記Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰが除去されるとき、前記リンカーが前記増幅アダプターにカップリングしたままである、請求項３３２から３３５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３３７】
前記ライゲーションがリガーゼの使用を含む、請求項３２９から３３６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３３８】
リガーゼがハイブリダイズ中に存在する、請求項３３７に記載の方法。
【請求項３３９】
リガーゼがハイブリダイズ中に不活性であり、ＡＴＰを使用してライゲーションするために活性化される、請求項３３８に記載の方法。
【請求項３４０】
前記リガーゼが、前記ハイブリダイズの後に付加される、請求項３３７に記載の方法。

【請求項３４１】
前記ハイブリダイズさせる前に、前記二本鎖ポリヌクレオチドをＡ－テーリングすることを更に含み、前記増幅アダプターが、前記Ａ－テールとハイブリダイズするための不対Ｔを含む、請求項３２９から３４０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３４２】
増幅アダプターが固有の分子識別子を含む、請求項３２９から３４１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３４３】
前記Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰがｄＣａｓ９を含む、請求項３２９から３４２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３４４】
組成物であって、
二本鎖ポリヌクレオチドの断片と、
前記二本鎖ポリヌクレオチド中の第１及び第２の部分配列にハイブリダイズした第１及び第２の複合体と
を含み、
前記第１及び第２の複合体の各々が、増幅アダプターにカップリングしたＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）を含む、組成物。
【請求項３４５】
前記第１の部分配列が、前記二本鎖ポリヌクレオチドの第１の鎖に沿った標的配列の３’側であり、前記第２の部分配列は、前記二本鎖ポリヌクレオチドの第２の鎖に沿った標的配列の３’側である、請求項３４４に記載の組成物。
【請求項３４６】
増幅アダプターがＹ字型である、請求項３４４又は請求項３４５に記載の組成物。
【請求項３４７】
各複合体が、前記Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを前記増幅アダプターにカップリングするリンカーを更に含む、請求項３４４から３４６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３４８】
前記リンカーが、前記Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのＣａｓにカップリングされている、請求項３４７に記載の組成物。
【請求項３４９】
前記リンカーが前記ｇＲＮＡにカップリングされている、請求項３４８に記載の組成物。
【請求項３５０】
前記リンカーが、タンパク質、ポリヌクレオチド、又はポリマーを含む、請求項３４７から３４９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３５１】
前記二本鎖ポリヌクレオチドがＡテールを含み、前記増幅アダプターが、前記Ａテールとハイブリダイズする不対Ｔを含む、請求項３４４から３４８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３５２】
増幅アダプターが固有の分子識別子を含む、請求項３４４から３５１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３５３】
前記Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰがｄＣａｓ９を含む、請求項３４４から３５２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３５４】
ポリヌクレオチドの断片を生成する方法であって、前記方法は、
第１のＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ

ＲＮＰ）を前記ポリヌクレオチド中の第１の配列にハイブリダイズさせることと、
　第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを、前記第１の配列から少なくとも標的配列だけ離間している前記ポリヌクレオチド中の第２の配列にハイブリダイズさせることと、
　前記第１及び第２の配列を前記第１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰで切断して、第１及び第２の末端並びにそれらの間の前記標的配列を含む断片を生成することであって、前記第１の末端が少なくとも１つの塩基の第１の５’オーバーハングを有し、前記第２の末端が少なくとも１つの塩基の第２の５’オーバーハングを有する、ことと
　を含む、方法。
【請求項３５５】
　前記第１及び第２の５’オーバーハングが各々約２～５塩基長である、請求項３５４に記載の方法。
【請求項３５６】
　前記第１及び第２の５’オーバーハングが各々約５塩基長である、請求項３５４に記載の方法。
【請求項３５７】
　前記第１及び第２の５’オーバーハングが互いに異なる配列を有する、請求項３５４から３５６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３５８】
　第１の増幅アダプターを前記断片の第１の末端にライゲーションすることと、第２の増幅アダプターを前記断片の第２の末端にライゲーションすることとを更に含み、
　前記第１の増幅アダプターが、前記第１の５’オーバーハングに相補的な第３の５’オーバーハングを有し、
　前記第２の増幅アダプターが、前記第２の５’オーバーハングに相補的な第４の５’オーバーハングを有し、
　前記第３及び第４の５’オーバーハングは、互いに異なる配列を有する、請求項３５７に記載の方法。
【請求項３５９】
　前記第１及び第２の増幅アダプターがライゲーションされた前記断片のアンプリコンを生成することと、
　前記アンプリコンを配列決定することと、
　前記配列決定に基づいて前記標的ポリヌクレオチドを同定することと
　を更に含む、請求項３５８に記載の方法。
【請求項３６０】
　前記増幅アダプターが固有の分子識別子（ＵＭＩ）を含む、請求項３５８又は３５９に記載の方法。
【請求項３６１】
　前記ＣａｓがＣａｓ１２ａを含む、請求項３５４から３６０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３６２】
　組成物であって、
　ポリヌクレオチドと、
　前記ポリヌクレオチド中の第１の配列にハイブリダイズした第１のＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）と、
　前記第１の配列から少なくとも標的配列だけ離間している前記ポリヌクレオチド中の第２の配列にハイブリダイズされた第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰと
　を含み、
　前記第１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰはそれぞれ、前記ポリヌクレオチドの前記第１及び第２の配列を切断して、前記標的配列を間に持つ第１及び第２の末端を有する断片を生成するためのものであり、前記第１の末端が少なくとも１つの塩基の第１の５’オーバーハングを有し、前記第２の末端が少なくとも１つの塩基の第２の５’オーバーハ

ングを有する、組成物。
【請求項３６３】
前記第１及び第２の５’オーバーハングが各々約２～５塩基長である、請求項３６２に記載の組成物。
【請求項３６４】
前記第１及び第２の５’オーバーハングが各々約５塩基長である、請求項３６２に記載の組成物。
【請求項３６５】
前記第１及び第２の５’オーバーハングが互いに異なる配列を有する、請求項３６２から３６４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３６６】
前記ＣａｓがＣａｓ１２ａを含む、請求項３６２から３６５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３６７】
組成物であって、
前記標的配列を間に持つ第１及び第２の末端を各々有するポリヌクレオチド断片であって、前記第１の末端が少なくとも１つの塩基の第１の５’オーバーハングを有し、前記第２の末端が少なくとも１塩基の第２の５’オーバーハングを有し、前記第１及び第２の５’オーバーハングが互いに異なる配列を有する、ポリヌクレオチド断片と、
前記第１の５’オーバーハングに相補的であり、かつ前記第２の５’オーバーハングに相補的でない第３の５’オーバーハングを有する第１の増幅アダプターと、
前記第２の５’オーバーハングに相補的であり、かつ前記第１の５’オーバーハングに相補的でない第４の５’オーバーハングを有する第２の増幅アダプターと
を含む、組成物。
【請求項３６８】
前記第１の増幅アダプターを前記第１の末端にライゲーションし、前記第２の増幅アダプターを前記第２の末端にライゲーションするための少なくとも１つのリガーゼを更に含む、請求項３６７に記載の組成物。
【請求項３６９】
前記第１及び第２の５’オーバーハングが各々約２～５塩基長である、請求項３６７又は請求項３６８に記載の組成物。
【請求項３７０】
前記第１及び第２の５’オーバーハングが各々約５塩基長である、請求項３６７又は請求項３６８に記載の組成物。
【請求項３７１】
前記第１及び第２の増幅アダプターが固有の分子識別子（ＵＭＩ）を含む、請求項３６７から３７０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３７２】
前記リガーゼがＴ４　ＤＮＡリガーゼを含む、請求項３６８から３７１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３７３】
組成物であって、
前記標的配列を間に持つ第１及び第２の末端を各々有する複数のポリヌクレオチド断片であって、前記第１の末端が少なくとも１つの塩基の第１の５’オーバーハングを有し、前記第２の末端が少なくとも１塩基の第２の５’オーバーハングを有し、前記第１及び第２の５’オーバーハングが、互いに、かつ他の断片の第１及び第２の５’オーバーハングとは異なる配列を有する、ポリヌクレオチド断片
を含む、組成物。
【請求項３７４】
複数の第１の増幅アダプターであって、各々が、対応する断片の第１の５’オーバーハ

ングに相補的であり、その断片の第２の５’オーバーハングに相補的でなく、他の断片の第１又は第２の５’オーバーハングに相補的でない第３の５’オーバーハングを有する、複数の第１の増幅アダプターと、
　複数の第２の増幅アダプターであって、各々が、対応する断片の第２の５’オーバーハングに相補的であり、その断片の第１の５’オーバーハングに相補的でなく、他の断片の第１又は第２の５’オーバーハングに相補的でない第４の５’オーバーハングを有する、複数の第２の増幅アダプターと
　を更に含む、請求項３７３に記載の組成物。
【請求項３７５】
　前記第１及び第３の５’オーバーハングが相補的である前記第１の末端に前記第１の増幅アダプターをライゲーションし、前記第２及び第４の５’オーバーハングが相補的である前記第２の末端に前記第２の増幅アダプターをライゲーションするためのリガーゼを更に含む、請求項３７４に記載の組成物。
【請求項３７６】
　前記リガーゼがＴ４　ＤＮＡリガーゼを含む、請求項３７５に記載の組成物。
【請求項３７７】
　前記第１及び第２の増幅アダプターが固有の分子識別子（ＵＭＩ）を含む、請求項３７５又は請求項３７６に記載の組成物。
【請求項３７８】
　前記第１及び第２の５’オーバーハングが各々約２～５塩基長である、請求項３７３から３７７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３７９】
　前記第１及び第２の５’オーバーハングが各々約５塩基長である、請求項３７３から３７７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３８０】
　組成物であって、
　複数のポリヌクレオチドと、
　前記ポリヌクレオチド中のそれぞれの第１の配列にハイブリダイズした複数の第１のＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）と、
　前記それぞれの第１の配列から少なくともそれぞれの標的配列にだけ離間している前記ポリヌクレオチド中のそれぞれの第２の配列にハイブリダイズした複数の第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰと
　を含み、
　前記第１及び第２の複数のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰはそれぞれ、前記それぞれのポリヌクレオチドの前記第１及び第２の配列を切断して、前記それぞれの標的配列内に第１及び第２の末端をそれぞれ有する断片を生成するためのものであり、前記第１の末端が少なくとも１つの塩基の第１の５’オーバーハングを有し、前記第２の末端が少なくとも１つの塩基の第２の５’オーバーハングを有する、組成物。
【請求項３８１】
　前記第１及び第２の５’オーバーハングが各々約２～５塩基長である、請求項３８０に記載の組成物。
【請求項３８３】
　前記第１及び第２の５’オーバーハングが各々約５塩基長である、請求項３８０に記載の組成物。
【請求項３８４】
　前記第１及び第２の５’オーバーハングが互いに異なる配列を有する、請求項３８０から３８３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３８５】
　前記ＣａｓがＣａｓ１２ａを含む、請求項３８０から３８４のいずれか一項に記載の組

成物。
【請求項３８６】
プライマー結合部位、増幅アダプター部位、及びＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーを含む、ガイドＲＮＡ。
【請求項３８７】
前記プライマー結合部位が、前記ＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーの少なくとも一部におおよそ相補的である、請求項３８６に記載のガイドＲＮＡ。
【請求項３８８】
前記増幅アダプター部位が、前記プライマー結合部位と前記ＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーとの間に位置する、請求項３８６又は請求項３８７に記載のガイドＲＮＡ。
【請求項３８９】
少なくとも１つのループを更に含む、請求項３８６から３８８のいずれか一項に記載のガイドＲＮＡ。
【請求項３９０】
第１のループが、前記増幅アダプター部位と前記ＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーとの間に位置する、請求項３８９に記載のガイドＲＮＡ。
【請求項３９１】
第２のループが、前記増幅アダプター部位と前記ＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーとの間に位置する、請求項３９０に記載のガイドＲＮＡ。
【請求項３９２】
ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）であって、
請求項３８６から３９１のいずれか一項に記載のｇＲＮＡと、
前記ＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーに結合するＣａｓタンパク質と
を含む、ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）。
【請求項３９３】
前記Ｃａｓタンパク質が二本鎖ポリヌクレオチド切断を行うように構成されている、請求項３９２に記載のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ。
【請求項３９４】
前記Ｃａｓタンパク質が、Ｃａｓ９、Ｃａｓ　１２ａ、又はＣａｓ１２ｆを含む、請求項３９３に記載のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ。
【請求項３９５】
前記プライマー結合部位及び前記増幅アダプター部位が、前記Ｃａｓタンパク質の外側に伸長する、請求項３９２から３９４のいずれか一項に記載のＣａｓ－ｇＲＮＡ ＲＮＰ。
【請求項３９６】
複合体であって、
第１の鎖及び第の２鎖を含むポリヌクレオチドと、
第１のＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ ＲＮＰ）であって、
第１のプライマー結合部位、第１の増幅アダプター部位、及び第１のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーを含む第１のガイドＲＮＡと、
前記第１のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーに結合する第１のＣａｓタンパク質とを含む、第１のＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）と
を含み、
前記第１のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーが前記第１の鎖にハイブリダイズしており、前記第１のプライマー結合部位が前記第２の鎖にハイブリダイズしている、複合体。
【請求項３９７】
前記第１及び第２の鎖が、前記第１のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーの配列に基づくそ

れぞれの位置で前記第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰによって切断されている、請求項３９６に記載の複合体。
【請求項３９８】
前記第１のＣａｓタンパク質が、Ｃａｓ９、Ｃａｓ　１２ａ、又はＣａｓ１２ｆを含む、請求項３９７に記載の複合体。
【請求項３９９】
前記第１のＣａｓタンパク質によって引き起こされた前記第２の鎖の切断部に前記増幅アダプター部位のアンプリコンを作製するための第１の逆転写酵素を更に含む、請求項３９７又は請求項３９８に記載の複合体。
【請求項４００】
前記第１の逆転写酵素が前記第１のＣａｓタンパク質にカップリングされている、請求項３９９に記載の複合体。
【請求項４０１】
前記第１の逆転写酵素及び前記第１のＣａｓタンパク質が、第１の融合タンパク質の構成要素である、請求項４００に記載の複合体。
【請求項４０２】
前記第１のプライマー結合部位が、前記第１のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーの少なくとも一部におおよそ相補的である、請求項３９６から４０１のいずれか一項に記載の複合体。
【請求項４０３】
前記第１の増幅アダプター部位が、前記第１のプライマー結合部位と前記第１のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーとの間に位置する、請求項３９６から４０２のいずれか一項に記載の複合体。
【請求項４０４】
前記第１のｇＲＮＡが少なくとも１つのループを更に含む、請求項３９６から４０３のいずれか一項に記載の複合体。
【請求項４０５】
第１のループが、前記第１の増幅アダプター部位と第１のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーとの間に位置する、請求項４０４に記載の複合体。
【請求項４０６】
第２のループが、前記第１の増幅アダプター部位と前記第１のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーとの間に位置する、請求項４０５に記載の複合体。
【請求項４０７】
第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを更に含み、前記第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰは、
第２のプライマー結合部位、第２の増幅アダプター部位、及び第２のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーを含む第２のガイドＲＮＡと、
前記第２のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーに結合する第２のＣａｓタンパク質とを含み、
前記第２のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーが前記第１の鎖にハイブリダイズしており、前記第２のプライマー結合部位が、前記第２の鎖にハイブリダイズしている、請求項３９６から４０６のいずれか一項に記載の複合体。
【請求項４０８】
前記第１及び第２の鎖が、前記第２のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーの配列に基づくそれぞれの位置で前記第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰによって切断されている、請求項４０７に記載の複合体。
【請求項４０９】
前記第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰによる第１及び第２の鎖の切断部が、前記第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰによる第１及び第２の鎖の切断部から少なくとも標的配列だけ離間している、請求項４０８に記載の複合体。
【請求項４１０】

前記第２のＣａｓタンパク質が、Ｃａｓ９、Ｃａｓ　１２ａ、又はＣａｓ１２ｆを含む、請求項４０８又は請求項４０９に記載の複合体。
【請求項４１１】
前記第２のＣａｓタンパク質によって引き起こされた前記第２の鎖の切断部に前記増幅アダプター部位のアンプリコンを作製するための第２の逆転写酵素を更に含む、請求項４０８から４１０のいずれか一項に記載の複合体。
【請求項４１２】
前記第２の逆転写酵素が、前記第２のＣａｓタンパク質にカップリングされている、請求項４１１に記載の複合体。
【請求項４１３】
前記第２の逆転写酵素及び前記第２のＣａｓタンパク質が、第２の融合タンパク質の構成要素である、請求項４１２に記載の複合体。
【請求項４１４】
前記第２のプライマー結合部位が、前記第２のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーの少なくとも一部におおよそ相補的である、請求項４０７から４１３のいずれか一項に記載の複合体。
【請求項４１５】
前記第２の増幅アダプター部位が、前記第２のプライマー結合部位と前記第２のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーとの間に位置する、請求項３９６から４１４のいずれか一項に記載の複合体。
【請求項４１６】
部分二本鎖ポリヌクレオチド断片であって、
第１の３’オーバーハングを含む第１の末端と、
第２の末端と、
前記第１の末端と前記第２の末端との間に位置する標的配列と
を含む、部分二本鎖ポリヌクレオチド断片。
【請求項４１７】
前記第１の３’オーバーハングが第１の増幅アダプターを含む、請求項４１６に記載の断片。
【請求項４１８】
前記第２の末端が第２の３’オーバーハングを含む、請求項４１６又は請求項４１７に記載の断片。
【請求項４１９】
前記第２の３’オーバーハングが第２の増幅アダプターを含む、請求項４１８に記載の断片。
【請求項４２０】
方法であって、
第１のＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）を、第１及び第２の鎖を含むポリヌクレオチドと接触させることであって、
前記第１のＣａｓ－ｇＲＮＡは、
　第１のプライマー結合部位、第１の増幅アダプター部位、及び第１のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーを含む第１のガイドＲＮＡと、
　前記第１のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーに結合する第１のＣａｓタンパク質とを含む、ことと、
前記第１のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーを前記第１の鎖にハイブリダイズさせることと、
前記第１のプライマー結合部位を前記第２の鎖にハイブリダイズさせることと
を含む、方法。
【請求項４２１】
前記第１のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーの配列に基づくそれぞれの位置で、前記第１

のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰによって前記第１及び第２の鎖を切断することを更に含む、請求項４２０に記載の方法。
【請求項４２２】
前記第１のＣａｓタンパク質が、Ｃａｓ９、Ｃａｓ　１２ａ、又はＣａｓ１２ｆを含む、請求項４２１に記載の方法。
【請求項４２３】
第１の逆転写酵素を使用して、前記第１のＣａｓタンパク質によって引き起こされた前記第２の鎖の前記切断部に前記増幅アダプター部位のアンプリコンを生成することを更に含む、請求項４２１又は請求項４２２に記載の方法。
【請求項４２４】
前記第１の逆転写酵素が、前記第１のＣａｓタンパク質にカップリングされる、請求項４２３に記載の方法。
【請求項４２５】
前記第１の逆転写酵素及び前記第１のＣａｓタンパク質が、第１の融合タンパク質の構成要素である、請求項４２４に記載の方法。
【請求項４２６】
前記第１のプライマー結合部位が、前記第１のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーの少なくとも一部におおよそ相補的である、請求項４２０から４２５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４２７】
第１の増幅アダプター部位が、第１のプライマー結合部位と第１のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーとの間に位置する、請求項４２０から４２６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４２８】
前記第１のｇＲＮＡが少なくとも１つのループを更に含む、請求項４２０から４２７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４２９】
第１のループが、前記第１の増幅アダプター部位と第１のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーとの間に位置する、請求項４２８に記載の方法。
【請求項４３０】
第２のループが、前記第１の増幅アダプター部位と前記第１のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーとの間に位置する、請求項４２９に記載の方法。
【請求項４３１】
前記ポリヌクレオチドを第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰと接触させることであって、
前記第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰが、
第２のプライマー結合部位、第２の増幅アダプター部位、及び第２のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーを含む第２のガイドＲＮＡと、
前記第２のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーに結合する第２のＣａｓタンパク質とを含む、ことと、
前記第２のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーを前記第１の鎖にハイブリダイズさせることと、
前記第２のプライマー結合部位を前記第２の鎖にハイブリダイズさせることと
を更に含む、請求項４２０から４３０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４３２】
前記第２のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーの配列に基づくそれぞれの位置で、前記第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰによって前記第１及び第２の鎖を切断することを更に含む、請求項４３１に記載の方法。
【請求項４３３】
前記第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰによる第１及び第２の鎖の切断部が、前記第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰによる第１及び第２の鎖の切断部から少なくとも標的配列だけ離間している、請求項４３２に記載の方法。

【請求項４３４】
前記第２のＣａｓタンパク質が、Ｃａｓ９、Ｃａｓ　１２ａ、又はＣａｓ１２ｆを含む、請求項４３２又は４３３に記載の方法。
【請求項４３５】
第２の逆転写酵素を使用して、前記第２のＣａｓタンパク質によって引き起こされた前記第２の鎖の切断部に前記増幅アダプター部位のアンプリコンを生成することを更に含む、請求項４３２～４３４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４３６】
前記第２の逆転写酵素が、前記第２のＣａｓタンパク質にカップリングされる、請求項４３５に記載の方法。
【請求項４３７】
前記第２の逆転写酵素及び前記第２のＣａｓタンパク質が、第２の融合タンパク質の構成要素である、請求項４３６に記載の方法。
【請求項４３８】
前記第２のプライマー結合部位が、前記第２のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーの少なくとも一部におおよそ相補的である、請求項４３１から４３７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４３９】
前記第２の増幅アダプター部位が、前記第２のプライマー結合部位と前記第２のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーとの間に位置する、請求項４３１から４３８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４４０】
前記第１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ並びに前記第１及び第２の逆転写酵素が、第１の末端及び第２の末端を有する部分二本鎖ポリヌクレオチド断片を生成し、
前記第１の末端は、第１の３’オーバーハングを含み、
前記第２の末端は、第２の３’オーバーハングを含み、
前記第１の末端と前記第２の末端との間に標的配列が位置する、請求項４３５から４３９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４４１】
前記第１の３’オーバーハングが、前記第１の増幅アダプター部位のアンプリコンを含む、請求項４４０に記載の方法。
【請求項４４２】
前記第２の３’オーバーハングが、前記第２の増幅アダプター部位のアンプリコンを含む、請求項４４０又は請求項４４１に記載の方法。
【請求項４４３】
第３の増幅アダプターを前記第１の末端の５’基にライゲーションすることと、
第４の増幅アダプターを第２の末端の５’基にライゲーションすることと、
前記第１、第２、第３、及び第４の増幅アダプターを使用して前記断片を増幅することと、
前記増幅された断片を配列決定することと
更に含む、請求項４４２に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、それらの各々の全内容が参照により本明細書に組み込まれている、以下の出願の利益を主張する：
２０２１年３月９日に出願され、「Ｇｅｎｏｍｉｃ　ｌｉｂｒａｒｙ　ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ　ａｎｄ　ｔａｒｇｅｔｅｄ　ｅｐｉｇｅｎｅｔｉｃ　ａｓｓａｙｓ　ｕｓｉｎｇ　Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ｒｉｂｏｎｕｃｌｅｏｐｒｏｔｅｉｎｓ」と題する米国仮特許出

願第６３／１５８，４９２号；
２０２１年３月１８日に出願され、「Ｇｅｎｏｍｉｃ ｌｉｂｒａｒｙ ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ ａｎｄ ｔａｒｇｅｔｅｄ ｅｐｉｇｅｎｅｔｉｃ ａｓｓａｙｓ ｕｓｉｎｇ Ｃａｓ－ｇＲＮＡ ｒｉｂｏｎｕｃｌｅｏｐｒｏｔｅｉｎｓ」と題する米国仮特許出願第６３／１６２，７７５号；
２０２１年３月１９日に出願され、「Ｇｅｎｏｍｉｃ ｌｉｂｒａｒｙ ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ ａｎｄ ｔａｒｇｅｔｅｄ ｅｐｉｇｅｎｅｔｉｃ ａｓｓａｙｓ ｕｓｉｎｇ Ｃａｓ－ｇＲＮＡ ｒｉｂｏｎｕｃｌｅｏｐｒｏｔｅｉｎｓ」と題する米国仮特許出願第６３／１６３，３８１号；
２０２１年８月２日に出願され、「Ｇｅｎｏｍｉｃ ｌｉｂｒａｒｙ ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ ａｎｄ ｔａｒｇｅｔｅｄ ｅｐｉｇｅｎｅｔｉｃ ａｓｓａｙｓ ｕｓｉｎｇ Ｃａｓ－ｇＲＮＡ ｒｉｂｏｎｕｃｌｅｏｐｒｏｔｅｉｎｓ」と題する米国仮特許出願第６３／２２８，３４４号；
２０２１年９月２２日に出願され、「Ｇｅｎｏｍｉｃ ｌｉｂｒａｒｙ ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ ａｎｄ ｔａｒｇｅｔｅｄ ｅｐｉｇｅｎｅｔｉｃ ａｓｓａｙｓ ｕｓｉｎｇ Ｃａｓ－ｇＲＮＡ ｒｉｂｏｎｕｃｌｅｏｐｒｏｔｅｉｎｓ」と題する米国仮特許出願第６３／２４６，８７９号；及び
２０２１年１２月３０日に出願され、「Ｇｅｎｏｍｉｃ ｌｉｂｒａｒｙ ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ ａｎｄ ｔａｒｇｅｔｉｎｇ ｅｐｉｇｅｎｅｔｉｃ ａｓｓａｙｓ ｕｓｉｎｇ Ｃａｓ－ｇＲＮＡ ｒｉｂｏｎｕｃｌｅｏｐｒｏｔｅｉｎｓ」と題する米国仮特許出願第６３／２９５，４３２号。

【０００２】

本出願は、ゲノムライブラリー調製及び標的化エピジェネティックアッセイのためにＣａｓ－ｇＲＮＡ ＲＮＰを使用する組成物及び方法に関する。

【０００３】

配列表に関する記述

本出願に関連する配列表は、紙のコピーの代わりにテキスト形式で提供され、参照により本明細書に組み込まれる。配列表を含むテキストファイルの名称は、８５４９１０２４１６＿ＳＬ．ｔｘｔである。テキストファイルは、約１．２９ＫＢであり、２０２２年３月３日に作成され、ＥＦＳ－Ｗｅｂを介して電子的に提出されている。

【背景技術】

【０００４】

Ｃｌｕｓｔｅｒｅｄ ｒｅｇｕｌａｒｌｙ ｉｎｔｅｒｓｐａｃｅｄ ｓｈｏｒｔ ｐａｌｉｎｄｒｏｍｉｃ ｒｅｐｅａｔｓ（ＣＲＩＳＰＲ）は、多くの細菌及び古細菌においてバクテリオファージ及び接合性プラスミドから細胞を保護する干渉経路に関与している；例えば、Ｍａｒｒａｆｆｉｎｉ ｅｔ ａｌ．，「ＣＲＩＳＰＲ ｉｎｔｅｒｆｅｒｅｎｃｅ：ＲＮＡ－ｄｉｒｅｃｔｅｄ ａｄａｐｔｉｖｅ ｉｍｍｕｎｉｔｙ ｉｎ ｂａｃｔｅｒｉａ ａｎｄ ａｒｃｈａｅａ」，Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｇｅｎｅｔ．１１（３）：１８１－１９０（２０１０）を参照されたい。ＣＲＩＳＰＲ配列は、スペーサーと呼ばれる同様のサイズの固有の可変ＤＮＡ配列だけ離間している短い反復配列のアレイを含み、これはファージ又はプラスミドＤＮＡに由来することが多い。例えば、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる、以下の参考文献を参照されたい：Ｂａｒｒａｎｇｏｕ ｅｔ ａｌ．，「ＣＲＩＳＰＲ ｐｒｏｖｉｄｅｓ ａｃｑｕｉｒｅｄ ｒｅｓｉｓｔａｎｃｅ ａｇａｉｎｓｔ ｖｉｒｕｓｅｓ ｉｎ ｐｒｏｋａｒｙｏｔｅｓ」，Ｓｃｉｅｎｃｅ ３１５：１７０９－１７１２（２００７）；Ｂｏｌｏｔｉｎ ｅｔ ａｌ．，「Ｃｌｕｓｔｅｒｅｄ ｒｅｇｕｌａｒｌｙ ｉｎｔｅｒｓｐｅｒｓｅｄ ｓｈｏｒｔ ｐａｌｉｎｄｒｏｍｅ ｒｅｐｅａｔｓ（ＣＲＩＳＰＲ）ｈａｖｅ ｓｐａｃｅｒｓ ｏｆ ｅｘｔｒａｃｈｒｏｍｏｓｏｍａｌ ｏｒｉｇｉｎ」，Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ １５１：２５５１－１５６１（２００５）；及びＭｏｊｉｃａ ｅｔ ａｌ．，「Ｉｎｔｅｒｖｅｎｉｎｇ ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ ｒｅｇｕｌａｒｌｙ ｓｐａｃｅｄ ｐｒｏ

karyotic repeats derive from foreign genetic elements」，J Mol Evol．６０：１７４－８２（２００５）。したがって、ＣＲＩＳＰＲ配列は、過去の感染の適応的な遺伝性記録を提供し、ＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）－侵襲性ポリヌクレオチドを標的とする低分子ＲＮＡに転写され得る（例えば、上記で引用されたＭａｒｒａｆｆｉｎｉ ｅｔ ａｌ．を参照されたい）。ＣＲＩＳＰＲは、ＣＲＩＳＰＲに関連するタンパク質をコードするＣＲＩＳＰＲ関連（Ｃａｓ）遺伝子と関連することが多い。Ｃａｓタンパク質は、ｃｒＲＮＡによって標的化される侵入外来ポリヌクレオチドを破壊する機構を提供することができる。ＣＲＩＳＰＲは、Ｃａｓ遺伝子と共に、細菌及び古細菌において侵入外来ポリヌクレオチドに対する獲得耐性を提供する適応免疫系を提供する（例えば、上記で引用されたＢａｒｒａｎｇｏｕ ｅｔ ａｌ．を参照されたい）。

【０００５】

単一分子配列決定研究は、Ｃａｓ９を用いた直接メチル化配列決定のためのＣＲＩＳＰＲ標的化方法を示唆している；例えば、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる、Ｇｉｌｐａｔｒｉｃｋ ｅｔ ａｌ．，「Ｔａｒｇｅｔｅｄ ｎａｎｏｐｏｒｅ ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ ｗｉｔｈ Ｃａｓ９ ｆｏｒ ｓｔｕｄｉｅｓ ｏｆ ｍｅｔｈｙｌａｔｉｏｎ，ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ ｖａｒｉａｎｔｓ ａｎｄ ｍｕｔａｔｉｏｎｓ」，ｈｔｔｐｓ：／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１１０１／６０４１７３，１－１４（２０１９）を参照されたい。しかしながら、ＤＮＡメチル化以外にも、標的ＤＮＡ遺伝子座におけるエピジェネティック変化の高感度特性評価を可能にする方法に対する満たされていない必要性が存在する。クロマチンアクセシビリティ（ＡＴＡＣ－ｓｅｑによる）及びＤＮＡ遺伝子座に関連するタンパク質（ＣｈＩＰ－ｓｅｑによる）は、既存のハイブリッド捕捉技術で標的化することが困難なエピジェネティックエレメントの例である。一般に、ＤＮＡ配列を濃縮するアッセイは、エピジェネティックな特徴と関連する。しかしながら、これらの配列は先験的に知られていないので、目的の特定のゲノム領域（例えば、ゲノム遺伝子座）に対するエピジェネティックアッセイの出力を効率的に濃縮するために適切なハイブリッド捕捉オリゴヌクレオチドを設計することは困難である。

【０００６】

ヒストン遺伝子調節因子を同定するための標的遺伝子座特異的タンパク質単離のために不活性化Ｃａｓ（ｄＣａｓ９）を使用する従来の方法が提示されている：例えば、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる、Ｔｓｕｉ ｅｔ ａｌ．，「ｄＣａｓ９－ｔａｒｇｅｔｅｄ ｌｏｃｕｓ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｐｒｏｔｅｉｎ ｉｓｏｌａｔｉｏｎ ｍｅｔｈｏｄ ｉｄｅｎｔｉｆｉｅｓ ｈｉｓｔｏｎｅ ｇｅｎｅ ｒｅｇｕｌａｔｏｒｓ」，ＰＮＡＳ １１５（２）：Ｅ２７３４－Ｅ２７４１（２０１８）を参照されたい。そのような方法は、ｄＣａｓ９に基づく遺伝子座濃縮が、後に質量分析によってアッセイすることができるクロマチンを単離できることを実証した。しかしながら、この方法では、各実験において単一のクロマチン遺伝子座をアッセイすることしかできない。更に、この先行研究は、２つの別個の結果（すなわち、ＤＮＡ遺伝子座の配列、及びＤＮＡ関連タンパク質を同定するための質量分析）を提供する。遺伝子座標的エピジェネティック分析のための改善された方法が必要とされている。

【発明の概要】

【０００７】

Ｃａｓ－ｇＲＮＡリボ核タンパク質（ＲＮＰ）を使用するゲノムライブラリー調製、及び標的化エピジェネティックアッセイが本明細書に提供される。

【０００８】

本明細書のいくつかの例は、第１の種に由来する第１の二本鎖ポリヌクレオチドと第２の種に由来する第２の二本鎖ポリヌクレオチドとの混合物を処理する方法を提供する。方法は、第１の二本鎖ポリヌクレオチドの末端及び第２の二本鎖ポリヌクレオチドの任意の末端を保護することを含み得る。方法は、第１及び第２の二本鎖ポリヌクレオチドの末端を保護した後、第１の二本鎖ポリヌクレオチド内に自由末端を選択的に生成することを含

み得る。方法は、第１の二本鎖ポリヌクレオチドを自由末端から保護末端に向かって分解することを含み得る。

【０００９】

いくつかの例では、第１の二本鎖ポリヌクレオチド内に自由末端を選択的に生成することは、ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）を、第１の二本鎖ポリヌクレオチド内に存在し、かつ第２の二本鎖ポリヌクレオチド内に存在しない配列にハイブリダイズさせることと、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰで配列を切断することとを含む。いくつかの例では、配列は、哺乳動物特異的反復要素を含む。いくつかの例では、哺乳動物特異的反復要素は、ヒト特異的反復要素を含む。いくつかの例では、第２の種は、細菌、真菌、又はウイルスである。いくつかの例では、第１の二本鎖ヌクレオチドは、第１の種に由来する複数の染色体を含む。

【００１０】

いくつかの例では、第１及び第２の二本鎖ポリヌクレオチドの末端を保護することは、ヘアピンアダプターを末端にライゲーションすることを含む。いくつかの例では、第１及び第２の二本鎖ポリヌクレオチドの末端を保護することは、末端の５’脱リン酸化を含む。いくつかの例では、第１及び第２の二本鎖ポリヌクレオチドの末端を保護することは、末端に修飾塩基を付加することを含む。いくつかの例では、修飾塩基は、ホスホロチオエート結合を含む。いくつかの例では、修飾塩基は、ターミナルトランスフェラーゼを使用して付加される。

【００１１】

いくつかの例では、第１の二本鎖ポリヌクレオチドを分解することは、エキソヌクレアーゼを使用して行われる。

【００１２】

いくつかの例では、自由末端は３’末端を含む。いくつかの例では、第１の二本鎖ポリヌクレオチドを分解することは、エキソヌクレアーゼＩＩＩを使用して行われる。いくつかの例では、自由末端は５’末端を含む。いくつかの例では、第１の二本鎖ポリヌクレオチドを分解することは、ラムダエキソヌクレアーゼを使用して行われる。

【００１３】

いくつかの例では、方法は、続いて、増幅アダプターを混合物中の任意の残りの二本鎖ポリヌクレオチドの末端にライゲーションすることを更に含む。いくつかの例では、増幅アダプターは、固有の分子識別子（ＵＭＩ）を含む。いくつかの例では、方法は、続いて、二本鎖ポリヌクレオチドを増幅し、配列決定することを更に含む。

【００１４】

いくつかの例では、第１の二本鎖ポリヌクレオチドは二本鎖ＤＮＡを含む。いくつかの例では、第２の二本鎖ポリヌクレオチドは二本鎖ＤＮＡを含む。いくつかの例では、第２の二本鎖ポリヌクレオチドは環状ＤＮＡを含む。

【００１５】

いくつかの例では、ＣａｓはＣａｓ９を含む。

【００１６】

本明細書のいくつかの例は、組成物を提供する。組成物は、第１の種に由来する第１の二本鎖ポリヌクレオチドを含み得る。第１の二本鎖ポリヌクレオチドの末端は保護されていてもよい。組成物は、第２の種に由来する第２の二本鎖ポリヌクレオチドを含み得る。第２の二本鎖ポリヌクレオチドの任意の末端は保護されていてもよい。組成物はまた、第１の二本鎖ポリヌクレオチド内に存在し、かつ第２の二本鎖ポリヌクレオチド内に存在しない配列にハイブリダイズしたＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）を含み得る。Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰは、第１の二本鎖ポリヌクレオチド内に自由末端を選択的に生成するように配列を切断するためのものであり得る。

【００１７】

いくつかの例では、配列は、哺乳動物特異的反復要素を含む。いくつかの例では、哺乳

動物特異的反復要素は、ヒト反復要素を含む。いくつかの例では、第２の種は、細菌、真菌、又はウイルスである。

【００１８】

いくつかの例では、第１及び第２の二本鎖ポリヌクレオチドの末端は、ヘアピンアダプターを使用して保護されている。いくつかの例では、第１及び第２の二本鎖ポリヌクレオチドの末端は、５’脱リン酸化を使用して保護されている。いくつかの例では、第１及び第２の二本鎖ポリヌクレオチドの末端は、修飾塩基を使用して保護されている。いくつかの例では、修飾塩基は、ホスホロチオエート結合を含む。

【００１９】

いくつかの例では、自由末端は３’末端を含む。いくつかの例では、自由末端は５’末端を含む。

【００２０】

いくつかの例では、第１の二本鎖ポリヌクレオチドは二本鎖ＤＮＡを含む。いくつかの例では、第２の二本鎖ポリヌクレオチドは二本鎖ＤＮＡを含む。いくつかの例では、第２の二本鎖ポリヌクレオチドは環状ＤＮＡを含む。

【００２１】

いくつかの例では、ＣａｓはＣａｓ９を含む。

【００２２】

本明細書のいくつかの例は、第１の種に由来する第１の二本鎖ポリヌクレオチドと第２の種に由来する第２の二本鎖ポリヌクレオチドとの混合物を処理する方法を提供する。方法は、混合物中の第１の二本鎖ポリヌクレオチドを選択的に一本鎖にすることを含み得る。方法は、続いて、増幅プライマーを混合物中の任意の残りの二本鎖ポリヌクレオチドに選択的にライゲーションすることを含み得る。方法は、続いて、増幅プライマーがライゲーションされた混合物中の任意の二本鎖ポリヌクレオチドを増幅することを含み得る。

【００２３】

本明細書のいくつかの例は、組成物を提供する。組成物は、第１の種から、実質的に一本鎖ポリヌクレオチドのみを含み得る。組成物は、第２の種から、実質的に二本鎖ポリヌクレオチドのみを含み得る。組成物は、第２の二本鎖ポリヌクレオチドの末端にライゲーションされ、かつ第１の二本鎖ポリヌクレオチドのいずれの末端にも実質的にライゲーションされない増幅プライマーを含み得る。

【００２４】

本明細書のいくつかの例は、全ゲノム（ＷＧ）の断片を生成する方法を提供する。方法は、ＷＧの第１のサンプル内で、ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）の第１のセットを、おおよそ第１の塩基対数だけ互いに離間しているＷＧ内の第１の配列にハイブリダイズさせることを含み得る。方法は、ＷＧの第１のサンプル内で、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第２のセットを、おおよそ第２の塩基対数だけ互いに離間しているＷＧ内の第２の配列にハイブリダイズさせることを更に含み得る。方法は、ＷＧの第１のサンプル内で、第１のサンプル内のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１及び第２のセットで第１及び第２の配列をそれぞれ切断して、各々が互いにおおよそ同じ数の塩基対を有するＷＧ断片の第１のセットを生成することを更に含み得る。

【００２５】

いくつかの例では、第１の塩基対数は、第２の塩基対数とおおよそ同じである。いくつかの例では、第１の塩基対数は約１００～約２０００であり、第２の塩基対数は約１００～約２０００である。いくつかの例では、第１の塩基対数は、約５００～約７００であり、第２の塩基対数は、約５００～約７００である。いくつかの例では、ＷＧ断片の第１のセットのＷＧ断片内の塩基対数は、約２０％未満だけ異なる。

【００２６】

いくつかの例では、方法は、ＷＧの第２のサンプル内で、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１のセットをＷＧ内の第１の配列にハイブリダイズさせることを更に含む。方法は、Ｗ

Ｇの第２のサンプル内で、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第２のセットをＷＧ内の第２の配列にハイブリダイズさせることを更に含み得る。方法は、ＷＧの第２のサンプル内で、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第３のセットを、おおよそ第３の塩基対数だけ互いに離間しているＷＧ内の第３の配列にハイブリダイズさせることを更に含み得る。方法は、ＷＧの第２のサンプル内で、第１、第２、及び第３の配列をＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１、第２、及び第３のセットでそれぞれ切断して、各々が互いにおおよそ同じ数の塩基対を有するＷＧ断片の第２のセットを生成することを更に含み得る。

【００２７】

いくつかの例では、第３の塩基対数は、第１の塩基対数と異なる。いくつかの例では、第３の塩基対数は、第２の塩基対数と異なる。いくつかの例では、第３の塩基対数は、約１００～約２０００である。いくつかの例では、第３の塩基対数は、約２００～約４００である。いくつかの例では、ＷＧ断片の第２のセットのＷＧ断片内のおおよその塩基対数は、ＷＧ断片の第１のセットのＷＧ断片内のおおよその塩基対数と異なる。いくつかの例では、ＷＧ断片の第２のセットのＷＧ断片内の塩基対数は、約２０％未満だけ異なる。

【００２８】

いくつかの例では、方法は、ＷＧの第３のサンプル内で、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１、第２、又は第３のセットを、ＷＧ内の第１、第２、又は第３の配列にそれぞれハイブリダイズさせることを更に含む。方法は、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１、第２、又は第３のセットで第１、第２、又は第３の配列をそれぞれ切断して、各々が互いにおおよそ同じ数の塩基対を有するＷＧ断片の第３のセットを生成することを更に含み得る。

【００２９】

いくつかの例では、ＷＧ断片の第３のセットのＷＧ断片内のおおよその塩基対数は、ＷＧ断片の第１のセットのＷＧ断片内のおおよその塩基対数と異なる。いくつかの例では、ＷＧ断片の第３のセットのＷＧ断片内のおおよその塩基対数は、ＷＧ断片の第２のセットのＷＧ断片内のおおよその塩基対数と異なる。いくつかの例では、ＷＧ断片の第３のセットのＷＧ断片内の塩基対数は、約２０％未満だけ異なる。

【００３０】

いくつかの例では、方法は、増幅アダプターをＷＧ断片の第３のセットのＷＧ断片の末端にライゲーションすることを更に含む。方法は、増幅アダプターがライゲーションされたＷＧ断片の第３のセットのＷＧ断片のアンプリコンを生成することを更に含み得る。方法は、ＷＧ断片の第３のセットのＷＧ断片のアンプリコンを配列決定することを更に含み得る。いくつかの例では、ＷＧ断片の第２及び第３のセットのＷＧ断片のアンプリコンは、配列決定のために一緒に混合される。いくつかの例では、ＷＧ断片の第１及び第３のセットのＷＧ断片のアンプリコンは、増幅及び配列決定のために一緒に混合される。

【００３１】

いくつかの例では、ＷＧ断片の第３のセットのＷＧ断片内の塩基対数は、約１００～約１０００である。いくつかの例では、ＷＧ断片の第３のセットのＷＧ断片内の塩基対数は、約５００～約７００である。

【００３２】

いくつかの例では、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第３のセットは、少なくとも約１，０００，０００個の異なるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを含む。

【００３３】

いくつかの例では、方法は、増幅アダプターをＷＧ断片の第２のセットのＷＧ断片の末端にライゲーションすることを更に含む。方法は、増幅アダプターがライゲーションされたＷＧ断片の第２のセットのＷＧ断片のアンプリコンを生成することを更に含み得る。方法は、ＷＧ断片の第２のセットのＷＧ断片のアンプリコンを配列決定することを更に含み得る。

【００３４】

いくつかの例では、ＷＧ断片の第１及び第２のセットのＷＧ断片のアンプリコンは、増幅及び配列決定のために一緒に混合される。

【００３５】
いくつかの例では、ＷＧ断片の第２のセットのＷＧ断片内の塩基対数は、約１００～約１０００である。いくつかの例では、ＷＧ断片の第２のセットのＷＧ断片内の塩基対数は、約１００～約２００である。
【００３６】
いくつかの例では、方法は、増幅アダプターをＷＧ断片の第１のセットのＷＧ断片の末端にライゲーションすることを更に含む。方法は、増幅アダプターがライゲーションされたＷＧ断片の第１のセットのＷＧ断片のアンプリコンを生成することを更に含み得る。方法は、ＷＧ断片の第１のセットのＷＧ断片のアンプリコンを配列決定することを更に含み得る。
【００３７】
いくつかの例では、増幅アダプターは、固有の分子識別子（ＵＭＩ）を含む。
【００３８】
いくつかの例では、ＷＧ断片の第１のセットのＷＧ断片内の塩基対数は、約１００～約１０００である。いくつかの例では、ＷＧ断片の第１のセットのＷＧ断片内の塩基対数は、約２００～約４００である。
【００３９】
いくつかの例では、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１のセットは、少なくとも約１，０００，０００個の異なるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを含む。いくつかの例では、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第２のセットは、少なくとも約１，０００，０００個の異なるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを含む。
【００４０】
いくつかの例では、ＷＧは二本鎖ＤＮＡを含む。いくつかの例では、ＣａｓはＣａｓ９を含む。
【００４１】
本明細書のいくつかの例は、組成物を提供する。組成物は、全ゲノム（ＷＧ）のサンプルを含み得る。組成物は、おおよそ第１の塩基対数だけ互いに離間しているＷＧ内の第１の配列にハイブリダイズされたＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）の第１のセットを含み得る。組成物は、おおよそ第２の塩基対数だけ互いに離間しているＷＧ内の第２の配列にハイブリダイズされたＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第２のセットを含み得る。Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１及び第２のセットはそれぞれ、サンプル内の第１及び第２の配列を切断して、各々が互いにおおよそ同じ数の塩基対を有するＷＧ断片を生成するためのものであり得る。
【００４２】
いくつかの例では、第１の塩基対数は、第２の塩基対数とおおよそ同じである。いくつかの例では、第１の塩基対数は約１００～約２０００であり、第２の塩基対数は約１００～約２０００である。いくつかの例では、第１の塩基対数は、約５００～約７００であり、第２の塩基対数は、約５００～約７００である。
【００４３】
いくつかの例では、ＷＧ断片内の塩基対数は、約２０％未満だけ変動する。いくつかの例では、ＷＧ断片内の塩基対数は、約１００塩基対～約１０００塩基対である。いくつかの例では、ＷＧ断片内の塩基対数は、約２００塩基対～約４００塩基対である。
【００４４】
いくつかの例では、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１のセットは、少なくとも約１，０００，０００個の異なるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを含む。いくつかの例では、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第２のセットは、少なくとも約１，０００，０００個の異なるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを含む。
【００４５】
いくつかの例では、ＷＧは二本鎖ＤＮＡを含む。いくつかの例では、ＣａｓはＣａｓ９を含む。

【００４６】
本明細書のいくつかの例は、組成物を提供する。組成物は、全ゲノム（ＷＧ）のサンプルを含み得る。組成物は、おおよそ第１の塩基対数だけ互いに離間しているＷＧ内の第１の配列にハイブリダイズされたＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）の第１のセットを含み得る。組成物は、おおよそ第２の塩基対数だけ互いに離間しているＷＧ内の第２の配列にハイブリダイズされたＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第２のセットを含み得る。組成物は、おおよそ第３の塩基対数だけ互いに離間しているＷＧ内の第３の配列にハイブリダイズされたＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第３のセットを含み得る。Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１、第２、及び第３のセットはそれぞれ、サンプル内の第１、第２、及び第３の配列を切断して、各々が互いにおおよそ同じ数の塩基対を有するＷＧ断片を生成するためのものであり得る。

【００４７】
いくつかの例では、第１の塩基対数は、第２の塩基対数とおおよそ同じである。いくつかの例では、第１の塩基対数は、約１００～約２０００であり、第２の塩基対数は、約１００～約２０００であり、第３の塩基対数は、約１００～約２０００である。いくつかの例では、第１の塩基対数は、約５００～約７００であり、第２の塩基対数は、約５００～約７００であり、第３の塩基対数は、約２００～約４００である。いくつかの例では、第３の塩基対数は、第１の塩基対数と異なる。いくつかの例では、第３の塩基対数は、第２の塩基対数と異なる。

【００４８】
いくつかの例では、ＷＧ断片内の塩基対数は、約２０％未満だけ変動する。いくつかの例では、ＷＧ断片内の塩基対数は、約１００～約１０００である。いくつかの例では、ＷＧ断片内の塩基対数は、約１００～約２００である。

【００４９】
いくつかの例では、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１のセットは、少なくとも約１，０００，０００個の異なるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを含む。いくつかの例では、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第２のセットは、少なくとも約１，０００，０００個の異なるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを含む。いくつかの例では、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第３のセットは、少なくとも約１，０００，０００個の異なるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを含む。

【００５０】
いくつかの例では、ＷＧは二本鎖ＤＮＡを含む。いくつかの例では、ＣａｓはＣａｓ９を含む。

【００５１】
本明細書のいくつかの例は、全ゲノム（ＷＧ）の断片を生成する方法を提供する。方法は、ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）のセットを、おおよそ塩基対数だけ互いに離間しているＷＧ内の配列にハイブリダイズさせることを含み得る。方法は、配列をＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのセットでそれぞれ切断して、各々が互いにおおよそ同じ数の塩基対を有するＷＧ断片のセットを生成することを含み得る。

【００５２】
いくつかの例では、塩基対数は、約１００～約１０００である。いくつかの例では、塩基対数は、約５００～約７００、又は約２００～約４００、又は約１００～約２００である。

【００５３】
いくつかの例では、ＷＧ断片のセットのＷＧ断片内の塩基対数は、約２０％未満だけ異なる。いくつかの例では、ＷＧ断片のセットのＷＧ断片内の塩基対数は、約１００～約１０００である。いくつかの例では、ＷＧ断片のセットのＷＧ断片内の塩基対数は、約１００～約２００、又は約２００～約４００、又は約５００～約７００である。

【００５４】
いくつかの例では、方法は、増幅アダプターをＷＧ断片のセットのＷＧ断片の末端にラ

イゲーションすることを更に含む。方法は、増幅アダプターがライゲーションされたＷＧ断片のセットのＷＧ断片のアンプリコンを生成することを更に含み得る。方法は、ＷＧ断片のセットのＷＧ断片のアンプリコンを配列決定することを更に含み得る。

【００５５】

いくつかの例では、増幅アダプターは、固有の分子識別子（ＵＭＩ）を含む。

【００５６】

いくつかの例では、ＷＧは二本鎖ＤＮＡを含む。いくつかの例では、ＣａｓはＣａｓ９を含む。

【００５７】

本明細書のいくつかの例は、組成物を提供する。組成物は、全ゲノム（ＷＧ）のサンプルを含み得る。組成物は、おおよそ塩基対数だけ互いに離間しているＷＧ内の配列にハイブリダイズされたＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）のセットを含み得る。Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのセットはそれぞれ、サンプル内の配列を切断して、各々が互いにおおよそ同じ数の塩基対を有するＷＧ断片を生成するためのものであり得る。

【００５８】

いくつかの例では、塩基対数は、約１００～約１０００である。いくつかの例では、塩基対数は、約５００～約７００、又は約２００～約４００、又は約１００～約２００である。

【００５９】

いくつかの例では、ＷＧ断片のセットのＷＧ断片内の塩基対数は、約２０％未満だけ異なる。いくつかの例では、ＷＧ断片のセットのＷＧ断片内の塩基対数は、約１００～約１０００である。いくつかの例では、ＷＧ断片のセットのＷＧ断片内の塩基対数は、約１００～約２００、又は約２００～約４００、又は約５００～約７００である。

【００６０】

いくつかの例では、ＷＧは二本鎖ＤＮＡを含む。いくつかの例では、ＣａｓはＣａｓ９を含む。

【００６１】

本明細書のいくつかの例は、組成物を提供する。組成物は、各々が互いにおおよそ同じ数の塩基対を有する少なくとも約１，０００，０００個のＷＧ断片のセットを含み得る。

【００６２】

いくつかの例では、塩基対数は、約１００～約２００である。いくつかの例では、塩基対数は、約２００～約４００である。いくつかの例では、塩基対数は、約５００～約７００である。

【００６３】

いくつかの例では、ＷＧは二本鎖ＤＮＡを含む。

【００６４】

いくつかの例では、ＷＧ断片のセットのＷＧ断片内の塩基対数は、約２０％未満だけ異なる。いくつかの例では、ＷＧ断片のセットのＷＧ断片内の塩基対数は、約１０％未満だけ異なる。いくつかの例では、ＷＧ断片のセットのＷＧ断片内の塩基対数は、約５％未満だけ異なる。

【００６５】

そのような組成物は、上記のような方法に従って調製され得る。

【００６６】

本明細書のいくつかの例は、配列を有する標的ポリヌクレオチドの分子を切断する方法を提供する。方法は、流体中で、標的ポリヌクレオチドの第１及び第２の分子を、複数の第１及び第２のＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）と接触させることを含み得る。方法は、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つを第１の分子中の第１の部分配列にハイブリダイズさせることを含み得る。方法は、第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つを第２の分子中の第２の部分配

列にハイブリダイズさせることを含み得る。第２の部分配列は、第１の部分配列と部分的にのみ重複してもよい。方法は、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つによって、第１の分子中の第２の部分配列への第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのいずれかのハイブリダイゼーションを阻害することを含み得る。方法は、第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つによって、第２の分子中の第１の部分配列への第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのいずれかのハイブリダイゼーションを阻害することを含み得る。方法は、第１の部分配列において第１の分子を切断することを含み得る。方法は、第２の部分配列において第２の分子を切断することを含み得る。

【００６７】

いくつかの例では、第１の分子における切断部は、標的ポリヌクレオチドの配列中で、第２の分子における切断部とは異なる位置にある。いくつかの例では、第１の分子における切断部は、標的ポリヌクレオチドの配列中で、約２塩基対～約１０塩基対だけ第２の分子における切断部からオフセットしている。

【００６８】

いくつかの例では、第１の分子は、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つを使用して切断され、第２の分子は、第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つを使用して切断される。

【００６９】

いくつかの例では、標的ポリヌクレオチドは二本鎖ＤＮＡを含む。いくつかの例では、Ｃａｓは、Ｃａｓ９又はｄＣａｓ９を含む。

【００７０】

いくつかの例では、方法は、流体中で、標的ポリヌクレオチドの第１及び第２の分子を複数の第３及び第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰと接触させることを更に含む。方法は、第３のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つを第１の分子中の第３の部分配列にハイブリダイズさせることを更に含み得る。方法は、第３のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つによって、第１の分子中の第４の部分配列への第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのいずれかのハイブリダイゼーションを阻害することを更に含み得る。第４の部分配列は、第３の部分配列と部分的にのみ重複してもよい。方法は、第３のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つを使用して第３の部分配列において第１の分子を切断して、第１の断片を生成することを含み得る。

【００７１】

いくつかの例では、方法は、流体中で、標的ポリヌクレオチドの第１及び第２の分子を複数の第３及び第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰと接触させることを更に含む。方法は、第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つを第１の分子中の第４の部分配列にハイブリダイズさせることを含み得る。方法は、第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つによって、第１の分子中の第３の部分配列への第３のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのいずれかのハイブリダイゼーションを阻害することを含み得る。方法は、第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つを使用して第４の部分配列において第１の分子を切断して、第１の断片を生成することを含み得る。

【００７２】

いくつかの例では、方法は、第３のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つを第２の分子中の第３の部分配列にハイブリダイズさせることを更に含む。方法は、第３のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つによって、第２の分子中の第４の部分配列への第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのいずれかのハイブリダイゼーションを阻害することを更に含み得る。方法は、第３のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つを使用して第３の部分配列において第２の分子を切断して、第２の断片を生成することを更に含み得る。

【００７３】

いくつかの例では、方法は、第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つを第２の分子中の第４の部分配列にハイブリダイズさせることを更に含む。方法は、第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つによって、第２の分子中の第３の部分配列への第３のＣａ

ｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのいずれかのハイブリダイゼーションを阻害することを更に含み得る。方法は、第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つを使用して第４の部分配列で第２の分子を切断して、第２の断片を生成することを更に含み得る。

【００７４】

いくつかの例では、方法は、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つ及び第３又は第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つが第１の分子にハイブリダイズしている間に、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つと第３又は第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つとの間にない第１の分子の任意の部分を分解することを更に含む。

【００７５】

いくつかの例では、方法は、第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つ及び第３又は第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つが第２の分子にハイブリダイズしている間に、第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つと第３又は第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つとの間にない第２の分子の任意の部分を分解することを更に含む。いくつかの例では、分解は、エキソヌクレアーゼＩＩＩ又はエキソヌクレアーゼＶＩＩを使用して行われる。

【００７６】

いくつかの例では、第１の分子は、第３又は第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つを使用して切断され、第２の分子は、第３又は第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つを使用して切断される。

【００７７】

いくつかの例では、第１及び第２の断片は、互いに異なる塩基対数を含む。いくつかの例では、第１の断片は、約１００塩基対～約１０００塩基対の長さを有し、第２の断片は、約１００塩基対～約１０００塩基対の長さを有する。いくつかの例では、第１の断片は、約５００塩基対～約７００塩基対の長さを有し、第２の断片は、約５００塩基対～約７００塩基対の長さを有する。いくつかの例では、第１の断片は、約２００塩基対～約４００塩基対の長さを有し、第２の断片は、約２００塩基対～約４００塩基対の長さを有する。いくつかの例では、第１の断片は、約１００塩基対～約２００塩基対の長さを有し、第２の断片は、約１００塩基対～約２００塩基対の長さを有する。

【００７８】

本明細書のいくつかの例は、標的ポリヌクレオチドを配列決定する方法を提供する。方法は、上記の方法を使用して、標的ポリヌクレオチドの第１及び第２の断片を生成することを含み得る。方法は、増幅アダプターを第１及び第２の断片の末端にライゲーションすることを更に含み得る。方法は、増幅アダプターがライゲーションされた第１及び第２の断片のアンプリコンをそれぞれ生成することを更に含み得る。方法は、第１及び第２の断片のアンプリコンを配列決定することを更に含み得る。

【００７９】

いくつかの例では、方法は、第１、第２、第３、及び第４の部分配列を使用することと、第１の断片のアンプリコンを第１の分子に由来するものとして同定することと、第２の断片のアンプリコンを第２の分子に由来するものとして同定することとを更に含む。

【００８０】

いくつかの例では、方法は、アンプリコンを生成する前に、固有の分子識別子（ＵＭＩ）を第１及び第２の断片の末端にライゲーションすることを更に含む。方法は、ＵＭＩを使用することと、第１の断片のアンプリコンを第１の分子に由来するものとして同定することと、第２の断片のアンプリコンを第２の分子に由来するものとして同定することとを更に含み得る。いくつかの例では、ＵＭＩは、増幅アダプターと同じ操作で、第１及び第２の断片の末端にカップリングされ、ライゲーションされる。

【００８１】

本明細書のいくつかの例は、組成物を提供する。組成物は、配列を有する標的ポリヌクレオチドの第１及び第２の分子を含み得る。組成物は、複数の第１及び第２のＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）を含み得

る。第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つは、第１の分子中の第１の部分配列にハイブリダイズしてもよく、第１の分子中の第２の部分配列への第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのいずれかのハイブリダイゼーションを阻害してもよい。第２の部分配列は、第１の部分配列と部分的にのみ重複してもよい。第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つは、第２の分子中の第２の部分配列にハイブリダイズしてもよく、第２の分子中の第１の部分配列への第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのいずれかのハイブリダイゼーションを阻害してもよい。

【００８２】

いくつかの例では、第１の分子における切断部は、標的ポリヌクレオチドの配列中で、第２の分子における切断部とは異なる位置にある。いくつかの例では、第１の分子における切断部は、標的ポリヌクレオチドの配列中で、約２塩基対～約１０塩基対だけ第２の分子における切断部からオフセットしている。

【００８３】

いくつかの例では、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つは、第１の分子を切断するためのものであり、第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つは、第２の分子を切断するためのものである。

【００８４】

いくつかの例では、標的ポリヌクレオチドは二本鎖ＤＮＡを含む。いくつかの例では、Ｃａｓは、Ｃａｓ９又はｄＣａｓ９を含む。

【００８５】

いくつかの例では、組成物は、複数の第３及び第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを更に含む。第３のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つは、第１の分子中の第３の部分配列にハイブリダイズしてもよく、第１の分子中の第４の部分配列への第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのいずれかのハイブリダイゼーションを阻害してもよく、第３の部分配列において第１の分子を切断して第１の断片を生成するためのものであってもよい。第４の部分配列は、第３の部分配列と部分的にのみ重複してもよい。

【００８６】

いくつかの例では、組成物は、複数の第３及び第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを更に含む。第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つは、第１の分子中の第４の部分配列にハイブリダイズしてもよく、第１の分子中の第３の部分配列への第３のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのいずれかのハイブリダイゼーションを阻害してもよく、第４の部分配列において第１の分子を切断して第１の断片を生成するためのものであってもよい。第４の部分配列は、第３の部分配列と部分的にのみ重複してもよい。

【００８７】

いくつかの例では、第３のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つは、第２の分子中の第３の部分配列にハイブリダイズしてもよく、第２の分子中の第４の部分配列への第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのいずれかのハイブリダイゼーションを阻害してもよく、第３の部分配列において第２の分子を切断して第２の断片を生成するためのものであってもよい。

【００８８】

いくつかの例では、第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つは、第２の分子中の第４の部分配列にハイブリダイズしてもよく、第２の分子中の第３の部分配列への第３のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのいずれかのハイブリダイゼーションを阻害してもよく、第４の部分配列において第２の分子を切断して第２の断片を生成するためのものであってもよい。

【００８９】

いくつかの例では、組成物は、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つと第３又は第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つとの間にない第１の分子の任意の部分を分解するためのエキソヌクレアーゼを更に含む。

【００９０】

いくつかの例では、組成物は、第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つと第３又は第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つとの間にない第２の分子の任意の部分を分解するためのエキソヌクレアーゼを更に含む。

【００９１】

いくつかの例では、エキソヌクレアーゼは、エキソヌクレアーゼＩＩＩ又はエキソヌクレアーゼＶＩＩを含む。

【００９２】

いくつかの例では、第３又は第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つは、第１の分子を切断するためのものであり、第３又は第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つは、第２の分子を切断するためのものである。

【００９３】

いくつかの例では、第１及び第２の断片は、互いに異なる塩基対数を含む。いくつかの例では、第１の断片は、約１００塩基対～約１０００塩基対の長さを有し、第２の断片は、約１００塩基対～約１０００塩基対の長さを有する。いくつかの例では、第１の断片は、約５００塩基対～約７００塩基対の長さを有し、第２の断片は、約５００塩基対～約７００塩基対の長さを有する。いくつかの例では、第１の断片は、約２００塩基対～約４００塩基対の長さを有し、第２の断片は、約２００塩基対～約４００塩基対の長さを有する。いくつかの例では、第１の断片は、約１００塩基対～約２００塩基対の長さを有し、第２の断片は、約１００塩基対～約２００塩基対の長さを有する。

【００９４】

本明細書のいくつかの例は、組成物を提供する。組成物は、配列を有する標的ポリヌクレオチドの第１及び第２の分子を含み得る。第１の分子は、第１の部分配列に第１の末端を有し得る。第２の分子は、第２の部分配列に第１の末端を有し得る。第１の部分配列は、第２の部分配列と部分的にのみ重複してもよい。

【００９５】

いくつかの例では、第１の分子の第１の末端は、標的ポリヌクレオチドの配列中で、第２の分子の第１の末端とは異なる位置にある。いくつかの例では、第１の分子の第１の末端は、標的ポリヌクレオチドの配列中で、約２塩基対～約１０塩基対だけ第２の分子の第１の末端からオフセットしている。

【００９６】

いくつかの例では、第１の分子は、第３の部分配列に第２の末端を更に有する。第２の分子は更に、第３の部分配列又は第４の部分配列に第２の末端を有し得る。第３の部分配列は、第４の部分配列と部分的にのみ重複してもよい。いくつかの例では、第１の分子の第２の末端は、標的ポリヌクレオチドの配列中で、第２の分子の第２の末端とは異なる位置にある。いくつかの例では、第１の分子の第２の末端は、標的ポリヌクレオチドの配列中で、約２塩基対～約１０塩基対だけ第２の分子の第２の末端からオフセットしている。

【００９７】

いくつかの例では、標的ポリヌクレオチドは二本鎖ＤＮＡを含む。

【００９８】

いくつかの例では、第１及び第２の分子は、互いに異なる塩基対数を含む。いくつかの例では、第１の分子は、約１００塩基対～約１０００塩基対の長さを有し、第２の分子は、約１００塩基対～約１０００塩基対の長さを有する。いくつかの例では、第１の断片は、約５００塩基対～約７００塩基対の長さを有し、第２の断片は、約５００塩基対～約７００塩基対の長さを有する。いくつかの例では、第１の断片は、約２００塩基対～約４００塩基対の長さを有し、第２の断片は、約２００塩基対～約４００塩基対の長さを有する。いくつかの例では、第１の断片は、約１００塩基対～約２００塩基対の長さを有し、第２の断片は、約１００塩基対～約２００塩基対の長さを有する。

【００９９】

本明細書のいくつかの例は、配列を有する標的ポリヌクレオチドの断片を生成する方法を提供する。方法は、流体中で、標的ポリヌクレオチドを第１及び第２の融合タンパク質

と接触させることを含み得る。第１の融合タンパク質は、第１の増幅アダプターがカップリングされた第１のトランスポザーゼにカップリングした第１のＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）を含み得る。第２の融合タンパク質は、第２の増幅アダプターがカップリングされた第２のトランスポザーゼにカップリングした第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを含み得る。方法は、第１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの活性を促進し、第１及び第２のトランスポザーゼの活性を阻害しながら、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを標的ポリヌクレオチド中の第１の部分配列にハイブリダイズさせ、第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを標的ポリヌクレオチド中の第２の部分配列にハイブリダイズさせることを含み得る。次いで、方法は、第１及び第２のトランスポザーゼの活性を促進しながら、第１のトランスポザーゼを使用して第１の増幅アダプターを標的ポリヌクレオチド中の第１の位置に付加することと、第２のトランスポザーゼを使用して第２の増幅アダプターを標的ポリヌクレオチド中の第２の位置に付加することとを含み得る。

【０１００】

いくつかの例では、流体の第１の条件を使用して、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの活性が促進され、トランスポザーゼの活性が阻害される。いくつかの例では、流体の第１の条件は、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの活性のために十分な量のカルシウムイオン、マンガンイオン、又はカルシウムイオンとマンガンイオンとの両方の存在を含む。いくつかの例では、流体の第１の条件は、トランスポザーゼの活性のために十分な量のマグネシウムイオンが存在しないことを含む。

【０１０１】

いくつかの例では、流体の第２の条件を使用して、トランスポザーゼの活性が促進される。いくつかの例では、流体の第２の条件は、トランスポザーゼの活性のために十分な量のマグネシウムイオンの存在を含む。

【０１０２】

いくつかの例では、方法は、第１の融合タンパク質のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰが第１の部分配列にハイブリダイズし、第２の融合タンパク質のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰが第２の部分配列にハイブリダイズしている間に、第１の融合タンパク質のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰと第２の融合タンパク質のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰとの間にない標的ポリヌクレオチドの任意の部分を分解することを更に含む。いくつかの例では、分解は、エキソヌクレアーゼＩＩＩ又はエキソヌクレアーゼＶＩＩを使用して行われる。

【０１０３】

いくつかの例では、方法は、標的ポリヌクレオチドを第１及び第２の融合タンパク質から遊離させて、一方の末端に第１の増幅アダプターを有し、他方の末端に第２の増幅アダプターを有する標的ポリヌクレオチドの断片を提供することを更に含む。いくつかの例では、遊離は、プロテイナーゼＫ、ドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）、又はプロテイナーゼＫとＳＤＳとの両方を使用して行われる。

【０１０４】

いくつかの例では、断片は、約１００塩基対～約１０００塩基対の長さを有する。いくつかの例では、断片は、約５００塩基対～約７００塩基対の長さを有する。いくつかの例では、断片は、約２００塩基対～約４００塩基対の長さを有する。いくつかの例では、断片は、約１００塩基対～約２００塩基対の長さを有する。

【０１０５】

いくつかの例では、ＣａｓはｄＣａｓ９を含む。いくつかの例では、トランスポザーゼはＴｎ５を含む。

【０１０６】

いくつかの例では、第１の増幅アダプターはＰ５アダプターを含み、第２の増幅アダプターはＰ７アダプターを含む。

【０１０７】

いくつかの例では、第１の増幅アダプターは第１の固有の分子識別子（ＵＭＩ）を含み

、第２の増幅アダプターは第２のＵＭＩを含む。
【０１０８】
いくつかの例では、第１の位置は第１の部分配列の約１０塩基以内であり、第２の位置は第２の部分配列の約１０塩基以内である。
【０１０９】
いくつかの例では、第１及び第２の融合タンパク質の各々において、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰは、共有結合を介してトランスポザーゼにカップリングされる。
【０１１０】
いくつかの例では、第１及び第２の融合タンパク質の各々において、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰは、非共有結合を介してトランスポザーゼにカップリングされる。いくつかの例では、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰは、抗体に共有結合的にカップリングされ、トランスポザーゼは、抗体が非共有結合的にカップリングされる抗原に共有結合的にカップリングされるか、又はＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰは、抗原に共有結合的にカップリングされ、トランスポザーゼは、抗原が非共有結合的にカップリングされる抗体に共有結合的にカップリングされる。いくつかの例では、Ｃａｓ－ｇＲＮＡは、ｇＲＮＡと第１又は第２の増幅アダプターとの間のハイブリダイゼーションを介してトランスポザーゼに非共有結合的にカップリングされる。いくつかの例では、Ｃａｓ－ｇＲＮＡは、ｇＲＮＡとトランスポザーゼ内のオリゴヌクレオチドとの間のハイブリダイゼーションを介してトランスポザーゼに非共有結合的にカップリングされる。
【０１１１】
いくつかの例では、第１の融合タンパク質において、第１の部分配列にハイブリダイズするｇＲＮＡの一部は、約１５～約１８ヌクレオチドの長さを有し、第２の融合タンパク質において、第２の部分配列にハイブリダイズするｇＲＮＡの一部は、約１５～約１８ヌクレオチドの長さを有する。
【０１１２】
いくつかの例では、第１及び第２の融合タンパク質は、標的ポリヌクレオチドに対しておおよそ化学量論比である。
【０１１３】
いくつかの例では、標的ポリヌクレオチドは二本鎖ＤＮＡを含む。
【０１１４】
いくつかの例では、第１のタグは第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰにカップリングされ、第２のタグは第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰにカップリングされる。いくつかの例では、方法は、第１のタグを基材にカップリングした第１のタグパートナーにカップリングすることと、第２のタグを基材にカップリングした第２のタグパートナーにカップリングすることとを含む。いくつかの例では、カップリングは、第１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰがそれぞれ第１及び第２の部分配列にハイブリダイズされた後に行われる。いくつかの例では、第１及び第２のタグがそれぞれ第１及び第２のタグパートナーに付加された後に、第１及び増幅アダプターが付加される。
【０１１５】
いくつかの例では、第１及び第２のタグは、ビオチンを含む。いくつかの例では、第１及び第２のタグパートナーは、ストレプトアビジンを含む。いくつかの例では、基材は、ビーズを含む。いくつかの例では、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰは、Ｃａｓ１２ｋを含む。いくつかの例では、トランスポザーゼは、Ｔｎ５又はＴｎ７様トランスポザーゼを含む。
【０１１６】
本明細書のいくつかの例は、標的ポリヌクレオチドを配列決定する方法を提供する。方法は、前述の方法のうちの１つを使用して標的ポリヌクレオチドの断片を生成することと、断片のアンプリコンを生成することと、アンプリコンを配列決定することとを含み得る。
【０１１７】
本明細書のいくつかの例は、組成物を提供する。組成物は、配列を有する標的ポリヌク

レオチドを含み得る。組成物は、第１の増幅アダプターがカップリングされた第１のトランスポザーゼにカップリングした第１のＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）を含む第１の融合タンパク質を含み得る。第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰは、標的ポリヌクレオチド中の第１の部分配列にハイブリダイズしてもよい。

【０１１８】

いくつかの例では、組成物は、第２の増幅アダプターがカップリングされた第２のトランスポザーゼにカップリングした第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを含む第２の融合タンパク質を含み得る。第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰは、標的ポリヌクレオチド中の第２の部分配列にハイブリダイズしてもよい。

【０１１９】

いくつかの例では、組成物は、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの活性を促進し、第１のトランスポザーゼの活性を阻害する条件を有する流体を更に含む。いくつかの例では、流体の条件は、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの活性のために十分な量のカルシウムイオン、マンガンイオン、又はカルシウムイオンとマンガンイオンとの両方の存在を含む。いくつかの例では、流体の条件は、第１のトランスポザーゼの活性のために十分な量のマグネシウムイオンが存在しないことを含む。

【０１２０】

いくつかの例では、組成物は、第１のトランスポザーゼの活性を促進する条件を有する流体を更に含み、第１のトランスポザーゼが第１の増幅アダプターを標的ポリヌクレオチド中の第１の位置に付加する。いくつかの例では、流体の条件は、第１トランスポザーゼの活性のために十分な量のマグネシウムイオンの存在を含む。

【０１２１】

いくつかの例では、組成物は、標的ポリヌクレオチドを第１及び第２の融合タンパク質から遊離させて、一方の末端に第１の増幅アダプターを有し、他方の末端に第２の増幅アダプターを有する標的ポリヌクレオチドの断片を提供するための薬剤を更に含む。いくつかの例では、薬剤は、プロテイナーゼＫ、ドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）、又はプロテイナーゼＫとＳＤＳとの両方を含む。

【０１２２】

いくつかの例では、断片は、約１００塩基対～約１０００塩基対の長さを有する。いくつかの例では、断片は、約５００塩基対～約７００塩基対の長さを有する。いくつかの例では、断片は、約２００塩基対～約４００塩基対の長さを有する。いくつかの例では、断片は、約１００塩基対～約２００塩基対の長さを有する。

【０１２３】

いくつかの例では、組成物は、第１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの間にない標的ポリヌクレオチドの任意の部分を分解するためのエキソヌクレアーゼを更に含む。いくつかの例では、エキソヌクレアーゼは、エキソヌクレアーゼＩＩＩ又はエキソヌクレアーゼＶＩＩを含む。

【０１２４】

いくつかの例では、ＣａｓはｄＣａｓ９を含む。いくつかの例では、トランスポザーゼはＴｎ５を含む。

【０１２５】

いくつかの例では、第１のアダプターはＰ５アダプターを含み、第２のアダプターはＰ７アダプターを含む。

【０１２６】

いくつかの例では、第１の増幅アダプターは第１の固有の分子識別子（ＵＭＩ）を含み、第２の増幅アダプターは第２のＵＭＩを含む。

【０１２７】

いくつかの例では、第１の位置は第１の部分配列の約１０塩基以内であり、第２の位置は第２の部分配列の約１０塩基以内である。

【０１２８】
いくつかの例では、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰは、共有結合を介して第１のトランスポザーゼにカップリングされる。
【０１２９】
いくつかの例では、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰは、非共有結合を介して第１のトランスポザーゼにカップリングされる。いくつかの例では、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰは、抗体に共有結合的にカップリングされ、第１のトランスポザーゼは、抗体が非共有結合的にカップリングされる抗原に共有結合的にカップリングされるか、又はＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰが、抗原に共有結合的にカップリングされ、第１のトランスポザーゼは、抗原が非共有結合的にカップリングされる抗体に共有結合的にカップリングされる。いくつかの例では、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡは、ｇＲＮＡと第１又は第２の増幅アダプターとの間のハイブリダイゼーションを介してトランスポザーゼに非共有結合的にカップリングされる。いくつかの例では、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡは、ｇＲＮＡとトランスポザーゼ内のオリゴヌクレオチドとの間のハイブリダイゼーションを介してトランスポザーゼに非共有結合的にカップリングされる。
【０１３０】
いくつかの例では、第１の融合タンパク質において、第１の部分配列にハイブリダイズするｇＲＮＡの一部は、約１５～約１８ヌクレオチドの長さを有する。第２の融合タンパク質を含む例では、第２の部分配列にハイブリダイズするｇＲＮＡの一部は、約１５～約１８ヌクレオチドの長さを有する。
【０１３１】
いくつかの例では、第１の融合タンパク質は、標的ポリヌクレオチドに対しておおよそ化学量論比である。
【０１３２】
いくつかの例では、標的ポリヌクレオチドは二本鎖ＤＮＡを含む。
【０１３３】
いくつかの例は、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰにカップリングした第１のタグを更に含む。いくつかの例は、基材と、基材及び第１のタグにカップリングした第１のタグパートナーとを更に含む。
【０１３４】
いくつかの例は、第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰにカップリングした第２のタグを更に含む。いくつかの例は、基材と、基材及び第１のタグにカップリングした第１のタグパートナーと、基材及び第２のタグにカップリングした第２のタグパートナーとを更に含む。
【０１３５】
いくつかの例では、第１及び第２のタグは、ビオチンを含む。いくつかの例では、第１及び第２のタグパートナーは、ストレプトアビジンを含む。いくつかの例では、基材は、ビーズを含む。いくつかの例では、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰは、Ｃａｓ１２ｋを含む。いくつかの例では、トランスポザーゼは、Ｔｎ５又はＴｎ７様トランスポザーゼを含む。
【０１３６】
本明細書のいくつかの例は、標的ポリヌクレオチドのそれぞれの遺伝子座にカップリングしたタンパク質を特徴付ける方法を提供する。方法は、標的ポリヌクレオチドを、第１及び第２のＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）と接触させることを含み得る。方法は、第１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを標的ポリヌクレオチド中の第１及び第２の部分配列にそれぞれハイブリダイズさせることを含み得、タンパク質は、第１及び第２の部分配列間の標的ポリヌクレオチドのそれぞれの遺伝子座にカップリングされ得る。方法は、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを使用して第１の部分配列において標的ポリヌクレオチドを切断し、第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを使用して第２の部分配列において標的ポリヌクレオチドを切断して断片を形成することを含み得る。タンパク質は、断片のそれぞれの遺伝子座にカップリングされ

得る。方法は、対応するオリゴヌクレオチドを使用して、断片のそれぞれの遺伝子座にカップリングしたタンパク質の各々をそれぞれ標識することを含み得る。方法は、対応するオリゴヌクレオチドを配列決定することを含み得る。

【０１３７】

いくつかの例では、方法は、対応するオリゴヌクレオチドを使用して断片のそれぞれの遺伝子座にカップリングしたタンパク質の各々をそれぞれ標識する前に断片を濃縮することを含む。いくつかの例では、第１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰはそれぞれ、断片が第１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを介してタグにカップリングされるようにタグにカップリングされる。濃縮することは、第１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを介してタグにカップリングした断片を、タグパートナーにカップリングした基材と接触させることを含み得る。濃縮することは、タグをタグパートナーにカップリングさせて断片を基材にカップリングすることを含み得る。濃縮することは、基材にカップリングされていない標的ポリヌクレオチドの任意の部分を除去することを含み得る。

【０１３８】

いくつかの例では、方法は、対応するオリゴヌクレオチドを使用してタンパク質を同定することを含む。

【０１３９】

いくつかの例では、方法は、対応するオリゴヌクレオチドを使用して遺伝子座を同定することを含む。

【０１４０】

いくつかの例では、方法は、対応するオリゴヌクレオチドを使用してタンパク質を定量化することを含む。

【０１４１】

いくつかの例では、対応するオリゴヌクレオチドを使用してタンパク質の各々をそれぞれ標識することは、断片を異なるタンパク質に特異的な抗体の混合物と接触させることを含む。抗体の各々は、対応するオリゴヌクレオチドにカップリングされ得る。断片のそれぞれの遺伝子座にカップリングしたタンパク質に特異的である混合物中の任意の抗体について、それらの抗体及び対応するオリゴヌクレオチドは、それらのタンパク質にカップリングされ得る。いくつかの例では、複数のタンパク質が遺伝子座のそれぞれ１つにカップリングされ、混合物中の複数の抗体がその遺伝子座においてタンパク質にカップリングされる。

【０１４２】

いくつかの例では、対応するオリゴヌクレオチドを配列決定することは、対応するオリゴヌクレオチドをビーズアレイにハイブリダイズさせることを含む。いくつかの例では、対応するオリゴヌクレオチドを配列決定することは、対応するオリゴヌクレオチドに対して合成による配列決定を行うことを含む。

【０１４３】

いくつかの例では、対応するオリゴヌクレオチドは、固有の分子識別子（ＵＭＩ）を含む。

【０１４４】

いくつかの例では、方法は、対応するオリゴヌクレオチドのそれぞれの存在を使用してタンパク質を同定することを含む。

【０１４５】

いくつかの例では、方法は、対応するオリゴヌクレオチドのそれぞれの量を使用してタンパク質を定量化することを含む。

【０１４６】

いくつかの例では、対応するオリゴヌクレオチドを使用してタンパク質の各々をそれぞれ標識することは、断片を複数のトランスポザーゼと接触させること（トランスポザーゼの各々は対応するオリゴヌクレオチドにカップリングされている）と、断片のそれぞれの遺伝子座にカップリングしたタンパク質によって、遺伝子座におけるトランスポザーゼの

活性を阻害することと、遺伝子座以外の位置で、トランスポザーゼを使用して断片に対応するオリゴヌクレオチドを付加することとを含む。

【０１４７】

いくつかの例では、対応するオリゴヌクレオチドを配列決定することは、対応するオリゴヌクレオチドが付加される断片に対して合成による配列決定を行うことを含む。

【０１４８】

いくつかの例では、対応するオリゴヌクレオチドの断片内のそれぞれの位置を使用して、タンパク質のそれぞれの遺伝子座を同定する。

【０１４９】

いくつかの例では、トランスポザーゼは断片を部分断片に分割し、合成による配列決定は部分断片に対して行われる。

【０１５０】

いくつかの例では、対応するオリゴヌクレオチドは、増幅アダプターを含む。いくつかの例では、増幅アダプターは、Ｐ５及びＰ７アダプターを含む。

【０１５１】

いくつかの例では、増幅アダプターは、固有の分子識別子（ＵＭＩ）を含む。

【０１５２】

いくつかの例では、ＣａｓはＣａｓ９を含む。

【０１５３】

いくつかの例では、断片は、約１００塩基対～約１０００塩基対の長さを有する。いくつかの例では、断片は、約５００塩基対～約７００塩基対の長さを有する。いくつかの例では、断片は、約２００塩基対～約４００塩基対の長さを有する。いくつかの例では、断片は、約１００塩基対～約２００塩基対の長さを有する。

【０１５４】

いくつかの例では、標的ポリヌクレオチドは二本鎖ＤＮＡを含む。

【０１５５】

本明細書のいくつかの例は、組成物を提供する。組成物は、標的ポリヌクレオチドの断片を含み得る。タンパク質は、断片のそれぞれの遺伝子座にカップリングされ得る。組成物は、異なるタンパク質に特異的な抗体の混合物を含み得る。抗体の各々は、対応するオリゴヌクレオチドにカップリングされ得る。断片のそれぞれの遺伝子座にカップリングしたタンパク質に特異的である混合物中の任意の抗体について、それらの抗体及び対応するオリゴヌクレオチドは、それらのタンパク質にカップリングされる。

【０１５６】

いくつかの例では、複数のタンパク質が遺伝子座のそれぞれ１つにカップリングされ、混合物中の複数の抗体がその遺伝子座においてタンパク質にカップリングされる。

【０１５７】

いくつかの例では、対応するオリゴヌクレオチドは、固有の分子識別子（ＵＭＩ）を含む。

【０１５８】

いくつかの例では、対応するオリゴヌクレオチドのそれぞれの存在は、タンパク質を同定するために使用可能である。

【０１５９】

いくつかの例では、対応するオリゴヌクレオチドのそれぞれの量は、タンパク質を定量化するために使用可能である。

【０１６０】

いくつかの例では、断片は、約１００塩基対～約１０００塩基対の長さを有する。いくつかの例では、断片は、約５００塩基対～約７００塩基対の長さを有する。いくつかの例では、断片は、約２００塩基対～約４００塩基対の長さを有する。いくつかの例では、断片は、約１００塩基対～約２００塩基対の長さを有する。

【０１６１】

いくつかの例では、標的ポリヌクレオチドは二本鎖ＤＮＡを含む。

【０１６２】

本明細書のいくつかの例は、組成物を提供する。組成物は、標的ポリヌクレオチドの断片を含み得る。タンパク質は、断片のそれぞれの遺伝子座にカップリングされ得る。組成物は、複数のトランスポザーゼを含み得る。トランスポザーゼの各々は、対応するオリゴヌクレオチドにカップリングされ得る。断片のそれぞれの遺伝子座にカップリングしたタンパク質は、その遺伝子座においてトランスポザーゼの活性を阻害し得る。トランスポザーゼは、遺伝子座以外の位置で断片に対応するオリゴヌクレオチドを付加し得る。

【０１６３】

いくつかの例では、対応するオリゴヌクレオチドの断片内のそれぞれの位置は、タンパク質のそれぞれの遺伝子座を同定するために使用可能である。

【０１６４】

いくつかの例では、トランスポザーゼは、断片を部分断片に分割する。

【０１６５】

いくつかの例では、対応するオリゴヌクレオチドは、増幅アダプターを含む。いくつかの例では、増幅アダプターは、Ｐ５及びＰ７アダプターを含む。いくつかの例では、増幅アダプターは、固有の分子識別子（ＵＭＩ）を含む。

【０１６６】

いくつかの例では、トランスポザーゼはＴｎ５を含む。

【０１６７】

いくつかの例では、断片は、約１００塩基対～約１０００塩基対の長さを有する。いくつかの例では、断片は、約５００塩基対～約７００塩基対の長さを有する。いくつかの例では、断片は、約２００塩基対～約４００塩基対の長さを有する。いくつかの例では、断片は、約１００塩基対～約２００塩基対の長さを有する。

【０１６８】

いくつかの例では、標的ポリヌクレオチドは二本鎖ＤＮＡを含む。

【０１６９】

本明細書におけるいくつかの例は、複数の部分配列を有する標的ポリヌクレオチドを含む組成物を提供する。組成物は、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）にカップリングしたＳｈＣＡＳＴ（Ｓｃｙｔｏｎｅｍａ　ｈｏｆｍａｎｎｉ　ＣＲＩＳＰＲ関連トランスポザーゼ）をそれぞれ含む複数の複合体を含み得る。ＳｈＣＡＳＴは、それにカップリングした増幅アダプターを有し得る。複合体の各々は、標的ポリヌクレオチド中の部分配列の対応する１つにハイブリダイズされ得る。

【０１７０】

いくつかの実施形態では、組成物は、部分配列への複合体のハイブリダイゼーションを促進し、かつトランスポザーゼの活性を阻害する条件を有する流体を更に含む。いくつかの例では、流体の条件は、トランスポザーゼの活性のために十分な量のマグネシウムイオンが存在しないことを含む。

【０１７１】

いくつかの例では、組成物は、トランスポザーゼの活性を促進する条件を有する流体を更に含み、トランスポザーゼは、標的ポリヌクレオチド中の位置に増幅アダプターを付加する。いくつかの例では、流体の条件は、トランスポザーゼの活性のために十分な量のマグネシウムイオンの存在を含む。

【０１７２】

いくつかの例では、ＳｈＣＡＳＴはＣａｓ１２ｋを含む。いくつかの例では、トランスポザーゼは、Ｔｎ５又はＴｎ７様トランスポザーゼを含む。いくつかの実施形態では、アダプターは、Ｐ５アダプター及びＰ７アダプターのうちの少なくとも１つを含む。いくつかの例では、標的ポリヌクレオチドは二本鎖ＤＮＡを含む。

【０１７３】

いくつかの例では、ｇＲＮＡ及びトランスポザーゼのうちの少なくとも１つは、ビオチ

ン化される。組成物は、ビオチン化されたｇＲＮＡ及びトランスポザーゼのうちの少なくとも１つがカップリングされる、ストレプトアビジンでコーティングされたビーズを更に含み得る。

【０１７４】

本明細書のいくつかの例は、二本鎖ポリヌクレオチドの断片を生成する方法を提供する。方法は、二本鎖ポリヌクレオチドを基材にカップリングすることを含み得る。方法は、第１及び第２のＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）ニッカーゼを二本鎖ポリヌクレオチド中の第１及び第２の部分配列にそれぞれハイブリダイズさせることを含み得る。第１の部分配列は、二本鎖ポリヌクレオチドの第１の鎖に沿った標的配列の３’側であり得る。第２の部分配列は、二本鎖ポリヌクレオチドの第２の鎖に沿った標的配列の３’側であり得る。方法は、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰニッカーゼを使用して、第１の部分配列において第１の鎖を切断することを含み得る。方法は、第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰニッカーゼを使用して、第２の部分配列において第２の鎖を切断することを含み得る。方法は、ポリメラーゼを使用して、それぞれの切断部から第１及び第２の鎖を伸長させ、基材から標的配列を溶出させることを含み得る。方法は、溶出された標的配列を配列決定することを含み得る。

【０１７５】

いくつかの例では、基材は、ビーズ、例えば常磁性ビーズを含む。

【０１７６】

いくつかの例では、二本鎖ポリヌクレオチドの３’末端がタグにカップリングされ、基材はタグパートナーにカップリングされ、カップリングはタグをタグパートナーにカップリングすることを含む。いくつかの例では、タグはビオチンを含み、タグパートナーはストレプトアビジンを含む。

【０１７７】

いくつかの例では、第１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰニッカーゼは、Ｃａｓ９を含む。

【０１７８】

いくつかの例では、ポリメラーゼは鎖置換ポリメラーゼを含む。いくつかの例では、ポリメラーゼは、Ｖｅｎｔ又はＢｓｕを含む。

【０１７９】

いくつかの例では、ポリメラーゼは５’エキソヌクレアーゼ活性を有する。いくつかの例では、ポリメラーゼは、Ｔａｑ、Ｂｓｔ、又はＤＮＡポリメラーゼＩを含む。

【０１８０】

いくつかの例は、組成物を提供する。組成物は、基材にカップリングした二本鎖ポリヌクレオチドを含み得る。組成物は、二本鎖ポリヌクレオチド中の第１及び第２の部分配列にそれぞれハイブリダイズした第１及び第２のＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）ニッカーゼを含み得る。第１の部分配列は、二本鎖ポリヌクレオチドの第１の鎖に沿った標的配列の３’側であり得る。第２の部分配列は、二本鎖ポリヌクレオチドの第２の鎖に沿った標的配列の３’側であり得る。

【０１８１】

いくつかの例では、基材は、ビーズ、例えば常磁性ビーズを含む。

【０１８２】

いくつかの例では、二本鎖ポリヌクレオチドの３’末端はタグにカップリングされ、基材はタグにカップリングしたタグパートナーにカップリングされる。いくつかの例では、タグはビオチンを含み、タグパートナーはストレプトアビジンを含む。

【０１８３】

いくつかの例では、第１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰニッカーゼは、Ｃａｓ９を含む。

【０１８４】

いくつかの例は、二本鎖ポリヌクレオチドの断片を生成する方法を提供する。方法は、

第１及び第２の複合体を二本鎖ポリヌクレオチド中の第１及び第２の部分配列にそれぞれハイブリダイズさせることを含み得る。第１及び第２の複合体の各々は、増幅アダプターにカップリングしたＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）を含み得る。方法は、ハイブリダイズされた第１及び第２の複合体の増幅アダプターを、二本鎖ポリヌクレオチドの第１及び第２の末端にそれぞれライゲーションすることを含み得る。方法は、二本鎖ポリヌクレオチドから第１及び第２の複合体のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを除去することを含み得る。方法は、増幅アダプターがライゲーションされた二本鎖ポリヌクレオチドを配列決定することを含み得る。

【０１８５】

いくつかの例では、第１の部分配列は、二本鎖ポリヌクレオチドの第１の鎖に沿った標的配列の３’側であり、第２の部分配列は、二本鎖ポリヌクレオチドの第２の鎖に沿った標的配列の３’側である。

【０１８６】

いくつかの例では、増幅アダプターはＹ字型である。

【０１８７】

いくつかの例では、各複合体は、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを増幅アダプターにカップリングするリンカーを更に含む。いくつかの例では、リンカーは、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのＣａｓにカップリングされる。いくつかの例では、リンカーは、ｇＲＮＡにカップリングされる。いくつかの例では、リンカーは、タンパク質、ポリヌクレオチド、又はポリマーを含む。いくつかの例では、リンカーは、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰが除去されても増幅アダプターにカップリングしたままである。

【０１８８】

いくつかの例では、ライゲーションは、リガーゼを使用することを含む。いくつかの例では、リガーゼは、ハイブリダイズ中に存在する。いくつかの例では、リガーゼは、ハイブリダイズ中は不活性であり、ＡＴＰを使用してライゲーションのために活性化される。いくつかの例では、リガーゼは、ハイブリダイズ後に付加される。

【０１８９】

いくつかの例では、方法は、ハイブリダイズする前に二本鎖ポリヌクレオチドをＡテーリングすることを含み、増幅アダプターは、Ａテールとハイブリダイズするための不対Ｔを含む。あるいは増幅アダプターを平滑末端にライゲーションしてもよい。

【０１９０】

いくつかの例では、増幅アダプターは、固有の分子識別子を含む。例えば、増幅アダプターは、二重鎖固有の分子識別子を含み得る。

【０１９１】

いくつかの例では、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰは、ｄＣａｓ９を含む。

【０１９２】

いくつかの例は、組成物を提供する。組成物は、二本鎖ポリヌクレオチドの断片を含み得る。組成物は、二本鎖ポリヌクレオチド中の第１及び第２の部分配列にハイブリダイズした第１及び第２の複合体を含み得る。第１及び第２の複合体の各々は、増幅アダプターにカップリングしたＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）を含み得る。

【０１９３】

いくつかの例では、第１の部分配列は、二本鎖ポリヌクレオチドの第１の鎖に沿った標的配列の３’側であり、第２の部分配列は、二本鎖ポリヌクレオチドの第２の鎖に沿った標的配列の３’側である。

【０１９４】

いくつかの例では、増幅アダプターはＹ字型である。

【０１９５】

いくつかの例では、各複合体は、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを増幅アダプターにカップリングするリンカーを更に含む。いくつかの例では、リンカーは、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　Ｒ

ＮＰのＣａｓにカップリングされる。いくつかの例では、リンカーは、ｇＲＮＡにカップリングされる。いくつかの例では、リンカーは、タンパク質、ポリヌクレオチド、又はポリマーを含む。

【０１９６】

いくつかの例では、二本鎖ポリヌクレオチドはＡテールを含み、増幅アダプターは、Ａテールとハイブリダイズするための不対Ｔを含む。あるいは増幅アダプターを平滑末端にライゲーションしてもよい。

【０１９７】

いくつかの例では、増幅アダプターは、固有の分子識別子を含む。例えば、増幅アダプターは、二重鎖固有の分子識別子を含み得る。

【０１９８】

いくつかの例では、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰは、ｄＣａｓ９を含む。

【０１９９】

本明細書のいくつかの例は、ポリヌクレオチドの断片を生成する方法を提供する。方法は、第１のＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）をポリヌクレオチド中の第１の配列にハイブリダイズさせることを含み得る。方法は、第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを、第１の配列から少なくとも標的配列だけ離間しているポリヌクレオチド中の第２の配列にハイブリダイズさせることを含み得る。方法は、第１及び第２の配列を第１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰで切断して、第１及び第２の末端並びにそれらの間の標的配列を含む断片を生成することを含み得る。第１の末端は、少なくとも１つの塩基の第１の５’オーバーハングを有し得る。第２の末端は、少なくとも１つの塩基の第２の５’オーバーハングを有し得る。

【０２００】

いくつかの例では、第１及び第２の５’オーバーハングは各々、約２～５塩基長である。いくつかの例では、第１及び第２の５’オーバーハングは各々、約５塩基長である。

【０２０１】

いくつかの例では、第１及び第２の５’オーバーハングは、互いに異なる配列を有する。

【０２０２】

いくつかの例は、第１の増幅アダプターを断片の第１の末端にライゲーションすることと、第２の増幅アダプターを断片の第２の末端にライゲーションすることとを更に含む。第１の増幅アダプターは、第１の５’オーバーハングに相補的である第３の５’オーバーハングを有し得る。第２の増幅アダプターは、第２の５’オーバーハングに相補的である第４の５’オーバーハングを有し得る。第３及び第４の５’オーバーハングは、互いに異なる配列を有し得る。いくつかの例は、第１及び第２の増幅アダプターがライゲーションされた断片のアンプリコンを生成することと、アンプリコンを配列決定することと、配列決定に基づいて標的ポリヌクレオチドを同定することとを更に含む。いくつかの例では、増幅アダプターは、固有の分子識別子（ＵＭＩ）を含む。

【０２０３】

いくつかの例では、ＣａｓはＣａｓ１２ａを含む。

【０２０４】

本明細書のいくつかの例は、組成物を提供する。組成物は、ポリヌクレオチドを含み得る。組成物は、ポリヌクレオチド中の第１の配列にハイブリダイズされた第１のＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）を含み得る。組成物は、第１の配列から少なくとも標的配列だけ離間しているポリヌクレオチド中の第２の配列にハイブリダイズした第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを含み得る。第１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰはそれぞれ、ポリヌクレオチドの第１及び第２の配列を切断して、標的配列を間に持つ第１及び第２の末端を有する断片を生成するためのものであり得る。第１の末端は、少なくとも１つの塩基の第１の５’オーバーハングを有し得る。第２の末端は、少なくとも１つの塩基の第２の５’オーバーハングを有し得る。

【０２０５】

いくつかの例では、第１及び第２の５’オーバーハングは各々、約２～５塩基長である。いくつかの例では、第１及び第２の５’オーバーハングは各々、約５塩基長である。

【０２０６】

いくつかの例では、第１及び第２の５’オーバーハングは、互いに異なる配列を有する。

【０２０７】

いくつかの例では、ＣａｓはＣａｓ１２ａを含む。

【０２０８】

本明細書のいくつかの例は、組成物を提供する。組成物は、標的配列を間に持つ第１及び第２の末端を各々有するポリヌクレオチド断片を含み得る。第１の末端は、少なくとも１つの塩基の第１の５’オーバーハングを有し得る。第２の末端は、少なくとも１つの塩基の第２の５’オーバーハングを有し得る。第１及び第２の５’オーバーハングは、互いに異なる配列を有し得る。組成物はまた、第１の５’オーバーハングに相補的であり、かつ第２の５’オーバーハングに相補的でない第３の５’オーバーハングを有する第１の増幅アダプターを含み得る。組成物はまた、第２の５’オーバーハングに相補的であり、かつ第１の５’オーバーハングに相補的でない第４の５’オーバーハングを有する第２の増幅アダプターを含み得る。

【０２０９】

いくつかの例は、第１の増幅アダプターを第１の末端にライゲーションし、第２の増幅アダプターを第２の末端にライゲーションするための少なくとも１つのリガーゼを更に含む。

【０２１０】

いくつかの例では、第１及び第２の５’オーバーハングは各々、約２～５塩基長である。いくつかの例では、第１及び第２の５’オーバーハングは各々、約５塩基長である。

【０２１１】

いくつかの例では、第１及び第２の増幅アダプターは、固有の分子識別子（ＵＭＩ）を含む。

【０２１２】

いくつかの例では、リガーゼはＴ４　ＤＮＡリガーゼを含む。

【０２１３】

本明細書におけるいくつかの例は、各々が標的配列を間に持つ第１及び第２の末端を有する複数のポリヌクレオチド断片を提供する。第１の末端は、少なくとも１つの塩基の第１の５’オーバーハングを有し得る。第２の末端は、少なくとも１つの塩基の第２の５’オーバーハングを有し得る。第１及び第２の５’オーバーハングは、互いに、かつ他の断片の第１及び第２の５’オーバーハングとは異なる配列を有し得る。

【０２１４】

いくつかの例は、複数の第１の増幅アダプターを更に含む。第１の増幅アダプターの各々は、対応する断片の第１の５’オーバーハングに相補的であり、その断片の第２の５’オーバーハングに相補的でなく、他の断片の第１又は第２の５’オーバーハングに相補的でない第３の５’オーバーハングを有し得る。本明細書におけるいくつかの例は、複数の第２の増幅アダプターを更に含む。第２の増幅アダプターの各々は、対応する断片の第２の５’オーバーハングに相補的であり、その断片の第１の５’オーバーハングに相補的でなく、他の断片の第１又は第２の５’オーバーハングに相補的でない第４の５’オーバーハングを有し得る。

【０２１５】

いくつかの例は、第１及び第３の５’オーバーハングが相補的である第１の末端に第１の増幅アダプターをライゲーションし、第２及び第４の５’オーバーハングが相補的である第２の末端に第２の増幅アダプターをライゲーションするためのリガーゼを更に含む。いくつかの例では、リガーゼはＴ４　ＤＮＡリガーゼを含む。

【０２１６】

いくつかの例では、第１及び第２の増幅アダプターは、固有の分子識別子（ＵＭＩ）を

含む。いくつかの例では、第１及び第２の５’オーバーハングは各々、約２～５塩基長である。いくつかの例では、第１及び第２の５’オーバーハングは各々、約５塩基長である。

【０２１７】

本明細書のいくつかの例は、組成物を提供する。組成物は、複数のポリヌクレオチドを含み得る。組成物は、ポリヌクレオチド中のそれぞれの第１の配列にハイブリダイズした複数の第１のＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）を含み得る。組成物は、それぞれの第１の配列から少なくともそれぞれの標的配列だけ離間しているポリヌクレオチド中のそれぞれの第２の配列にハイブリダイズした複数の第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを含み得る。第１及び第２の複数のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰはそれぞれ、それぞれのポリヌクレオチドの第１及び第２の配列を切断して、それぞれの標的配列をそれらの間に持つ第１及び第２の末端をそれぞれ有する断片を生成するためのものであり得る。第１の末端は、少なくとも１つの塩基の第１の５’オーバーハングを有し得る。第２の末端は、少なくとも１つの塩基の第２の５’オーバーハングを有し得る。

【０２１８】

いくつかの例では、第１及び第２の５’オーバーハングは各々、約２～５塩基長である。いくつかの例では、第１及び第２の５’オーバーハングは各々、約５塩基長である。

【０２１９】

いくつかの例では、第１及び第２の５’オーバーハングは、互いに異なる配列を有する。

【０２２０】

いくつかの例では、ＣａｓはＣａｓ１２ａを含む。

【０２２１】

本明細書におけるいくつかの例は、ガイドＲＮＡを提供する。ガイドＲＮＡは、プライマー結合部位、増幅アダプター部位、及びＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーを含み得る。

【０２２２】

いくつかの例では、プライマー結合部位は、ＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーの少なくとも一部におおよそ相補的である。

【０２２３】

いくつかの例では、増幅アダプター部位は、プライマー結合部位とＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーとの間に位置する。

【０２２４】

いくつかの例では、ガイドＲＮＡは、少なくとも１つのループを含む。いくつかの例では、第１のループは、増幅アダプター部位とＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーとの間に位置する。いくつかの例では、第２のループは、増幅アダプター部位とＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーとの間に位置する。

【０２２５】

本明細書におけるいくつかの例は、ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）を提供する。Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰは、前述のｇＲＮＡのいずれか１つと、ＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーに結合するＣａｓタンパク質とを含み得る。

【０２２６】

いくつかの例では、Ｃａｓタンパク質は、二本鎖ポリヌクレオチド切断を行うように構成される。いくつかの例では、Ｃａｓタンパク質は、Ｃａｓ９、Ｃａｓ　１２ａ、又はＣａｓ１２ｆを含む。

【０２２７】

いくつかの例では、プライマー結合部位及び増幅アダプター部位は、Ｃａｓタンパク質の外側に伸長する。

【０２２８】

本明細書のいくつかの例は、複合体を提供する。複合体は、第１及び第２の鎖を含むポリヌクレオチドを含み得る。複合体は、第１のＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡ

リボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）を含み得る。第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰは、第１のプライマー結合部位、第１の増幅アダプター部位、及び第１のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーを含む第１のガイドＲＮＡ、並びに第１のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーに結合する第１のＣａｓタンパク質を含み得る。第１のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーは第１の鎖にハイブリダイズしてもよく、第１のプライマー結合部位は第２の鎖にハイブリダイズしてもよい。

【０２２９】

いくつかの例では、第１及び第２の鎖は、第１のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーの配列に基づくそれぞれの位置で第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰによって切断される。いくつかの例では、第１のＣａｓタンパク質は、Ｃａｓ９、Ｃａｓ　１２ａ、又はＣａｓ１２ｆを含む。

【０２３０】

いくつかの例では、複合体は、第１のＣａｓタンパク質によって引き起こされた第２の鎖の切断部に増幅アダプター部位のアンプリコンを作製するための第１の逆転写酵素を更に含む。いくつかの例では、第１の逆転写酵素は、第１のＣａｓタンパク質にカップリングされる。いくつかの例では、第１の逆転写酵素及び第１のＣａｓタンパク質は、第１の融合タンパク質の構成要素である。

【０２３１】

いくつかの例では、第１のプライマー結合部位は、第１のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーの少なくとも一部におおよそ相補的である。

【０２３２】

いくつかの例では、第１の増幅アダプター部位は、第１のプライマー結合部位と第１のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーとの間に位置する。

【０２３３】

いくつかの例では、第１のｇＲＮＡは、少なくとも１つのループを更に含む。いくつかの例では、第１のループは、第１の増幅アダプター部位と第１のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーとの間に位置する。いくつかの例では、第２のループは、第１の増幅アダプター部位と第１のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーとの間に位置する。

【０２３４】

いくつかの例は、第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを更に含む。第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰは、第２のプライマー結合部位、第２の増幅アダプター部位、及び第２のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーを含む第２のガイドＲＮＡを含み得る。第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰは、第２のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーに結合する第２のＣａｓタンパク質を含み得る。第２のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーは第１の鎖にハイブリダイズしてもよく、第２のプライマー結合部位は第２の鎖にハイブリダイズしてもよい。

【０２３５】

いくつかの例では、第１及び第２の鎖は、第２のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーの配列に基づくそれぞれの位置で第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰによって切断される。いくつかの例では、第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰによる第１及び第２の鎖の切断部は、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰによる第１及び第２の鎖の切断部から少なくとも標的配列だけ離間している。いくつかの例では、第２のＣａｓタンパク質は、Ｃａｓ９、Ｃａｓ　１２ａ、又はＣａｓ１２ｆを含む。

【０２３６】

いくつかの例では、複合体は、第２のＣａｓタンパク質によって引き起こされた第２の鎖の切断部に増幅アダプター部位のアンプリコンを作製するための第２の逆転写酵素を更に含む。いくつかの例では、第２の逆転写酵素は、第２のＣａｓタンパク質にカップリングされる。いくつかの例では、第２の逆転写酵素及び第２のＣａｓタンパク質は、第２の融合タンパク質の構成要素である。

【０２３７】

いくつかの例では、第２のプライマー結合部位は、第２のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサ

ーの少なくとも一部におおよそ相補的である。
【０２３８】
いくつかの例では、第２の増幅アダプター部位は、第２のプライマー結合部位と第２のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーとの間に位置する。
【０２３９】
本明細書におけるいくつかの例は、部分二本鎖ポリヌクレオチド断片を提供する。断片は、第１の３’オーバーハングを含む第１の末端；第２の末端；及び第１及び第２の末端の間に位置する標的配列を含み得る。
【０２４０】
いくつかの例では、第１の３’オーバーハングは、第１の増幅アダプターを含む。
【０２４１】
いくつかの例では、第２の末端は、第２の３’オーバーハングを含む。
【０２４２】
いくつかの例では、第２の３’オーバーハングは、第２の増幅アダプターを含む。
【０２４３】
本明細書のいくつかの例は、方法を提供する。方法は、第１のＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）を、第１及び第２の鎖を含むポリヌクレオチドと接触させることを含み得る。第１のＣａｓ－ｇＲＮＡは、第１のプライマー結合部位、第１の増幅アダプター部位、及び第１のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーを含む第１のガイドＲＮＡ、並びに第１のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーに結合する第１のＣａｓタンパク質を含み得る。方法は、第１のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーを第１の鎖にハイブリダイズさせることを含み得る。方法は、第１のプライマー結合部位を第２の鎖にハイブリダイズさせることを含み得る。
【０２４４】
いくつかの例では、方法は、第１のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーの配列に基づくそれぞれの位置で、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰによって第１及び第２の鎖を切断することを更に含む。いくつかの例では、第１のＣａｓタンパク質は、Ｃａｓ９、Ｃａｓ　１２ａ、又はＣａｓ１２ｆを含む。
【０２４５】
いくつかの例では、方法は、第１の逆転写酵素を使用して、第１のＣａｓタンパク質によって引き起こされた第２の鎖の切断部に増幅アダプター部位のアンプリコンを生成することを更に含む。いくつかの例では、第１の逆転写酵素は、第１のＣａｓタンパク質にカップリングされる。いくつかの例では、第１の逆転写酵素及び第１のＣａｓタンパク質は、第１の融合タンパク質の構成要素である。
【０２４６】
いくつかの例では、第１のプライマー結合部位は、第１のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーの少なくとも一部におおよそ相補的である。
【０２４７】
いくつかの例では、第１の増幅アダプター部位は、第１のプライマー結合部位と第１のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーとの間に位置する。
【０２４８】
いくつかの例では、第１のｇＲＮＡは、少なくとも１つのループを更に含む。いくつかの例では、第１のループは、第１の増幅アダプター部位と第１のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーとの間に位置する。いくつかの例では、第２のループは、第１の増幅アダプター部位と第１のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーとの間に位置する。
【０２４９】
いくつかの例では、方法は、ポリヌクレオチドを第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰと接触させることを更に含む。第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰは、第２のプライマー結合部位、第２の増幅アダプター部位、及び第２のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーを含む第２のガイドＲＮＡ；並びに第２のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーに結合する第２のＣａｓタン

パク質を含み得る。方法は、第２のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーを第１の鎖にハイブリダイズさせることを含み得る。方法は、第２のプライマー結合部位を第２の鎖にハイブリダイズさせることを含み得る。

【０２５０】

いくつかの例では、方法は、第２のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーの配列に基づくそれぞれの位置で、第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰによって第１及び第２の鎖を切断することを含み得る。いくつかの例では、第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰによる第１及び第２の鎖の切断部は、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰによる第１及び第２の鎖の切断部から少なくとも標的配列だけ離間している。いくつかの例では、第２のＣａｓタンパク質は、Ｃａｓ９、Ｃａｓ　１２ａ、又はＣａｓ１２ｆを含む。

【０２５１】

いくつかの例では、方法は、第２の逆転写酵素を使用して、第２のＣａｓタンパク質によって引き起こされた第２の鎖の切断部に増幅アダプター部位のアンプリコンを生成することを更に含み得る。いくつかの例では、第２の逆転写酵素は、第２のＣａｓタンパク質にカップリングされる。いくつかの例では、第２の逆転写酵素及び第２のＣａｓタンパク質は、第２の融合タンパク質の構成要素である。

【０２５２】

いくつかの例では、第２のプライマー結合部位は、第２のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーの少なくとも一部におおよそ相補的である。

【０２５３】

いくつかの例では、第２の増幅アダプター部位は、第２のプライマー結合部位と第２のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーとの間に位置する。

【０２５４】

いくつかの例では、第１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ並びに第１及び第２の逆転写酵素は、第１の末端及び第２の末端を有する部分二本鎖ポリヌクレオチド断片を生成する。第１の末端は、第１の３’オーバーハングを含み得る。第２の末端は、第２の３’オーバーハングを含み得る。標的配列は、第１の末端と第２の末端との間に位置し得る。いくつかの例では、第１の３’オーバーハングは、第１の増幅アダプター部位のアンプリコンを含む。いくつかの例では、第２の３’オーバーハングは、第２の増幅アダプター部位のアンプリコンを含む。いくつかの例では、方法は、第３の増幅アダプターを第１の末端の５’基にライゲーションすることと、第４の増幅アダプターを第２の末端の５’基にライゲーションすることと、第１、第２、第３、及び第４の増幅アダプターを使用して断片を増幅することと、増幅された断片を配列決定することとを更に含む。

【０２５５】

本明細書に記載されている利益を実現するため、本明細書に記載されている本開示の態様の各々の任意のそれぞれの特徴／例は、任意の適切な組み合わせで一緒に実施されてもよいこと、及びこれらの態様のいずれか１つ以上からの任意の特徴／例は、任意の適切な組み合わせで、本明細書に記載されている他の態様の特徴のいずれかと一緒に実施されてもよいことを理解すべきである。

【図面の簡単な説明】

【０２５６】

【図１Ａ】Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ媒介性脱宿主化のための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。

【図１Ｂ】Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ媒介性脱宿主化のための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。

【図１Ｃ】Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ媒介性脱宿主化のための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。

【図１Ｄ】Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ媒介性脱宿主化のための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。

【図１Ｅ】Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ媒介性脱宿主化のための例示的な組成物及びプロセ

スフローにおける操作を概略的に示す。
【図１Ｆ】Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ媒介性脱宿主化のための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図１Ｇ】Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ媒介性脱宿主化のための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図１Ｈ】Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ媒介性脱宿主化のための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図１Ｉ】Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ媒介性脱宿主化のための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図１Ｊ】Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ媒介性脱宿主化のための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図１Ｋ】Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ媒介性脱宿主化のための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【０２５７】
【図２Ａ】異なる定義された断片サイズへのＷＧ断片化のための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図２Ｂ】異なる定義された断片サイズへのＷＧ断片化のための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図２Ｃ】異なる定義された断片サイズへのＷＧ断片化のための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図２Ｄ】異なる定義された断片サイズへのＷＧ断片化のための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図２Ｅ】異なる定義された断片サイズへのＷＧ断片化のための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図２Ｆ】異なる定義された断片サイズへのＷＧ断片化のための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図２Ｇ】異なる定義された断片サイズへのＷＧ断片化のための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図２Ｈ】異なる定義された断片サイズへのＷＧ断片化のための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図２Ｉ】異なる定義された断片サイズへのＷＧ断片化のための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図２Ｊ】異なる定義された断片サイズへのＷＧ断片化のための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図２Ｋ】異なる定義された断片サイズへのＷＧ断片化のための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【０２５８】
【図３Ａ】切断部を使用してポリヌクレオチドを標識するための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図３Ｂ】切断部を使用してポリヌクレオチドを標識するための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図３Ｃ】切断部を使用してポリヌクレオチドを標識するための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図３Ｄ】切断部を使用してポリヌクレオチドを標識するための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図３Ｅ】切断部を使用してポリヌクレオチドを標識するための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【０２５９】
【図４Ａ】増幅アダプターをポリヌクレオチドにカップリングするための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。

【図４Ｂ】増幅アダプターをポリヌクレオチドにカップリングするための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図４Ｃ】増幅アダプターをポリヌクレオチドにカップリングするための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図４Ｄ】増幅アダプターをポリヌクレオチドにカップリングするための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図４Ｅ】増幅アダプターをポリヌクレオチドにカップリングするための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図４Ｆ】増幅アダプターをポリヌクレオチドにカップリングするための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図４Ｇ】増幅アダプターをポリヌクレオチドにカップリングするための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図４Ｈ】増幅アダプターをポリヌクレオチドにカップリングするための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図４Ｉ】増幅アダプターをポリヌクレオチドにカップリングするための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図４Ｊ】増幅アダプターをポリヌクレオチドにカップリングするための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【０２６０】
【図５Ａ】標的化エピジェネティックアッセイのための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図５Ｂ】標的化エピジェネティックアッセイのための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図５Ｃ】標的化エピジェネティックアッセイのための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図５Ｄ】標的化エピジェネティックアッセイのための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図５Ｅ】標的化エピジェネティックアッセイのための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図５Ｆ】標的化エピジェネティックアッセイのための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図５Ｇ】標的化エピジェネティックアッセイのための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図５Ｈ】標的化エピジェネティックアッセイのための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図５Ｉ】標的化エピジェネティックアッセイのための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図５Ｊ】標的化エピジェネティックアッセイのための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図５Ｋ】標的化エピジェネティックアッセイのための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【０２６１】
【図６Ａ】ＳｈＣＡＳＴ（Ｓｃｙｔｏｎｅｍａ　ｈｏｆｍａｎｎｉ　ＣＲＩＳＰＲ関連トランスポザーゼ）標的化ライブラリー調製及び濃縮のための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図６Ｂ】ＳｈＣＡＳＴ（Ｓｃｙｔｏｎｅｍａ　ｈｏｆｍａｎｎｉ　ＣＲＩＳＰＲ関連トランスポザーゼ）標的化ライブラリー調製及び濃縮のための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【０２６２】
【図７Ａ】増幅アダプターをポリヌクレオチドにカップリングするための例示的な組成物

及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図７Ｂ】増幅アダプターをポリヌクレオチドにカップリングするための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図７Ｃ】増幅アダプターをポリヌクレオチドにカップリングするための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図７Ｄ】増幅アダプターをポリヌクレオチドにカップリングするための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図７Ｅ】増幅アダプターをポリヌクレオチドにカップリングするための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図７Ｆ】増幅アダプターをポリヌクレオチドにカップリングするための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図７Ｇ】増幅アダプターをポリヌクレオチドにカップリングするための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図７Ｈ】増幅アダプターをポリヌクレオチドにカップリングするための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【０２６３】
【図８Ａ】Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰニッカーゼを使用して選択されたポリヌクレオチド断片を濃縮するための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図８Ｂ】Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰニッカーゼを使用して選択されたポリヌクレオチド断片を濃縮するための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図８Ｃ】Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰニッカーゼを使用して選択されたポリヌクレオチド断片を濃縮するための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図８Ｄ】Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰニッカーゼを使用して選択されたポリヌクレオチド断片を濃縮するための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図８Ｅ】Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰニッカーゼを使用して選択されたポリヌクレオチド断片を濃縮するための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図８Ｆ】Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰニッカーゼを使用して選択されたポリヌクレオチド断片を濃縮するための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図８Ｇ】Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰニッカーゼを使用して選択されたポリヌクレオチド断片を濃縮するための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図８Ｈ】Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰニッカーゼを使用して選択されたポリヌクレオチド断片を濃縮するための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【０２６４】
【図９Ａ】増幅アダプターをｄｓＤＮＡライブラリーの断片にライゲーションするための以前から知られている例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【０２６５】
【図９Ｂ】Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを使用して増幅アダプターを選択されたポリヌクレオチド断片にライゲーションするための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図９Ｃ】Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを使用して増幅アダプターを選択されたポリヌクレオチド断片にライゲーションするための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図９Ｄ】Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを使用して増幅アダプターを選択されたポリヌクレオチド断片にライゲーションするための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図９Ｅ】Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを使用して増幅アダプターを選択されたポリヌクレオチド断片にライゲーションするための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図９Ｆ】Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを使用して増幅アダプターを選択されたポリヌクレオチド断片にライゲーションするための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作

を概略的に示す。
【０２６６】
【図１０Ａ】Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを使用して断片を生成し、それにアダプターをカップリングするための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図１０Ｂ】Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを使用して断片を生成し、それにアダプターをカップリングするための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図１０Ｃ】Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを使用して断片を生成し、それにアダプターをカップリングするための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【０２６７】
【図１１Ａ】Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを使用して断片を生成し、それにアダプターをカップリングするための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図１１Ｂ】Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを使用して断片を生成し、それにアダプターをカップリングするための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図１１Ｃ】Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを使用して断片を生成し、それにアダプターをカップリングするための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図１１Ｄ】Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを使用して断片を生成し、それにアダプターをカップリングするための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図１１Ｅ】Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを使用して断片を生成し、それにアダプターをカップリングするための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図１１Ｆ】Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを使用して断片を生成し、それにアダプターをカップリングするための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【図１１Ｇ】Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを使用して断片を生成し、それにアダプターをカップリングするための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。
【０２６８】
【図１２】タグメンテーション、停止及びＴＷＢ洗浄後の標的ＤＮＡ断片を概略的に示す。
【０２６９】
【図１３】ギャップ充填及びＥＬＭとのライゲーション後の標的ＤＮＡ断片を概略的に示す。
【０２７０】
【図１４】ＰＡＭ部位の反対側を切断するＣａｓ９ニッカーゼ（Ｄ１０Ａ）を概略的に示す。
【０２７１】
【図１５】３’ニックを含有する標的ＤＮＡを概略的に示す。
【０２７２】
【図１６】標的断片の溶出をもたらす‘３末端のポリメラーゼ伸長を概略的に示す。
【０２７３】
【図１７】４つのラムダ標的の濃縮を示すＩＧＶトレースの例を示す。
【発明を実施するための形態】
【０２７４】
　Ｃａｓ－ｇＲＮＡリボ核タンパク質（ＲＮＰ）を使用するゲノムライブラリー調製、及び標的化エピジェネティックアッセイが本明細書に提供される。
【０２７５】
　ゲノムライブラリー調製に関して、本明細書におけるいくつかの例は、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ媒介性脱宿主化に関する。本明細書におけるいくつかの例は、全ゲノム（ＷＧ）の、異なる定義された断片サイズへの断片化に関する。本明細書のいくつかの例は、ポリヌクレオチドを切断することに関し、本明細書のいくつかの例は、ポリヌクレオチドを増幅アダプターにカップリングすることに関する。ゲノムライブラリー調製に関する任意のそのような例の１つ以上の態様は、ゲノムライブラリー調製に関する任意の他のそのような例の１つ以上の態様と組み合わせて使用され得ることが理解されるであろう。

【０２７６】
標的化エピジェネティックアッセイに関して、本明細書におけるいくつかの例は、エピジェネティックな特徴（例えば、クロマチン）を保持するＤＮＡ領域（小又は大）を濃縮するためにＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを使用することに関し、これはその後、エピジェネティック－ＮＧＳアッセイにおいて処理される。このアプローチは、ウルトラディープエピジェネティックアッセイを可能にし、重要な研究又は臨床開発であり得るようなエピジェネティック機構のより良い理解を容易にし得る微細なエピジェネティック変化（例えば、ＡＴＡＣ－ｓｅｑ又はＣｈＩＰ－ｓｅｑと比較して）及び複雑なネットワーク（例えば、遺伝子座関連プロテオミクス）の問題解決を改善する。標的化エピジェネティックアッセイに関する任意のそのような例の１つ以上の態様は、ゲノムライブラリー調製に関する任意の例の１つ以上の態様と組み合わせて使用されてもよく、逆もまた同様であることが理解されるであろう。
【０２７７】
最初に、本明細書で使用されるいくつかの用語を簡単に説明する。次いで、Ｃａｓ－ＲＮＰを使用する、ゲノムライブラリー調製のためのいくつかの例示的な組成物及び例示的な方法、並びに標的化エピジェネティックアッセイを説明する。
【０２７８】
用語
別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、当該技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。「含むこと（including）」という用語、並びに「含む（include）」、「含む（includes）」及び「含まれた（included）」などの他の形態の使用は、限定ではない。「有すること（having）」という用語、並びに「有する（have）」、「有する（has）」及び「有した（had）」などの他の形態の使用は、限定ではない。本明細書で使用される場合、移行句中か又は請求項の本文中のいずれであっても、「含む（comprise）」及び「含む（comprising）」という用語は、オープンエンドの意味を有するものとして解釈されるべきである。すなわち、上記の用語は、語句「少なくとも有する」又は「少なくとも含む」と同義であると解釈されるべきである。例えば、プロセスの文脈において使用される場合、「含む（comprising）」という用語は、プロセスが少なくとも列挙された工程を含むが、追加の工程を含み得ることを意味する。化合物、組成物、又はデバイスの文脈で使用される場合、「含む（comprising）」という用語は、化合物、組成物、又はデバイスが少なくとも列挙された特徴又は構成要素を含むが、追加の特徴又は構成要素も含み得ることを意味する。
【０２７９】
本明細書で使用される場合、単数形「１つ（a）」、「１つ（an）」及び「この（the）」は、内容が明確に別段の指示をしない限り、複数の指示対象を含む。
【０２８０】
本明細書全体を通して使用される「実質的に」、「おおよそ（approximately）」、及び「約」という用語は、処理のばらつきなどに起因する小さな変動を記載及び考慮するために使用されている。例えば、それらは、±５％以下など、±２％以下など、±１％以下など、±０．５％以下など、±０．２％以下など、±０．１％以下など、±０．０５％以下などの、±１０％以下を指し得る。
【０２８１】
本明細書で使用される場合、「ハイブリダイズする」及び「ハイブリダイゼーション」などの用語は、ポリヌクレオチドを、それらのポリヌクレオチドの長さに沿って互いに非共有結合的に会合させて、二本鎖「二重鎖」、三本鎖「三重鎖」、又はより高次の構造を形成することを意味することが意図される。例えば、２つのＤＮＡポリヌクレオチド鎖は、相補的塩基対合を介して会合して二重鎖を形成し得る。ポリヌクレオチド鎖間の一次相互作用は、典型的には、ヌクレオチド塩基特異的、例えば、Ａ：Ｔ、Ａ：Ｕ、及びＧ：Ｃであり得る。塩基スタッキング及び疎水性相互作用も二重鎖安定性に寄与し得る。ハイブ

リダイゼーション条件は、約１Ｍ未満、より通常は約５００ｍＭ未満、又は約２００ｍＭ未満の塩濃度を含み得る。ハイブリダイゼーション緩衝液は、５％ＳＳＰＥなどの緩衝塩溶液、又は当該技術分野で公知の他の適切な緩衝液を含み得る。ハイブリダイゼーション温度は５℃程度と低くすることができるが、典型的には２２℃よりも高く、より典型的には約３０℃よりも高く、典型的には３７℃を超える。第１及び第２のポリヌクレオチド間の会合の強度は、それらのポリヌクレオチド内のヌクレオチド配列間の相補性と共に増加する。ポリヌクレオチド間のハイブリダイゼーションの強度は、二本鎖の５０％のポリヌクレオチド鎖が分離する融解温度（Ｔｍ）によって特徴付けられ得る。

【０２８２】

本明細書で使用される場合、「ヌクレオチド」という用語は、糖、及び少なくとも１つのホスフェート基を含み、一部の例では、核酸塩基もまた含む分子を意味することが意図される。核酸塩基を欠くヌクレオチドは、「脱塩基」と称され得る。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、修飾デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾リボヌクレオチド、ペプチドヌクレオチド、修飾ペプチドヌクレオチド、修飾ホスフェート糖骨格ヌクレオチド、及びそれらの混合物を含む。ヌクレオチドの例には、アデノシン一リン酸（adenosine monophosphate、ＡＭＰ）、アデノシン二リン酸（adenosine diphosphate、ＡＤＰ）、アデノシン三リン酸（adenosine triphosphate、ＡＴＰ）、チミジン一リン酸（thymidine monophosphate、ＴＭＰ）、チミジン二リン酸（thymidine diphosphate、ＴＤＰ）、チミジン三リン酸（thymidine triphosphate、ＴＴＰ）、シチジン一リン酸（cytidine monophosphate、ＣＭＰ）、シチジン二リン酸（cytidine diphosphate、ＣＤＰ）、シチジン三リン酸（cytidine triphosphate、ＣＴＰ）、グアノシン一リン酸（guanosine monophosphate、ＧＭＰ）、グアノシン二リン酸（guanosine diphosphate、ＧＤＰ）、グアノシン三リン酸（guanosine triphosphate、ＧＴＰ）、ウリジン一リン酸（uridine monophosphate、ＵＭＰ）、ウリジン二リン酸（uridine diphosphate、ＵＤＰ）、ウリジン三リン酸（uridine triphosphate、ＵＴＰ）、デオキシアデノシン一リン酸（deoxyadenosine monophosphate、ｄＡＭＰ）、デオキシアデノシン二リン酸（deoxyadenosine diphosphate、ｄＡＤＰ）、デオキシアデノシン三リン酸（deoxyadenosine triphosphate、ｄＡＴＰ）、デオキシチミジン一リン酸（deoxythymidine monophosphate、ｄＴＭＰ）、デオキシチミジン二リン酸（deoxythymidine diphosphate、ｄＴＤＰ）、デオキシチミジン三リン酸（deoxythymidine triphosphate、ｄＴＴＰ）、デオキシシチジン二リン酸（deoxycytidine diphosphate、ｄＣＤＰ）、デオキシシチジン三リン酸（deoxycytidine triphosphate、ｄＣＴＰ）、デオキシグアノシン一リン酸（deoxyguanosine monophosphate、ｄＧＭＰ）、デオキシグアノシン二リン酸（deoxyguanosine diphosphate、ｄＧＤＰ）、デオキシグアノシン三リン酸（deoxyguanosine triphosphate、ｄＧＴＰ）、デオキシウリジン一リン酸（deoxyuridine monophosphate、ｄＵＭＰ）、デオキシウリジン二リン酸（deoxyuridine diphosphate、ｄＵＤＰ）及びデオキシウリジン三リン酸（deoxyuridine triphosphate、ｄＵＴＰ）が含まれる。

【０２８３】

本明細書で使用される場合、「ヌクレオチド」という用語はまた、天然に存在するヌクレオチドと比較して修飾された核酸塩基、糖、骨格及び／又はリン酸部分を含むタイプのヌクレオチドである、任意のヌクレオチドアナログを包含することが意図される。ヌクレオチド類似体はまた、「修飾核酸」と称され得る。例となる修飾核酸塩基の例には、イノシン、キササニン、ヒポキササニン、イソシトシン、イソグアニン、２－アミノプリン、５－メチルシトシン、５－ヒドロキシメチルシトシン、２－アミノアデニン、６－メチルアデニン、６－メチルグアニン、２－プロピルグアニン、２－プロピルアデニン、２－チオウラシル、２－チオチミン、２－チオシトシン、１５－ハロウラシル、１５－ハロシトシン、５－プロピニルウラシル、５－プロピニルシトシン、６－アゾウラシル、６－アゾシトシン、６－アゾチミン、５－ウラシル、４－チオウラシル、８－ハロアデニン又はグ

アニン、８－アミノアデニン又はグアニン、８－チオールアデニン又はグアニン、８－チオアルキルアデニン又はグアニン、８－ヒドロキシルアデニン又はグアニン、５－ハロ置換ウラシル又はシトシン、７－メチルグアニン、７－メチルアデニン、８－アザグアニン、８－アザアデニン、７－デアザグアニン、７－デアザアデニン、３－デアザグアニン、３－デアザアデニンなどが含まれる。当技術において公知のとおり、ある特定のヌクレオチドアナログは、ポリヌクレオチド、例えば、アデノシン５’－ホスホスルフェートなどのヌクレオチドアナログに組み込まれた状態にはなり得ない。ヌクレオチドは、任意の好適な数のホスフェート、例えば、３、４、５、６、又は６を超えるホスフェートを含み得る。ヌクレオチド類似体には、ロック核酸（ＬＮＡ）、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、及び５－ヒドロキシルブチニル－２’－デオキシウリジン（「スーパーＴ」）も含まれる。

【０２８４】

本明細書で使用される場合、用語「ポリヌクレオチド」とは、相互に結合しているヌクレオチドの配列を含む分子を指す。ポリヌクレオチドは、ポリマーの非限定的な一例である。ポリヌクレオチドの例としては、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）、リボ核酸（ＲＮＡ）、並びにロック核酸（ＬＮＡ）及びペプチド核酸（ＰＮＡ）などの、それらの類似体が挙げられる。ポリヌクレオチドは、ＲＮＡ又は一本鎖ＤＮＡなどのヌクレオチドの一本鎖配列であり得、二本鎖ＤＮＡなどのヌクレオチドの二本鎖配列であるか、又はヌクレオチドの一本鎖及び二本鎖配列の混合物を含み得る。二本鎖ＤＮＡ（double stranded DNA、ｄｓＤＮＡ）は、ゲノムＤＮＡ、及びＰＣＲ及び増幅生成物を含む。一本鎖ＤＮＡ（single stranded DNA、ｓｓＤＮＡ）は、ｄｓＤＮＡに変換され得、その反対もあり得る。ポリヌクレオチドには、エナンチオマーＤＮＡ、ＬＮＡ、又はＰＮＡなどの非自然発生ＤＮＡが含まれ得る。ポリヌクレオチド中のヌクレオチドの正確な配列は、既知であっても未知であってもよい。以下は、ポリヌクレオチドの例である：遺伝子又は遺伝子断片（例えば、プローブ、プライマー、発現配列タグ（expressed sequence tag、ＥＳＴ）、又は遺伝子発現連続分析（serial analysis of gene expression、ＳＡＧＥ）タグ）、ゲノムＤＮＡ、ゲノムＤＮＡ断片、エクソン、イントロン、メッセンジャーＲＮＡ（messenger RNA、ｍＲＮＡ）、転移ＲＮＡ、リボソームＲＮＡ、リボザイム、ｃＤＮＡ、組換えポリヌクレオチド、合成ポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、いかなる配列の単離されたＤＮＡ、いかなる配列の単離されたＲＮＡ、核酸プローブ、前述のいずれかのプライマー又は増幅されたコピー。

【０２８５】

本明細書で使用される場合、「ポリメラーゼ」は、ヌクレオチドをポリヌクレオチドに重合することによってポリヌクレオチドを組み立てる活性部位を有する酵素を意味することが意図される。ポリメラーゼは、プライミングされた一本鎖標的ポリヌクレオチドに結合し、ヌクレオチドをプライマーに連続的に付加して成長させ、標的ポリヌクレオチドの配列に相補的な配列を有する「相補的コピー」ポリヌクレオチドを形成することができる。次いで、別のポリメラーゼ、又は同じポリメラーゼは、その相補的コピーポリヌクレオチドの相補的コピーを形成することによって、標的ヌクレオチドのコピーを形成することができる。かかるコピーのいずれも、本明細書では「アンプリコン」と称され得る。ＤＮＡポリメラーゼは、標的ポリヌクレオチドに結合し、次いで、ヌクレオチドを、ポリヌクレオチド鎖の３’末端の遊離ヒドロキシル基に連続的に付加して成長させ（アンプリコン成長）つつ、標的ポリヌクレオチドを下流へ移動することができる。ＤＮＡポリメラーゼは、ＤＮＡ鋳型から相補的ＤＮＡ分子を合成し得、ＲＮＡポリメラーゼは、ＤＮＡ鋳型からＲＮＡ分子を合成し得る（転写）。ポリメラーゼは、短いＲＮＡ又はＤＮＡ鎖（プライマー）を使用して、鎖成長を開始し得る。いくつかのポリメラーゼは、それらが鎖に塩基を付加する部位の上流の鎖を置換し得る。かかるポリメラーゼは、鎖置換であるとも言われ得、これは、ポリメラーゼによって読み取られる鋳型鎖から相補鎖を除去する活性を有すると言われ得る。

【０２８６】

ポリメラーゼの例としては、Ｂｓｔ　ＤＮＡポリメラーゼ、９°Ｎｍ　ＤＮＡポリメラ

ーゼ、Ｐｈｉ２９　ＤＮＡポリメラーゼ、ＤＮＡポリメラーゼＩ（大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ））、ＤＮＡポリメラーゼＩ（Ｌａｒｇｅ）、（クレノウ）断片、クレノウ断片（３’－５’ｅｘｏ－）、Ｔ４　ＤＮＡポリメラーゼ、Ｔ７　ＤＮＡポリメラーゼ、Ｄｅｅｐ　ＶｅｎｔＲ（商標）（ｅｘｏ－）ＤＮＡポリメラーゼ、Ｄｅｅｐ　ＶｅｎｔＲ（商標）ＤＮＡポリメラーゼ、ＤｙＮＡｚｙｍｅ（商標）ＥＸＴ　ＤＮＡ、ＤｙＮＡｚｙｍｅ（商標）ＩＩ　Ｈｏｔ　Ｓｔａｒｔ　ＤＮＡポリメラーゼ、Ｐｈｕｓｉｏｎ（商標）Ｈｉｇｈ－Ｆｉｄｅｌｉｔｙ　ＤＮＡポリメラーゼ、Ｔｈｅｒｍｉｎａｔｏｒ（商標）ＤＮＡポリメラーゼ、Ｔｈｅｒｍｉｎａｔｏｒ（商標）ＩＩ　ＤＮＡポリメラーゼ、ＶｅｎｔＲ（登録商標）ＤＮＡポリメラーゼ、ＶｅｎｔＲ（商標）（ｅｘｏ－）ＤＮＡポリメラーゼ、ＲｅｐｌｉＰＨＩ（商標）Ｐｈｉ２９　ＤＮＡポリメラーゼ、ｒＢｓｔ　ＤＮＡポリメラーゼ、ｒＢｓｔ　ＤＮＡポリメラーゼ（Ｌａｒｇｅ）、断片（ＩｓｏＴｈｅｒｍ（商標）ＤＮＡポリメラーゼ）、ＭａｓｔｅｒＡｍｐ（商標）ＡｍｐｌｉＴｈｅｒｍ（商標）ＤＮＡポリメラーゼ、Ｔａｑ　ＤＮＡポリメラーゼ、Ｔｔｈ　ＤＮＡポリメラーゼ、Ｔｆｌ　ＤＮＡポリメラーゼ、Ｔｇｏ　ＤＮＡポリメラーゼ、ＳＰ６　ＤＮＡポリメラーゼ、Ｔｂｒ　ＤＮＡポリメラーゼ、ＤＮＡポリメラーゼベータ、及びＴｈｅｒｍｏＰｈｉ　ＤＮＡポリメラーゼが挙げられる。特定の非限定的な例では、ポリメラーゼは、Ｂｓｔ、Ｂｓｕ、及びＰｈｉ２９からなる群から選択される。ポリメラーゼはハイブリダイズした鎖を伸長させるので、一本鎖結合タンパク質（ＳＳＢ）を含むことが有益であり得る。ＳＳＢは、置換された（非鋳型）鎖を安定化し得る。鎖置換活性を有する例示的なポリメラーゼとしては、Ｖｅｎｔポリメラーゼ、Ｂｓｕポリメラーゼ、Ｂｓｔ（バチルス・ステアロサーモフィルス（Bacillus stearothermophilus））ポリメラーゼ、ｅｘｏ－クレノウポリメラーゼ又は配列決定グレードＴ７エキソ－ポリメラーゼの大きな断片が含まれるが、これらに限定されない。いくつかのポリメラーゼは、それらの前の鎖を切断し、それを成長する鎖に効果的に置き換える（５’エキソヌクレアーゼ活性）。５’エキソヌクレアーゼ活性を有するポリメラーゼの例としては、Ｔａｑ、Ｂｓｔ、及びＤＮＡポリメラーゼＩが挙げられる。いくつかのポリメラーゼは、その後ろの鎖を分解する活性（３’エキソヌクレアーゼ活性）を有する。いくつかの有用なポリメラーゼは、３’及び／又は５’エキソヌクレアーゼ活性を低減又は排除するために変異又は他の方法で修飾されている。ポリメラーゼは、逆転写酵素（ＲＴ）を含み得る。ＲＴの非限定的な例としては、ＭＭＬＶ及びその変異体、例えば、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる、Ａｎｚａｌｏｎｅ　ｅｔ　ａｌ．，「Ｓｅａｒｃｈ－ａｎｄ－ｒｅｐｌａｃｅ　ｇｅｎｏｍｅ　ｅｄｉｔｉｎｇ　ｗｉｔｈｏｕｔ　ｄｏｕｂｌｅ－ｓｔｒａｎｄ　ｂｒｅａｋｓ　ｏｒ　ｄｏｎｏｒ　ＤＮＡ」，Ｎａｔｕｒｅ　５７６：１４９－１５７（２０１９）に記載されているものが挙げられる。

【０２８７】

本明細書で使用される場合、「プライマー」という用語は、ヌクレオチドが遊離３’ＯＨ基を介して付加され得るポリヌクレオチドとして定義される。プライマーは、ブロックが除去されるまで重合を防止する３’ブロックを含み得る。プライマーは、カップリング反応を可能にするか、又はプライマーを別の部分にカップリングすることを可能にするための、５’末端の修飾を含み得る。プライマーは、例えば、ＵＶ光、化学物質、酵素などの適切な条件下で切断され得る、８－オキソ－Ｇなどの１つ以上の部分を含み得る。プライマーの長さは、任意の好適な数の塩基の長さであり得、天然及び／又は非天然ヌクレオチドの好適な組み合わせを含み得る。標的ポリヌクレオチドは、プライマーにハイブリダイズする（プライマーに相補的な配列を有する）「増幅アダプター」又はより単純には「アダプター」を含み得、プライマーの遊離３’ＯＨ基にヌクレオチドを付加することによって相補的コピーポリヌクレオチドを生成するように増幅され得る。「捕捉プライマー」は、基材に結合し、標的ポリヌクレオチドの第１のアダプターにハイブリダイズし得るプライマーを意味することが意図され、「直交捕捉プライマー」は、基材に結合し、その標的ポリヌクレオチドの第２のアダプターにハイブリダイズし得るプライマーを意味することが意図される。第１のアダプターは、捕捉プライマーの配列と相補的な配列を有し得、

第２のアダプターは、直交捕捉プライマーのものと相補的な配列を有し得る。捕捉プライマー及び直交捕捉プライマーは、互いに異なる独立した配列を有し得る。更に、捕捉プライマー及び直交捕捉プライマーは、少なくとも１つの他の特性において互いに異なり得る。例えば、捕捉プライマー及び直交捕捉プライマーは、互いに異なる長さを有し得、該捕捉プライマー又は該直交捕捉プライマーのいずれかは、該捕捉プライマー又は該直交捕捉プライマーの他方が有しない非核酸部分（遮断基又は除去部分など）を含み得、又はかかる特性の任意の好適な組み合わせを含み得る。修飾された捕捉プライマーは、限定されないが、ＤＮＡなどの複数の天然に存在する核酸を更に含み得る。

【０２８８】

いくつかの例では、捕捉プライマーは、Ｉｌｌｕｍｉｎａ，Ｉｎｃ．から市販されているＰ５又はＰ７プライマーである。Ｐ５及びＰ７プライマーは、互いに直交するプライマーの非限定的な例である。Ｐ５及びＰ７プライマー配列は、いくつかの例では、以下の配列を有し得る：

ペアリードセット：

Ｐ５：５’－ＡＡＴＧＡＴＡＣＧＧＣＧＡＣＣＡＣＣＧＡＧＡＵＣＴＡＣＡＣ－３’（配列番号１）

Ｐ７：５’－ＣＡＡＧＣＡＧＡＡＧＡＣＧＧＣＡＴＡＣＧＡＧ*ＡＴ－３’（配列番号２）

単一リードセット：

Ｐ５：５’－ＡＡＴＧＡＴＡＣＧＧＣＧＡＣＣＡＣＣＧＡ－３’（配列番号３）

Ｐ７：５’－ＣＡＡＧＣＡＧＡＡＧＡＣＧＧＣＡＴＡＣＧＡ３’（配列番号４）

式中、Ｇ*は、Ｇ又は８－オキソグアニンである。

【０２８９】

本明細書で使用するとき、用語「複数の」とは、２つ以上の異なるメンバーの集団を意味することを意図する。複数とは、小さい、中程度、大きい、から非常に大きいサイズまでの範囲であり得る。小さいサイズの複数とは、例えば、数メンバー～数十メンバーの範囲であり得る。中程度のサイズの複数とは、例えば、数十メンバー～約１００メンバー又は数百メンバーの範囲であり得る。大きい複数とは、例えば、約数百メンバー～約１０００メンバー、数千メンバー、及び数万メンバーの範囲であり得る。非常に大きな複数とは、例えば、数万メンバー～約数十万、数百万、数千万、又は数億以上のメンバーの範囲であり得る。したがって、複数は、２から１億をはるかに超えるメンバーのサイズの範囲、並びにメンバーの数によって測定される全てのサイズの間及び上記の例示的な範囲よりも大きい範囲であり得る。複数のポリヌクレオチドの例としては、例えば、約1×10^{5}以上、5×10^{5}以上又は1×10^{6}以上の異なるポリヌクレオチドの集団が挙げられる。したがって、この用語の定義は、２より大きい全ての整数値を含むことが意図される。複数値の上限は、例えば、サンプル中のポリヌクレオチド配列の理論的多様性によって設定され得る。

【０２９０】

本明細書で使用される場合、「二本鎖」という用語は、ポリヌクレオチドに関して使用される場合、ポリヌクレオチド中のヌクレオチドの全て又は実質的に全てが、相補的ポリヌクレオチド内のそれぞれのヌクレオチドに水素結合していることを意味することが意図される。二本鎖ポリヌクレオチドは「二重鎖」とも称され得る。本明細書で使用される場合、「一本鎖」という用語は、ポリヌクレオチドに関して使用される場合、ポリヌクレオチド中のヌクレオチドのいずれも、相補的ポリヌクレオチド中のそれぞれのヌクレオチドに水素結合していないことを意味する。

【０２９１】

本明細書で使用される場合、「標的ポリヌクレオチド」という用語は、分析又は作用の対象となるポリヌクレオチドを意味することが意図され、「ライブラリーポリヌクレオチド」、「鋳型ポリヌクレオチド」、又は「ライブラリーテンプレート」などの用語を使用しても参照され得る。分析又は作用としては、ポリヌクレオチドを捕捉、増幅、配列決定

、及び／又は他の手順に供することが挙げられる。標的ポリヌクレオチドは、分析される標的配列に追加のヌクレオチド配列を含み得る。例えば、標的ポリヌクレオチドは、プライマー結合部位として機能する増幅アダプターを含む１つ以上のアダプターを含み得、それは、分析される標的ポリヌクレオチド配列の側方にある（flank）。捕捉プライマーにハイブリダイズした標的ポリヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチドの全てが伸長に適さないように、捕捉オリゴヌクレオチドの５’又は３’末端を超えて伸長するヌクレオチドを含み得る。特定の例では、複数の標的ポリヌクレオチドは、互いに異なる配列を有し得るが、互いに同じである第１及び第２のアダプターを有し得る。特定の標的ポリヌクレオチド配列に隣接し得る２つのアダプターは、互いに同じ配列、又は互いに相補的配列を有し得るか、又は２つのアダプターは、異なる配列を有し得る。したがって、複数の標的ポリヌクレオチド中の種は、例えば、配列決定（例えば、ＳＢＳ）によって評価される未知の配列領域が隣接した、既知の配列領域を含み得る。いくつかの例では、標的ポリヌクレオチドは、単一の末端で増幅アダプターを担持し、かかるアダプターは、標的ポリヌクレオチドの３’末端又は５’末端のいずれかに位置し得る。標的ポリヌクレオチドは、アダプターなしで使用され得、その場合、プライマー結合配列は、標的ポリヌクレオチドに存在する配列を直接用い得る。

【０２９２】

「ポリヌクレオチド」及び「オリゴヌクレオチド」という用語は、本明細書においては交換可能に使用される。用語の違いは、特に明記しない限り、サイズ、配列、又は他の特性の任意の特定の違いを示すことを意図するものではない。説明を明確にするために、いくつかのポリヌクレオチド種を含む特定の方法又は組成物を説明する際に、１つの種のポリヌクレオチドを別の種と区別するために用語を使い分けてもよい。

【０２９３】

「配列」及び「部分配列」という用語は、場合によっては、本明細書で交換可能に使用され得る。例えば、配列は、その中に１つ以上の部分配列を含み得る。かかる部分配列の各々は、配列とも称され得る。

【０２９４】

本明細書で使用するとき、用語「アンプリコン」は、ポリヌクレオチドに関して使用する場合、ポリヌクレオチドの複製による生成物を意味し、この生成物は、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列の少なくとも一部と実質的に同じ又は実質的に相補的なヌクレオチド配列を有する。「増幅」及び「増幅すること」は、ポリヌクレオチドのアンプリコンを作製するプロセスを指す。標的ポリヌクレオチドの第１のアンプリコンは、典型的には相補的なコピーであり得る。追加的なアンプリコンは、第１のアンプリコンの生成後に、標的ポリヌクレオチド又は第１のアンプリコンから作成されたコピーである。後続のアンプリコンは、標的ポリヌクレオチドと実質的に相補的であるか、又は標的ポリヌクレオチドと実質的に同一である配列を有し得る。ポリヌクレオチドの（例えば、増幅アーチファクトによる）少数の変異が、そのポリヌクレオチドのアンプリコンを生成するときに起こり得ることは理解されるであろう。

【０２９５】

本明細書で使用される場合、「保護要素」という用語は、ポリヌクレオチドの５’末端又は３’末端に関して使用される場合、ポリヌクレオチドの末端の改変を阻害するエレメントを意味することが意図される。例示的に、保護要素は、５’又は３’エキソヌクレアーゼの作用など、ポリヌクレオチドの末端における１つ以上の酵素の作用を阻害し得る。保護要素の非限定的な例としては、二本鎖ポリヌクレオチドの末端の５’鎖及び３’鎖にライゲーションされたヘアピン配列、修飾塩基（例えば、ホスホロチオエート結合又は３’リン酸を含む）、又は脱リン酸化塩基が挙げられる。

【０２９６】

本明細書で使用される場合、「ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステム」、「Ｃａｓ－ｇＲＮＡリボ核タンパク質」、及びＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰなどの用語は、標的ポリヌクレオチド中の配列に相補的又は実質的に相補的なオリゴヌクレオチド配列を含むガイドＲＮＡ（

ｇＲＮＡ）配列と、Ｃａｓタンパク質とを含む酵素系を指す。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムは、一般に、コアエレメント含量及び配列に基づいて、更に１０のサブタイプに細分される３つの主要なタイプに分類することができる；例えば、Ｍａｋａｒｏｖａ ｅｔ ａｌ．，「Ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ ａｎｄ ｃｌａｓｓｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ ｓｙｓｔｅｍｓ，」Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．９（６）：４６７－４７７（２０１１）参照。Ｃａｓタンパク質は、様々な活性、例えばヌクレアーゼ活性を有し得る。したがって、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムは、（例えば、ｇＲＮＡを介して）特定の配列を標的化するための機構、並びに（例えば、Ｃａｓタンパク質を介して）配列に対するある特定の酵素活性を提供する。

【０２９７】

Ｉ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムは、別個のヘリカーゼ活性及びＤＮａｓｅ活性を有するＣａｓ３タンパク質を含み得る。例えば、１－Ｅ型システムにおいて、ｃｒＲＮＡは、カスケード（抗ウイルス防御のためのＣＲＩＳＰＲ関連複合体）と呼ばれるマルチサブユニットエフェクター複合体に組み込まれ、これは、標的ＤＮＡに結合し、Ｃａｓ３タンパク質による分解を誘発する；例えば、Ｂｒｏｕｎｓ ｅｔ ａｌ．，「Ｓｍａｌｌ ＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡｓ ｇｕｉｄｅ ａｎｔｉｖｉｒａｌ ｄｅｆｅｎｓｅ ｉｎ ｐｒｏｋａｒｙｏｔｅｓ」，Ｓｃｉｅｎｃｅ ３２１（５８９１）：９６０－９６４（２００８）；Ｓｉｎｋｕｎａｓ ｅｔ ａｌ．，「Ｃａｓ３ ｉｓ ａ ｓｉｎｇｌｅ－ｓｔｒａｎｄｅｄ ＤＮＡ ｎｕｃｌｅａｓｅ ａｎｄ ＡＴＰ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ ｈｅｌｉｃａｓｅ ｉｎ ｔｈｅ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ ｉｍｍｕｎｅ ｓｙｓｔｅｍ」，ＥＭＢＯ Ｊ ３０：１３３５－１３４２（２０１１）；及びＢｅｌｏｇｌａｚｏｖａ ｅｔ ａｌ．，「Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ａｎｄ ａｃｔｉｖｉｔｙ ｏｆ ｔｈｅ Ｃａｓ３ ＨＤ ｎｕｃｌｅａｓｅ ＭＪ０３８４，ａｎ ｅｆｆｅｃｔｏｒ ｅｎｚｙｍｅ ｏｆ ｔｈｅ ＣＲＩＳＰＲ ｉｎｔｅｒｆｅｒｅｎｃｅ」，ＥＭＢＯ Ｊ ３０：４６１６－４６２７（２０１１）を参照されたい。ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムは、ｃｒＲＮＡを生成して標的ＤＮＡを切断することができる単一タンパク質（約１６０ＫＤａ）である、シグネチャーＣａｓ９タンパク質を含む。Ｃａｓ９タンパク質は、典型的には、２つのヌクレアーゼドメインである、アミノ末端付近のＲｕｖＣ様ヌクレアーゼドメインと、タンパク質の中央付近のＨＮＨ（又はＭｃｒＡ様）ヌクレアーゼドメインとを含む。Ｃａｓ９タンパク質の各ヌクレアーゼドメインは、二重らせんの一方の鎖を切断するように特殊化されている；例えば、Ｊｉｎｅｋ ｅｔ ａｌ．，「Ａ ｐｒｏｇｒａｍｍａｂｌｅ ｄｕａｌ－ＲＮＡ－ｇｕｉｄｅｄ ＤＮＡ ｅｎｄｏｎｕｃｌｅａｓｅ ｉｎ ａｄａｐｔｉｖｅ ｂａｃｔｅｒｉａｌ ｉｍｍｕｎｉｔｙ」，Ｓｃｉｅｎｃｅ ３３７（６０９６）：８１６－８２１（２０１２）を参照されたい。ＩＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムは、ポリメラーゼ及びＲＡＭＰモジュールを含む。ＩＩＩ型システムは、ＩＩＩ－Ａ及びＩＩＩ－Ｂのサブタイプに更に分けることができる。ＩＩＩ－Ａ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムは、プラスミドを標的化することが示されており、ＩＩＩ－Ａ型システムのポリメラーゼ様タンパク質は、標的ＤＮＡの切断に関与する；例えば、Ｍａｒｒａｆｆｉｎｉ ｅｔ ａｌ．，「ＣＲＩＳＰＲ ｉｎｔｅｒｆｅｒｅｎｃｅ ｌｉｍｉｔｓ ｈｏｒｉｚｏｎｔａｌ ｇｅｎｅ ｔｒａｎｓｆｅｒ ｉｎ Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｉ ｂｙ ｔａｒｇｅｔｉｎｇ ＤＮＡ」，Ｓｃｉｅｎｃｅ ３２２（５９０９）：１８４３－１８４５ （２００８）を参照されたい。ＩＩＩ－Ｂ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムもまた、ＲＮＡを標的化することが示されている；例えば、Ｈａｌｅ ｅｔ ａｌ．，「ＲＮＡ－ｇｕｉｄｅｄ ＲＮＡ ｃｌｅａｖａｇｅ ｂｙ ａ ＣＲＩＳＰＲ－ＲＮＡ－Ｃａｓ ｐｒｏｔｅｉｎ ｃｏｍｐｌｅｘ」，Ｃｅｌｌ １３９（５）：９４５－９５６（２００９）を参照されたい。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムは、天然に存在するＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムに由来する操作された及び／又はプログラムされたヌクレアーゼ系を含む。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムは、操作された及び／又は変異したＣａｓタンパク質を含み得る。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムは、操作された及び／又はプログラムされたガイドＲＮＡを含み得る。

【０２９８】
いくつかの具体例では、本発明のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つにおけるＣａｓタンパク質は、Ｃａｓ９、又はｇＲＮＡが相補的である配列で標的ポリヌクレオチドを切断することができる他の適切なＣａｓを、以下の参照文献に記載されているような方法で含むことができ、それらの各々の全内容は参照により本明細書に組み込まれる：Ｎａｃｈｍａｎｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，「Ｔａｒｇｅｔｅｄ　ｇｅｎｏｍｅ　ｆｒａｇｍｅｎｔａｔｉｏｎ　ｗｉｔｈ　ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９　ｅｎａｂｌｅｓ　ｆａｓｔ　ａｎｄ　ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ　ｅｎｒｉｃｈｍｅｎｔ　ｏｆ　ｓｍａｌｌ　ｇｅｎｏｍｉｃ　ｒｅｇｉｏｎｓ　ａｎｄ　ｕｌｔｒａ－ａｃｃｕｒａｔｅ　ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ　ｗｉｔｈ　ｌｏｗ　ＤＮＡ　ｉｎｐｕｔ（ＣＲＩＳＰＲ－ＤＳ）」，Ｇｅｎｏｍｅ　Ｒｅｓ．２８（１０）：１５８９－１５９９　（２０１８）；Ｖａｋｕｌｓｋａｓ　ｅｔ　ａｌ．，「Ａ　ｈｉｇｈ－ｆｉｄｅｌｉｔｙ　Ｃａｓ９　ｍｕｔａｎｔ　ｄｅｌｉｖｅｒｅｄ　ａｓ　ａ　ｒｉｂｏｎｕｃｌｅｏｐｒｏｔｅｉｎ　ｃｏｍｐｌｅｘ　ｅｎａｂｌｅｓ　ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ　ｇｅｎｅ　ｅｄｉｔｉｎｇ　ｉｎ　ｈｕｍａｎ　ｈｅｍａｔｏｐｏｉｅｔｉｃ　ｓｔｅｍ　ａｎｄ　ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ　ｃｅｌｌｓ」，Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ　２４：１２１６－１２２４　（２０１８）；Ｃｈａｔｔｅｒｊｅｅ　ｅｔ　ａｌ．，「Ｍｉｎｉｍａｌ　ＰＡＭ　ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ　ｏｆ　ａ　ｈｉｇｈｌｙ　ｓｉｍｉｌａｒ　ＳｐＣａｓ９　ｏｒｔｈｏｌｏｇ」，Ｓｃｉｅｎｃｅ　Ａｄｖａｎｃｅｓ　４（１０）：ｅａａｕ０７６６，１－１０　（２０１８）；Ｌｅｅ　ｅｔ　ａｌ．，「ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｐ：ｍｕｌｔｉｐｌｅｘｅｄ　ｄｏｕｂｌｅ－ｓｔｒａｎｄｅｄ　ＤＮＡ　ｅｎｒｉｃｈｍｅｎｔ　ｂａｓｅｄ　ｏｎ　ｔｈｅ　ＣＲＩＳＰＲ　ｓｙｓｔｅｍ」，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　４７（１）：１－１３　（２０１９）。Ｓ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムから単離されたＣａｓ９－ｃｒＲＮＡ複合体、並びに、別個の構成要素からインビトロで組み合わされた複合体は、それが合成オリゴデオキシヌクレオチド及びｃｒＲＮＡに相補的なヌクレオチド配列を有するプラスミドＤＮＡの両方に結合することが実証される。Ｃａｓ９は、ＲｕｖＣ及びＨＮＨ活性部位／ヌクレアーゼドメインの２つのヌクレアーゼドメインを有し、これらの２つのヌクレアーゼドメインは、反対のＤＮＡ鎖の切断に関与することが示されている。いくつかの例では、Ｃａｓ９タンパク質は、Ｓ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムのタンパク質に由来する。いくつかの例では、Ｃａｓ９タンパク質は、約１，４０９アミノ酸残基を有するマルチドメインタンパク質である。

【０２９９】
他の例では、Ｃａｓは、ｇＲＮＡが相補的である配列で標的ポリヌクレオチドを切断しないように、例えば、以下の参照文献に記載されているような方法で操作されてもよく、それらの各々の全内容は参照により本明細書に組み込まれる：Ｇｕｉｌｉｎｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，「Ｆｕｓｉｏｎ　ｏｆ　ｃａｔａｌｙｔｉｃａｌｌｙ　ｉｎａｃｔｉｖｅ　Ｃａｓ９　ｔｏ　Ｆｏｋｌ　ｎｕｃｌｅａｓｅ　ｉｍｐｒｏｖｅｓ　ｔｈｅ　ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ　ｏｆ　ｇｅｎｏｍｅ　ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ」，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　３２：５７７－５８２（２０１４）；Ｂｈａｔｔ　ｅｔ　ａｌ．，「Ｔａｒｇｅｔｅｄ　ＤＮＡ　ｔｒａｎｓｐｏｓｉｔｉｏｎ　ｕｓｉｎｇ　ａ　ｄＣａｓ９－ｔｒａｎｓｐｏｓａｓｅ　ｆｕｓｉｏｎ　ｐｒｏｔｅｉｎ」，ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１１０１／５７１６５３，ｐａｇｅｓ　１－８９　（２０１９）；Ｘｕ　ｅｔ　ａｌ．，「ＣＲＩＳＰＲ－ａｓｓｉｓｔｅｄ　ｔａｒｇｅｔｅｄ　ｅｎｒｉｃｈｍｅｎｔ－ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ　（ＣＡＴＥ－ｓｅｑ）」，ａｖａｉｌａｂｌｅ　ａｔ　ＵＲＬ　ｗｗｗ．ｂｉｏｒｘｉｖ．ｏｒｇ／ｃｏｎｔｅｎｔ／１０．１１０１／６７２８１６ｖ１，１－３０　（２０１９）；及びＴｉｊａｎ　ｅｔ　ａｌ．，「ｄＣａｓ９－ｔａｒｇｅｔｅｄ　ｌｏｃｕｓ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ　ｐｒｏｔｅｉｎ　ｉｓｏｌａｔｉｏｎ　ｍｅｔｈｏｄ　ｉｄｅｎｔｉｆｉｅｓ　ｈｉｓｔｏｎｅ　ｇｅｎｅ　ｒｅｇｕｌａｔｏｒｓ」，ＰＮＡＳ　１１５（１２）：Ｅ２７３４－Ｅ２７４１　（２０１８）。ヌクレアーゼ活性を欠くＣａｓは、不活性化Ｃａｓ（ｄＣａｓ）と称され得る。いくつかの例

では、ｄＣａｓは、ＲｕｖＣ及びＨＮＨ活性部位／ヌクレアーゼドメインの両方が変異している、Ｃａｓ９タンパク質のヌクレアーゼ欠損バリアントを含み得る。Ｃａｓ９タンパク質のヌクレアーゼ欠損変異体（ｄＣａｓ９）は、二本鎖ＤＮＡに結合するが、ＤＮＡを切断しない。Ｃａｓ９タンパク質の別の変異体は、ｃｒＲＮＡに相補的な鎖を切断するドメイン中の第１の突然変異と、ｃｒＲＮＡに非相補的な鎖を切断するドメイン中の第２の突然変異とを有する、２つの不活性化ヌクレアーゼドメインを有する。いくつかの例では、Ｃａｓ９タンパク質は、第１の突然変異Ｄ１０Ａ及び第２の突然変異Ｈ８４０Ａを有する。

【０３００】

更に他の例では、Ｃａｓタンパク質は、Ｃａｓｃａｄｅタンパク質を含む。大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）のカスケード複合体は、配列特異的に二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）標的を認識する。大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）のカスケード複合体は、５つの機能的に必須のＣＲＩＳＰＲ関連（Ｃａｓ）タンパク質（ＣａｓＡ１Ｂ２Ｃ６Ｄ１Ｅ１、カスケードタンパク質とも呼ばれる）と６１ヌクレオチドのｃｒＲＮＡとを含む、４０５ｋＤａの複合体である。ｃｒＲＮＡは、相補的ＤＮＡ鎖と塩基対を形成する一方で、非相補鎖を置換してＲループを形成することによって、カスケード複合体をｄｓＤＮＡ標的配列に誘導する。カスケードは、ＡＴＰを消費することなく標的ＤＮＡを認識し、これは、連続的なインベーダーＤＮＡ監視がエネルギー投資なしに行われることを示唆する；例えば、Ｍａｔｔｈｉｊｓ ｅｔ ａｌ．，「Ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ ｂａｓｉｓ ｆｏｒ ＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡ－ｇｕｉｄｅｄ ＤＮＡ ｒｅｃｏｇｎｉｔｉｏｎ ｂｙ Ｃａｓｃａｄｅ」，Ｎａｔｕｒｅ Ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ ＆ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ １８（５）：５２９－５３６（２０１１）を参照されたい。更に他の例では、Ｃａｓタンパク質は、Ｃａｓ３タンパク質を含む。例示的に、大腸菌（E.coli）Ｃａｓ３は、ＲＮＡとＤＮＡとのＡＴＰ非依存的アニーリングを触媒して、Ｒループ、及びＲＮＡ塩基対のハイブリッドを二本鎖ＤＮＡに形成し得る。Ｃａｓ３タンパク質は、Ｃａｓ９よりも長いｇＲＮＡを使用し得る；例えば、Ｈｏｗａｒｄ ｅｔ ａｌ．，「Ｈｅｌｉｃａｓｅ ｄｉｓａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ ａｎｄ ａｎｎｅａｌｉｎｇ ｏｆ ＲＮＡ－ＤＮＡ ｈｙｂｒｉｄｓ ｂｙ Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ Ｃａｓ３ ｐｒｏｔｅｉｎ」，Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｊ．４３９（１）：８５－９５（２０１１）を参照されたい。そのようなより長いｇＲＮＡは、標的ＤＮＡへの他のエレメントのより容易なアクセス、例えば、ポリメラーゼによって伸長されるプライマーのアクセスを可能にし得る。Ｃａｓ３タンパク質によって提供される別の特徴は、Ｃａｓ３タンパク質がＣａｓ９のようにＰＡＭ配列を必要とせず、したがって、所望の配列を標的化するためにより高い柔軟性を提供することである。Ｃａｓ３によるＲループ形成は、補因子としてマグネシウムを利用し得る；例えば、Ｈｏｗａｒｄ ｅｔ ａｌ．，「Ｈｅｌｉｃａｓｅ ｄｉｓａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ ａｎｄ ａｎｎｅａｌｉｎｇ ｏｆ ＲＮＡ－ＤＮＡ ｈｙｂｒｉｄｓ ｂｙ Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ Ｃａｓ３ ｐｒｏｔｅｉｎ」，Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｊ．４３９（１）：８５－９５（２０１１）を参照されたい。ＰＡＭ配列の必要性を低減又は回避するＣａｓ９バリアントも開発されている；例えば、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる、Ｗａｌｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，「Ｕｎｃｏｎｓｔｒａｉｎｅｄ ｇｅｎｏｍｅ ｔａｒｇｅｔｉｎｇ ｗｉｔｈ ｎｅａｒ ＰＡＭｌｅｓｓ ｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９ ｖａｒｉａｎｔｓ」，Ｓｃｉｅｎｃｅ ３６８（６４８８）：２９０－２９６（２０２０）を参照されたい。カチオンなどの任意の適切な補因子が、本発明の組成物及び方法において使用されるＣａｓタンパク質と一緒に使用され得ることが理解されるであろう。

【０３０１】

二本鎖ポリヌクレオチドを破壊し、ループ構造を作り出すことができる任意のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムが使用され得ることも理解されるべきである。例えば、Ｃａｓタンパク質としては、以下の参考文献に記載されているようなＣａｓタンパク質を挙げることができるが、これらに限定されず、それらの各々の全内容は参照により本明細書に組み込

まれる：Ｈａｆｔ ｅｔ ａｌ．，「Ａ ｇｕｉｌｄ ｏｆ ４５ ＣＲＩＳＰＲ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ（Ｃａｓ）ｐｒｏｔｅｉｎ ｆａｍｉｌｉｅｓ ａｎｄ ｍｕｌｔｉｐｌｅ ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ ｓｕｂｔｙｐｅｓ ｅｘｉｓｔ ｉｎ ｐｒｏｋａｒｙｏｔｉｃ ｇｅｎｏｍｅｓ」，ＰＬｏＳ Ｃｏｍｐｕｔ Ｂｉｏｌ．１（６）：ｅ６０，１－１０（２００５）；Ｚｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，「Ｅｘｐａｎｄｉｎｇ ｔｈｅ ｃａｔａｌｏｇ ｏｆ ｃａｓ ｇｅｎｅｓ ｗｉｔｈ ｍｅｔａｇｅｎｏｍｅｓ」，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．４２（４）：２４４８－２４５９（２０１３）；及びＳｔｒｅｃｋｅｒ ｅｔ ａｌ．，「ＲＮＡ－ｇｕｉｄｅｄ ＤＮＡ ｉｎｓｅｒｔｉｏｎ ｗｉｔｈ ＣＲＩＳＰＲ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｔｒａｎｓｐｏｓａｓｅｓ」，Ｓｃｉｅｎｃｅ ３６５（６４４８）：４８－５３ （２０１９）（Ｃａｓタンパク質はＣａｓ１２ｋを含み得る）。これらのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムのいくつかは、標的配列を認識して結合するために特定の配列を利用し得る。例えば、Ｃａｓ９は、５’－ＮＧＧプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）の存在を利用し得る。

【０３０２】

いくつかの例では、Ｃａｓタンパク質は、例えば、１つ以上の塩基、例示的には２～５塩基のｄｓＤＮＡ切断後に一本鎖ＤＮＡオーバーハング領域を残すように選択され得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１２ａ（Ｃｐｆ１）は、Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ ＤＮＡ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ．（アイオワ州コーラルビル）から市販されている。製造業者によれば、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１２ａ（Ｃｐｆ１）は、５’オーバーハングを有するスタッガードカットを生成し、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９とは異なる部位を標的とし得る。いくつかの例では、５’オーバーハングは、５塩基長であり得る。これらのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系のいくつかは、ＰＡＭを利用し得る。例えば、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる、Ｔｅｎｇ ｅｔ ａｌ．，「Ｅｎｈａｎｃｅｄ ｍａｍｍａｌｉａｎ ｇｅｎｏｍｅ ｅｄｉｔｉｎｇ ｂｙ ｎｅｗ Ｃａｓ１２ａ ｏｒｔｈｏｌｏｇｓ ｗｉｔｈ ｏｐｔｉｍｉｚｅｄ ｃｒＲＮＡ ｓｃａｆｆｏｌｄｓ」，Ｇｅｎｏｍｅ Ｂｉｏｌｏｇｙ ２０：１５（２０１９）に記載されるような方法で、Ｃａｓ１２ａ（Ｃｐｆ１又はＣ２ｃ１）又はＦｎＣａｓ１２ａは、切断部位の上流のＴＴＴＮのＰＡＭを使用してもよいが、出現するＣａｓ１２ａオルソログは、低減されたＰＡＭ要件（例えば、ＹＴＮ）を有してもよい。Ｃａｓ１２は、Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｎｏｖｉｃｉｄａ、Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｓｐ．、及びＰｒｅｖｏｔｅｌｌａ ｓｐ．などの生物に由来し得る。Ｃａｓ１２ａに関する更なる詳細については、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｃｏｖｓｋｙ ｅｔ ａｌ．，「ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１２ａ ｅｘｐｌｏｉｔｓ Ｒ－ｌｏｏｐ ａｓｙｍｍｅｔｒｙ ｔｏ ｆｏｒｍ ｄｏｕｂｌｅ－ｓｔｒａｎｄ ｂｒｅａｋｓ」，ｅＬｉｆｅ，９：ｅ５５１４３（２０２０）を参照されたい。

【０３０３】

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムはまた、操作された及び／又はプログラムされたガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を含み得る。本明細書で使用されるとき、「ガイドＲＮＡ」及び「ｇＲＮＡ」（当該技術分野では単一ガイドＲＮＡ又はｓｇＲＮＡと呼ばれることもある）という用語は、標的ＤＮＡ配列の領域に相補的又は実質的に相補的であり、Ｃａｓタンパク質をその領域に誘導する配列を含むＲＮＡを意味することが意図される。ガイドＲＮＡは、標的ＤＮＡ配列の領域に相補的又は実質的に相補的であるヌクレオチド配列に加えて、ヌクレオチド配列を含み得る。ｇＲＮＡを設計するための方法は、当該技術分野において周知であり、非限定的な例は、以下の参考文献に提供されており、これらの各々の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる：Ｓｔｅｖｅｎｓ ｅｔ ａｌ．，「Ａ ｎｏｖｅｌ ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９ ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ｆｏｒ ｓｅｑｕｅｎｃｅ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｎｕｃｌｅｉｃ ａｃｉｄ ｅｎｒｉｃｈｍｅｎｔ」，ＰＬｏＳ ＯＮＥ １４（４）：ｅ０２１５４４１，ｐａｇｅｓ １－７（２０１９）；Ｆｕ ｅｔ ａｌ．，「Ｉｍｐｒｏｖｉｎｇ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ ｎｕｃｌｅａｓｅ ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ ｕｓｉｎｇ ｔｒｕｎｃａｔｅｄ ｇｕｉｄｅ ＲＮ

Ａｓ，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ３２（３）：２７９－２８４ （２０１４）；Ｋｏｃａｋ ｅｔ ａｌ．，「Ｉｎｃｒｅａｓｉｎｇ ｔｈｅ ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ ｏｆ ＣＲＩＳＰＲ ｓｙｓｔｅｍｓ ｗｉｔｈ ｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ ＲＮＡ ｓｅｃｏｎｄａｒｙ ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ」，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ３７：６５７－６６６ （２０１９）；Ｌｅｅ ｅｔ ａｌ．，「ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｐ：ｍｕｌｔｉｐｌｅｘｅｄ ｄｏｕｂｌｅ－ｓｔｒａｎｄｅｄ ＤＮＡ ｅｎｒｉｃｈｍｅｎｔ ｂａｓｅｄ ｏｎ ｔｈｅ ＣＲＩＳＰＲ ｓｙｓｔｅｍ」，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ４７（１）：ｅ１，１－１３ （２０１９）；Ｑｕａｎ ｅｔ ａｌ．，「ＦＬＡＳＨ：ａ ｎｅｘｔ－ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ＣＲＩＳＰＲ ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃ ｆｏｒ ｍｕｌｔｉｐｌｅｘｅｄ ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ｏｆ ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂｉａｌ ｒｅｓｉｓｔａｎｃｅ ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ」，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ４７（１４）：ｅ８３，１－９ （２０１９）；及びＸｕ ｅｔ ａｌ．，「ＣＲＩＳＰＲ－ａｓｓｉｓｔｅｄ ｔａｒｇｅｔｅｄ ｅｎｒｉｃｈｍｅｎｔ－ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ （ＣＡＴＥ－ｓｅｑ）」，ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１１０１／６７２８１６，１－３０ （２０１９）。

【０３０４】

いくつかの例では、ｇＲＮＡは、キメラ、例えば、トランス活性化ＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）に融合されたＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）を含む。そのようなキメラ単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）は、Ｊｉｎｅｋ ｅｔ ａｌ．，「Ａ ｐｒｏｇｒａｍｍａｂｌｅ ｄｕａｌ－ＲＮＡ－ｇｕｉｄｅｄ ｅｎｄｏｎｕｃｌｅａｓｅ ｉｎ ａｄａｐｔｉｖｅ ｂａｃｔｅｒｉａｌ ｉｍｍｕｎｉｔｙ」，Ｓｃｉｅｎｃｅ ３３７（６０９６）：８１６－８２１（２０１２）に記載されている。Ｃａｓタンパク質は、キメラｓｇＲＮＡによって、５’－ＮＧＧプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）が続く任意のゲノム遺伝子座に指向され得る。非限定的な一例において、ｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡは、Ｔ７プロモーターを含む合成二本鎖ＤＮＡ鋳型を使用して、インビトロ転写によって合成され得る。ｔｒａｃｒＲＮＡは固定配列を有してもよいが、標的配列はｃｒＲＮＡの配列の一部を決定してもよい。等モル濃度のｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡを混合し、５５℃で３０秒間加熱してもよい。Ｃａｓ９を３７℃にて同じモル濃度で添加し、ＲＮＡミックスと共に１０分間インキュベートすることができる。次いで、１０～２０倍モル過剰の得られたＣａｓ９－ｇＲＮＡ ＲＮＰを標的ＤＮＡに添加することができる。結合反応は１５分以内に起こり得る。他の適切な反応条件を容易に使用することができる。

【０３０５】

本明細書で使用される場合、「融合タンパク質」及び「キメラタンパク質」という用語は、互いに異なる機能的特性（例えば、異なる酵素活性）を有する２つ以上のポリペプチドドメインを含む要素を意味することが意図される。ドメインは、互いに共有結合的又は非共有結合的にカップリングしていてもよい。融合タンパク質は、任意選択的に、１つ以上の他のポリペプチドドメインに作動可能に連結された第３、第４若しくは第５のポリペプチドドメイン又は他のポリペプチドドメインを含み得る。融合タンパク質は、同じポリペプチドドメインの複数のコピーを含み得る。融合タンパク質はまた、又は代替的に、１つ以上のポリペプチドにおいて１つ以上の突然変異を含み得る。融合タンパク質は、ポリヌクレオチド（例示的に、ｇＲＮＡ）及び／又はドメインを互いにカップリングするリンカーなどの１つ以上の非タンパク質要素を含み得る。融合タンパク質の非限定的な例については、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる、以下の参考文献を参照されたい：Ｇｕｉｌｉｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，「Ｆｕｓｉｏｎ ｏｆ ｃａｔａｌｙｔｉｃａｌｌｙ ｉｎａｃｔｉｖｅ Ｃａｓ９ ｔｏ Ｆｏｋｌ ｎｕｃｌｅａｓｅ ｉｍｐｒｏｖｅｓ ｔｈｅ ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ ｏｆ ｇｅｎｏｍｅ ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ」，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ３２：５７７－５８２（２０１４）；Ｂｈａｔｔ ｅｔ ａｌ．，「Ｔａｒｇｅｔｅｄ ＤＮＡ ｔｒａｎｓｐｏｓｉｔｉ

on using a dCas9－transposase fusion protein」，https：／／doi．org／10．1101／571653，pages 1－89 （2019）；及びStrecker et al．，「RNA－guided DNA insertion with CRISPR－associated transposases」，Science 365（6448）：48－53（2019）。別の例示的な融合タンパク質はShCAST（Scytonema hofmanni CRISPR関連トランスポザーゼ）であり、これはCas12k及びTn7様トランスポザーゼを含む。内部にCas12k及びTn7を含むShCASTに関する更なる詳細については、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる、Strecker et al．，「RNA－Guided DNA insertion with CRISPR－associated transposases」，Science 365（6448）：48－53（2019）を参照されたい。

【0306】

本明細書で使用される場合、「トランスポザーゼ」という用語は、オリゴヌクレオチドをポリヌクレオチドにカップリングすることができる酵素を意味することが意図される。いくつかの例では、オリゴヌクレオチドは、増幅アダプターを含み得、任意選択的に、固有の分子識別子（UMI）を含み得る。トランスポザーゼは、オリゴヌクレオチドを付加しながらポリヌクレオチドを切断してもよい。トランスポザーゼの非限定的な一例はTn5である。更に別の例では、トランスポザーゼは、レトロトランスポゾン又はレトロウイルス由来のインテグラーゼを含み得る。トランスポザーゼ、トランスポソーム及びトランスポソーム複合体は、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2010／0120098号の開示によって例示されるように、当業者に一般に知られている。

【0307】

本明細書に提供されるような方法で使用され得るトランスポザーゼの更なる非限定的な例については、それらの各々の全内容が参照により本明細書に組み込まれる、以下の参考文献を参照されたい：Strecker et al．，「RNA－guided DNA insertion with CRISPR－associated transposases」，Science 365（6448）：48－53（2019）；Klompe et al．，「Transposon－encoded CRISPR－Cas systems direct RNA－guided DNA integration」，Nature 571：219－225（2019）；Bhatt et al．，「Targeted DNA transposition using a dCas9－transposase fusion protein」，https：／／doi．org／10．1101／571653，pages 1－89（2019）。提供される方法で使用できる既知の転位システムの他の例は、黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）Tn552、Tyl、トランスポゾンTn7、Tn／O及びIS10、マリナートランスポザーゼ、Tel、P要素、Tn3、細菌の挿入配列、レトロウイルス、並びに酵母のレトロトランスポゾン（例えば、Colegio et al．2001，J．Bacteriol．183：2384－8；Kirby et al．，2002，Mol．Microbiol．43：173－86；Devine and Boeke，1994，Nucleic Acids Res．，22：3765－72；国際特許出願第95／23875号、Craig，1996，Science 271：1512；Craig，1996，Review in：Curr Top Microbiol Immunol．204：27－48；Kleckner et al．，1996，Curr Top Microbiol Immunol．204：49－82；Lampe et al．，1996，EMBO J．15：5470－9；Plasterk，1996，Curr Top Microbiol Immunol 204：125－43；Gloor，2004，Methods Mol．Biol．260：97－114；Ichikawa and Ohtsubo，1990

，Ｊ Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６５：１８８２９－３２；Ｏｈｔｓｕｂｏ ａｎｄ Ｓｅｋｉｎｅ，１９９６，Ｃｕｒｒ．Ｔｏｐ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０４：１－２６；Ｂｒｏｗｎ ｅｔ ａｌ．，１９８９，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ８６：２５２５－９；ａｎｄ Ｂｏｅｋｅ ａｎｄ Ｃｏｒｃｅｓ，１９８９，Ａｎｎｕ Ｒｅｖ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．４３：４０３－３４）を含むが、それらに限定されない。別の例として、ＳｈＣＡＳＴ（Ｓｃｙｔｏｎｅｍａ ｈｏｆｍａｎｎｉ ＣＲＩＳＰＲ関連トランスポザーゼ）は、Ｔｎ７様トランスポザーゼを含む；更なる詳細については、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる、Ｓｔｒｅｃｋｅｒ ｅｔ ａｌ．，「ＲＮＡ－Ｇｕｉｄｅｄ ＤＮＡ ｉｎｓｅｒｔｉｏｎ ｗｉｔｈ ＣＲＩＳＰＲ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｔｒａｎｓｐｏｓａｓｅｓ」，Ｓｃｉｅｎｃｅ ３６５（６４４８）：４８－５３（２０１９）を参照されたい。

【０３０８】

いくつかの例では、トランスポザーゼは、例えば、それらの各々の全内容は参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第２０１０／０１２００９８号明細書又は国際公開第２０１０／０４８６０号に記載されているような方法で、標的ポリヌクレオチドの断片化並びに二本鎖ＤＮＡ断片の両方の鎖の５’末端への、又は５’及び３’末端へのアダプターのライゲーションをもたらす「タグメンテーション」又は「転位」と呼ばれ得るプロセスを実行し得る。

【０３０９】

トランスポザーゼは、トランスポザーゼと、トランスポゾン末端含有組成物と、二本鎖ポリヌクレオチドとを含む「転位複合体」を形成し得、トランスポゾン末端含有組成物の二本鎖標的ポリヌクレオチドへの挿入又は転位を触媒し得る。転位複合体の例としては、限定されないが、高活性Ｔｎ５トランスポザーゼ及びＴｎ５型トランスポゾン末端によって、又はＭｕＡトランスポザーゼ並びにＲ１及びＲ２末端配列を含むＭｕトランスポゾン末端によって形成されるものが挙げられる；例えば、それらの各々の全内容が参照により本明細書に組み込まれる、以下の参考文献を参照されたい：Ｇｏｒｙｓｈｉｎ ｅｔ ａｌ．，「Ｔｎ５ ｉｎ ｖｉｔｒｏ ｔｒａｎｓｐｏｓｉｔｉｏｎ」，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ。２７３：７３６７－７３９４（１９９８）；Ｍｉｚｕｕｃｈｉ，「Ｉｎ ｖｉｔｒｏ ｔｒａｎｓｐｏｓｉｔｉｏｎ ｏｆ ｂａｃｔｅｒｉｏｐｈａｇｅ Ｍｕ：ａ ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ ａｐｐｒｏａｃｈ ｔｏ ａ ｎｏｖｅｌ ｒｅｐｌｉｃａｔｉｏｎ ｒｅａｃｔｉｏｎ」，Ｃｅｌｌ ３５（３ ｐｔ ２）：７８５－７９４（１９８３）；及びＳａｖｉｌａｈｔｉ ｅｔ ａｌ．，「Ｔｈｅ ｐｈａｇｅ Ｍｕ ｔｒａｎｓｐｏｓｏｍｅｓ ｃｏｒｅ：ＤＮＡ ｒｅｑｕｉｒｅｍｅｎｔｓ ｆｏｒ ａｓｓｅｍｂｌｙ ａｎｄ ｆｕｎｃｔｉｏｎ」，ＥＭＢＯ Ｊ．１４（１９）：４８９３－４９０３（１９９５）。トランスポザーゼ及びトランスポゾン末端の組み合わせは、「トランスポソーム」と称され得る。

【０３１０】

トランスポザーゼ及び他の適切な転位系の更なる別の例としては、スタフィロコッカス・アウレウス（Staphylococcus aureus）Ｔｎ５５２が挙げられる（例えば、Ｃｏｌｌｅｇｉｏ ｅｔ ａｌ．，「Ｉｎ ｖｉｔｒｏ ｔｒａｎｓｐｏｓｉｔｉｏｎ ｓｙｓｔｅｍ ｆｏｒ ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ ｒａｎｄｏｍ ｍｕｔａｎｔｓ ｏｆ Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ ｊｅｊｕｎｉ」，Ｊ Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１８３：２３８４－２３８８（２００１）並びにＫｉｒｂｙ ｅｔ ａｌ．，「Ｃｒｙｐｔｉｃ ｐｌａｓｍｉｄｓ ｏｆ Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ａｖｉｕｍ：Ｔｎ５５２ ｔｏ ｔｈｅ ｒｅｓｃｕｅ」，Ｍｏｌ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，４３（１）：１７３－１８６（２００２））；ＴｙＩ（Ｄｅｖｉｎｅ ｅｔ ａｌ．，「Ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ ｉｎｔｅｇｒａｔｉｏｎ ｏｆ ａｒｔｉｆｉｃｉａｌ ｔｒａｎｓｐｏｓｏｎｓ ｉｎｔｏ ｐｌａｓｍｉｄ ｔａｒｇｅｔｓ ｉｎ ｖｉｔｒｏ：ａ ｕｓｅｆｕｌ ｔｏｏｌ ｆｏｒ ＤＮＡ ｍａｐｐｉｎｇ，ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ ａｎｄ ｇｅｎｅｔｉｃ ａｎａｌｙｓｉｓ」，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２２（１８）：３

７６５－３７７２（１９９４）及び国際特許出願第９５／２３８７５号）；トランスポゾンＴｎ７（Ｃｒａｉｇ，「Ｖ（Ｄ）Ｊ ｒｅｃｏｍｂｉｎａｔｉｏｎ ａｎｄ ｔｒａｎｓｐｏｓｉｔｉｏｎ：Ｃｌｏｓｅｒ ｔｈａｎ ｅｘｐｅｃｔｅｄ」，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２７１（５２５５）：１５１２（１９９６）及びＣｒａｉｇ，Ｒｅｖｉｅｗ ｉｎ：Ｃｕｒｒ Ｔｏｐ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ，２０４：２７－４８（１９９６））；ＴｎＩＯ及びＩＳｌＯ（Ｋｌｅｃｋｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ Ｔｏｐ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ，２０４：４９－８２（１９９６））；マリナートランスポザーゼ（Ｌａｍｐｅ ｅｔ ａｌ．，「Ａ ｐｕｒｉｆｉｅｄ ｍａｒｉｎｅｒ ｔｒａｎｓｐｏｓａｓｅ ｉｓ ｓｕｆｆｉｃｉｅｎｔ ｔｏ ｍｅｄｉａｔｅ ｔｒａｎｓｐｏｓｉｔｉｏｎ ｉｎ ｖｉｔｒｏ」，ＥＭＢＯ Ｊ．１５（１９）：５４７０－５４７９（１９９６））；Ｔｃｉ（Ｐｌａｓｔｅｒｋ，Ｃｕｒｒ Ｔｏｐ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ，２０４：１２５－１４３（１９９６）），Ｐ Ｅｌｅｍｅｎｔ（Ｇｌｏｏｒ，「Ｇｅｎｅ ｔａｒｇｅｔｉｎｇ ｉｎ Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ」，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ２６０：９７－１１４（２００４））；ＴｎＪ（Ｉｃｈｉｋａｗａ ｅｔ ａｌ．，「Ｉｎ ｖｉｔｒｏ ｔｒａｎｓｐｏｓｉｔｉｏｎ ｏｆ ｔｒａｎｓｐｏｓｏｎ Ｔｎ３」，Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ．２６５（３１）：１８８２９－１８８３２（１９９０））；細菌挿入配列（Ｏｈｔｓｕｂｏ ｅｔ ａｌ．，「Ｂａｃｔｅｒｉａｌ ｉｎｓｅｒｔｉｏｎ ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ」，Ｃｕｒｒ．Ｔｏｐ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０４：１－２６（１９９６））；レトロウイルス（Ｂｒｏｗｎ ｅｔ ａｌ．，「Ｒｅｔｒｏｖｉｒａｌ ｉｎｔｅｇｒａｔｉｏｎ：Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ｏｆ ｔｈｅ ｉｎｉｔｉａｌ ｃｏｖａｌｅｎｔ ｐｒｏｄｕｃｔ ａｎｄ ｉｔｓ ｐｒｅｃｕｒｓｏｒ，ａｎｄ ａ ｒｏｌｅ ｆｏｒ ｔｈｅ ｖｉｒａｌ ＩＮ ｐｒｏｔｅｉｎ」，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ，８６：２５２５－２５２９（１９８９））；及び酵母のレトロトランスポゾン（Ｂｏｅｋｅ ｅｔ ａｌ．，「Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ ａｎｄ ｒｅｖｅｒｓｅ ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ ｏｆ ｒｅｔｒｏｔｒａｎｓｐｏｓｏｎｓ」，Ａｎｎｕ Ｒｅｖ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．４３：４０３－４３４（１９８９）を参照されたい。

【０３１１】

本明細書で使用される場合、「ヌクレアーゼ」という用語は、ポリヌクレオチドのヌクレオチドサブユニット間のホスホジエステル結合を切断することができる酵素を意味することが意図される。「エンドヌクレアーゼ」という用語は、ポリヌクレオチド鎖内のホスホジエステル結合を切断することができる酵素を指す。

【０３１２】

本明細書で使用される場合、「ニッカーゼ」という用語は、ＤＮＡ二重鎖の一本鎖のみを切断するエンドヌクレアーゼを指す。いくつかのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系は、二本鎖ポリヌクレオチドの一方の鎖のみを切断することができ、したがって、ＣＲＩＳＰＲニッカーゼ又はＣａｓ－ｇＲＮＡ ＲＮＰニッカーゼと称され得る。例えば、「Ｃａｓ９ニッカーゼ」という用語は、典型的にはＣａｓ９タンパク質の１つのヌクレアーゼドメインを不活性化することによる、Ｃａｓ９タンパク質に由来するニッカーゼを指す。ＣＲＩＳＰＲニッカーゼの非限定的な例としては、第１の突然変異Ｄ１０Ａ及び第２の突然変異Ｈ８４０Ａを有するＳ．ＰｙｏｇｅｎｅｓのＣａｓ９が挙げられる。

【０３１３】

ポリペプチドの文脈において、本明細書で使用される「バリアント」及び「誘導体」という用語は、アミノ酸残基の置換、欠失又は付加の導入によって改変されたポリペプチド又はポリペプチドの断片のアミノ酸配列を含むポリペプチドを指す。ポリペプチドのバリアント又は誘導体は、ポリヌクレオチドのアミノ酸配列の一部を含む融合タンパク質であり得る。本明細書で使用される「バリアント」又は「誘導体」という用語はまた、例えば、ポリペプチドへの任意の種類の分子の共有結合によって化学的に修飾されたポリペプチド又はその断片を指す。例えば、限定するものではないが、ポリペプチド又はポリペプチドの断片は、例えば、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、既知の

保護基／ブロッキング基による誘導体化、タンパク質分解切断、細胞リガンド又は他のタンパク質への結合などによって化学的に修飾することができる。バリアント又は誘導体は、天然に存在する又は出発ペプチド若しくはポリペプチドとは異なる方法で、結合した分子の種類又は位置のいずれかで修飾される。バリアント又は誘導体は、ペプチド又はポリペプチド上に天然に存在する１つ以上の化学基の欠失を更に含む。ポリペプチド若しくはポリペプチドの断片のバリアント又は誘導体は、限定するものではないが、特異的な化学的切断、アセチル化、製剤化、ツニカマイシンの代謝合成などを含む、当業者に公知の技術を使用した化学修飾によって化学的に修飾することができる。更に、ポリペプチド若しくはポリペプチドの断片のバリアント又は誘導体は、１つ以上の非古典的アミノ酸を含み得る。ポリペプチドバリアント又は誘導体は、本明細書に記載されているポリペプチド又はポリペプチドの断片と類似又は同一の機能を有し得る。ポリペプチドバリアント又は誘導体は、本明細書に記載されているポリペプチド又はポリペプチドの断片と比較し、追加の又は異なる機能を有し得る。

【０３１４】

本明細書で使用される場合、「配列決定」という用語は、ポリヌクレオチドの配列を決定することを意味することが意図される。配列決定は、合成による配列決定、ブリッジＰＣＲ、連鎖停止配列決定、ハイブリダイゼーションによる配列決定、ナノポア配列決定、及びライゲーションによる配列決定のうちの１つ以上を含み得る。

【０３１５】

本明細書で使用される場合、「脱宿主化（dehosting）」という用語は、別の種のポリヌクレオチドに対する、ある種のポリヌクレオチドの選択的な不活性化又は分解を意味することが意図される。例えば、哺乳動物（例えば、ヒト）などの第１の種は、細菌、真菌、及びウイルスなどの多数の他の種に対する宿主として作用し得る。１つ以上の他の種のポリヌクレオチドが増幅及び配列決定され得るように、第１の種のポリヌクレオチドを選択的に不活性化又は分解することが望ましい場合がある。

【０３１６】

標的に対して「選択的」であることは、その標的に結合し、かつ異なる標的に結合しないことを意味することが意図される。例えば、種特異的反復要素に対して選択的なＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰは、その種特異的反復要素に結合してもよく、異なる種特異的反復要素に結合しなくてもよい。

【０３１７】

本明細書で使用される場合、「種特異的反復要素」という用語は、所定の種のポリヌクレオチド内に存在し、別の種のポリヌクレオチド中には存在し得ない反復配列を意味することが意図される。複数の染色体を有する種（例えば、哺乳動物、例えば、ヒト）は、各染色体上に異なる種特異的要素を含み得るか、又は各染色体上に同じ種特異的要素、若しくは各染色体上に同じ種特異的要素及び異なる種特異的要素の混合物を含み得る。種特異的反復要素の一例は、フォトスペーサー隣接モチーフ又はＰＡＭ配列（例えば、ＮＧＧ）である。Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのｇＲＮＡは、種特異的反復要素にハイブリダイズする配列を有し得る。

【０３１８】

本明細書で使用される場合、「固有の分子識別子」及び「ＵＭＩ」という用語は、ポリヌクレオチドにカップリングされ得、それを介してポリヌクレオチドが同定され得るオリゴヌクレオチドを意味することが意図される。例えば、異なるＵＭＩのセットを複数の異なるポリヌクレオチドに結合させてもよく、それらのポリヌクレオチドの各々を、そのポリヌクレオチドにカップリングされた特定のＵＭＩを使用して同定してもよい。

【０３１９】

本明細書で使用される場合、種の「全ゲノム」又は「ＷＧ」という用語は、その種の細胞プロセスによって使用されるポリヌクレオチドの大部分を一緒に提供する１つ以上のポリヌクレオチドのセットを意味することが意図される。種の全ゲノムは、種の染色体ＤＮＡ及び／又はミトコンドリアＤＮＡの任意の適切な組み合わせを含み得、植物種の場合、

葉緑体に含まれるＤＮＡを含み得る。１つ以上のポリヌクレオチドのセットは、一緒になって、その種の細胞プロセスによって使用されるポリヌクレオチドの少なくとも約５０％、又は少なくとも約６０％、又は少なくとも約７０％、又は少なくとも約８０％、又は少なくとも約９０％、又は少なくとも約９５％、又は少なくとも約９８％、又は少なくとも約９９％を提供し得る。

【０３２０】

本明細書で使用される場合、「断片」という用語は、ポリヌクレオチドの一部を意味することが意図される。例えば、ポリヌクレオチドは、総塩基数の長さであってもよく、そのポリヌクレオチドの断片は、総塩基数の長さより短くてもよい。

【０３２１】

本明細書で使用される場合、「サンプル」という用語は、１つ以上のポリヌクレオチドを含む流体の容量を意味することが意図される。サンプル内のポリヌクレオチドは、全ゲノムを含み得、又は全ゲノムの一部のみを含み得る。サンプルは、単一種又は複数の種に由来するポリヌクレオチドを含み得る。

【０３２２】

本明細書で使用される「抗体」という用語は、標的抗原部位及びその目的のアイソフォームに結合する所望の生物学的活性を示す限り、モノクローナル抗体（完全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、及び抗体断片を包含する。「抗体断片」という用語は、全長抗体の一部、一般にはその抗原結合領域又は可変領域を含む。本明細書で使用される「抗体」という用語は、ヒト抗体、ラット抗体、マウス抗体、ウサギ抗体などを含むがこれらに限定されない、任意の種及び資源に由来する任意の抗体を包含し、合成的に作製され得るか、又は天然に存在し得る。

【０３２３】

本明細書で使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指す。すなわち、集団を含む個々の抗体は、少量で存在し得る可能な天然に存在する変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、単一の抗原部位に対して向けられている。更に、異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を典型的には含む従来の（ポリクローナル）抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対するものである。「モノクローナル抗体」はまた、当該技術分野で公知の技術を使用してファージ抗体ライブラリーから単離され得る。モノクローナル抗体は、この用語が本明細書で使用される場合、重鎖及び／又は軽鎖の一部が、特定の種に由来する抗体又は特定の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一又は相同であり、鎖の残りの部分が、別の種に由来する抗体又は別の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一まあ葉相同である「キメラ」抗体（免疫グロブリン）、並びにかかる抗体の断片を含み得るが、それらが所望の生物学的活性を示す限りにおいてである。

【０３２４】

本明細書で使用される場合、「標的特異的」及び「選択的」などの用語は、ガイドＲＮＡ又は他のポリヌクレオチドに関して使用される場合、別のポリヌクレオチド中の配列に特異的である（実質的に相補的であり、ハイブリダイズし得る）配列を含むポリヌクレオチドを意味することが意図される。

【０３２５】

本明細書で使用される場合、「相補的」及び「実質的に相補的」という用語は、ポリヌクレオチドに関して使用される場合、そのポリヌクレオチドが、特定の条件下で別のポリヌクレオチド中の配列に選択的にハイブリダイズすることができる配列を含むことを意味することが意図される。

【０３２６】

本明細書で使用される場合、「増幅」及び「増幅する」などの用語は、ポリヌクレオチドのアンプリコンを生成するための任意の適切な増幅方法の使用を指す。ポリメラーゼ連

鎖反応（ＰＣＲ）は、１つの非限定的な増幅方法である。当該技術分野で公知の他の適切な増幅方法としては、限定されないが、ローリングサークル増幅；ｒｉｂｏｐｒｉｍｅｒ増幅（例えば、米国特許第７，４１３，８５７号明細書に記載されている）；ＩＣＡＮ；ＵＣＡＮ；ｒｉｂｏｓｐｉａ；末端タグ付け；（例えば、米国特許出願公開第２００５／０１５３３３３号明細書に記載されている）及びＥｂｅｒｗｉｎｅ型ａＲＮＡ増幅又は鎖置換増幅が挙げられる。増幅方法の更なる非限定的な例は、国際公開第０２／１６６３９号；国際公開第００／５６８７７号；オーストラリア国特許出願公開第００／２９７４２号明細書；米国特許第５，５２３，２０４号明細書；米国特許第５，５３６，６４９号明細書；米国特許第５，６２４，８２５号明細書；米国特許第５，６３１，１４７号明細書；米国特許第５，６４８，２１１号明細書；米国特許第５，７３３，７５２号明細書；米国特許第５，７４４，３１１号明細書；米国特許第５，７５６，７０２号明細書；米国特許第５，９１６，７７９号明細書；米国特許第６，２３８，８６８号明細書；米国特許第６，３０９，８３３号明細書；米国特許第６，３２６，１７３号明細書；米国特許第５，８４９，５４７号明細書；米国特許第５，８７４，２６０号明細書；米国特許第６，２１８，１５１号明細書；米国特許第５，７８６，１８３号明細書；米国特許第６，０８７，１３３号明細書；米国特許第６，２１４，５８７号明細書；米国特許第６，０６３，６０４号明細書；米国特許第６，２５１，６３９号明細書；米国特許第６，４１０，２７８号明細書；国際公開第００／２８０８２号；米国特許第５，５９１，６０９号明細書；米国特許第５，６１４，３８９号明細書；米国特許第５，７７３，７３３号明細書；米国特許第５，８３４，２０２号明細書；米国特許第６，４４８，０１７号明細書；米国特許第６，１２４，１２０号明細書；及び米国特許第６，２８０，９４９号明細書に記載されている。

【０３２７】

「ポリメラーゼ連鎖反応」及び「ＰＣＲ」という用語は、本明細書で使用される場合、少量のポリヌクレオチド、例えば、ＲＮＡ及び／又はＤＮＡが増幅される手順を指す。一般に、増幅プライマーは、ＰＣＲ中に使用するためにポリヌクレオチドにカップリングされる。例えば、それらの各々の全内容が参照により本明細書に組み込まれる、以下の参考文献を参照されたい：Ｍｕｌｌｉｓの米国特許第４，６８３，１９５号明細書；Ｍｕｌｌｉｓ ｅｔ ａｌ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｓｙｍｐ．Ｑｕａｎｔ．Ｂｉｏｌ．，５１：２６３（１９８７）；及びＥｒｌｉｃｈ，ｅｄ．，ＰＣＲ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，（Ｓｔｏｃｋｔｏｎ Ｐｒｅｓｓ，ＮＹ，１９８９）。当業者に知られているように、ＰＣＲを行うために多種多様な酵素及びキットが利用可能である。例えば、いくつかの例では、ＰＣＲ増幅は、製造業者によって記載されるように、ＥＰＩＣＥＮＴＲＥ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（ウィスコンシン州マディソン）からのＦＡＩＬＳＡＦＥ（商標）ＰＣＲ Ｓｙｓｔｅｍ又はＭＡＳＴＥＲＡＭＰ（商標）Ｅｘｔｒａ－Ｌｏｎｇ ＰＣＲ Ｓｙｓｔｅｍのいずれかを使用して実行される。

【０３２８】

本明細書で使用される場合、「ライゲーション」及び「ライゲーションする」などの用語は、２つ以上のポリヌクレオチドの末端間に共有結合又は連結を形成することを意味することが意図される。結合又は連鎖の性質は大きく異なり得、ライゲーションは酵素的又は化学的に実行され得る。ライゲーションは通常、酵素的に行われ得、あるオリゴヌクレオチドの５’炭素末端ヌクレオチドと別のヌクレオチドの３’炭素との間にホスホジエステル結合を形成する。鋳型駆動ライゲーション反応は、以下の参考文献に記載されており、それらの各々の全内容は参照により本明細書に組み込まれる：米国特許第４，８８３，７５０号明細書；米国特許第５，４７６，９３０号明細書；米国特許第５，５９３，８２６号明細書；及び米国特許第５，８７１，９２１号明細書。ライゲーションはまた、ホスホジエステル結合の非酵素的形成、又はホスホロチオエート結合、ジスルフィド結合などのポリヌクレオチドの末端間の非ホスホジエステル共有結合の形成を用いて行われてもよい。

【０３２９】

本明細書で使用される場合、用語「基材」とは、本明細書に記載されている構成物のための支持体として使用される材料を指す。例となる基材材料は、ガラス、シリカ、プラスチック、石英、金属、金属酸化物、オルガノ－シリケート（例えば、多面体有機シルセスキオキサン（polyhedral organic silsesquioxanes、ＰＯＳＳ））、ポリアクリレート、酸化タンタル、相補型金属酸化膜半導体（complementary metal oxide semiconductor、ＣＭＯＳ）、又はそれらの組み合わせを含むことができる。ＰＯＳＳの一例は、Ｋｅｈａｇｉａｓ ｅｔ ａｌ．，Ｍｉｃｒｏｅｌｅｃｔｒｏｎｉｃ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ８６（２００９），ｐｐ．７７６－７７８に記載されているものであり得、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの例では、本出願に使用される基材は、ガラス、溶融シリカ、又は他のシリカ含有材料などのシリカベースの基材を含む。いくつかの例では、シリカ系基材は、ケイ素、二酸化ケイ素、窒化ケイ素、又は水素化シリコーンを含むことができる。いくつかの例では、本出願において使用される基材は、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリ（塩化ビニル）、ポリプロピレン、ナイロン、ポリエステル、ポリカーボネート、及びポリ（メタクリル酸メチル）などのプラスチック材料又は構成要素を含む。プラスチック材料の例は、ポリ（メタクリル酸メチル）、ポリスチレン、及び環式オレフィンポリマー基材を含む。いくつかの例では、基材は、シリカベースの材料若しくはプラスチック材料、又はそれらの組み合わせであるか、又はそれらを含む。特定の例では、基材は、ガラス又はケイ素系ポリマーを含む少なくとも１つの表面を有する。一部の例では、基材は、金属を含むことができる。一部のこのような例では、金属は金である。いくつかの例では、基材は、金属酸化物を含む少なくとも１つの表面を有する。一例では、表面は、酸化タンタル又は酸化スズを含む。アクリルアミド、エノン、又はアクリレートもまた、基材材料又は構成要素として利用することができる。他の基材材料は、限定するものではないが、ヒ化ガリウム、リン化インジウム、アルミニウム、セラミック、ポリイミド、石英、樹脂、ポリマー及びコポリマーを含むことができる。一部の例では、基材及び／又は基材表面は、石英であり得るか、又は石英を含むことができる。一部の他の例では、基材及び／又は基材表面は、ＧａＡｓ又はＩＴＯなどの半導体であり得るか、又は当該半導体を含むことができる。上述のリストは、本出願を例示することが意図されているが、本出願を限定するものではない。基材は、単一の材料又は複数の異なる材料を含むことができる。基材は、複合体又は積層体とすることができる。いくつかの例では、基材は、有機シリケート材料を含む。

【０３３０】

基材は、水平、円形、球形、ロッド形状、又は任意の他の好適な形状とすることができる。基材は、剛性であってもよく、又は可撓性であってもよい。いくつかの例では、基材は、ビーズ又はフローセルである。

【０３３１】

基材は、基材の１つ以上の表面上にパターンを有していなくてもよく、テクスチャード加工を有していてもよく、又はパターンを有していてもよい。一部の例では、基材は、パターン形成されている。そのようなパターンは、ポスト、パッド、ウェル、隆起、チャネル、又は他の三次元凹状若しくは凸構造を含み得る。パターンは、基材の表面全体にわたって規則的であってもよく、又は不規則的であってもよい。パターンは、例えば、ナノインプリントリソグラフィーによって、又は例えば、非金属製表面に特徴部を形成する金属パッドの使用によって形成することができる。

【０３３２】

いくつかの例では、本明細書に記載されている基材は、フローセルの少なくとも一部を形成するか、又はフローセル内に位置するか、又はフローセルに結合されている。フローセルは、複数のレーン又は複数のセクターに分割されているフローチャンバを含んでもよい。本明細書において説明されている方法及び組成物に使用することができるフローセルの例、並びにフローセルを製造するための基材例は、限定するものではないが、Ｉｌｌｕｍｉｎａ、Ｉｎｃ．（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）から市販されているものを含む。

【０３３３】

Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ媒介性脱宿主化のための組成物及び方法

本明細書におけるいくつかの例は、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ媒介脱宿主化に関する。例えば、図１Ａ～図１Ｋは、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ媒介性脱宿主化のための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。

【０３３４】

より複雑な種、例示的には哺乳動物は、細菌、真菌、及びウイルスなどの複数の他のより単純な種を宿主とすることができる。宿主となる種のポリヌクレオチド（ＤＮＡなど）を配列決定することが望ましい場合があるが、そのようなポリヌクレオチドを宿主種のポリヌクレオチドから十分に分離することは困難であり得る。例えば、宿主由来の流体又は組織から精製されたポリヌクレオチドのサンプルは、主に、宿主由来のポリヌクレオチド（例えば、約９９％以上）、及び他の種に由来する比較的少量のポリヌクレオチド（例えば、約１％以下）を含み得る。したがって、そのサンプルの配列決定は主に宿主の配列を生じ得、他の種の配列に関する情報は比較的少ない。本明細書で提供されるように、所与の種（宿主など）のポリヌクレオチドは、そのサンプル内の１つ以上の他の種のポリヌクレオチドを配列決定する能力を増強するような方法でサンプルから除去され得る。

【０３３５】

例えば、図１Ａに示されるように、第１の種から得られたサンプルは、第１の種に由来する第１の二本鎖ポリヌクレオチドと、１つ以上の第２の種に由来する第２の二本鎖ポリヌクレオチドとの混合物を含み得る。例示的に、第１の種（Ｓ１）は、細菌、真菌、及びウイルス（Ｓ２、Ｓ３など）などの多数の他の種に対する宿主として作用し得る哺乳動物（例えば、ヒト）であり得る。図１Ａに示される非限定的な例では、組成物１０１は、第１の種に由来するポリヌクレオチドＳ１－１、Ｓ１－２、Ｓ１－３の混合物；第２の種に由来するポリヌクレオチドＳ２－１；及び第３の種に由来するポリヌクレオチドＳ３－１を含む。第１の種に由来する第１の種に由来するポリヌクレオチドＳ１－１、Ｓ１－２、Ｓ１－３の各々は、図１Ａに示されるような種特異的反復要素１４０を含み得る。例えば、第１の種が哺乳動物である場合、その種に由来するポリヌクレオチドは、哺乳動物特異的反復要素を含み得る。例えば、第１の種がヒトである場合、そのヒト由来のポリヌクレオチドの各々は、１つ以上のヒト特異的反復要素１４０を含み得る。

【０３３６】

各所定の種に由来するポリヌクレオチドの濃度、数、及び種類は、各特定のサンプルについて変化し得ることが理解されるであろう。例えば、第１の種が第２及び第３の種に対する宿主である場合、サンプルは、第２及び第３の種よりも有意に高い濃度の第１の種に由来するポリヌクレオチドを含有し得る。更に、第１の種は、より大きな遺伝的複雑性を有し得、例えば、ヒトの２３本の比較的長い染色体Ｓ１－１、Ｓ１－２、Ｓ１－３・・・Ｓ１－２３などの複数のポリヌクレオチドを有するゲノムを含み得、一方、第２及び／又は第３の種は、遺伝的により単純であり得、例えば、単一の比較的短いポリヌクレオチドのみを有するゲノムを含み得る。更に、混合物中の１つ以上の種のポリヌクレオチドは、それらの種が生理学的プロセス中にインビボで通常使用するよりも短い断片にエクスビボで断片化され得る。更に、混合物中の１つ以上の種のポリヌクレオチドは、環状（Ｓ３－１など）であり得、したがって、いかなる末端も有し得ない。

【０３３７】

図１Ａに示されるように、混合物中の各ポリヌクレオチドは二本鎖であり得る。例えば、ポリヌクレオチドＳ１－１は、第１の鎖１１１及び相補的な第２の鎖１１１’を含み得る；ポリヌクレオチドＳ１－２は、第１の鎖１１２及び相補的な第２の鎖１１２’を含み得る；ポリヌクレオチドＳ１－３は、第１の鎖１１３及び相補的な第２の鎖１１３’を含み得る；ポリヌクレオチドＳ２－１は、第１の鎖１２１及び相補的な第２の鎖１２１’を含み得る；ポリヌクレオチドＳ３－１は、第１の鎖１３１及び相補的な第２の鎖１３１’を含み得る。いくつかの例では、第１、第２、及び／又は第３の種に由来する二本鎖ポリヌクレオチドは、二本鎖ＤＮＡを含み得る。

【０３３８】

第１の二本鎖ポリヌクレオチドの末端、及び存在する場合、第２の二本鎖ポリヌクレオチドの末端は、保護され得る。例えば、図１Ｂに示されるように、組成物１０２は、混合物中の二本鎖ポリヌクレオチドの任意の末端を保護する保護要素１５０を含む。例示的に、保護要素１５０は、第１の種のポリヌクレオチドＳ１－１、Ｓ１－２及びＳ１－３の末端、並びに第２の種のポリヌクレオチドＳ２－１の末端にカップリングされ、それらを保護する。第３の種のポリヌクレオチドＳ３－１は環状であるので、かかるポリヌクレオチドは、保護要素１５０がカップリングされ得る末端を有していなくてもよい。保護要素１５０は、かかる保護要素がカップリングしている二本鎖ポリヌクレオチドの末端に対する１つ以上の酵素（エキソヌクレアーゼなど）の作用を阻害する任意の適切な化学部分を含み得る。例えば、図１Ｂの挿入図に示されるように、保護要素１５０は、修飾塩基１５１、末端にライゲーションされたヘアピンアダプター１５２、又は５’脱リン酸化末端を含み得る。修飾塩基１５１は、例えば、ホスホロチオエート結合又は３’ホスフェートを含み得る、ターミナルトランスフェラーゼを用いて付加され得る。ヘアピンアダプター１５２は、互いにハイブリダイズするステム配列と、ステム配列間に伸長するループ配列とを含むオリゴヌクレオチドを含み得、例えば、末端修復を行って任意のオーバーハングを埋め、次いでＡオーバーハング（「Ａテール」）を付加し（例えば、Ｋｌｅｎｏｗ　Ｆｒａｇｍｅｎｔ　ｅｘｏ－などのエキソヌクレアーゼを使用して）、次いでヘアピンアダプター１５２を末端にライゲーションするなど、当該技術分野で公知の方法で付加され得る。二本鎖ポリヌクレオチドの５’末端は、適切なホスファターゼ酵素を使用して脱リン酸化され得る。

【０３３９】

第１及び第２の二本鎖ポリヌクレオチドの末端を保護した後、第１の二本鎖ポリヌクレオチド中の自由末端を選択的に生成することができる。例えば、図１Ｃは、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　１６０が、第１の二本鎖ポリヌクレオチド内に存在し、かつ第２の二本鎖ポリヌクレオチド内に存在しない配列、例えば、種特異的反復要素１４０にハイブリダイズしている組成物１０３を示す。次いで、配列をＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰで切断して、図１Ｄに示すような方法で、自由末端を生成することができ、これには、自由末端１４１、１４１’がポリヌクレオチドＳ１－１の鎖に生成され、自由末端１４３、１４２’がポリヌクレオチドＳ１－２の鎖に生成され、自由末端１４２、１４３’がポリヌクレオチドＳ１－３の鎖に生成されるが、それらのポリヌクレオチドはＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　１６０が選択的にハイブリダイズする種特異的反復要素１５０を含まないため、ポリヌクレオチドＳ２－１及びＳ３－１では自由末端が生成されない組成物１０４が含まれる。Ｃａｓは、例えばＣａｓ９を含み得る。

【０３４０】

次いで、第１の二本鎖ポリヌクレオチドは、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　１６０によって生成された自由末端から保護末端に向かって分解され得る。例えば、図１Ｅに例示される組成物１０５は、第１の二本鎖ポリヌクレオチドＳ１－１、Ｓ１－２、Ｓ１－３を分解するためのエキソヌクレアーゼ１７０を含む。任意の適切なエキソヌクレアーゼ１７０を使用することができる。例示的に、自由末端は、図１Ｅの挿入図の上部に示されるような方法で３’末端を含み得、第１の二本鎖ポリヌクレオチドＳ１－１、Ｓ１－２、Ｓ１－３は、エキソヌクレアーゼＩＩＩを使用して分解され得る。別の純粋に例示的な例として、自由末端は、図１Ｅの挿入図の下部に示されるような方法で５’末端を含み得、第１の二本鎖ポリヌクレオチドＳ１－１、Ｓ１－２、Ｓ１－３の各々の１本の鎖は、ラムダエキソヌクレアーゼを使用して分解され得る。使用される保護要素１５０の特定のタイプに依存して、エキソヌクレアーゼの使用は、ポリヌクレオチドＳ１－１、Ｓ１－２、Ｓ１－３の各々の両方の鎖が分解される図１Ｆに例示される組成物１０６、又はポリヌクレオチドＳ１－１、Ｓ１－２、Ｓ１－３が一本鎖にされる図１Ｇに例示される組成物１０７を生じ得る。例示的に、保護要素１５０がヘアピンオリゴヌクレオチドを含む場合、一方の鎖を分解した後、エキソヌクレアーゼがヘアピンに続いて他方の鎖を分解し、両方の鎖の分解をもたらすことができる。別の例として、保護要素１５０が修飾塩基又は５’脱リン酸化塩

基を含む場合、エキソヌクレアーゼが一方の鎖を分解した後、保護要素は、エキソヌクレアーゼが他方の鎖を分解することを阻害し得る。使用される特定のエキソヌクレアーゼ、及び第１の種のポリヌクレオチドが完全に分解されるか又は一本鎖にされるかにかかわらず、ポリヌクレオチドＳ２－１及びＳ３－１は、ポリヌクレオチドＳ２－１の末端が保護要素１５０によって保護され、ポリヌクレオチド３　Ｓ３－１は末端を欠くので、そのエキソヌクレアーゼによって分解され得ない。

【０３４１】

第１の種のポリヌクレオチドの分解後、増幅アダプターを混合物中の任意の残りの二本鎖ポリヌクレオチドの末端にライゲーションすることができる。例えば、図１Ｈは、ポリヌクレオチドＳ１－１、Ｓ１－２、及びＳ１－３が分解され（例えば、両方の鎖が図１Ｆに示されるように分解されるか、又はポリヌクレオチドが図１Ｇ及び１Ｈに示されるように一本鎖にされる）、保護基１５０が混合物中の任意の残りの二本鎖ポリヌクレオチド、例えばポリヌクレオチドＳ２－１から除去される組成物１０８を示す。第１の種のポリヌクレオチドの任意の残りの部分にカップリングした任意の残りの保護基１５０も同様に除去され得る。図１Ｉに図示されるように、任意の環状ポリヌクレオチド（例えば、第３の種のＳ３－１）は、例えば、タグメンテーション、せん断、又は混合物中の任意の残りの二本鎖ポリヌクレオチド（例えば、Ｓ２－１）を断片化することができる他の適切な断片化技術を使用して開かれ得る。次いで、増幅アダプターは、残りの二本鎖ポリヌクレオチド、例えば、第２の種及び第３の種のものにライゲーションされ得るか、又は残りの二本鎖ポリヌクレオチドをタグ化して、図１Ｊに示される組成物１０９を得ることができる。組成物１０９は、第１の種から、実質的に一本鎖ポリヌクレオチドＳ１－１、Ｓ１－２、Ｓ１－３のみ；第２及び／又は第３の種から、実質的に二本鎖ポリヌクレオチドＳ１－２、Ｓ１－３のみ；及び第２の二本鎖ポリヌクレオチドＳ２－１、Ｓ３－１の断片の末端にライゲーションされ、かつ第１の二本鎖ポリヌクレオチドＳ１－１、Ｓ１－２、Ｓ１－３のいずれの末端にも実質的にライゲーションされていない増幅アダプター１８０を含む。第１の種のポリヌクレオチドが、図１Ｆを参照して説明されるような方法で完全に分解される場合、組成物１０９は、代わりに、第１の種に由来する任意のポリヌクレオチドを含まなくてもよいことが理解されるであろう。図１Ｊに示されるような方法では、増幅アダプター１８０は、Ｙ字型であってもよく、それらの各々の全内容が参照により本明細書に組み込まれる、以下の参考文献に記載されているような固有の分子識別子（ＵＭＩ）を含み得る：Ｋｅｎｎｅｄｙ ｅｔ ａｌ．，「Ｄｅｔｅｃｔｉｎｇ ｕｌｔｒａｌｏｗ－ｆｒｅｑｕｅｎｃｙ ｍｕｔａｔｉｏｎｓ ｂｙ Ｄｕｐｌｅｘ Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ」，Ｎａｔ Ｐｒｏｔｏｃ．９：２５８６－２６０６（２０１４）；及びＫｉｖｉｏｊａ ｅｔ ａｌ．，「Ｃｏｕｎｔｉｎｇ ａｂｓｏｌｕｔｅ ｎｕｍｂｅｒｓ ｏｆ ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ ｕｓｉｎｇ ｕｎｉｑｕｅ ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｉｄｅｎｔｉｆｉｅｒｓ」，Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｔｈｏｄｓ ９：７２－４２（２０１２）。その後、二本鎖ポリヌクレオチドＳ２－１及びＳ３－１は、実質的に第１の種に由来するポリヌクレオチドのいずれも配列決定することなく、増幅され（例えば、ＰＣＲを使用して）、配列決定され得る。したがって、ポリヌクレオチドＳ２－１及びＳ３－１の配列は、第２及び第３の種を宿主とし得る第１の種からのバックグラウンドシグナルが比較的低いか又は実質的にない状態で得ることができる。

【０３４２】

第１の種のポリヌクレオチドＳ１－１、Ｓ１－２、及びＳ１－３は、これらのポリヌクレオチドを増幅及び配列決定に利用できないようにするために、必ずしも完全に分解される必要はないことに留意されたい。例えば、増幅アダプター１８０は、任意の二本鎖ポリヌクレオチドに選択的にライゲーションされ、任意の一本鎖ポリヌクレオチドに実質的にライゲーションされないように構成され得る。したがって、増幅アダプターがライゲーションされた混合物中の任意の二本鎖ポリヌクレオチドを増幅し、次いで配列決定することができるが、任意の一本鎖ポリヌクレオチドは、適切な増幅アダプターを欠くために増幅することができない。例示的に、タグメンテーションは、ｄｓＤＮＡにのみアダプターを

付加してもよく、ｓｓＤＮＡにアダプターを付加しなくてもよい。別の例として、Ｔ４ＤＮＡリガーゼは、ｄｓＤＮＡのみに作用し得る。これに関して、増幅アダプター１８０は、そのようなアプローチのいずれにおいても平滑末端又はＡテールであり得ることに留意されたい。

【０３４３】

図１Ｋは、第１の種に由来する第１の二本鎖ポリヌクレオチドと第２の種に由来する第２の二本鎖ポリヌクレオチドとの混合物を処理するための方法における操作の例示的なフローを示す。図１Ｋに例示される方法１０００は、混合物中に、第１の二本鎖ポリヌクレオチドの末端及び第２の二本鎖ポリヌクレオチドの任意の末端を保護すること（操作１００１）を含み得る。例えば、図１Ｂを参照して説明されるような方法で、保護要素１５０は、第１の二本鎖ポリヌクレオチドＳ１－１、Ｓ１－２及びＳ１－３並びに第２の二本鎖ポリヌクレオチドＳ２－１の末端に付加され得るが、二本鎖ポリヌクレオチドＳ３－１は末端を欠いており、したがって、保護要素１５０にカップリングされ得ない。

【０３４４】

図１Ｋに示される方法１０００はまた、第１及び第２の二本鎖ポリヌクレオチドの末端を保護した後に、第１の二本鎖ポリヌクレオチド内に自由末端を選択的に生成すること（操作１００２）を含み得る。例えば、図１Ｃを参照して説明されるような方法で、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　１６０は、第１の種のポリヌクレオチドＳ１－１、Ｓ１－２、及びＳ１－３内にあり、かつ第２の種のポリヌクレオチドＳ２－１（又は第３の種のポリヌクレオチドＳ３－１）内にない配列、例えば種特異的反復要素と選択的にハイブリダイズされ得る。Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　１６０は、第１の種のポリヌクレオチドＳ１－１、Ｓ１－２、及びＳ１－３を切断して、図１Ｄを参照して説明されるような自由末端を生成し得る。図１Ｋに例示される方法１０００はまた、第１の二本鎖ポリヌクレオチドを自由末端から保護末端に向かって分解すること（操作１００３）を含み得る。例えば、図１Ｅ～１Ｇを参照して説明されるような方法で、エキソヌクレアーゼは、それぞれの自由末端１４１、１４１’、１４２、１４２’、及び１４３、１４３’から第１の種のポリヌクレオチドＳ１－１、Ｓ１－２、及びＳ１－３を分解するために使用され得る。続いて、増幅アダプターは、図１Ｉ～１Ｊを参照して説明されるような方法で、第２の種のポリヌクレオチドＳ２－１にカップリングされ得（任意選択的に、増幅アダプターを添加する前に断片化を含む）、次いで、ポリヌクレオチドが増幅され、配列決定される。

【０３４５】

したがって、本明細書で提供されるように、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰは、所望の種のポリヌクレオチドにおいて自由末端を選択的に生成するために使用され得、これらのポリヌクレオチドは、その後、増幅及び配列決定され得る１つ以上の他の種のポリヌクレオチドのために、増幅又は配列決定のために実質的に利用不可能にするような方法で分解される。

【０３４６】

異なる定義された断片サイズへの全ゲノム（ＷＧ）の断片化

本明細書におけるいくつかの例は、全ゲノム（ＷＧ）の異なる定義された断片サイズへの断片化に関する。例えば、図２Ａ～図２Ｋは、ＷＧを異なる定義された断片サイズにの断片化するための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。

【０３４７】

種に応じて、その種のＷＧは、明確な数の染色体を含む。各ヒト染色体の一般的な配列は、十分に特徴付けられているが、各個体の染色体の配列は、その個体に特異的な遺伝的変異を含む。更に、例えば、個体が、その個体の正常組織とは異なる遺伝的変異を有する腫瘍を有する場合、１つ以上の染色体の配列は、個体内でさえ変動し得る場合がある；腫瘍は、異なる位置で異なる遺伝的変異さえ有し得る。これら及び他のタイプの遺伝的変異により、ＷＧ配列決定を行うことが望ましい。典型的には、ＷＧ配列決定は、血液又は他の流体又は組織のアリコートを個体から取得し、そのアリコート内のＤＮＡを精製し、次いで、そのＤＮＡを、配列決定されるのに適したサイズのより小さな断片に断片化するこ

とによって開始する。ＤＮＡを配列決定するために使用される特定の機器に依存して、特定のサイズ範囲（例えば、約１００～約１０００塩基対）の断片のみが適切に配列決定され得る。しかしながら、超音波処理又は酵素的断片化などの機械的プロセスを使用してＤＮＡを断片化するこれまでに公知の方法は、異なる断片サイズの比較的広い分布を生じる。その分布内の断片のごく一部（例えば、約２０％）のみが、配列決定に適切な範囲のサイズを有してもよく、ＷＧの残りの部分（例えば、約８０％）は廃棄されてもよい。本明細書で提供されるように、ＷＧ－又は任意の他の適切なポリヌクレオチド又はポリヌクレオチドの集合－は、任意の所望の数の異なる断片サイズに断片化され得、その断片サイズの各々は比較的良好に制御され得る。

【０３４８】

例えば、図２Ａに示されるように、所与の種の染色体の一部又は更には全部を含むＷＧの第１の精製サンプル２０１を得ることができる。図２Ａに示される非限定的な例では、サンプル２０１は、ヒトのＷＧを含み、したがって、２３本のＤＮＡ染色体Ｃ１、Ｃ２、．．．Ｃ２３を含む。本明細書で提供されるように処理され得る所与のサンプルは、任意の適切な数の任意の適切なタイプのポリヌクレオチドを含み得ることが理解されるであろう。サンプル２０１内の染色体Ｃ１、Ｃ２、．．．Ｃ２３は、それらの長さに沿って異なる配列２１０、２２０を含み、これらの配列の異なる部分は、おおよそ均一なサイズの断片を形成するように、おおよそ均一に離間した位置で染色体を切断するために使用されるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのための所定の標的として使用され得る。例示的に、第１の配列２１０は、おおよそ第１の塩基対数だけ互いに離間されてもよく、第２の配列２２０は、おおよそ第２の塩基対数だけ互いに離間されてもよい。配列２１０は、各個々の位置で同じ特定の配列を含む必要はなく、同様に、配列２２０は、各個々の位置で同じ特定の配列を含む必要はないことに留意されたい。代わりに、配列２１０は、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１のセットのための所定の標的として使用される異なる染色体内の選択された位置の第１のセットを表し、そのＲＮＰの各々は、配列２１０の特定の１つに標的化されてもよく、配列２２０は、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第２のセットのための所定の標的として使用される異なる染色体内の選択された位置の第２のセットを表し、そのＲＮＰの各々は、配列２２０の特定の１つに標的化されてもよい。

【０３４９】

図２Ｂに示される組成物２０２は、第１の配列２１０にハイブリダイズしたＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１のセット２５１と、第２の配列２２０にハイブリダイズしたＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　２５２の第２のセット２５２とを含む。Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１のセット２５１及び第２のセット２５２はそれぞれ、サンプル内の第１及び第２の配列を切断して、各々が互いにおおよそ同じ数の塩基対を有するＷＧ断片を生成するためのものであり得る。ＣａｓはＣａｓ９を含み得る。Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１のセット２５１及び第２のセット２５２は各々、任意の適切な数のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを含み得る。第１のセット２５１のＲＮＰの各所与の１つは、第１のセット又は第２のセット内の１つ以上の他のＲＮＰと同じであってもよく、その場合、そのようなＲＮＰは、互いに同じ特定の配列２１０又は２２０を標的としてもよく、又は第１のセット若しくは第２のセット内の複数の他のＲＮＰと異なっていてもよく、その場合、そのＲＮＰは、そのような他のＲＮＰとは異なる特定の配列を標的としてもよい。同様に、第２のセット２５２のＲＮＰの各所与の１つは、第１のセット又は第２のセット内の１つ以上の他のＲＮＰと同じであってもよく、その場合、そのようなＲＮＰは、互いに同じ特定の配列２１０又は２２０を標的としてもよく、又は第１のセット又は第２のセット内の複数の他のＲＮＰと異なっていてもよく、その場合、そのＲＮＰは、そのような他のＲＮＰとは異なる特定の配列を標的としてもよい。

【０３５０】

Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１及び第２のセット２５１、２５２の各々におけるＲＮＰの数は、適切には、所望のポリヌクレオチド（例えば、１本以上の二本鎖ＤＮＡ染色体、又は二本鎖ＤＮＡ染色体のセット全体）を断片化するように選択され得る。例示的に、

Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１のセット２５１は、少なくとも約５０，０００個の異なるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ、又は少なくとも約１００，０００個の異なるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ、又は少なくとも約１，０００，０００個の異なるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ、又は少なくとも約１０，０００，０００個の異なるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ、又は少なくとも約２０，０００，０００個の異なるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを含み得る。例示的に、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第２のセット２５２は、少なくとも約５０，０００個の異なるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ、又は少なくとも約１００，０００個の異なるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ、又は少なくとも約１，０００，０００個の異なるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ、又は少なくとも約１０，０００，０００個の異なるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ、又は少なくとも約２０，０００，０００個の異なるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを含み得る。

【０３５１】

図２Ｃに示される組成物２０３は、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１のセット２５１及び第２のセット２５２によるそのような切断部から生じ、各々がおおよそＸ塩基対を含む断片２６０のセットを含むか、又は本質的にそれからなる。したがって、第１のサンプル２０１中の実質的に全ＷＧ（又は任意の適切なポリヌクレオチド）は、規定されたサイズの断片２６０に断片化され得る。Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１及び第２のセット２５１、２５２によってそれぞれ標的化される染色体Ｃ１、Ｃ２、．．．Ｃ２３に沿った配列２１０、２２０の特定の位置は、任意の適切な長さの断片２６０を提供するように選択され得ることが理解されるであろう。この特定の例では、配列２１０が離間している第１の塩基対数は、配列２１０及び２２０が各染色体の長さに沿って実質的に交互になるように、配列２２０が離間している第２の塩基対数とおおよそ同じである。例示的に、第１の塩基対数は、約１００～約２０００（例えば、約５００～約７００）であり得、第２の塩基対数は、約１００～約２０００（例えば、約５００～約７００）であり得るか、又は第１の塩基対数は、約１０００塩基対～約３０００塩基対（例示的に、約２０００塩基対）であり得、第１の塩基対数は、約１０００塩基対～約３０００塩基対（例示的に、約２０００塩基対）であり得る。

【０３５２】

配列２１０及び２２０は集合的に、適切に予め規定され、比較的等間隔の位置にあるので、断片２６０の各々における塩基対数は、比較的密な分布を有し得る。例えば、ＷＧ断片２６０中の塩基対数は、約２０％未満、又は約１０％未満、又は約５％未満、又は約２％未満、又は更に約１％未満だけ変動し得る。ＷＧ断片２６０の各々における塩基対数（Ｘ）は、例示的に、約１００塩基対～約１０００塩基対、例えば、約２００塩基対～約４００塩基対（例示的に、約３００塩基対）であり得、又は約１０００塩基対～約３０００塩基対（例示的に、約２０００塩基対）であり得る。

【０３５３】

Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１及び／又は第２のセットは、他の長さを有するＷＧ断片を生成するために使用され得ることに留意されたい。実際に、所与のＷＧについて、互いに異なる規定された長さを有する断片を生成し、次いで、そのような異なる規定された長さの各々を使用して得られる配列を比較することが所望され得る。本明細書で提供されるように、異なる断片長はそれぞれ、ＷＧの異なるサンプル（又は他のポリヌクレオチドの異なるサンプル）中で生成され得る。例えば、図２Ｄに示されるように、ＷＧの第２の精製サンプル２０４を得ることができ、これは、図２Ａに示されるサンプル２０１のように、おおよそ第１の塩基対数だけ互いに離間している第１の配列２１０、及びおおよそ第２の塩基対数だけ互いに離間している第２の配列２２０を有する２３本のＤＮＡ染色体Ｃ１、Ｃ２、．．．Ｃ２３を含む。図２Ａに具体的に示されていないが、染色体Ｃ１、Ｃ２、．．．Ｃ２３は、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１のセットのための所定の標的として使用され得る異なる染色体内の選択された位置の他のセットを表し得る他の配列を含み得る。例えば、図２Ｄに示される配列２３０は、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第３のセットのための所定の標的として使用される異なる染色体内の選択された位置の第３のセットを

表し、そのＲＮＰの各々は、配列２３０のうちの特定のものに標的化され得る。

【０３５４】

図２Ｅに示される組成物２０５は、第１の配列２１０にハイブリダイズしたＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１のセット２５１、及び第２の配列２２０にハイブリダイズしたＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　２５２の第２のセット２５２、並びに第３の配列２３０にハイブリダイズしたＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第３のセット２５３を含む。図２Ｂを参照して説明されたものと同様の方法で、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１のセット２５１、第２のセット２５２、及び第３のセット２５３はそれぞれ、サンプル内の第１、第２、及び第３の配列を切断して、各々が互いにおおよそ同じ数の塩基対を有するＷＧ断片を生成するためのものであり得る。ＣａｓはＣａｓ９を含み得る。図２Ｂを参照して説明されたものと同様の方法で、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１のセット２５１、第２のセット２５２、及び第３のセット２５３は各々、任意の適切な数のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを含み得る。第１のセット２５１のＲＮＰの各所与の１つは、第１のセット、第２のセット、又は第３のセット内の１つ以上の他のＲＮＰと同じであってもよく、その場合、そのようなＲＮＰは、互いに同じ特定の配列２１０、２２０、又は２３０を標的としてもよく、又は第１のセット、第２のセット、又は第３のセット内の複数の他のＲＮＰと異なっていてもよく、その場合、そのＲＮＰは、そのような他のＲＮＰとは異なる特定の配列を標的としてもよい。同様に、第２のセット２５２のＲＮＰの各所与の１つは、第１のセット、第２のセット、又は第３のセット内の１つ以上の他のＲＮＰと同じであってもよく、その場合、そのようなＲＮＰは、互いに同じ特定の配列２１０、２２０、又は２３０を標的としてもよく、又は第１のセット、第２のセット、又は第３のセット内の複数の他のＲＮＰと異なっていてもよく、その場合、そのＲＮＰは、そのような他のＲＮＰとは異なる特定の配列を標的としてもよい。同様に、第３のセット２５３のＲＮＰの各所与の１つは、第１のセット、第２のセット、又は第３のセット内の１つ以上の他のＲＮＰと同じであってもよく、その場合、そのようなＲＮＰは、互いに同じ特定の配列２１０、２２０、又は２３０を標的としてもよく、又は第１のセット、第２のセット、又は第３のセット内の複数の他のＲＮＰと異なっていてもよく、その場合、そのＲＮＰは、そのような他のＲＮＰとは異なる特定の配列を標的としてもよい。

【０３５５】

Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１、第２、及び第３のセット２５１、２５２、２５３の各々におけるＲＮＰの数は、適切には、所望のポリヌクレオチド（例えば、１本以上の二本鎖ＤＮＡ染色体、又は二本鎖ＤＮＡ染色体のセット全体）を断片化するように選択され得る。例示的に、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１のセット２５１は、少なくとも約５０，０００個の異なるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ、又は少なくとも約１００，０００個の異なるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ、又は少なくとも約１，０００，０００個の異なるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ、又は少なくとも約１０，０００，０００個の異なるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ、又は少なくとも約２０，０００，０００個の異なるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを含み得る。例示的に、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第２のセット２５２は、少なくとも約５０，０００個の異なるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ、又は少なくとも約１００，０００個の異なるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ、又は少なくとも約１，０００，０００個の異なるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ、又は少なくとも約１０，０００，０００個の異なるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ、又は少なくとも約２０，０００，０００個の異なるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを含み得る。例示的に、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第３のセット２５３は、少なくとも約５０，０００個の異なるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ、又は少なくとも約１００，０００個の異なるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ、又は少なくとも約１，０００，０００個の異なるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ、又は少なくとも約１０，０００，０００個の異なるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ、又は少なくとも約２０，０００，０００個の異なるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを含み得る。

【０３５６】

図２Ｆに示される組成物２０６は、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１のセット２５１、

第２のセット２５２、及び第３のセット２５３によるそのような切断部から生じ、各々がおおよそＹ塩基対（Ｘ≠Ｙ）を含む断片２７０のセットを含むか、又は本質的にそれからなる。したがって、第２のサンプル２０４中の実質的に全ＷＧ（又は任意の適切なポリヌクレオチド）は、規定されたサイズの断片２７０に断片化され得る。Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１、第２、及び第３のセット２５１、２５２、２５３によってそれぞれ標的化される染色体Ｃ１、Ｃ２、．．．Ｃ２３に沿った配列２１０、２２０、２３０の特定の位置は、任意の適切な長さの断片２７０を提供するように選択され得ることが理解されるであろう。この特定の例では、配列２１０が離間している第１の塩基対数は、図２Ａ～図２Ｃを参照して説明されたものと同様の方法で、配列２１０及び２２０が各染色体の長さに沿って実質的に交互になるように、配列２２０が離間している第２の塩基対数とおおよそ同じである。しかしながら、配列２３０が離間している第３の塩基対数は、塩基対の第１及び／又は第２の数と異なっていてもよい。したがって、配列２１０及び２２０は、各染色体の長さに沿って実質的に交互であり得るが、配列２３０は、図２Ｅに示されるような方法で、配列２１０及び２２０のうちの異なるものの間に規則的に挿入され得る。例示的に、第１の塩基対数は、約１００～約２０００（例えば、約５００～約７００）であり得、第２の塩基対数は、約１００～約２０００（例えば、約５００～約７００）であり得、第３の塩基対数は、約１００～約２０００（例えば、約２００～約４００）であり得るか、又は第１の塩基対数は、約１０００～約３０００（例えば、約２０００）であり得、第２の塩基対数は、約１０００～約３０００（例えば、約２０００）であり得、第３の塩基対数塩基対数は、約５００～約２０００（例えば、約１０００）であり得る。

【０３５７】

配列２１０、２２０、２３０は集合的に、適切に予め規定され、比較的等間隔の位置にあるので、断片２７０の各々における塩基対数は、比較的密な分布を有し得る。例えば、ＷＧ断片２７０中の塩基対数は、約２０％未満、又は約１０％未満、又は約５％未満、又は約２％未満、又は更に約１％未満だけ変動し得る。ＷＧ断片２７０の各々における塩基対（Ｙ）の数は、例示的に、約１００塩基対～約１０００塩基対、例えば、約１００塩基対～約２００塩基対（例えば、約１５０塩基対）であり得る。

【０３５８】

サンプル２０１を使用して実行された処理をサンプル２０４を使用して実行された処理と比較すると、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの同じセットを使用して、互いに異なる長さを有するＷＧ断片を生成し得ることが理解され得る。例えば、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１及び第２のセット２５１、２５２は、長さＸを有する断片２６０を生成するために使用されてもよく、また、長さＹ（Ｘ≠Ｙ）を有する断片２７０を生成するために（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第３のセット２５３と組み合わせて）使用されてもよい。Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１、第２、及び／又は第３のセットは、同様に、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの更に別の異なるセットを提供する必要なく、ＷＧの他のサンプルのための更に他の規定された長さの断片を生成するために使用され得る。

【０３５９】

例えば、図２Ｇに示されるように、ＷＧの第３の精製サンプル２０７を得ることができ、これは、図２Ａに示されるサンプル２０１、及び図２Ｄに示されるサンプル２０４のように、おおよそ第１の塩基対数だけ互いに離間している第１の配列２１０を有する２３本のＤＮＡ染色体Ｃ１、Ｃ２、．．．Ｃ２３を含む。図２Ｇに具体的に示されていないが、染色体Ｃ１、Ｃ２、．．．Ｃ２３は、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの他のセットのための所定の標的として使用され得る異なる染色体内の選択された位置の他のセットを表し得る他の配列を含み得る。例えば、図２Ａに示される配列２２０及び図２Ｄに示される配列２３０は、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの他のセットのための所定の標的として使用される異なる染色体内の選択された位置の他のセットを表す。図２Ｈに示される組成物２０８は、第１の配列２１０にハイブリダイズされたＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１のセット２５１を含む。図２Ｂを参照して説明されたものと同様の方法で、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１のセット２５１は、サンプル内の第１の配列２１０を切断して、各々が互いにおおよ

そ同じ数の塩基対を有するＷＧ断片を生成するためのものであり得る。ＣａｓはＣａｓ９を含み得る。図２Ｂを参照して説明されたものと同様の方法で、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１のセット２５１は各々、任意の適切な数のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを含み得る。第１のセット２５１のＲＮＰの各所与の１つは、第１のセット内の１つ以上の他のＲＮＰと同じであってもよく、その場合、そのようなＲＮＰは、互いに同じ特定の配列２１０を標的としてもよく、又は第１のセット内の複数の他のＲＮＰと異なっていてもよく、その場合、そのＲＮＰは、そのような他のＲＮＰとは異なる特定の配列を標的としてもよい。Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１のセット２５１中のＲＮＰの数は、適切には、所望のポリヌクレオチド（例えば、１本以上の二本鎖ＤＮＡ染色体、又は二本鎖ＤＮＡ染色体のセット全体）を断片化するように選択され得る。例示的に、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１のセット２５１は、少なくとも約５０，０００個の異なるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ、又は少なくとも約１００，０００個の異なるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ、又は少なくとも約１，０００，０００個の異なるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ、又は少なくとも約１０，０００，０００個の異なるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ、又は少なくとも約２０，０００，０００個の異なるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを含み得る。

【０３６０】

図２Ｉに示される組成物２０９は、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１のセット２５１（図２Ｈに示される）によるそのような切断部から生じ、各々がおおよそＺ個の塩基対（Ｘ≠Ｙ≠Ｚ）を含む断片２８０のセットを含むか、又は本質的にそれからなる。したがって、第３のサンプル２０７中の実質的に全ＷＧ（又は任意の適切なポリヌクレオチド）は、規定されたサイズの断片２８０に断片化され得る。Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１のセット２５１によってそれぞれ標的化される染色体Ｃ１、Ｃ２、．．．Ｃ２３に沿った配列２１０の特定の位置は、任意の適切な長さの断片２８０を提供するように選択され得ることが理解されるであろう。例示的に、第１の塩基対数は、約１００～約２０００（例えば、約５００～約７００、例えば、約６００、又は約２００～約４００、例えば、約３００）であり得、又は約１０００塩基対～約３０００塩基対、例えば、約２０００であり得る。配列２１０は集合的に、適切に予め規定され、比較的等間隔の位置にあるので、断片２８０の各々における塩基対数は、比較的密な分布を有し得る。例えば、ＷＧ断片２８０中の塩基対数は、約２０％未満、又は約１０％未満、又は約５％未満、又は約２％未満、又は更に約１％未満だけ変動し得る。ＷＧ断片２８０の各々における塩基対（Ｚ）の数は、例示的に、約１００塩基対～約１０００塩基対、例えば、約５００～約７００塩基対（例示的に、約６００）、若しくは約２００～約４００塩基対（例示的に、約３００）であり得、又は約１０００塩基対～約３０００塩基対、例えば、約２０００であり得る。

【０３６１】

第３のサンプル２０７と共にＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１のセット２５１を使用する代わりに、第２のセット２５２又は第３のセット２５３のいずれかを第１のセット２５１の代わりに使用して、代わりに他の長さを有する断片を提供し得る標的配列２２０又は２３０を標的化することができることが理解されるであろう。任意の適切な数のポリヌクレオチド（１つのポリヌクレオチドを含む）の任意の適切な数のサンプル（１つのサンプルを含む）が、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの任意の適切な数のセット（１つのセットを含む）を使用して調製され得ることも理解されるであろう。例えば、図２Ｊは、ＷＧの断片を生成する方法における操作のフローを示す。図２Ｊに示される方法２０００は、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのセットを、おおよそ塩基対数だけ互いに離間しているＷＧのサンプル内の配列にハイブリダイズさせること（操作２００１）を含む。得られた組成物は、おおよそ塩基対数だけ互いに離間しているＷＧのサンプル内の配列にハイブリダイズしたＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのセットを含み得る。Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのセットはそれぞれ、サンプル内の配列を切断して、各々が互いにおおよそ同じ数の塩基対を有するＷＧ断片を生成するためのものであり得る。例えば、図２Ｊに示される方法２０００は、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのセットを用いて配列をそれぞれ切断して、各々が互いにおおよそ同じ数の塩基対を有するＷＧ断片のセットを生成すること（操作２００２）を含み得る。

配列間の塩基対数は、約１００～約２０００、例えば、約５００～約７００（例えば、約６００）、又は約２００～約４００（例えば、約３００）、又は約１００～約２００（例えば、約１５０）であり得、又は約１０００塩基対～約３０００塩基対、例えば、約２０００であり得る。いくつかの例では、ＷＧ断片内の塩基対数は、約１００～約２０００、例えば、約１００～約２００（例えば、約１５０）、又は約２００～約４００（例えば、約３００）、又は約５００～約７００（例えば、約６００）であり得、又は約１０００塩基対～約３０００塩基対、例えば、約２０００であり得る。ＷＧ断片のセットのＷＧ断片内の塩基対数は、約２０％未満変動し得る。

【０３６２】

追加的又は代替的に、他のサンプルでは、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの１つ以上の他のセットを互いに組み合わせて使用して、ＷＧの断片を生成してもよい。例えば、図２Ｋは、ＷＧのサンプルにおいてＷＧの断片を生成する別の方法における操作のフローを示す。図２Ｋに示される方法２０１０は、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１のセットを、おおよそ第１の塩基対数だけ互いに離間しているＷＧ内の第１の配列にハイブリダイズさせること（操作２０１１）を含み得る。図２Ｋに示される方法２０１０はまた、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第２のセットを、おおよそ第２の塩基対数だけ互いに離間されたＷＧ内の第２の配列にハイブリダイズさせること（操作２０１２）を含み得る。操作２０１１及び２０１２は、例えば、ＷＧのサンプルをＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１及び第２のセットと接触させることによって、互いに同時に行われ得る。あるいはサンプルをＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１のセットと接触させ、続いてＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第２のセットと接触させてもよく、又はその逆であってもよい。図２Ｋに示される方法２０１０はまた、第１のサンプル内のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１及び第２のセットで第１及び第２の配列をそれぞれ切断して、各々が互いにおおよそ同じ数の塩基対を有するＷＧ断片の第１のセットを生成することを更に含み得る。第１及び第２の配列は、互いに同時に切断され得る。あるいは第１の配列を、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第１のセットで切断し、続いてＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの第２のセットで切断してもよく、又はその逆であってもよい。図２Ｋは、例えば、図２Ｄ～図２Ｆを参照して説明されるような方法でＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの１つ以上の更なるセットを使用して更なる配列を切断するように適切に改変され得ることが理解されるであろう。

【０３６３】

所与のサンプル内のポリヌクレオチドを切断するために使用されるＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのセットの特定の数にかかわらず、得られる断片が増幅され、配列決定され得ることが理解されるであろう。例えば、増幅アダプターは、図１Ｊを参照して説明されるのと同様の方法で断片の末端にライゲーションされ得、アンプリコンは、それにライゲーションされた増幅アダプターを有する断片から生成され得、そしてアンプリコンは配列決定され得る。例えば、増幅アダプターは、断片２６０、断片２７０、及び／又は断片２８０の末端にライゲーションされ得、次いで、そのような断片が増幅され、配列決定され得る。いくつかの例では、増幅アダプターは、固有の分子識別子（ＵＭＩ）を含む。断片の異なるセットは、互いに別々に増幅及び配列決定され得るか、又は増幅及び／若しくは配列決定のために一緒に混合され得る。例示的に、断片２６０、２７０、及び／又は２８０の任意の適切なもののアンプリコンは、増幅及び／又は配列決定のために一緒に混合されてもよい。

【０３６４】

したがって、各々が互いにおおよそ同じ数の塩基対を有する少なくとも約１，０００，０００個のＷＧ断片のセットを含むか、又は本質的にそれからなる組成物が本明細書において提供される。例示的に、塩基対数は、約１００～約２００（例えば、約１５０）、又は約２００～約４００（例えば、約３００）、又は約５００～約７００（例えば、約６００）、又は約１０００～約３０００、例えば、約２０００であり得る。組成物は、種の全ゲノムに由来し得、全ゲノムの配列を提供するように増幅及び配列決定され得る。ＷＧ断片のサイズは、使用される配列決定技術と共に使用するために調整することができ、ＷＧ

の比較的低い部分が配列決定に使用可能な長さであり得る機械的断片化技術と比較して、所与のサンプル内の実質的に全ＷＧを配列決定することができる。

【０３６５】

切断を用いたポリヌクレオチドの標識

本明細書の他の箇所に記載されるように、固有の分子識別子（ＵＭＩ）は、配列決定のためにそれらのポリヌクレオチドを標識する方法として、それぞれのポリヌクレオチドにカップリングされ得る。例示的に、所与のＵＭＩにカップリングした所与のポリヌクレオチド分子の任意のアンプリコンはまた、そのＵＭＩを含み得、それによって、それらのアンプリコンは、他のＵＭＩにカップリングした他のポリヌクレオチド分子と比較して、そのポリヌクレオチド分子に由来するものとして一意的に同定され得る。しかしながら、そのようなＵＭＩは増幅プロセス中に突然変異する可能性があり、そのような突然変異は、アンプリコンが由来するポリヌクレオチド分子を同定する能力を阻害する可能性がある。本明細書で提供されるように、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰは、ＵＭＩを必要とすることなく、配列決定のためにそれらのポリヌクレオチド分子及びそれらのアンプリコンを標識するような方法でポリヌクレオチド分子を切断するために使用され得るが、そのようなＵＭＩは、任意選択的に本明細書で提供されるような方法で切断されるポリヌクレオチドにカップリングされ得る。

【０３６６】

例えば、図３Ａ～図３Ｅは、切断部を使用してポリヌクレオチドを標識するための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。図３Ａは、二本鎖ＤＮＡなどの標的ポリヌクレオチドの第１及び第２の分子Ｍ１、Ｍ２を含む組成物３０１を示す。分子Ｍ１、Ｍ２の各々は、実質的に同じ配列を有してもよく、したがって、どの分子が「第１」であるとみなされ、どの分子が「第２」であるかは任意である。標的ポリヌクレオチドの配列は、互いに１つ以上の異なる位置でポリヌクレオチド分子Ｍ１、Ｍ２を切断するために使用され得る異なる部分配列を含み得、そのような切断のそれぞれの位置は、それぞれのポリヌクレオチド分子を標識するために考慮され得る。例えば、ポリヌクレオチド分子の各々は、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰが標的化され得る（ｇＲＮＡの関連部分に相補的な配列を有する）第１の部分配列３１１と、第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰが標的化され得る第２の部分配列３１２と、第３のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰが標的化され得る第３の部分配列３１３と、第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰが標的化され得る第４の部分配列３１４とを含み得る。第１及び第２の部分配列３１１、３１２は、互いに部分的にのみ重複してもよく、第３及び第４の部分配列３１３、３１４は、互いに部分的にのみ重複してもよい。

【０３６７】

図３Ｂに示される組成物３０２において、標的ポリヌクレオチドの第１及び第２の分子Ｍ１、Ｍ２は、流体中で、第１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　３５１、３５２の各々の複数と接触し、また、第３及び第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　３５３、３５４の各々の複数と接触してもよい。ＲＮＰのいずれが分子Ｍ１、Ｍ２の各々の中の対応する部分配列と最初にハイブリダイズするかに依存して、ＲＮＰの他の部分は、図３Ｂに示されるような方法で、これらの分子の中の他の部分配列とハイブリダイズすることを阻害され得る。非限定的な一例では、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　３５１のうちの１つは、第１の分子Ｍ１内の第１の部分配列３１１にハイブリダイズしてもよく、第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つは、第２の分子Ｍ２内の第２の部分配列３１２にハイブリダイズしてもよい。第１及び第２の部分配列３１１、３１２は互いに部分的にのみ重複するので、第１の分子Ｍ１にハイブリダイズする第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　３５１のうちの１つは、第１の分子Ｍ１における第２の部分配列３１１への第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　３５１のいずれかのハイブリダイゼーションを阻害し得、第２の分子Ｍ２にハイブリダイズする第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　３５２のうちの１つは、第２の分子Ｍ２における第１の部分配列３１２への第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　３５１のいずれかのハイブリダイゼーションを阻害し得る。すなわち、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ

ＲＮＰ　３５１のうちの１つが分子のうちの１つにハイブリダイズすれば、第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　３５２もその分子にハイブリダイズしなくてもよく、第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　３５２のうちの１つが分子のうちの１つにハイブリダイズすれば、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　３５１もその分子にハイブリダイズしなくてもよい。次いで、図３Ｃを参照してより詳細に説明されるような方法で、分子は、第１又は第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　３５１、３５２がハイブリダイズされる第１又は第２の部分配列３１１、３１２で切断され得る。したがって、切断部は互いに異なる位置にあってもよい。例示的に、第１の分子Ｍ１の切断部は、標的ポリヌクレオチドの配列中で、第２の分子Ｍ２の切断部とは異なる位置にあり得る。いくつかの状況では、同じタイプのＲＮＰが、第１及び第２の分子Ｍ１、Ｍ２の両方にハイブリダイズし得、この場合、これらの分子は、同じ位置で切断され得ることが理解されるであろう。

【０３６８】

図３Ｂに例示されるような方法で、第３及び第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　３５３、３５４は、同様に、第３又は第４の部分配列３１３、３１４にハイブリダイズし得、他のＲＮＰのそれらの部分配列へのハイブリダイゼーションを阻害し得る。例えば、第３のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　３５３のうちの１つは、第１の分子Ｍ１内の第３の部分配列３１３にハイブリダイズしてもよく、第１の分子Ｍ１内の第４の部分配列３１４への第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのいずれかのハイブリダイゼーションを阻害してもよい。図３Ｃを参照してより詳細に説明されるような方法で、第１の分子Ｍ１は、次いで、第３のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　３５３のうちの１つを使用して、第３の部分配列において切断され、断片を生成し得る。あるいは第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　３５４のうちの１つは、第１の分子Ｍ１内の第４の部分配列３５４にハイブリダイズしてもよく、第３のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちのいずれかの第１の分子中の第３の部分配列へのハイブリダイゼーションを阻害してもよい。次いで、図３Ｃを参照してより詳細に説明されるような方法で、第１の分子Ｍ１は、第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　３５４のうちの１つを使用して、第４の部分配列において切断され、断片を生成し得る。ＲＮＰは、同様の方法で、第２の分子Ｍ２の異なる部分配列にハイブリダイズし得る。例えば、第３のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　３５３のうちの１つは、第２の分子Ｍ２内の第３の部分配列３１３にハイブリダイズしてもよく、第２の分子Ｍ２内の第４の部分配列３１４への第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　３５４のいずれかのハイブリダイゼーションを阻害してもよい。図３Ｃを参照してより詳細に説明されるような方法で、第２の分子Ｍ１は、次いで、第３のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　３５４のうちの１つを使用して、第３の部分配列３１３において切断され、断片を生成し得る。あるいは第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　３５４のうちの１つは、第２の分子Ｍ２における第４の部分配列３１４にハイブリダイズしてもよく、第２の分子Ｍ２における第３の部分配列３１３への第３のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　３５３のいずれかのハイブリダイゼーションを阻害してもよい。次いで、図３Ｃを参照してより詳細に説明されるような方法で、第２の分子Ｍ２は、第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　３５４のうちの１つを使用して、第４の部分配列において切断され、断片を生成し得る。いくつかの状況では、同じタイプのＲＮＰが、第１及び第２の分子Ｍ１、Ｍ２の両方にハイブリダイズし得、この場合、これらの分子は、同じ位置で切断され得ることが理解されるであろう。しかしながら、統計的には、第１及び第２の分子における切断の少なくとも１つは、標的ポリヌクレオチドの配列において互いに異なる位置にあり得る可能性が高い。

【０３６９】

ここで図３Ｃを参照すると、第１及び第２の分子Ｍ１、Ｍ２は、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを使用して切断されて、組成物３０３を生成し得る。例示的に、第１の分子Ｍ１は、それにハイブリダイズした第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　３５１のうちの１つを使用して位置３４１で切断され得、第２の分子Ｍ２は、第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つを使用して位置３４２で切断され得る。同様に、第１の分子Ｍ１は、それにハイブリダイズした第３又は第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　３５３、３５４のうちの１つ

を使用して、位置３４３又は３４４で切断され得、第２の分子Ｍ２は、それにハイブリダイズした第３又は第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　３５３、３５４のうちの１つを使用して、位置３４３又は３４４で切断され得る。しかしながら、標的ポリヌクレオチドの任意の分子は、任意の適切な位置、例えば、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰがハイブリダイズし得る位置で切断され得ることを理解されたい。１つの分子における位置３４１での切断部は、例えば、標的ポリヌクレオチドの配列中で、約２塩基対～約４０塩基対（例えば、約２～２０塩基対、又は約５～１０塩基対）だけ別の分子における位置３４２での切断部からオフセットされ得る。同様に、１つの分子における位置３４３での切断部は、例えば、標的ポリヌクレオチドの配列中で、約２塩基対～約４０塩基対（例えば、約２～２０塩基対、又は約５～１０塩基対）だけ別の分子における位置３４４での切断部からオフセットされ得る。したがって、図３Ｃに示されるように、第１及び第２の分子Ｍ１、Ｍ２の各々において作製される切断部３４１又は３４２及び３４３又は３４４の特定の組み合わせに依存して、異なる長さの断片及び異なる塩基対数を有する断片が形成され得る。例えば、断片３３１は、切断部３４１の位置と切断部３４３の位置との間の長さを有し得る。断片３３２は、切断部３４２の位置と切断部３４４の位置との間の長さを有し得る。断片３３３は、切断部３４１の位置と切断部３４４との間の長さを有し得、断片３３４は、切断部３４２の位置と切断部３４３との間の長さを有し得る。断片３３１及び３３２は、互いにおおよそ同じ長さを有し得るが、様々な断片内の切断部の特定の位置のために、断片３３３よりも短く、断片３３４より長くあり得ることに留意されたい。断片３３１、３３２、３３３、３３４の各々は、約１００塩基対～約１０００塩基対、例えば、約５００塩基対～約７００塩基対（例示的に、約６００塩基対）、又は約２００塩基対～約４００塩基対（例示的に、約３００塩基対）、又は約１００塩基対～約２００塩基対（例示的に、約１５０塩基対）、又は約１０００～約３０００塩基対、例えば、約２０００塩基対の長さを有し得る。

【０３７０】

したがって、図３Ｃに示される組成物３０３は、配列を有する標的ポリヌクレオチドの第１及び第２の分子Ｍ１、Ｍ２を含み得る。第１の分子（例えば、断片３３１又は断片３３３）は、第１の部分配列３１１に第１の末端を有し得、第２の分子（例えば、断片３３２又は３３４）は、第２の部分配列３１２に第１の末端を有し得る。図４を参照して説明したような方法で、第１の部分配列３１１、３１２は第２の部分配列と部分的にのみ重複してもよい。第１の分子の第１の末端は、標的ポリヌクレオチドの配列中で、第２の分子の第１の末端とは異なる位置にあってもよい。第１の分子の第１の末端は、例えば、標的ポリヌクレオチドの配列中で、約２塩基対～約１０塩基対だけ第２の分子の第１の末端からオフセットされ得る。第１の分子（例えば、断片３３１）は、第３の部分配列３１３に第２の末端を更に有し得、第２の分子（例えば、断片３３２又は３３４）は、第３の部分配列３１３又は第４の部分配列３１４に第２の末端を更に有し得る。第３の部分配列は、第４の部分配列と部分的にのみ重複してもよい。第２の分子の第１の末端は、標的ポリヌクレオチドの配列中で、第２の分子の第２の末端とは異なる位置にあってもよい。第１の分子の第２の末端は、標的ポリヌクレオチドの配列中で、約２塩基対～約１０塩基対だけ第２の分子の第２の末端からオフセットされ得る。第１及び第２の分子は、互いに異なる塩基対数を含み得、又は互いに同じ数の塩基対を有し得る。

【０３７１】

いくつかの例では、Ｃａｓは、それぞれのＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　３５１、３５２、３５３、及び／又は３５４がハイブリダイズする分子を切断するＣａｓ９を含む。他の例では、Ｃａｓは、不活性化Ｃａｓ９（ｄＣａｓ９）を含む。非限定的な一例では、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　３５１のうちの１つ、及び第３又は第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　３５３、３５４のうちの１つが、第１の分子Ｍ１にハイブリダイズしている間に、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰとその第３又は第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰとの間にない第１の分子の任意の部分は、例えば、エキソヌクレアーゼＩＩＩ又はエキソヌクレアーゼＶＩＩを使用して分解され得る。別の非限定的な例では、第２のＣａｓ－ｇ

ＲＮＡ　ＲＮＰ　３５２のうちの１つ、及び第３又は第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　３５３、３５４のうちの１つが、第２の分子Ｍ２にハイブリダイズしている間に、第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰとその第３又は第４のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰとの間にない第２の分子の任意の部分は、例えば、エキソヌクレアーゼＩＩＩ又はエキソヌクレアーゼＶＩＩを使用して分解され得る。すなわち、適切なエキソヌクレアーゼを使用して、それにハイブリダイズするＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの間に位置しない分子の部分を分解することができる。したがって、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰは、それらの間の分子の部分を保護すると考えられ得る。

【０３７２】

本発明の方法を使用して生成された断片は、増幅され、配列決定され得る。例えば、図３Ｄに示されるように、増幅アダプター３６０は、図１Ｊを参照して説明されるのと同様の方法で断片の末端にライゲーションされ得、アンプリコンは、それにライゲーションされた増幅アダプターを有する断片から生成され得、そしてアンプリコンは配列決定され得る。例えば、増幅アダプター３６０は、断片３３１、３３２、３３３、３３４の末端にライゲーションされ得、次いで、そのような断片が増幅され、配列決定され得る。いくつかの例では、増幅アダプターは固有の分子識別子（ＵＭＩ）を含むが、そのようなＵＭＩは純粋に任意である。任意のＵＭＩを、増幅アダプターと同じ操作で、第１及び第２の断片の末端にカップリング及びライゲーションすることができる。

【０３７３】

第１の部分配列３１１、第２の部分配列３１２、第３の部分配列３１３、及び第４の部分配列３１４を使用して、異なる断片のアンプリコンを、第１及び第２の分子Ｍ１、Ｍ２のうちの異なる分子に由来するものとして同定することができる。例示的に、断片３３１及びそのアンプリコンは、部分配列３１１内に収まる位置３４１に第１の末端を有し、部分配列３１３内に収まる位置３４２に第２の末端を有し得る。断片３３２及びそのアンプリコンは、部分配列３１２内に収まる位置３４２の第１の末端と、部分配列３１４内に収まる位置３４４の第２の末端とを有し得る。断片３３３及びそのアンプリコンは、部分配列３１１内に収まる位置３４１に第１の末端、及び部分配列３１４内に収まる位置３４４に第２の末端を有し得；断片３３４及びそのアンプリコンは、部分配列３１２内に収まる位置３４２に第１の末端、及び部分配列３１３内に収まる位置３３２に第２の末端を有し得る。したがって、部分配列３１１、３１２、３１３、３１４内の所与のアンプリコンのそれぞれの末端の位置に基づいて、そのようなアンプリコンが分子Ｍ１又はＭ２のうちの特定の１つに由来することを決定することができる。同様に、任意のＵＭＩを使用して、アンプリコンを分子Ｍ１又はＭ２の特定の１つに由来するものとして同定することができる。特定の分子に由来するリードの全てを同定するこの能力は、元の分子の真の配列を決定するために、これらのリードを折り畳むことを可能にする。実際には、これにより誤り訂正及び精度の向上がもたらされ得、調製及び配列決定中に導入され得る誤りとは対照的に真のバリアントの同定が可能になる。これはまた、ＵＭＩを追加する非常に効率的な方法を提供する。比較すると、増幅の前にライゲーションされるＵＭＩは、変換効率が低いという欠点がある可能性がある。本発明の方法は、ＰＣＲ中に導入されるエラーを受けにくく、したがってより正確であり得るライブラリーの切断にＵＭＩ同定を組み込むことができる。

【０３７４】

図３Ｅは、ポリヌクレオチドを切断するための方法における操作の例示的なフローを示す。図３Ｅに示される方法３０００は、流体中で、標的ポリヌクレオチドの第１及び第２の分子を複数の第１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰと接触させること（操作３００１）を含む。図３Ｅに示される方法３０００は、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つを第１の分子中の第１の部分配列にハイブリダイズさせること（操作３００２）を含む。例えば、図３Ｂを参照して説明されるような方法で、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　３５１のうちの１つが分子Ｍ１中の第１の部分配列３１１にハイブリダイズし得る。図３Ｅに示される方法３０００は、第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つを第

２の分子中の第２の部分配列にハイブリダイズさせることを含み、第２の部分配列は第１の部分配列と部分的にのみ重複する（操作３００３）。例えば、図３Ｂを参照して説明されるような方法で、第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　３５２のうちの１つが分子Ｍ２中の第２の部分配列３１２にハイブリダイズされ得る。図３Ｅに示される方法３０００は、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つによって、第１の分子中の第２の部分配列への第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのいずれかのハイブリダイゼーションを阻害すること（操作３００４）を含む。例えば、分子Ｍ１にハイブリダイズした第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　３５１は、第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　３５２もその分子にハイブリダイズすることを阻害し得る。図３Ｅに示される方法３０００は、第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのうちの１つによって、第２の分子中の第１の部分配列への第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのいずれかのハイブリダイゼーションを阻害すること（操作３００５）を含む。例えば、分子Ｍ２にハイブリダイズした第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　３５２は、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　３５１もその分子にハイブリダイズすることを阻害し得る。図３Ｅに示される方法３０００は、第１の部分配列において第１の分子を切断すること（操作３００６）と、第２の部分配列において第２の分子を切断すること（操作３００７）とを含む。Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを使用してそのような分子を切断するための例示的な操作は、図３Ｃを参照して提供される。

【０３７５】

したがって、標的ポリヌクレオチドの異なる分子は、種々の位置で末端を生成するように規定された位置で切断され得、増幅及び配列決定に続いて、標的ポリヌクレオチドの配列におけるそのような末端の位置を使用して、アンプリコンが由来する分子を同定することが理解され得る。

【０３７６】

増幅アダプターのポリヌクレオチドへのカップリング

増幅アダプターのポリヌクレオチドへのカップリングは、それらの増幅及び配列決定を容易にする。本明細書で提供されるように、増幅アダプターは、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ及びトランスポザーゼの両方を含む融合タンパク質を使用してポリヌクレオチドにカップリングされ得る。例えば、図４Ａ～図４Ｊは、増幅アダプターをポリヌクレオチドに導入するための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。図４Ａに示されるように、組成物４０１は、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを使用して標的化され得る（すなわち、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのｇＲＮＡがハイブリダイズし得る配列を含む）第１の部分配列４１０を含む標的ポリヌクレオチドＰ１（二本鎖ＤＮＡなど）を含み得る。任意選択的に、組成物４０１は、第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを使用して標的化され得る第２の部分配列４２０を更に含み得る。図４Ｂに示されるように、標的ポリヌクレオチドＰ１は、流体中で、第１の融合タンパク質４３０及び任意の第２の融合タンパク質４４０と接触させられ得る。第１の融合タンパク質４３０（及び、存在する場合、第２の融合タンパク質４４０）は、流体中の標的ポリヌクレオチドＰ１に対しておおよそ化学量論比であり得る。

【０３７７】

第１の融合タンパク質４３０は、第１の増幅アダプター（破線で示す）がカップリングされた第１のトランスポザーゼ４３２にカップリングされた第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　４３１を含み得る。任意選択の第２の融合タンパク質４４０は、第２の増幅アダプター（点線で示す）がカップリングされた第２のトランスポザーゼ４４２にカップリングされた第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　４４１を含み得る。Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰをトランスポザーゼにカップリングするための非限定的な例は、図４Ｆ～４Ｉを参照して以下に更に提供される。任意の適切な増幅アダプターが、トランスポザーゼ４３２、４４２を使用して標的ポリヌクレオチドにカップリングされ得ることが理解されるであろう。例示的に、第１の増幅アダプターは、Ｐ５アダプターを含み得、第２の増幅アダプターは、Ｐ７アダプターを含み得る。任意選択的に、第１の増幅アダプターはまた、第１の固有の分子識別子（ＵＭＩ）を含み得、第２の増幅アダプターは、第２のＵＭＩを含み得る。

ＵＭＩは、本明細書の他の箇所に記載されているような方法で配列決定中に使用され得る。

【０３７８】

第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　４３１（及び、存在する場合、第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　４４１）の活性を促進し、第１のトランスポザーゼ４３２（及び、存在する場合、第２のトランスポザーゼ４４２）の活性を阻害しながら、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　４３１が標的ポリヌクレオチドＰ１中の第１の部分配列４１０にハイブリダイズし、存在する場合、第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　４４１が標的ポリヌクレオチド中の第２の部分配列４２０にハイブリダイズする、図４Ｂに示される組成物４０２が提供され得る。いくつかの例では、流体の条件を使用して、第１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　４３１、４４１の活性が促進され得、トランスポザーゼ４３２、４４２の活性が阻害され得る。例えば、異なる酵素が機能するために特定のイオンを使用し得ることは周知である。例示的に、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　４３１、４４１は、カルシウムイオン（Ｃａ２＋）、マンガンイオン（Ｍｎ２＋）、又はカルシウムイオンとマンガンイオンとの両方を使用して、例えば、それぞれ配列４２０、４３０にハイブリダイズするように機能し得る。比較すると、トランスポザーゼ４３２、４４２は、マグネシウムイオン（Ｍｇ２＋）を使用して機能し得る、例えば、増幅アダプターを標的ポリヌクレオチドＰにカップリングし得る。したがって、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　４３２、４４２の活性のために十分な量のカルシウムイオン、マンガンイオン、又はカルシウムイオンとマンガンイオンとの両方が存在し、トランスポザーゼ４３１、４４１の活性のために十分な量のマグネシウムイオンが存在しないことを含む条件を有する流体中で、標的ポリヌクレオチドＰ１を第１及び第２の融合タンパク質４３０、４４０と接触させることによって、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰは適切に機能し得るが、トランスポザーゼは適切に機能し得ない。追加的又は代替的に、トランスポザーゼの標的ポリヌクレオチドへの結合は、任意の適切な方法で阻害され得、例えば、トランスポザーゼ上の結合部位を可逆的にブロックすること、トランスポザーゼのために使用されるものとは異なる温度を使用してＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰをハイブリダイズすること、及び／又はトランスポザーゼの標的ポリヌクレオチドへの結合能を遅延させるためにＣａｓ－ｇＲＮＡが標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズする後までトランスポザーゼアダプターのトランスポザーゼへの結合を遅延させることなどが挙げられる。任意選択的に、第１の融合タンパク質４３０のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　４３１が第１の部分配列４１０にハイブリダイズし、第２の融合タンパク質４４０のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　４４１が第２の部分配列４２０にハイブリダイズする間に、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　４３１、４４１の間にない標的ポリヌクレオチドＰ１の任意の部分が、例えば、エキソヌクレアーゼＩＩＩ又はエキソヌクレアーゼＶＩＩを使用して分解され得る。

【０３７９】

続いて、第１及び第２のトランスポザーゼ４３２、４４２の活性を促進しながら、第１のトランスポザーゼを使用して、第１の増幅アダプターを標的ポリヌクレオチドＰ１内の第１の位置に付加することができ、第２のトランスポザーゼを使用して、第２の増幅アダプターを標的ポリヌクレオチド中の第２の位置に付加することができる。例えば、トランスポザーゼ４３２、４４２の活性は、トランスポザーゼの活性のために十分な量のマグネシウムイオンの存在など、流体の第２の条件を使用して促進され得る。例示的に、マグネシウムイオンは流体中に混合され得る。したがって、トランスポザーゼ４３２、４４２が標的ポリヌクレオチドＰ１に作用して第１及び第２の増幅アダプターをそれにカップリングさせる、図４Ｃに示される組成物４０３が提供され得る。標的ポリヌクレオチドＰ１は、第１及び第２の融合タンパク質４３０、４４０から遊離されて、一方の末端に第１の増幅アダプターを有し、他方の末端に第２の増幅アダプターを有する標的ポリヌクレオチドＰ１の断片４５０を含む、図４Ｄに示される組成物４０４を提供し得る。そのような遊離は、プロテイナーゼＫ、ドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）、又はプロテイナーゼＫとＳＤＳとの両方を使用して行われ得る。増幅アダプターがカップリングされた断片４５０は

増幅され、配列決定され得る。

【０３８０】

断片４５０の長さは、第１の配列４１０と第２の配列４２０、例えば、それらの間のおおよその距離に密接に関連し得る。例えば、図４Ｃに示されるように、融合タンパク質４４０の第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　４３１は、リンカー４３３を介して第１のトランスポザーゼ４３２にカップリングされてもよく、融合タンパク質４３０の第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　４４１は、リンカー４４３を介して第２のトランスポザーゼ４４２にカップリングされてもよい。リンカー４３３、４４３の非限定的な例は、図４Ｆ～４Ｉを参照して以下でより詳細に提供される。リンカー４３３、４４３は、明確な長さを有し得、したがって、トランスポザーゼがそれぞれのＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰから移動し得る明確な距離を提供し得る。したがって、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　４３１、４４１が標的ポリヌクレオチドＰ１内のそれらのそれぞれの配列４１０、４２０にハイブリダイズされ、トランスポザーゼ４３２、４４２が活性化されると（例えば、流体の条件を使用して）、トランスポザーゼはそれぞれ、リンカー４３３、４４３の長さによって許容され得る任意の位置で、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰに比較的近い標的ポリヌクレオチドの領域にカップリングされ得る。しかしながら、トランスポザーゼは（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰがそうであるように）標的ポリヌクレオチドＰ１内の特定の配列にカップリングしない可能性があるため、トランスポザーゼがそれぞれ結合し得る位置の範囲が存在し得る。例示的に、トランスポザーゼ４３２が第１のアダプターを付加する第１の位置は、第１の部分配列４１０の約１０塩基以内であってもよく、トランスポザーゼ４４２が第２のアダプターを付加する第２の位置は、第２の部分配列４２０の約１０塩基以内であってもよい。

【０３８１】

図４Ｄに示される断片４５０は、例えば、配列４１０、４２０間の距離（図４Ａ～図４Ｃに示す）によっておおよそ定義されるような任意の適切な長さを有し得ることが理解されるであろう。例えば、断片４５０は、約１００塩基対～約１０００塩基対、例えば、約５００塩基対～約７００塩基対（例示的に、約６００塩基対）、又は約２００塩基対～約４００塩基対（例示的に、約３００塩基対）、又は約１００塩基対～約２００塩基対（例示的に、約１５０塩基対）の長さ、又は約１０００塩基対～約３０００塩基対（例示的に、約２０００塩基対）の長さを有し得る。

【０３８２】

図４Ｅに示されるように、第１及び第２の融合タンパク質４３０、４４０内のそれぞれのｇＲＮＡ　４３４、４４４は、それぞれの配列４１０、４２０へのそのハイブリダイゼーションを促進するための任意の適切な長さ及び配列を有し得る。例えば、第１又は第２の部分配列４１０、４２０にハイブリダイズするｇＲＮＡ　４３４、４４４の５’末端は、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰにおいてより典型的に使用されるｇＲＮＡの５’末端に対して切断されていてもよい。例示的に、図４Ｅに示されるように、典型的なｇＲＮＡは、長さｘの５’末端を有し得、ｘは約２０ヌクレオチドであり得るが、ｇＲＮＡ　４３４、４４４は、長さｙの５’末端を有し得、ｙはｘ未満である。いくつかの例では、第１の部分配列４１０にハイブリダイズするｇＲＮＡ　４３４の部分ｙは、約１５～約１８ヌクレオチドの長さを有してもよく、第２の部分配列４２０にハイブリダイズするｇＲＮＡ　４４４の部分ｙは、約１５～約１８ヌクレオチドの長さを有してもよい。切断型ｇＲＮＡに関する更なる詳細については、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる、Ｆｕ　ｅｔ　ａｌ．，「Ｉｍｐｒｏｖｉｎｇ　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ　ｎｕｃｌｅａｓｅ　ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ　ｕｓｉｎｇ　ｔｒｕｎｃａｔｅｄ　ｇｕｉｄｅ　ＲＮＡｓ」，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．３２（３）：２７９－２８４（２０１４）を参照されたい。

【０３８３】

任意の適切なＣａｓ及び任意の適切なトランスポザーゼが融合タンパク質４３０、４４０において使用され得ることが理解されるであろう。例示的に、Ｃａｓは、ｄＣａｓ９を含んでもよく（例えば、トランスポザーゼが活性化される前にＣａｓが標的ポリヌクレオチドＰ１を切断することを阻害するように）、トランスポザーゼは、Ｔｎ５を含んでもよ

い（例えば、トランスポザーゼの活性が、十分な量のマグネシウムイオンを添加するなどの流体条件を通して良好に制御され得るように）。Ｃａｓ及びトランスポザーゼは、任意の適切なカップリングを介して、例えば、共有結合を介して、又は非共有結合を介して互いにカップリングされ得る。共有結合は、例示的に、銅（Ｉ）触媒クリック反応、又は歪み促進アジド－アルキン環化付加によって形成され得る。非共有結合は、任意の適切な方法で形成され得る。例えば、図４Ｆに示されるような方法で、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰは、抗体４６１に共有結合的にカップリングされ得、トランスポザーゼは、抗体が非共有結合的にカップリングされる抗原４６２に共有結合的にカップリングされ得るか、又は図４Ｇに示されるような方法で、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰは、抗原４６１に共有結合的にカップリングされ得、トランスポザーゼは、抗原が非共有結合的にカップリングされる抗体４６２に共有結合的にカップリングされ得る。あるいは図４Ｈに示されるような方法で、Ｃａｓ－ｇＲＮＡは、ｇＲＮＡの部分４６３と第１又は第２の増幅アダプターとの間のハイブリダイゼーションを介してトランスポザーゼに非共有結合的にカップリングされ得る。更に別の例として、図４Ｉに示されるような方法で、Ｃａｓ－ｇＲＮＡは、ｇＲＮＡの部分４６４とトランスポザーゼ内のオリゴヌクレオチド４６５との間のハイブリダイゼーションを介してトランスポザーゼに非共有結合的にカップリングされ得る。Ｃａｓが別のタンパク質にカップリングされ得る方法の更なる例については、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる、以下の参考文献を参照されたい：Ｇｕｉｌｉｎｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，「Ｆｕｓｉｏｎ　ｏｆ　ｃａｔａｌｙｔｉｃａｌｌｙ　ｉｎａｃｔｉｖｅ　Ｃａｓ９　ｔｏ　Ｆｏｋｌ　ｎｕｃｌｅａｓｅ　ｉｍｐｒｏｖｅｓ　ｔｈｅ　ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ　ｏｆ　ｇｅｎｏｍｅ　ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ」，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　３２：５７７－５８２（２０１４）；及びＢｈａｔｔ　ｅｔ　ａｌ．，「Ｔａｒｇｅｔｅｄ　ＤＮＡ　ｔｒａｎｓｐｏｓｉｔｉｏｎ　ｉｎ　ｖｉｔｒｏ　ｕｓｉｎｇ　ａ　ｄＣａｓ９－ｔｒａｎｓｐｏｓａｓｅ　ｆｕｓｉｏｎ　ｐｒｏｔｅｉｎ」，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．４７：８１２６－８１３５（２０１９）。

【０３８４】

図４Ｊは、配列を有する標的ポリヌクレオチドの断片を生成する方法における操作の例示的なフローを示す。図４Ｊに示される方法４０００は、流体中で、標的ポリヌクレオチドを、増幅アダプターがカップリングされたトランスポザーゼにカップリングしたＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを各々含む第１及び第２の融合タンパク質と接触させること（操作４００１）を含む。例えば、標的ポリヌクレオチドＰ１は、図４Ｂを参照して説明されるような方法で、第１の融合タンパク質４３０及び第２の融合タンパク質４４０と接触させられ得る。図４Ｊに示される方法４０００は、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの活性を促進し、トランスポザーゼの活性を阻害しながら、（ｉ）第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを標的ポリヌクレオチド中の第１の部分配列にハイブリダイズさせることと、（ｉｉ）第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを標的ポリヌクレオチド中の第２の部分配列にハイブリダイズさせること（操作４００２）とを含む。例えば、流体は、図４Ｂを参照して説明されるような方法（例示的に、十分な量のＣａ２＋及び／又はＭｎ２＋の存在並びに十分な量のＭｇ２＋の非存在）でトランスポザーゼ４３２及び４４２の活性を阻害しながら、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　４３１の第１の部分配列４１０への、及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　４４２の第２の部分配列４２０へのそのようなハイブリダイゼーションを促進する第１の条件を有し得る。図４Ｊに示される方法４０００は、第１及び第２のトランスポザーゼの活性を促進しながら、（ｉ）第１のトランスポザーゼを使用して第１の増幅アダプターを標的ポリヌクレオチド中の第１の位置に付加することと、（ｉｉ）第２のトランスポザーゼを使用して第２の増幅アダプターを標的ポリヌクレオチド中の第２の位置に付加すること（操作４００３）とを含む。例えば、流体は、図４Ｃを参照して説明されるような方法で、第１及び第２のトランスポザーゼ４３２及び４４２の活性を促進する第２の条件（例示的に、十分な量のＭｇ２＋の存在）を有し得る。

【０３８５】

いくつかの実施態様では、ＳｈＣＡＳＴ（Ｓｃｙｔｏｎｅｍａ　ｈｏｆｍａｎｎｉ　Ｃ

ＲＩＳＰＲ関連トランスポザーゼ）標的化ライブラリー調製及び濃縮が使用され得る。

【０３８６】

ライブラリー調製後に別個の濃縮工程を使用する特定の遺伝子の標的化配列決定は、時間がかかる場合がある。例えば、このような別個の濃縮工程は、オリゴヌクレオチドプローブをライブラリーＤＮＡにハイブリダイズさせることと、ストレプトアビジンでコーティングされたビーズ上でハイブリダイズしたＤＮＡを単離することと、を包含し得る。効率及び必要な時間が著しく改善されているものの、そのような別個の濃縮プロトコルは、約２時間と多くの試薬を要する場合があり、そのようなプロトコルの自動化を困難にし得る。

【０３８７】

比較すると、本明細書のいくつかの例を使用して、調製及び濃縮の両方について単一工程を使用する、特定の遺伝子の標的化配列決定のためのライブラリーの調製及び濃縮ができる。

【０３８８】

例えば、図７Ａ及び図７Ｈは、増幅アダプターをポリヌクレオチドにカップリングするための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。まず図７Ａを参照すると、組成物７０１は、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを使用して標的化され得る（すなわち、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのｇＲＮＡがハイブリダイズし得る配列を含む）第１の部分配列７１０を含む標的ポリヌクレオチドＰ３（二本鎖ＤＮＡなど）を含み得る。任意選択的に、組成物７０１は、第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを使用して標的化され得る第２の部分配列７２０を更に含み得る。標的ポリヌクレオチドＰ３は、無細胞ＤＮＡなどの部分的に断片化されたｄｓＤＮＡ、又は本明細書の他の箇所に記載されるような方法で断片化されたＤＮＡを含み得る。あるいは標的ポリヌクレオチドＰ３は、染色体全体のＤＮＡを含み得る。図７Ｂに示されるように、標的ポリヌクレオチドＰ３は、図４Ａ～４Ｄを参照して説明されたものと同様の方法で、流体中で、第１の融合タンパク質７３０及び任意の第２の融合タンパク質７４０と接触させられ得る。第１の融合タンパク質７３０（及び、存在する場合、第２の融合タンパク質７４０）は、流体中の標的ポリヌクレオチドＰ３に対しておおよそ化学量論比であり得る。

【０３８９】

第１の融合タンパク質７３０は、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　７３１を含み得、これはタグ７３３を含み、第１の増幅アダプター（破線で示す）がカップリングされた第１のトランスポザーゼ７３２にカップリングされている。任意選択の第２の融合タンパク質７４０は、第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　７４１を含み得、これはタグ７３３を含み、第２の増幅アダプター（点線によって示される）がカップリングされた第２のトランスポザーゼ７４２にカップリングされている。タグ７３３は、それぞれのＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの任意のｇＲＮＡ　ＲＮＰの任意の適切な部分にカップリングされ得る。Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰをトランスポザーゼにカップリングするための非限定的な例は、図４Ｆ～４Ｉを参照して上記に更に提供される。任意の適切な増幅アダプターが、トランスポザーゼ７３２、７４２を使用して標的ポリヌクレオチドにカップリングされ得ることが理解されるであろう。例示的に、第１の増幅アダプターは、Ｐ５アダプターを含み得、第２の増幅アダプターは、Ｐ７アダプターを含み得る。任意選択的に、第１の増幅アダプターはまた、第１の固有の分子識別子（ＵＭＩ）を含み得、第２の増幅アダプターは、第２のＵＭＩを含み得る。ＵＭＩは、本明細書の他の箇所に記載されているような方法で配列決定中に使用され得る。

【０３９０】

第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　７３１（及び、存在する場合、第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　７４１）の活性を促進し、第１のトランスポザーゼ７３２（及び、存在する場合、第２のトランスポザーゼ７４２）の活性を阻害しながら、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　７３１が標的ポリヌクレオチドＰ３中の第１の部分配列７１０にハイブリダイズし、存在する場合、第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　７４１が標的ポリヌクレオチ

ド中の第２の部分配列７２０にハイブリダイズする、図７Ｂに示される組成物７０２が提供され得る。いくつかの例では、図４Ａ～４Ｄを参照して説明したような方法で流体の条件を使用して、第１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　７３１、７４１の活性が促進され得、トランスポザーゼ７３２、７４２の活性が阻害され得る。

【０３９１】

標的ポリヌクレオチドＰ３は、タグ７３３を使用して濃縮され得る。例えば、図７Ｃに示される組成物７０３において、ハイブリダイズした第１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　７３１、７３２（それぞれタグ７３３及びトランスポザーゼ７３２、７４２にカップリングされている）を有する標的ポリヌクレオチドを、それぞれのリンカーを介してタグパートナー７５１にカップリングした基材７５０と接触させてもよい。タグパートナー７５１は、タグ７３３に共有結合的又は非共有結合的にカップリングするように選択され得、標的ポリヌクレオチドＰ３がタグ７３３及びタグパートナー７５１を介して基材７５０にカップリングされる図７Ｄに示されるような組成物７０４を形成する。基材７５０にカップリングされない任意の他のポリヌクレオチドは、洗い流され得る。

【０３９２】

続いて、第１及び第２のトランスポザーゼ７３２、７４２の活性を促進しながら、第１のトランスポザーゼを使用して、第１の増幅アダプターを標的ポリヌクレオチドＰ３内の第１の位置に付加することができ、第２のトランスポザーゼを使用して、第２の増幅アダプターを標的ポリヌクレオチド中の第２の位置に付加することができる。例えば、トランスポザーゼ７３２、７４２の活性は、図４Ａ～４Ｄを参照して説明されるような方法で、流体の第２の条件を使用して促進され得る。したがって、トランスポザーゼ７３２、７４２が標的ポリヌクレオチドＰ３に作用して第１及び第２の増幅アダプターをそれにカップリングさせる、図７Ｅに示される組成物７０５が提供され得る。ポリヌクレオチドＰ３は、第１及び第２の融合タンパク質７３０、７４０から遊離されて、一方の末端に第１の増幅アダプターを有し、他方の末端に第２の増幅アダプターを有する標的ポリヌクレオチドＰ３の断片７６０を含む、図７Ｆに示される組成物７０６を提供し得る。そのような遊離は、プロテイナーゼＫ、ドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）、又はプロテイナーゼＫとＳＤＳとの両方を使用して；Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　７３１、７４１を変性させること、タグパートナー７５１からタグ７３３をデカップリングすること、タグパートナー７５１と基材７５０との間のリンカーを切断することなどによって行われ得る。あるいは断片７６０は、その後の処理のために基材７５０にカップリングされたままであってもよい。いずれの例においても、図７Ｆに示される得られた濃縮断片７６０（具体的に示されていない基材７５０への任意のカップリング）は、図５Ｇ～５Ｈ又は５Ｉ～５Ｊを参照して説明されるような方法で更に分析され得る。

【０３９３】

増幅アダプターがカップリングされた断片７６０は増幅され、配列決定され得る。図４Ａ～４Ｅを参照して説明されるような方法で、断片７６０の長さは、第１の配列７１０と第２の配列７２０、例えば、それらの間のおおよその距離に密接に関連し得る。図７Ｇに示される断片７６０は、例えば、配列７１０、７２０間の距離によっておおよそ定義されるような任意の適切な長さを有し得ることが理解されるであろう。例えば、断片７６０は、約１００塩基対～約１０００塩基対、例えば、約５００塩基対～約７００塩基対（例示的に、約６００塩基対）、又は約２００塩基対～約７００塩基対（例示的に、約３００塩基対）、又は約１００塩基対～約２００塩基対（例示的に、約１５０塩基対）の長さ、又は約１０００塩基対～約３０００塩基対（例示的に、約２０００塩基対）の長さを有し得る。

【０３９４】

任意の適切なタグ７３３及びタグパートナー７５１が、標的ポリヌクレオチドＰ３を基材７５０にプルダウンするために使用され得ることが理解されるであろう。例えば、タグパートナー７５１はＳＮＡＰタンパク質を含み得、タグ７３３はＯ－ベンジルグアニンを含み得る；タグパートナーはＣＬＩＰタンパク質を含み得、タグはＯ－ベンジルシトシン

を含み得る；タグパートナーはＳｐｙＴａｇを含み得、タグはＳｐｙＣａｔｃｈｅｒを含み得る；タグパートナーはＳｐｙＣａｔｃｈｅｒを含み得、タグはＳｐｙＴａｇを含み得る；タグパートナーはビオチンを含み得、タグはストレプトアビジンを含み得る；タグパートナーはストレプトアビジンを含み得、タグはビオチンを含み得る；タグパートナーはＮＴＡを含み得、タグはＨｉｓタグを含み得る；タグパートナーはＨｉｓタグを含み得、タグはＮＴＡを含み得る；タグパートナーは、抗体（例えば抗ＦＬＡＧ抗体）を含み得、タグは、抗体が選択的である抗原（例えばＦＬＡＧタグ）を含み得る；タグパートナーは抗原（例えばＦＬＡＧタグ）を含み得、タグは、抗原に対して選択的な抗体（例えば抗ＦＬＡＧ抗体）を含み得る；又はタグパートナーは第１のオリゴヌクレオチドを含み得、タグは、第１のオリゴヌクレオチドに相補的であり、第１のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズする第２のオリゴヌクレオチドを含み得る。タグパートナー７５１は、任意の適切な結合を介して、例えば、共有結合又は非共有結合を介して基材７５０にカップリングされ得る。同様に、タグ７３３はそれぞれ、例えば、図４Ｆ～４Ｉを参照して説明されたものと同様の方法で、任意の適切なカップリングを介して、例えば、共有結合を介して、又は非共有結合を介して、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　７３１、７３２にカップリングされ得る。いくつかの例では、それぞれ第１及び第２の融合タンパク質７３０、７４０内のｇＲＮＡ　７３４、７４４は、図７Ｇに示されるような方法でタグ７３３にカップリングされ得る。例えば、タグにカップリングしたＲＮＡオリゴヌクレオチドは商業的に購入することができ、それらの調製は当該技術分野で公知である。

【０３９５】

任意の適切なＣａｓ及び任意の適切なトランスポザーゼが融合タンパク質７３０、７４０において使用され得ることが理解されるであろう。例示的に、Ｃａｓは、ｄＣａｓ９を含んでもよく（例えば、トランスポザーゼが活性化される前にＣａｓが標的ポリヌクレオチドＰ３を切断することを阻害するように）、トランスポザーゼは、Ｔｎ５を含んでもよい（例えば、トランスポザーゼの活性が、十分な量のマグネシウムイオンを添加するなどの流体条件を通して良好に制御され得るように）。他の例では、ＣａｓはＣａｓ１２ｋを含み得、トランスポザーゼはＴｎ７又はＴｎ７様トランスポザーゼを含み得る（例えば、トランスポザーゼの活性が、十分な量のマグネシウムイオンを添加するなどの流体条件によって十分に制御され得るように）。Ｃａｓ及びトランスポザーゼは、任意の適切な結合を介して、例えば共有結合を介して、又は非共有結合を介して、例えば図４Ｆ～図４Ｉを参照して、又はＳｔｒｅｃｋｅｒらに記載されているような方法で互いにカップリングされ得る。

【０３９６】

例えば、図６Ａ及び図６Ｂは、ＳｈＣＡＳＴ（Ｓｃｙｔｏｎｅｍａ　ｈｏｆｍａｎｎｉ　ＣＲＩＳＰＲ関連トランスポザーゼ）標的化ライブラリー調製及び濃縮のための例示的なプロセスにおける組成物及び操作を概略的に示す。ＳｈＣＡＳＴ６０００は、Ｃａｓ１２ｋ　６００１と、ＲＮＡガイド６００４を用いて大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ゲノム中の特定の部位にＤＮＡ６００３を挿入することができるＴｎ７様トランスポザーゼ６００２とを含む。本明細書で提供されるいくつかの例は、特定の遺伝子の標的化増幅のために、ＳｈＣＡＳＴ又はＴｎ５トランスポザーゼを組み込んだ改変バージョンのＳｈＣＡＳＴ（ＳｈＣＡＳＴ－Ｔｎ５）を利用する。このように、ライブラリー調製及び濃縮工程が組み合わされ、したがって、標的ライブラリー配列決定のワークフロー効率を簡略化し、改善し、自動化を促進する。

【０３９７】

例示的には、ｇＲＮＡ　６００４は、特定の遺伝子（配列）を標的化するように設計されてもよく、ｇＲＮＡの間隔は、挿入サイズを制御してもよい。いくつかの例では、ｇＲＮＡ　６００４及び／又はＳｈＣＡＳＴ／ＳｈＣＡＳＴ－Ｔｎ５　６００２は、タグ６００５にカップリングされてもよく、例えば、ビオチン化されてもよい。図６Ａに示されているような方法で、ｇＲＮＡ　６００４及びアダプター６００３（例えば、Ｉｌｌｕｍｉｎａアダプター）を有する転位性エレメントをＳｈＣＡＳＴのトランスポザーゼ６００２

上に含ませ、複合体６０００を得ることができる。図６Ｂのプロセスフロー６０１０に示されるような方法で、得られたＳｈＣＡＳＴ／ＳｈＣＡＳＴ－Ｔｎ５複合体６０００は、図４Ａ～４Ｊ及び図７Ａ～７Ｇを参照して説明されたものと同様の方法で、タグメンテーションを阻害しながら、複合体を標的ＤＮＡ中のそれぞれの配列に結合させる流体条件下（例えば、マグネシウム、Ｍｇ２＋が少ないか、又は全くない）でゲノムＤＮＡ（標的ポリヌクレオチド）６０１１と混合され得る。次いで、タグ化（例えば、ビオチン化）ｇＲＮＡ及び／又はＳｈＣＡＳＴ／ＳｈＣＡＳＴ－Ｔｎ５がカップリングするストレプトアビジンビーズ６０１２などのタグパートナーにカップリングした基材を使用して複合体を単離することができる。例えば、オフターゲットタグメンテーションを低減又は最小化するために、任意の非結合ＤＮＡを洗い流してもよい。次いで、流体条件は、図４Ａ－４Ｊを参照して説明されたものと同様の方法で、タグメンテーションを促進するように変更されてもよい（例えば、マグネシウムを十分に増加させる）。配列決定のための調製においてビーズからライブラリーを遊離させるために、ギャップ充填ライゲーション工程とそれに続く熱解離を使用することができる。

【０３９８】

図６Ａ～図６Ｂに示されるような組成物及び操作において、複合体６０００のトランスポザーゼ部分６００２は、ＤＮＡにランダムに挿入することが可能であり得ることに留意されたい。そのような挿入は、ＳｈＣＡＳＴ／ＳｈＣＡＳＴ－Ｔｎ５複合体を、タグメンテーションを阻害することによって、標的が結合されることを可能にする流体条件下（例えば、低マグネシウム又は無マグネシウム）でゲノムＤＮＡと混合することによって阻害又は最小化され得る。

【０３９９】

内部にＣａｓ１２ｋ及びＴｎ７を含むＳｈＣＡＳＴに関する更なる詳細については、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる、Ｓｔｒｅｃｋｅｒ ｅｔ ａｌ．，「ＲＮＡ－Ｇｕｉｄｅｄ ＤＮＡ ｉｎｓｅｒｔｉｏｎ ｗｉｔｈ ＣＲＩＳＰＲ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｔｒａｎｓｐｏｓａｓｅｓ」，Ｓｃｉｅｎｃｅ ３６５（６４４８）：４８－５３ （２０１９）を参照されたい。

【０４００】

タグ７３３又はタグ６００５は、任意の適切な時点でタグパートナーに（したがって基材に）カップリングされてもよく、そのような結合は、必ずしも融合タンパク質又は複合体が標的ポリヌクレオチドにカップリングした後に行われる必要はなく、実際に、融合タンパク質又は複合体が標的ポリヌクレオチドに結合する前に行われてもよいことを理解されたい。例示的に、図７Ｇに図示されるような方法でタグ７３３にカップリングしたｇＲＮＡ ７３４、７４４は、タグ７３３とタグパートナー７５１との間の相互作用を使用して基材７５０にカップリングされ得る。次いで、融合タンパク質又は複合体のＣａｓ（トランスポザーゼも含む）は、基材結合ｇＲＮＡにカップリングされ得る。次いで、標的ポリヌクレオチドは、Ｃａｓにカップリングされ得、したがって、標的ポリヌクレオチドを基材にカップリングする。

【０４０１】

図４Ｊを参照して説明したプロセスフローは、図６Ａ～図６Ｂ及び図７Ａ～図７Ｇを参照して説明したような方法でタグの使用を含むように修正されてもよいことも理解されたい。例えば、操作４００１及び４００２に関連する任意の適切な時点で、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ ＲＮＰにそれぞれカップリングされたタグを使用して、標的ポリヌクレオチドを基材上にプルダウンすることができる。図７Ａ～７Ｆを参照して説明されるような方法で、タグは、ポリヌクレオチドをＣａｓ－ｇＲＮＡ ＲＮＰと接触させる前にＣａｓ－ｇＲＮＡ ＲＮＰにカップリングされ得る。あるいはタグは、ｇＲＮＡ及び基材にカップリングしたタグパートナーにカップリングされてもよく、Ｃａｓ－トランスポザーゼ融合タンパク質又は複合体は、ｇＲＮＡと接触させられる。次いで、トランスポザーゼの活性を促進し、増幅アダプターを標的ポリヌクレオチドに付加するように、操作４００３が行われ得る。

【０４０２】

したがって、ポリヌクレオチドを任意の適切な位置対で切断して断片を形成することができ、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ／トランスポザーゼ融合タンパク質を使用して、得られた断片の末端に任意の適切な増幅プライマーを結合させることができることが理解されよう。次いで、断片を増幅し、配列決定することができる。

【０４０３】

標的化エピジェネティックアッセイのための組成物及び方法

本明細書におけるいくつかの例は、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを使用して、エピジェネティックな目的の断片を生成するためのポリヌクレオチド（ＤＮＡなど）の濃縮、及びそれらの断片に沿った遺伝子座におけるタンパク質のアッセイを提供する。アッセイのいくつかの非限定的な例が、特定のワークフロー操作及び順序付けと共に与えられるが、他の例も容易に想定され得る。本実施例では、断片に沿ったタンパク質は、オリゴヌクレオチドを使用して標識され得、これは続いて配列決定され、このオリゴヌクレオチドを使用してタンパク質が特徴付けられ得る。例えば、オリゴヌクレオチドの配列は、所与の断片の遺伝子座におけるタンパク質の存在についての情報を提供し得るか、所与の断片の遺伝子座におけるタンパク質の位置についての情報を提供し得るか、所与の断片の遺伝子座におけるタンパク質の量についての情報を提供し得るか、又はそのような情報の任意の適切な組み合わせを提供し得る。断片は濃縮されてもよく、例えば、所与のポリヌクレオチドから特異的に選択されてもよいが、そのポリヌクレオチドの他の部分及び他のポリヌクレオチドの部分は廃棄されてもよい。そのような遺伝子座関連プロテオーム解析を使用して、例示的に、全ゲノム配列決定を補完するゲノムワイドプロテオームアトラスを提供して、遺伝子型表現型間の関係の特徴付けを向上させるか、又は特定の遺伝子座に関連するエピジェネティック特徴をより良く特徴付け、研究又は臨床応用及び治療に重要なエピジェネティック機構を理解することができる。

【０４０４】

例えば、図５Ａ～５Ｋは、標的化エピジェネティックアッセイのための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。図５Ａに示されるように、組成物５０１は、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを使用して標的化され得る（すなわち、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのｇＲＮＡがハイブリダイズし得る配列を含む）第１の部分配列５１１を含む標的ポリヌクレオチドＰ２（二本鎖ＤＮＡなど）と、第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを使用して標的化され得る第２の部分配列５１２とを含み得る。標的ポリヌクレオチドＰ２は、例えば、図２Ａ～２Ｋ、３Ａ～３Ｅ、又は４Ａ～４Ｊを参照して、本明細書の他の箇所でより詳細に説明されるような方法で生成される断片を含み得るか、又は染色体全体若しくはその一部を含み得る。タンパク質５２１、５２２、及びクロマチン５２３は、第１の部分配列５１１と第２の部分配列５１２との間の標的ポリヌクレオチドＰ２のそれぞれの遺伝子座にカップリングされ得る。任意選択的に、タンパク質５２１、５２２は、例えば、以下に記載されるような方法で対応する抗体によって選択的に標的化されるそれらの能力を保存しながら、それらを標的ポリヌクレオチドＰ２に沿って適所に残すなど、後のプロセッシング操作中のそれらの安定性を高めるために架橋され得る。

【０４０５】

図５Ｂに示される例示的な組成物５０２では、標的ポリヌクレオチドＰ２は、流体中で、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　５３１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　５３２と接触させられ得る。第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　５３１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　５３２は各々、第１の部分配列５１１と第２の部分配列５１２との間の標的ポリヌクレオチドＰ２の部分を選択的にプルダウンし、したがって、図５Ｄ～５Ｆを参照して以下でより詳細に説明されるような方法でポリヌクレオチドのその部分を濃縮するために使用され得るそれぞれのタグ５３３を含み得る。非限定的な例では、Ｃａｓは、Ｃａｓ９又は標的ポリヌクレオチドＰ２を切断し得る他の適切なＣａｓを含む。第１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　５３１、５３２は、標的ポリヌクレオチドＰ２内の第１及び第２の部分配列５１１、５１２にハイブリダイズし、それぞれ第１及び第２の部分配列で標的ポリヌクレオチドを切断して断片を形成する。例示的に、図５Ｃに示される得

られた組成物５０３は、そのそれぞれの遺伝子座にカップリングされた１つの第１のタンパク質５２１、２つの第２のタンパク質５２２、及びクロマチン５２３を有する断片５４０、並びにタグ５３３にそれぞれカップリングされ、部分配列５１１、５１２にそれぞれハイブリダイズされ、したがってタグ５３３を断片５４０にカップリングする第１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　５３１、５３２を含む。断片５４０は、任意の適切な長さ、例えば、約１００塩基対～約１０００塩基対、例えば、約５００塩基対～約７００塩基対、又は約２００塩基対～約４００塩基対、又は約１００塩基対～約２００塩基対、又は約１０００塩基対～約３０００塩基対（例示的に、約２０００塩基対）の長さを有し得る。ポリヌクレオチドＰ２の残りの部分５４１、５４２は、任意の長さを有してもよく、いくつかの例では、断片５４０の除去後に染色体の残部を形成してもよい。

【０４０６】

断片５４０は、タグ５３３を使用して濃縮され得る。例えば、図５Ｄに示されるように、第１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　５３１、５３２（それぞれタグ５３３にカップリングされている）がハイブリダイズした断片５４０、並びにポリヌクレオチドＰ２の残りの部分５４１、５４２を、それぞれのリンカーを介してタグパートナー５５１にカップリングした基材５５０と接触させてもよい。タグパートナー５５１は、タグ５３３に共有結合的又は非共有結合的にカップリングするように選択され得、図５Ｅに示されるような組成物を形成し、ここで、断片５４０は、タグ５３３及びタグパートナー５５１を介して基材５５０にカップリングされるが、残りの部分５４１、５４２は、基材５５０にカップリングされず、洗い流され得る。次いで、断片５４０は、例えば、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　５３１、５３２を変性させることによって（この場合、タンパク質５２１、５２２は、それらの変性を阻害するために予め架橋されていてもよい）、タグパートナー５５１からタグ５３３をデカップリングすることによって、タグパートナー５５１と基材との間のリンカーを切断することなどによって、基材５５０から遊離され得る。あるいは断片５４０は、その後の処理のために基材５５０にカップリングされたままであってもよい。いずれの例においても、図５Ｆに示される得られた濃縮断片５４０（具体的に示されていない基材５５０への任意のカップリング）は、図５Ｇ～５Ｈ又は５Ｉ～５Ｊを参照して説明されるような方法で更に分析され得る。

【０４０７】

任意の適切なタグ５３３及びタグパートナー５５１が、断片５４０をプルダウンするために使用され得ることが理解されるであろう。例えば、タグパートナー５５１はＳＮＡＰタンパク質を含み得、タグ５３３はＯ－ベンジルグアニンを含み得る；タグパートナーはＣＬＩＰタンパク質を含み得、タグはＯ－ベンジルシトシンを含み得る；タグパートナーはＳｐｙＴａｇを含み得、タグはＳｐｙＣａｔｃｈｅｒを含み得る；タグパートナーはＳｐｙＣａｔｃｈｅｒを含み得、タグはＳｐｙＴａｇを含み得る；タグパートナーはビオチンを含み得、タグはストレプトアビジンを含み得る；タグパートナーはストレプトアビジンを含み得、タグはビオチンを含み得る；タグパートナーはＮＴＡを含み得、タグはＨｉｓタグを含み得る；タグパートナーはＨｉｓタグを含み得、タグはＮＴＡを含み得る；タグパートナーは、抗体（例えば抗ＦＬＡＧ抗体）を含み得、タグは、抗体が選択的である抗原（例えばＦＬＡＧタグ）を含み得る；タグパートナーは抗原（例えばＦＬＡＧタグ）を含み得、タグは、抗原に対して選択的な抗体（例えば抗ＦＬＡＧ抗体）を含み得る；又はタグパートナーは第１のオリゴヌクレオチドを含み得、タグは、第１のオリゴヌクレオチドに相補的であり、第１のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズする第２のオリゴヌクレオチドを含み得る。タグ５３３はそれぞれ、例えば、図４Ｆ～４Ｉ又は７Ｇを参照して説明されたものと同様の方法で、任意の適切なカップリングを介して、例えば、共有結合を介して、又は非共有結合を介して、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　５３１、５３２にカップリングされ得る。同様に、タグパートナー５５１は、任意の適切な結合を介して、例えば、共有結合又は非共有結合を介して基材５５０にカップリングされ得る。

【０４０８】

本明細書で提供されるように、対応するオリゴヌクレオチドを使用して、断片（この断

片は、図５Ａ～５Ｆを参照して説明されるような方法で調製及び濃縮され得る）のそれぞれの遺伝子座にカップリングしたタンパク質５２１、５２２のそれぞれをそれぞれ標識してもよく、次いで、そのようなオリゴヌクレオチドを配列決定してもよい。対応するオリゴヌクレオチドを用いて、タンパク質を同定することができ、遺伝子座を同定することができ、及び／又はタンパク質を定量化することができる。

【０４０９】

ここで図５Ｇ～５Ｈを参照して説明されるいくつかの例では、タンパク質の各々をそれぞれ標識するために対応するオリゴヌクレオチドを使用することは、濃縮断片５４０を、異なるタンパク質に特異的な抗体の混合物と接触させることを含み得、抗体の各々は、タンパク質を特徴付けるような方法でタンパク質を標識するために使用され得る対応するオリゴヌクレオチドにカップリングされる。例えば、図５Ｇに示される組成物５０４は、対応する第１、第２、第３、及び第４のオリゴヌクレオチドにそれぞれカップリングされた複数の第１、第２、第３、及び第４の抗体５５１、５５２、５５３、５５４のそれぞれと接触している濃縮断片５４０を含む。抗体５５１、５５２、５５３、５５４の各々は、異なるタンパク質に特異的である。濃縮された断片５４０は、その断片に沿った遺伝子座に潜在的にカップリングされ得、エピジェネティックな対象であり得る、異なるタンパク質又は他のクロマチンに特異的な任意の適切な数及びタイプの異なる抗体と接触させられ得ることが理解されるであろう。濃縮断片５４０のそれぞれの遺伝子座にカップリングしたタンパク質に特異的な混合物中の任意の抗体について、それらの抗体及び対応するオリゴヌクレオチドは、抗体／標的結合を介してそれらのタンパク質に非共有結合的にカップリングされるようになり得る。図５Ｅに示される非限定的な例示的組成物５０５では、第１の抗体５５１は、第１のタンパク質５２１に特異的であり、それにカップリングされ、一方、第２の抗体５５２は、第２のタンパク質５２２に特異的であり、それにカップリングされる。複数の第２のタンパク質５２２が遺伝子座のそれぞれ１つにカップリングされ、混合物中の複数の第２の抗体５５２がその遺伝子座においてタンパク質にカップリングされる。この例では、濃縮断片５４０は、第３及び第４の抗体５５３、５５４が特異的であるタンパク質を含まず、したがって、これらの抗体（及びそれらのそれぞれのオリゴヌクレオチド）は、断片にカップリングされない。

【０４１０】

カスタムオリゴヌクレオチドコンジュゲート抗体は、市販されているか、又は例えば、それらの各々の全内容が参照により本明細書に組み込まれる、以下の参考文献に記載されているような公知の技術を使用して調製することができる：Ｇｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，「Ｓｉｍｐｌｅ ｍｅｔｈｏｄ ｔｏ ｐｒｅｐａｒｅ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ－ｃｏｎｊｕｇａｔｅｄ ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ ｉｔｓ ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ ｔｏ ｍｕｌｔｉｐｌｅｘ ｐｒｏｔｅｉｎ ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ｉｎ ｓｉｎｇｌｅ ｃｅｌｌｓ」，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．２７：２１７－２２５（２０１６）；及びＳｔｏｅｃｋｉｕｓ ｅｔ ａｌ．，「Ｓｉｍｕｌｔａｎｅｏｕｓ ｅｐｉｔｏｐｅ ａｎｄ ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｏｍｅ ｍｅａｓｕｒｅｍｅｎｔ ｉｎ ｓｉｎｇｌｅ ｃｅｌｌｓ」，Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｔｈｏｄｓ １４：８６５－８６８（２０１７）。

【０４１１】

抗体５５１、５５２にそれぞれカップリングされる第１及び第２のオリゴヌクレオチドは、配列決定され得、濃縮断片５４０内のタンパク質５２１、５２２の存在、及び任意選択的にその量を同定するためにそれぞれ使用され得る。いくつかの例では、第１及び第２のオリゴヌクレオチドは、例えば、タンパク質５２１、５２２及び抗体５５１、５５２を消化するプロテアーゼを適用することによって、断片５４０から遊離され、次いで増幅され、配列決定され得る。そのような配列決定は、任意の適切な方法で行われ得る。例えば、対応するオリゴヌクレオチドを配列決定することは、例えば、Ｉｌｌｕｍｉｎａ ＢｅａｄＡｒｒａｙ（商標）技術（カリフォルニア州サンディエゴ）を使用して、対応するオリゴヌクレオチドをビーズアレイにハイブリダイズさせること、又は対応するオリゴヌク

レオチドに対して合成による配列決定（ＳＢＳ）を行うことを含み得る。オリゴヌクレオチドは、任意選択的に、増幅アダプター（例えば、Ｐ５及びＰ７アダプター、又はＹ字型アダプター）及び／又はＵＭＩを含み得るか、あるいはそのような増幅アダプター及び／又はＵＭＩは、増幅及び配列決定の前に、ＰＣＲなどの公知の技術を使用してオリゴヌクレオチドに付加され得る。

【０４１２】

使用される特定の配列決定方法にかかわらず、対応するオリゴヌクレオチドのそれぞれの存在を使用して、濃縮断片５４０にカップリングしたタンパク質を同定し、任意選択的に定量化することができる。例えば、第１及び第２のオリゴヌクレオチドの存在は、ビーズアレイ又はＳＢＳを使用して検出され得、そのような存在に基づいて、第１及び第２のタンパク質５２１、５２２が断片５４０中に存在したと推定され得る。対応するオリゴヌクレオチドのそれぞれの量もまた、タンパク質を定量化するために使用され得る。例えば、濃縮断片５４０は２つの第２のタンパク質５２２を含んでいたので、第１の抗体５５１の１つのコピー及び第１のオリゴヌクレオチドの１つのコピーに結合するようになる１つの第１のタンパク質５２１と比較して、第２の抗体５５２の２つのコピーが、第２のオリゴヌクレオチドの２つのコピーと共にそれに結合するようになる。第１のオリゴヌクレオチド（１コピー）及び第２のオリゴヌクレオチド（２コピー）の相対量は、濃縮断片５４０内の第１のタンパク質５２１（１コピー）及び第２のタンパク質５２２（２コピー）の相対量を示す。第３及び第４のオリゴヌクレオチドが存在しないことは、第３及び第４の抗体５５３、５５４がそれぞれ選択的であるタンパク質が、濃縮断片５４０中に存在しなかったことを示す。したがって、本発明の方法は、濃縮断片５４０、より具体的には濃縮断片５４０に沿った遺伝子座にカップリングしているタンパク質のエピジェネティック特徴のアッセイを提供する。

【０４１３】

ここで図５Ｉ～５Ｊを参照して説明する他の例では、タンパク質の各々をそれぞれ標識するために対応するオリゴヌクレオチドを使用することは、断片を複数のトランスポザーゼと接触させることを含み得、トランスポザーゼの各々は、タンパク質を特徴付けるような方法でタンパク質を標識するために使用され得る対応するオリゴヌクレオチドにカップリングされる。例えば、図５Ｉに示される組成物５０６は、それぞれオリゴヌクレオチドを含む複数のトランスポザーゼ５６１と接触している濃縮断片５４０（図５Ａ～５Ｆを参照して説明されるような方法で調製され得る）を含む。非限定的な例では、トランスポザーゼはＴｎ５を含み得る。

【０４１４】

濃縮断片のそれぞれの遺伝子座にカップリングしたタンパク質は、その遺伝子座においてトランスポザーゼの活性を阻害し得る。したがって、トランスポザーゼ５６１は、遺伝子座以外の位置で断片５４０にカップリングされるようになり得る。トランスポザーゼ５６１が断片５４０にカップリングされる位置で、トランスポザーゼは、対応するオリゴヌクレオチドを断片に結合し得る。そのようなプロセスは、断片５４０を部分断片に分割することができる。図５Ｊに示される組成物５０７の非限定的な例では、部分断片５７１は、第１のタンパク質５２１及びオリゴヌクレオチドを含み、部分断片５７２は、クロマチン５２３及びオリゴヌクレオチドを含み、部分断片５７３は、タンパク質５２２及びオリゴヌクレオチドを含む。これに関して、トランスポザーゼ５６１（図５Ｉに示される）は、タンパク質５２１、５２２又はクロマチン５２３の存在によって阻害されない（すなわち、所与のタンパク質又は断片の部分に特異的でない）任意の位置で断片５４０に結合し得るので、そのようなトランスポザーゼは、それらのそれぞれのオリゴヌクレオチドを任意のそのような位置に付加し得ることに留意されたい。

【０４１５】

第２、第１、及び第３の断片５７１、５７２、５７３にそれぞれカップリングされたオリゴヌクレオチドは、例えば、図５Ｇ～５Ｈを参照して説明されるような方法で、配列決定され、タンパク質５２１、５２２及びクロマチン５２３の存在、及び任意選択的に量を

同定するためにそれぞれ使用され得る。オリゴヌクレオチドの断片５７１、５７２、５７３におけるそれぞれの位置は、タンパク質及び／又はクロマチンのそれぞれの遺伝子座を同定するために使用され得る。例えば、図５Ｉ及び５Ｊに示される純粋に例示的な図では、タンパク質５２１は、任意のトランスポザーゼがそのタンパク質の遺伝子座において作用することを阻害し、タンパク質５２２は、任意のトランスポザーゼがそれらのタンパク質の遺伝子座において作用することを阻害し、クロマチン５２３は、任意のトランスポザーゼがそのクロマチンが位置する場所で作用することを阻害する。したがって、断片５７２、５７１、５７３中の第２、第１、及び第３のオリゴヌクレオチド中のタンパク質５２２、５２１及び／又はクロマチン５２３のそれぞれの位置は、オリゴヌクレオチドが付加された位置以外の位置であると理解され得る。

【０４１６】

図５Ｋは、標的ポリヌクレオチドのそれぞれの遺伝子座にカップリングしたタンパク質を特徴付ける方法５０００における操作の例示的なフローを示す。方法５０００は、例えば図５Ａ～図５Ｃを参照して説明されるような方法で、標的ポリヌクレオチドを第１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰと接触させること（操作５００１）を含み得る。任意選択的に、方法５０００は、対応するオリゴヌクレオチドを使用して断片のそれぞれの遺伝子座にカップリングしたタンパク質の各々をそれぞれ標識する前に断片を濃縮することを含み得る。例えば、第１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰはそれぞれ、例えば、図５Ｂ～５Ｃを参照して説明されるような方法で、断片が第１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを介してタグにカップリングされるようにタグにカップリングされ得る。濃縮することは、第１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを介してタグにカップリングした断片を、例えば、図５Ｄを参照して説明されるような方法で、タグパートナーにカップリングした基材と接触させることを含み得る。濃縮することは、例えば、図５Ｅを参照して説明されるような方法で、タグをタグパートナーにカップリングして、断片を基材にカップリングすることを更に含み得る。濃縮することは、例えば、図５Ｆを参照して説明されるような方法で、基材にカップリングされていない標的ポリヌクレオチドの任意の部分を除去することを更に含み得る。

【０４１７】

方法５０００は、第１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを標的ポリヌクレオチド中の第１及び第２の部分配列にそれぞれハイブリダイズさせることを含み得、タンパク質は、例えば、図５Ａ～５Ｃを参照して説明されるような方法で、第１及び第２の部分配列間の標的ポリヌクレオチドのそれぞれの遺伝子座にカップリングされる（操作５００２）。方法５０００は、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを使用して第１の部分配列で、及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを使用して標的ポリヌクレオチドを切断し、第２の部分配列において標的ポリヌクレオチドを切断して断片を形成することを含み得、タンパク質は、例えば、図５Ａ～５Ｃを参照して説明されるような方法で、断片のそれぞれの遺伝子座にカップリングされる（操作５００３）。方法５０００は、例えば、図５Ｇ～図５Ｈを参照して説明されるような方法で、及び／又は図５Ｉ～図５Ｊを参照して説明されるような方法で、断片のそれぞれの遺伝子座にカップリングしたタンパク質の各々をそれぞれ標識するために対応するオリゴヌクレオチドを使用すること（操作５００４）と、対応するオリゴヌクレオチドを配列決定すること（操作５００５）とを含み得る。

【０４１８】

図５Ｇ～５Ｈ及び５Ｉ～５Ｊを参照してそれぞれ記載されるようなプロセスフローは、任意の適切な長さのポリヌクレオチドを使用して行われ得、図５Ａ～５Ｃを参照して説明されるようなプロセスフローを使用して生成された断片を使用して必ずしも行われる必要はないことが理解されるであろう。したがって、図５Ｋを参照して説明した方法５０００の操作５００１～５００３は、任意選択的あると理解されるべきである。

【０４１９】

したがって、図５Ａ～５Ｋから、本明細書のいくつかの例では、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを使用して、タンパク質にカップリングしたポリヌクレオチド断片を生成及び濃縮す

ることができ、それらのタンパク質の位置、量、及び／又は同一性を、本明細書に記載されるようなエピジェネティックアッセイを使用して特徴付けられ得ることが理解され得る。

【０４２０】

Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰニッカーゼを使用するポリヌクレオチドの選択された断片の濃縮

本明細書で提供されるいくつかの方法は、インタクトなｄｓＤＮＡ断片の標的化配列決定のための長く面倒なワークフローの問題を解決する。本開示から明らかなように、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰは、ポリヌクレオチド、例えば、ｄｓＤＮＡにおける標的領域の迅速かつ特異的な切断を提供し得る。ここで図８Ａ～８Ｈを参照して説明されるように、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰニッカーゼ及びポリメラーゼ伸長は、基材からの溶出によってｄｓＤＮＡ断片を選択的に濃縮するために使用され得る。そのような方法及び組成物は、インタクトな起源断片を回収するために使用され得る。これは、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰによる完全なｄｓＤＮＡ切断が望ましくない場合がある用途、例えば、無細胞ＤＮＡ（ｃｆＤＮＡ）の配列決定において特に有用であり得る。これはまた、又は代替的に、配列決定ライブラリーの基礎となるサイズがＣＲＩＳＰＲ切断によって変化しないので有用であり得、これは、非常に短い産物の生成を低減又は回避することを意味する。

【０４２１】

より具体的には、図８Ａ及び図８Ｈは、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰニッカーゼを使用して選択されたポリヌクレオチド断片を濃縮するための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。図８Ａは、標的領域の選択的溶出のためのＣＲＩＳＰＲニッカーゼ伸長の例示的なプロセスフローの概要を示す。プロセスフローの操作Ａにおいて、ｄｓＤＮＡ断片Ｐ４（任意選択的に本明細書の他の箇所に記載されるような方法で生成され得る）は、ビーズへの断片の結合を容易にするように３’官能化（「Ｂ」）され得る。例えば、断片は、図８Ｃを参照して以下に記載されるような方法を使用して３’ビオチン化され得る。断片Ｐ４のいくつかは、濃縮及び検出することが所望されるそれぞれの標的配列を含み得るが、他の断片は、そのような配列を必ずしも含まなくてもよい。例えば、図８Ａに示される断片Ｐ４は、標的配列８１０を含むが、他の断片は、他の標的配列を含み得、又はそのような標的配列を含まなくてもよい。

【０４２２】

図８　Ａに示すプロセスフローの操作Ｂにおいて、３’官能化断片Ｐ４は、１つ以上の基材、例えば３’官能化断片Ｐ４にカップリングすることになるように官能化されたビーズにカップリングされ得る。非限定的な一例では、ビーズ８２０は、３’ビオチン化断片Ｐ４がカップリングされるストレプトアビジンを含み得る。図示の例では、ｄｓＤＮＡ断片Ｐ４の官能基化された３’末端の各々が異なるビーズ８２０に結合されるが、他の例では、所与の断片Ｐ４の３’官能基化末端が互いに同じビーズに結合され得ることが理解されるであろう。ビーズ８２０は、溶液から引き出されてもよく（例えば、ビーズは、強磁性又は常磁性であってもよく、外部磁石を使用して溶液から引き出されてもよい）、次いで、ビーズは、洗浄されて、ビーズにカップリングした精製されたｄｓＤＮＡ断片Ｐ４を提供し、一方、任意の他のｄｓＤＮＡは、実質的に洗い流されてもよい。

【０４２３】

図８Ａに示されるように、操作Ｃにおいて、ビーズ結合断片Ｐ４は、複数のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰニッカーゼ（本明細書ではＣＲＩＳＰＲニッカーゼとも称される）と接触させられ得る。Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰニッカーゼの各々のｇＲＮＡは、ｄｓＤＮＡのそれぞれの一本鎖内の特定の領域（部分配列）を標的とすることができ、この領域は、ニッカーゼが、互いにオフセットされ、かつ濃縮することが望まれる二本鎖標的領域８１０の両側にある位置でそれぞれの鎖を切断するように互い違いにされ得る。例えば、図８Ａの操作Ｃに示されるような方法で、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰニッカーゼ８５１のｇＲＮＡは、標的配列８１０のフォワード（「ｆｗｄ」）である領域を標的としてもよく、第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰニッカーゼ８５２のｇＲＮＡは、標的配列８１０のリ

バース（「ｒｅｖ」）である領域を標的としてもよい。したがって、第１及び第２のニッカーゼ８５１、８５２のガイド配列は、順方向及び逆方向において標的配列８１０に「隣接する」と考えられ得る。第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰニッカーゼ８５１は、ビーズ結合ｄｓＤＮＡ断片Ｐ４の一方の鎖にニック（切断）を生成し、第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰニッカーゼ８５２は、ビーズ結合ｄｓＤＮＡ断片Ｐ４の他方の鎖に、ニッカーゼ８５１によって生成された位置からずれた位置にニックを生成する。対応するＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰニッカーゼが、ｄｓＤＮＡ断片内の特定の配列に隣接する位置でそれぞれの鎖を切断するように、任意の適切な数のｇＲＮＡが設計され得ることが理解されるであろう。例えば、複数の異なるｇＲＮＡ（例えば、１０００～１００，０００個のｇＲＮＡ、又は１００，０００個を超えるｇＲＮＡ）を使用して、サンプル内の目的の多くの異なる配列を同時に濃縮することができる。ｇＲＮＡは、必ずしも所与の標的配列８１０に「隣接する」必要はなく、むしろ標的配列当たり少なくとも２つのガイドが所与の断片Ｐ４内の対向する鎖に結合して、ニックを形成し得ることに留意されたい。

【０４２４】

図８Ａの操作Ｄに示されるように、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰニッカーゼ８５１、８５２は、例えば、穏やかな熱及び／又はＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰニッカーゼを破壊するための試薬、例えば、プロテイナーゼＫ、プロテアーゼ、又はＳＤＳ洗浄剤を使用して、ニックの３’末端を露出させるように除去される。各所与のｄｓＤＮＡ断片Ｐ４の鎖は互いにハイブリダイズしたままであるので、断片は、対応するビーズ８２０に実質的にカップリングしたままである。

【０４２５】

次いで、ｄｓＤＮＡの鎖中の対向するニックに隣接する標的配列８１０は、選択的に溶液中に溶出され得るが、断片Ｐ４の残りの部分はビーズ８２０にカップリングしたままである。例えば、ニックが入った断片Ｐ４は、ポリメラーゼ及びヌクレオチド（具体的には図示せず）と接触させられ得る。図８Ａの操作Ｅに示されるような方法で、ポリメラーゼは、ニックによって露出された３’末端から断片のそれぞれの鎖を伸長し得、そのような伸長は、結合された鎖を置換し得、標的配列８１０の溶出をもたらす。非標的化領域は、ビーズ８２０にカップリングしたままであり、例えば、磁気又は他の分離技術を使用して、溶出された標的配列８１０から分離される。ポリメラーゼ伸長は、断片Ｐ４内のどこにニックが生じたかにかかわらず、インタクトな配列８１０の溶出を生じる。

【０４２６】

Ｃａｓ　９ニッカーゼ及びポリメラーゼ伸長を使用してラムダＤＮＡ中の標的を濃縮して基材から溶出するためのワークフローの例

図８Ａは、Ｃａｓ９ニッカーゼを使用してラムダＤＮＡ中の標的を濃縮するために使用することができる例示的なワークフローを示す。ラムダゲノムの４つの領域を標的とする特異的ガイドＲＮＡ配列を使用する。図１２～１６は、以下でより詳細に説明するように、ワークフローの様々な工程後のライブラリー構造の概略図を提供する。表１は、ガイドＲＮＡ配列並びにそれらが標的とする領域を提供する。

【表１】

表１．ガイドＲＮＡ配列

Regionコード	ラムダ切断部位	ガイド配列（標的部分）	完全ガイドRNA配列
region1＋	192	TTTGTCCGTGGAATGAACAA	mU*mU*mU*rGrUrCrCrGrUrGrGrArArUrGrArArCrArArGrUrUrUrUrArGrArGrCrUrArGrArArArUrArGrCrArArGrUrUrArArArArArUrArArGrGrCrUrArGrUrCrCrGrUrUrArUrCrArArCrUrUrGrArArArArArArGrUrGrGrCrArCrCrGrArGrUrCrGrGrUrGrCmU*mU*mU*rU
region1	323	GGCATACCATTTTATGACGG	mG*mG*mC*rArUrArCrCrArUrUrUrUrArUrGrArCrGrGrGrUrUrUrUrArGrArGrCrUrArGrArArArUrArGrCrArArGrUrUrArArArArArUrArArGrGrCrUrArGrUrCrCrGrUrUrArUrCrArArCrUrUrGrArArArArArArGrUrGrGrCrArCrCrGrArGrUrCrGrGrUrGrCmU*mU*mU*rU
region2＋	15024	TTACATGAGACTCTGCCTGA	mU*mU*mA*rCrArUrGrArGrArCrUrCrUrGrCrCrUrGrArGrUrUrUrUrArGrArGrCrUrArGrArArArUrArGrCrArArGrUrUrArArArArArUrArArGrGrCrUrArGrUrCrCrGrUrUrArUrCrArArCrUrUrGrArArArArArArGrUrGrGrCrArCrCrGrArGrUrCrGrGrUrGrCmU*mU*mU*rU
region2－	15160	GGTCATACCACCGGCCCCAA	mG*mG*mU*rCrArUrArCrCrArCrCrGrGrCrCrCrCrArArGrUrUrUrUrArGrArGrCrUrArGrArArArUrArGrCrArArGrUrUrArArArArArUrArArGrGrCrUrArGrUrCrCrGrUrUrArUrCrArArCrUrUrGrArArArArArArGrUrGrGrCrArCrCrGrArGrUrCrGrGrUrGrCmU*mU*mU*rU
region3＋	35292	GCGCTTACCCCAACCAACAG	mG*mC*mG*rCrUrUrArCrCrCrCrArArCrCrArArCrArGrGrUrUrUrUrArGrArGrCrUrArGrArArArUrArGrCrArArGrUrUrArArArArArUrArArGrGrCrUrArGrUrCrCrGrUrUrArUrCrArArCrUrUrGrArArArArArArGrUrGrGrCrArCrCrGrArGrUrCrGrGrUrGrCmU*mU*mU*rU
region3－	35372	CACCACCAAAGCTAACTGAC	mC*mA*mC*rCrArCrCrArArArGrCrUrArArCrUrGrArCrGrUrUrUrUrArGrArGrCrUrArGrArArArUrArGrCrArArGrUrUrArArArArArUrArArGrGrCrUrArGrUrCrCrGrUrUrArUrCrArArCrUrUrGrArArArArArArGrUrGrGrCrArCrCrGrArGrUrCrGrGrUrGrCmU*mU*mU*rU
region4＋	25073	TGTCCTATATCACCACAAAA	mU*mG*mU*rCrCrUrArUrArUrCrArCrCrArCrArArArArGrUrUrUrUrArGrArGrCrUrArGrArArArUrArGrCrArArGrUrUrArArArArArUrArArGrGrCrUrArGrUrCrCrGrUrUrArUrCrArArCrUrUrGrArArArArArArGrUrGrGrCrArCrCrGrArGrUrCrGrGrUrGrCmU*mU*mU*rU
region4－	25176	AGTAGTTGGTAACCTGACAA	mA*mG*mU*rArGrUrUrGrGrUrArArCrCrUrGrArCrArArGrUrUrUrUrArGrArGrCrUrArGrArArArUrArGrCrArArGrUrUrArArArArArUrArArGrGrCrUrArGrUrCrCrGrUrUrArUrCrArArCrUrUrGrArArArArArArGrUrGrGrCrArCrCrGrArGrUrCrGrGrUrGrCmU*mU*mU*rU

【０４２７】

Ｃａｓ９酵素にガイドＲＮＡ配列をロードする。ガイド配列を、１ｕＭガイド、１ｕＭＣａｓ９ニッカーゼ（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ａｌｔ－Ｒ（登録商標）Ｓ．ｐ．Ｃａｓ９　Ｄ１０Ａニッカーゼ Ｖ３、１０８１０６２）及び１×リン酸緩衝生理食塩水を含む最終体積５０ｕｌでＣａｓｐに別々にロードする。構成要素を室温で１０分間放置し、次いで等量でプールして、Ｃａｓ９ニッキングミックスを作製する。溶液を使用するまで氷上で保存する。

【０４２８】

ビーズ連結トランスポソームを用いたタグ付け断片化によるライブラリー調製

【０４２９】
３’末端によって小さな表面に付着したライブラリーを、ビーズ連結トランスポソームを使用して調製した。
【０４３０】
工程１：５００ｎｇのラムダＤＮＡを、１０ｕＬのＴＢ１及び１０ｕＬのｅＢＬＴと共に、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＤＮＡ　Ｐｒｅｐ　ｗｉｔｈ　Ｅｎｒｉｃｈｍｅｎｔキットからの５０ｕＬの総体積でインキュベートした。混合物を４１℃に５分間加熱した。
【０４３１】
工程２：１０ｕＬのＳＴ２を添加することによってＴｎ５を除去し、３７℃で５分間加熱した。
【０４３２】
図１２は、工程２の後のライブラリー構造を示す。要素１２００は、ＤＮＡインサート中のＰＡＭ部位を示す。
【０４３３】
工程３：反応プレートを磁気スタンド上に置き、ビーズをペレット化した。上清を除去し、１５０ｕＬのＴＷＢを添加することによってビーズを洗浄した。次いで磁石を除去し、溶液をピペッティングにより混合した。ビーズを再び磁石上でペレット化し、その後磁石を除去した。上清を廃棄した。
【０４３４】
工程４：５０ｕＬのＥＬＭ（Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＤＮＡ　Ｐｒｅｐ　ＰＣＲ　Ｆｒｅｅキットから）を溶液に添加した。この溶液を３７℃で１５分間インキュベートして、インサートの３’末端とトランスポゾンの非転移鎖との間をギャップを充填し、ライゲーションした。
【０４３５】
図１３は、工程４後のライブラリー構造を示す。要素１２００は、ＤＮＡインサート中のＰＡＭ部位を示す。
【０４３６】
工程５：ビーズを磁石上でペレット化する。上清を除去し、ＴＷＢで洗浄した。
【０４３７】
工程６：５０μＬ容量中の１×ＮＥＢｕｆｆｅｒ　１（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）中の０．５μＬのエキソヌクレアーゼＩＩＩ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、Ｍ０２０６）を添加することによって、バックグラウンドに寄与し得る任意の不完全にギャップ充填及びライゲーションされた断片を除去した。ピペットで混合し、３７℃に１０分間加熱することによって、ビーズを再懸濁した。
【０４３８】
Ｃａｓ９ニッキング反応
【０４３９】
工程１：２ｕＬのプールされ負荷されたＣａｓ９ニッカーゼを１×ＮＥＢｕｆｆｅｒ２．１（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）と共に２０ｕＬの総体積で添加することによって、上清を除去した。ピペットで混合し、３７℃に３０分間加熱することによって、ビーズを再懸濁した。
【０４４０】
図１４は、Ｃａｓ９が各鎖上の標的断片にどのようにニックを入れるかを示す。
【０４４１】
工程２：１０ｕＬのＳＴ２を添加し、３７℃で５分間加熱することによって、Ｃａｓ９を除去した。ビーズをペレット化し、ＴＷＢで２回洗浄した。上清を廃棄した。
【０４４２】
図１５は、この時点でのライブラリー構造を示し、各鎖に１つのニックを有する。要素１２００は、ＤＮＡインサート中のＰＡＭ部位を示す。
【０４４３】

ビーズから標的断片を溶出するためのポリメラーゼ伸長。

【０４４４】

０．５ｕＬのＤＮＡポリメラーゼＩ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ、Ｍ０２１０）又はＢｓｕ ＤＮＡポリメラーゼ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ、Ｍ０３３０）を溶液に添加した。１×ＮＥＢｕｆｆｅｒ ２（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ）を使用し、２００ｕＭの各ｄＮＴＰを５０ｕＬの総容量で添加した。溶液を３７℃で１０時間撹拌した。

【０４４５】

図１６は、ポリメラーゼ伸長後のものを示す。示されるように、断片はもはや３’ビオチンを有さず、したがって溶液中に遊離される。要素１２００は、ＤＮＡインサート中のＰＡＭ部位を示す。

【０４４６】

精製及びＰＣＲ

【０４４７】

工程１：ビーズをペレット化し、選択された標的断片を含有する４０ｕＬの上清を新しいチューブに移した。Ｉｌｌｕｍｉｎａ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｂｅａｄｓ（ＩＰＢ）を使用して、１００ｕＬのＩＴＢを添加し、十分に混合し、室温で５分間インキュベートすることによって、ビーズを精製した。ビーズを磁石上でペレット化し、１８０μＬの８０％エタノールで２回洗浄した。上清を除去し、２分間乾燥させ、次いで２７μＬの水に再懸濁した。溶液をよく混合し、ビーズをペレット化し、２５μＬの上清を新しいチューブに移した。

【０４４８】

工程２：以下のＰＣＲプログラムを使用して、２０μＬのＥＰＭ及び５μＬのインデックスプライマーミックスを添加することによって、ライブラリーを増幅した。

－ ９８℃で１分間。
－ ９８℃で２０秒間を１２サイクル
－ ６０℃で３０秒間
－ ７２℃で３０秒間
－ １０℃に冷却

【０４４９】

配列決定

【０４５０】

ライブラリーを、Ｑｕｂｉｔキット（ｄｓＤＮＡ ＢＲ Ａｓｓａｙ Ｋｉｔ、Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び蛍光光度計を使用して定量化し、次いで、１２ｐＭのローディング濃度でＭｉＳｅｑ上で配列決定した。

【０４５１】

図１７は、４つの標的の濃縮後のラムダゲノムにわたる配列決定深度を示す。

【０４５２】

図８Ｂは、図８Ａを参照して説明されるような選択的溶出を引き起こすための断片Ｐ４に対する少なくとも２つのＣＲＩＳＰＲ事象の使用に関する更なる詳細を示す。図８Ｂに示す操作Ａでは、ニッキング事象は生じておらず、したがって、断片Ｐ４は、ビーズ８２０にカップリングしたままである。図８Ｂに示される操作Ｂでは、図８Ａを参照して説明される操作Ｃを参照して説明されるような方法で、２つのニッキング事象が生じており、ポリメラーゼを使用するニックのその後の伸長が、それぞれのビーズにカップリングした両方の末端を置換し、したがって標的配列８１０を溶出することが見られ得る。図８Ｃに示される操作Ｃでは、例えば、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ ＲＮＰニッカーゼが断片Ｐ４のオフターゲット配列８１１にニックを形成し、したがって、対応するニッカーゼは、配列８１１に隣接する断片Ｐ４の対向する部分にニックを形成しなかったので、単一のニッキング事象のみが生じている。ポリメラーゼを使用するニックのその後の３’伸長は、それぞれのビーズにカップリングした末端の１つを置換するが、他方の末端はビーズにカップリング

したままであり、したがって溶出されないことが見られ得る。したがって、図８Ｂから、標的配列８１０のいずれかの側の対向する鎖上でニックが入っている断片は、ニックが入っていない断片又は一本鎖上でのみニックが入っている断片と比較して優先的に溶出され得ることが理解され得る。ｇＲＮＡは、対応するニッカーゼが標的配列８１０の３’側であるそれぞれの位置でニックを生成し得る領域に結合するように設計され得、したがって、ポリメラーゼ伸長を使用して首尾よく溶出され得るが、標的配列の５’である位置で生成された任意のニックは、例えば、図８Ｇを参照して以下により詳細に記載されるような方法で、鋳型鎖上のニックを越えて伸長することができない場合があることに留意されたい。Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰニッカーゼは、任意選択的に異なる鎖を標的化し得ることに留意されたい。図は、ｇＲＮＡとハイブリダイズした鎖を標的とする単一のニッカーゼを示し得るが、他の鎖にニックを入れる別のニッカーゼを使用してもよい。これは、ゲノム中の両方の鎖が使用され得るので、ニッキングのための配列の改善された選択を提供し得る。

【０４５３】

図８Ｃは、図８Ａ～８Ｂを参照して説明されるようなニッキング及び伸長操作の前にＰＣＲ増幅を受けた配列決定ライブラリーからｄｓＤＮＡ断片を濃縮するための例示的なプロセスフローを示す。そのようなＰＣＲ増幅は、例えば、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰニッカーゼ結合及びニッキング工程が１００％効率的でない場合、及び／又は比較的少数のｄｓＤＮＡ断片が存在する場合、例えば、ｄｓＤＮＡが無細胞ＤＮＡ（ｃｆＤＮＡ）配列決定ライブラリーから得られる場合、感度を増強するために、及び／又は品質管理を行い、小パネルから配列決定するのに十分な材料を増幅するために有用であり得る。図８Ｃに示される操作Ａにおいて、増幅アダプターは、任意の適切な方法（例えば、図１Ｊ、３Ｄ、４Ａ～４Ｊ、６Ａ～６Ｂ、又は７Ａ～７Ｇを参照して説明されるような方法）を介して添加される。増幅アダプターは、任意選択的に、図１Ｊ及び３Ｄを参照して説明されるような方法でＹ字型であり得、それぞれリード１及びリード２配列決定プライマーを提供し得る。非限定的な一例では、増幅アダプターは、二本鎖ＭＥ、ＭＥ’領域に加えて、Ａ１４及びＢ１５増幅アダプター（Ａ１４’及びＢ１５’である相補体）を含み得る。例えば、図８Ｃの操作Ａに示されるように、ｄｓＤＮＡ断片Ｐ４の第１の鎖の３’末端は、ＭＥ’配列を介してＢ１５’増幅アダプターにカップリングされ得、その鎖の５’末端は、ＭＥ配列を介してＡ１４増幅アダプターにカップリングされ得る。断片Ｐ４の第２の鎖の３’末端は、ＭＥ’配列を介してＢ１５’増幅アダプターにカップリングされ得、その鎖の５’末端は、ＭＥ配列を介してＡ１４増幅アダプターにカップリングされ得る。しかしながら、任意の他の配列及び／又は増幅アダプター（例えば、ＵＭＩ、サンプルインデックス、クラスター増幅プライマーなど）が鎖に付加され得ることが理解されるであろう。

【０４５４】

増幅アダプターを有するライブラリーの調製に続いて、図８Ｃの操作Ｂに示されるように、ＰＣＲ増幅を行って、最初の断片Ｐ４の両方の鎖を別々に増幅する。この操作の間、又は終了時に、断片は、図８Ａの操作Ａを参照して説明されたものと同様の方法で、３’末端で官能化（例えば、ビオチン化）され得る。例示的に、非テンプレート付加（例えば、Ｔａｑポリメラーゼを使用する）又はターミナルトランスフェラーゼを使用して、図８Ｃの操作Ｂに示されるように、増幅された鎖の３’末端にビオチン化ヌクレオチドを付加し得る。その後の操作は、図８Ａを参照して説明したのと同様に行うことができる。例えば、図８Ｃの操作Ｃに示されるように、ライブラリー全体は、図８Ａの操作Ｂを参照して説明されるような方法で、断片Ｐ４の３’官能基を介して、１つ以上の基材（ビーズ８２０等）にカップリングされてもよく、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰニッカーゼは、図８Ａの操作Ｃを参照して説明されるような方法で、それぞれの標的配列８１０に３’隣接するニックを生成するために使用される。図８Ｃの操作Ｄに示されるように、次いで、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰニッカーゼは、図８Ａの操作Ｄを参照して説明されるような方法で除去され得、ポリメラーゼは、ニックから伸長させ、図８Ａの操作Ｅを参照して説明されるような方法で標的配列８１０の溶出を引き起こすように添加され得る。次いで、溶出された

標的配列は、例えば、ＰＣＲ又はクラスター増幅を使用して更に増幅され得、その増幅の間に、ＵＭＩ、サンプルインデックス、及び／又はクラスター化アダプターが、例えば、そのような配列が図８Ｃの操作Ａの間に添加されなかった場合、任意選択的に添加され得る。サンプルインデックスの非限定的な例としては、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ｉ５及びｉ７インデックスが挙げられる。クラスター化アダプターの非限定的な例としては、Ｐ５及びＰ７プライマーが挙げられる。任意の適切な配列がカップリングされた溶出断片は、標的化配列決定アッセイの一部として任意の適切なプラットフォーム（例えば、Ｉｌｌｕｍｉｎａの合成による配列決定プラットフォーム）で配列決定され得る。

【０４５５】

ＰＣＲを使用して、適切なアダプターを断片Ｐ４にカップリングし、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ媒介溶出の前に断片を増幅することができるが、ＰＣＲは必ずしもそのように使用される必要はないことが理解されるであろう。例えば、図８Ｄは、ＰＣＲフリーの断片化及びライゲーションされた配列決定ライブラリーからの断片を濃縮するためのプロセスフローを示す。ここで、図８Ｄの操作Ａにおいて、断片Ｐ４が生成され、増幅アダプター（例えば、ＭＥ／ＭＥ’領域及び５’増幅アダプター）が、例えば、図１Ｊ、３Ｄ、４Ａ～４Ｊ、６Ａ～６Ｂ、又は７Ａ～７Ｇを参照して説明されるような任意の適切な方法を介して付加される。図８Ｄに例示される非限定的な例において、３’官能基（ビオチンなど）は、例えば、ＭＥ／ＭＥ’及び単一のＡ１４アダプターを含む単純化されたアダプターを使用して、アダプターライゲーションによって付加され得る。アダプターは、図８Ｄの操作Ｃ及びＤを参照して以下に更に記載されるような方法でポリメラーゼ伸長を失速させ得るウラシル（Ｕ）を含むように改変され得る。図８Ｄの操作Ｂにおいて、３’官能基は、図８Ａの操作Ｂを参照して説明されるような方法で、ビーズ８２０等の基材にカップリングされ、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰニッカーゼは、図８Ａの操作Ｃを参照して説明されるような方法で、それぞれの標的配列８１０に３’隣接するニックを生成するために使用される。図８Ｄの操作Ｃに示されるように、次いで、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰニッカーゼは、図８Ａの操作Ｄを参照して説明されるような方法で除去され得、ポリメラーゼは、ニックから伸長させ、図８Ａの操作Ｅを参照して説明されるような方法で標的配列８１０の溶出を引き起こすように添加され得る。しかしながら、修飾されたアダプター（例えば、Ａ１４－Ｕ）内のウラシルは、そのウラシルの位置でポリメラーゼを失速させる。図８Ｄの操作Ｃに示されるように、第２の配列決定プライマー（例えば、Ｂ１５）を含むテンプレートスイッチオリゴヌクレオチドは、失速した伸長産物がプライミングオフし、溶出された標的断片に３’増幅アダプターを付加することを可能にする。次いで、溶出された標的断片８１０は、任意選択的に本明細書の他の箇所に記載されているような方法で、クラスター増幅アダプター（例えば、Ｐ５及びＰ７）、ＵＭＩ、及び／又はサンプルインデックスの付加を含めて、ＰＣＲ増幅され得る。しかしながら、例えば、図８Ｄに示されるプロセスフローの操作Ａ及びＤにおいて完全配列決定／クラスター増幅アダプター及びサンプルインデックスを追加することによって、ＰＣＲを含まないプロセスフローが適切に行われ得ることが理解されるであろう。図８Ｄを参照して説明される選択された操作に関する更なる詳細については、「Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｆｏｒ　Ｉｎｃｒｅａｓｉｎｇ　Ｙｉｅｌｄ　ｏｆ　Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ　Ｌｉｂｒａｒｉｅｓ」と題される、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる国際公開第２０２１／２５２６１７号を参照されたい。

【０４５６】

図８Ａ～図８Ｄを参照して説明されるようなプロセスフローは、任意のタイプのライブラリー、機器、又はワークフローと共に使用するために適切に適合され得ることが理解されるであろう。図８Ｅは、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　Ｎｅｘｔｅｒａワークフローと共に使用するためのプロセスフローの非限定的な例を示す。ここで、サンプルライブラリーは、Ｎｅｘｔｅｒａシステムを使用して同時断片化及び５’アダプター付加を介して調製され得る。Ｎｅｘｔｅｒａシステムは、図８Ａの操作Ｂを参照して説明されるような方法で基材（例えば、ビーズ８２０）に結合されてもよく、その結果、初期断片化事象を使用して断片Ｐ４を基材に結合することができる。図８Ｅの操作Ａに示されるように、例えば、ビオチ

ン等の３’官能基を介してビーズ８２０にカップリングされたＮｅｘｔｅｒａライブラリーが生成されてもよい。いくつかの例では、ライブラリーは、Ａ１４アダプター及びＢ１５アダプターなどのそれぞれの増幅アダプターを含むトランスポソームの混合物を使用して生成することができ、この場合、断片Ｐ４の一部（例えば、約半分）は、いずれかの末端にＡ１４アダプター及びＢ１５アダプターを含み得る（本明細書に示すように）。他の断片は、必ずしもＡ１４及びＢ１５アダプターの両方を含まなくてもよく、例えば、Ｂ１５アダプターを欠くが２つのＡ１４アダプターを含み得、又はＡ１４アダプターを欠くが２つのＢ１５アダプターを含み得る。

【０４５７】

Ｎｅｘｔｅｒａ断片化プロセスの結果として、各断片Ｐ４は、約９塩基対長である３’末端とＭＥ領域との間のギャップを含み得る。図８Ｅの操作Ｂに示されるように、ギャップは、例えば、ポリメラーゼ及びリガーゼを使用する伸長ライゲーションによってシールされ得る。ニックのシーリングは、ポリメラーゼによる任意の非特異的伸長及び溶出を阻害し得ることに留意されたい。あるいは望ましくない伸長及びその後のＴｄＴ又はポリメラーゼ、及びジデオキシ塩基による溶出を阻害するために、末端塩基を添加してもよい。次いで、図８Ａの操作Ｃを参照して説明されるような方法で、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰニッカーゼを基材上の断片に適用して、図８Ｅの操作Ｃに示すような方法で、標的配列８１０に隣接する標的化ニックを作製することができる。次に、図８Ａの操作Ｅを参照して説明されるような方法で、ポリメラーゼを加えて、図８Ｅの操作Ｄに示すような方法で標的配列を溶出させることができる。溶出後、更なる増幅アダプター及び／又はサンプルインデックスは、本明細書の他の箇所に記載されるような方法で、例えば、配列決定の前にＰＣＲ又はクラスター増幅を使用して、断片にカップリングされ得る。これに関して、２つのＢ１５アダプター又は２つのＡ１４アダプターを有する任意の断片Ｐ４は、そのようなＰＣＲ増幅の間に増幅され得ず、したがって配列決定され得ない。図８Ｄの操作Ｄを参照して説明されるようなテンプレートスイッチ機構を使用して、Ａ１４アダプター及びＢ１５アダプターの両方を提供するようにアダプターを交換することによって、そのようなＢ１５－Ｂ１５断片及びＡ１４－Ａ１４断片の損失を減らすことができ、その結果、そのような断片を、ＰＣＲ又はクラスター増幅を使用して増幅し、続いて配列決定し得ることが理解されるであろう。

【０４５８】

図８Ｆは、図８Ａの操作Ｅ、図８Ｂの操作Ｂ、図８Ｃの操作Ｄ、図８Ｄの操作Ｃ、及び図８Ｅの操作Ｄを参照して説明されるようなニック伸長溶出操作のためのポリメラーゼのオプションを示す。図８Ｆの例Ａでは、鎖置換ポリメラーゼの使用は、標的配列８１０からの３’官能化（例えば、３’ビオチン化）鎖の置換をもたらし、標的化溶出をもたらす。図８Ｆの例Ｂでは、５’エキソヌクレアーゼ活性を有するポリメラーゼの使用を含むニックトランスレーションアプローチが、３’官能化（例えば、３’ビオチン化）鎖の５’から３’への分解を引き起こし、標的配列８１０の標的溶出をもたらす。

【０４５９】

図８Ｇは、標的配列の３’側であるニックの使用（操作Ａ）を、標的配列の５’側であるニックの使用（操作Ｂ）と比較する。操作Ａから理解され得るように、標的配列８１０の３’側である２つのニッキング事象は、基材、例えば、ビーズ８２０からの標的配列の溶出をもたらす。操作Ｂから理解され得るように、標的配列８１０の５’である２つのニッキング事象は、ポリメラーゼをニックにおいて失速させ、標的配列を基材、例えば、ビーズ８２０に結合したままにすることができる。

【０４６０】

多数の分離技術が、図８Ａ～８Ｇを参照して説明されるようなプロセスフローと適合性があり、記載されるようなビーズの磁気分離の使用に限定されないことに留意されたい。例えば、基材は、充填カラム又はフローセルなどのフローシステム内に提供され得る。標的断片は、そのようなシステムにおいてフローを使用して溶出され得る。

【０４６１】

断片Ｐ４は、任意の適切なタグを含むように官能化されてもよく、基材は、断片Ｐ４を基材にプルダウンするための任意の適切なタグパートナーを含むように官能化されてもよいことが更に理解されるであろう。例えば、タグパートナーはＳＮＡＰタンパク質を含み得、タグはＯ－ベンジルグアニンを含み得る；タグパートナーはＣＬＩＰタンパク質を含み得、タグはＯ－ベンジルシトシンを含み得る；タグパートナーはＳｐｙＴａｇを含み得、タグはＳｐｙＣａｔｃｈｅｒを含み得る；タグパートナーはＳｐｙＣａｔｃｈｅｒを含み得、タグはＳｐｙＴａｇを含み得る；タグパートナーはビオチンを含み得、タグはストレプトアビジンを含み得る；タグパートナーはストレプトアビジンを含み得、タグはビオチンを含み得る；タグパートナーはＮＴＡを含み得、タグはＨｉｓタグを含み得る；タグパートナーはＨｉｓタグを含み得、タグはＮＴＡを含み得る；タグパートナーは、抗体（例えば抗ＦＬＡＧ抗体）を含み得、タグは、抗体が選択的である抗原（例えばＦＬＡＧタグ）を含み得る；タグパートナーは抗原（例えばＦＬＡＧタグ）を含み得、タグは、抗原に対して選択的な抗体（例えば抗ＦＬＡＧ抗体）を含み得る；又はタグパートナーは第１のオリゴヌクレオチドを含み得、タグは、第１のオリゴヌクレオチドに相補的であり、第１のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズする第２のオリゴヌクレオチドを含み得る。タグパートナーは、任意の適切な結合を介して、例えば、共有結合を介して、又は非共有結合を介して基材にカップリングされ得る。同様に、タグはそれぞれ、任意の適切なカップリングを介して、例えば共有結合を介して、又は非共有結合を介して断片Ｐ４に３’カップリングされ得る。

【０４６２】

図８Ａ～図８Ｇを参照して説明されるような組成物及び操作は、任意の適切な方法又は状況で使用することができる。例えば、図８Ｈは、二本鎖ポリヌクレオチドの断片を生成する例示的な方法８０００における操作のフローを示す。方法８０００は、特定のポリヌクレオチドに対して行われる操作を説明し得るが、方法は、説明される方法で同時に操作され得るいくつかの異なるポリヌクレオチドを含む混合物に適用され得ることが理解されるであろう。いくつかの例では、二本鎖ポリヌクレオチドは、ｄｓＤＮＡを含み得、任意選択的にｃｆＤＮＡを含み得る。

【０４６３】

方法８０００は、二本鎖ポリヌクレオチドを基材にカップリングすること（操作８００１）を含み得る。例えば、図８Ａの操作Ａ、図８Ｃの操作Ｂ、図８Ｄの操作Ａ、又は図８Ｅの操作Ａを参照して説明されるような方法で、二本鎖ポリヌクレオチドの３’末端は、官能化され得る（例えば、タグ又はタグパートナーにカップリングされ得る）。更に、図８Ａの操作Ｂ、図８Ｃの操作Ｃ、図８Ｄの操作Ｂ、又は図８Ｅの操作Ａを参照して説明されるような方法で、二本鎖ポリヌクレオチドの３’官能化末端は、基材、例えば、二本鎖ポリヌクレオチドのタグ又はタグパートナーにカップリングするようになるタグパートナー又はタグにカップリングする基材にカップリングすることができる。図８Ａ～８Ｇを参照して説明されるいくつかの例は、基材としてストレプトアビジンビーズ及び３’官能基としてビオチンを含み得るが、基材及びタグ／タグパートナー対の多くの他の例が容易に想定され得る。

【０４６４】

図８Ｈに示される方法８０００はまた、第１及び第２のＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）ニッカーゼを、二本鎖ポリヌクレオチド中の第１及び第２の部分配列にそれぞれハイブリダイズさせることを含み得る（操作８００２）。第１の部分配列は、二本鎖ポリヌクレオチドの第１の鎖に沿った標的配列の３’側であってもよく、第２の部分配列は、二本鎖ポリヌクレオチドの第２の鎖に沿った標的配列の３’側であってもよい。例えば、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰニッカーゼ８５１のｇＲＮＡは、図８Ａの操作Ｃ、図８Ｂの操作Ｂ、図８Ｃの操作Ｃ、図８Ｄの操作Ｂ、図８Ｅの操作Ｃ、図８Ｆの例Ａ、図８Ｆの例Ｂ、及び図８Ｇの例Ａを参照して説明されるような方法で、「ｆｗｄ」３’位置で二本鎖ポリヌクレオチドＰ４の第１の鎖に選択的にカップリングされ得、第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰニッカーゼ８５２のｇ

ＲＮＡは、「ｒｅｖ」３’位置で二本鎖ポリヌクレオチドＰ４の第２の鎖に選択的にカップリングされ得る。ニッカーゼは、標的配列の３’側にあると考えられ得る。上記のように、ニッカーゼは、ｇＲＮＡがハイブリダイズした鎖又は反対の鎖のいずれかを標的とし得る。

【０４６５】

図８Ｈに示される方法８０００はまた、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰニッカーゼを使用して第１の部分配列において第１の鎖を切断することと、第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰニッカーゼを使用して第２の部分配列において第２の鎖を切断することとを含み得る（操作８００３）。例えば、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰニッカーゼ８５１のニッカーゼは、図８Ａの操作Ｃ、図８Ｂの操作Ｂ、図８Ｃの操作Ｃ、図８Ｄの操作Ｂ、図８Ｅの操作Ｃ、図８Ｆの例Ａ、図８Ｆの例Ｂ、及び図８Ｇの例Ａを参照して説明されるような方法で、そのニッカーゼのｇＲＮＡがカップリングされる部分配列によって規定される位置で二本鎖ポリヌクレオチドＰ４の第１の鎖に選択的にニックを入れることができ、第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰニッカーゼ８５２のニッカーゼは、そのニッカーゼのｇＲＮＡがカップリングされる部分配列によって規定される位置で二本鎖ポリヌクレオチドＰ４の第２の鎖に選択的にニックを入れることができる。得られたニッカーゼは、標的配列の３’側にあると考えられ得る。切断のそのような２つの事例は、同時に行われてもよく、又は互いに異なる時間に行われてもよい。例えば、第１鎖及び第２鎖ＣＲＩＳＰＲニッカーゼ複合体の大きなプールを、サンプルと一度にインキュベートすることができる。操作８００２及び８００３は、任意の適切なＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰニッカーゼ、例示的に、第１の突然変異Ｄ１０Ａ及び第２の突然変異Ｈ８４０Ａを有する化膿レンサ球菌（Ｓ．Ｐｙｏｇｅｎｅｓ）Ｃａｓ９を使用して行われ得ることが理解されるであろう。

【０４６６】

方法８０００はまた、ポリメラーゼを使用して、それぞれの切断部から第１及び第２の鎖を伸長させ、基材から標的配列を溶出すること（操作８００４）を含み得る。例えば、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰニッカーゼは、図８Ａの操作Ｄ及びＥ、図８Ｂの操作Ｂ、図８Ｃの操作Ｄ、図８Ｄの操作Ｃ、図８Ｅの操作Ｄ、図８Ｆの例Ａ、図８Ｆの例Ｂ、及び図８Ｇの例Ａを参照して説明したような方法で、操作８００３で生成されたニックの３’末端を露出させるために除去されてもよく、二本鎖である標的配列を３’末端から伸長させるために適切なポリメラーゼが加えられてもよい。そのような伸長は、基材にカップリングしたままである基材にカップリングした二本鎖ポリヌクレオチドの部分を置換し、標的配列を溶出する。したがって、標的配列は基材から遊離される。操作８００４は、任意の適切なポリメラーゼを使用して行われ得ることが理解されるであろう。例えば、ポリメラーゼは、図８Ｆの実施例Ａを参照して説明されるような鎖置換ポリメラーゼ、例示的にはＶｅｎｔ又はＢｓｕを含み得る。又は、例えば、ポリメラーゼは５’エキソヌクレアーゼ活性を有してもよく、例示的にはＴａｑ、Ｂｓｔ、又はＤＮＡポリメラーゼＩである。

【０４６７】

方法８０００はまた、溶出された標的配列を配列決定すること（操作８００５）を含み得る。そのような配列決定は、任意の適切な方法で、及び任意の適切な機器、例えばＩｌｌｕｍｉｎａ，Ｉｎｃ．から市販されている機器を使用して行われ得る。配列決定の前の任意の適切な時点で、標的配列は、例えば図８Ｃの操作Ａ～Ｄ、図８Ｄの操作Ａ～Ｄ、又は図８Ｅの操作Ａ～Ｄを参照して説明したような方法で、増幅アダプターに適切に結合され得る。そのような増幅アダプターは、操作８００１、８００２、８００３、及び８００４の任意の適切な操作の前又は後に付加され得る。更に、配列決定前の任意の適切な時点で、標的配列は、例えば、ＰＣＲ又はクラスター増幅を使用して増幅され得る。そのような増幅は、操作８００１、８００２、８００３、及び８００４のうちの任意の適切なものの前又は後に実行され得る。

【０４６８】

Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを使用した選択されたポリヌクレオチド断片への増幅アダプターのライゲーション

本明細書で提供されるいくつかの方法は、インタクトなｄｓＤＮＡ断片の標的化配列決定のための長く面倒なワークフローの問題を解決する。本開示から明らかなように、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰは、ポリヌクレオチド、例えば、ｄｓＤＮＡにおける標的領域の迅速かつ特異的なハイブリダイゼーションを提供し得る。ここで図９Ａ～９Ｆを参照して説明されるように、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ及び増幅アダプターを含む複合体は、増幅アダプターを選択された断片にライゲーションするために使用され得、その結果、これらの断片は続いて増幅及び配列決定され得るが、他の断片はそのようなアダプターにライゲーションされることにならず、したがって増幅及び配列決定されない。したがって、選択された断片は、簡素化された方法で濃縮及び配列決定され得る。これは、例えば、無細胞ＤＮＡ（ｃｆＤＮＡ）を配列決定する際に、アダプターライゲーション中に二本鎖ポリヌクレオチドを保存及び濃縮することが望ましい場合がある用途において特に有用であり得るが、以前から知られている濃縮アプローチは、一本鎖ポリヌクレオチドを含み得る。追加的又は代替的に、更なる精度のために、ｃｆＤＮＡ分子の両方の鎖を二本鎖ＵＭＩで標識することが有用であり得る。

【０４６９】

いくつかの以前に公知のライゲーションアプローチは、二本鎖ポリヌクレオチドと適合し得るが、そのようなアプローチは、選択された断片の任意の濃縮を提供し得ない。例えば、図９Ａは、増幅アダプターをｄｓＤＮＡライブラリーの断片にライゲーションするための以前から知られている例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。操作Ａに示すように、ｄｓＤＮＡライブラリーを断片化することができる。そのような断片化は、例えば、ｃｆＤＮＡの場合、自然に起こり得るか、機械的若しくは酵素的に行われ得るか、又はＲＮＡライブラリーから生成され得る。得られた複数の断片は、図９Ａの操作Ｂに示すような方法で端部修復を使用して鈍らせることができる不均一な端部を有することができる。次いで、５’末端は、図９Ａの操作Ｃに示されるような方法でリン酸化され得る。次いで、図９Ａの操作Ｄに示すような方法で、Ａテーリングを使用して非鋳型Ａヌクレオチドを３’末端に付加する。次いで、図９Ａの操作Ｅに示されるような方法で、アダプターライゲーションを使用して、Ｙ字型（フォーク型）増幅アダプターを断片にカップリングさせ得る。アダプターは、ＰＣＲ増幅後に両方の元の鎖の同定を可能にする配列を有し得る。図９Ａの操作Ｆに示されるように、断片は、次いで、ＰＣＲを使用して増幅されてもよく、その間、サンプルインデックスが追加されてもよい。次いで、断片を増幅し、配列決定することができる。図９Ａに示されるプロセスフローから、操作Ａ中に存在する実質的に各ｄｓＤＮＡ断片は、最終的に、それにライゲーションされた増幅アダプターを有し得、したがって、増幅及び配列決定され得ることが理解される。状況次第では、所与のサンプル内の実質的に全てのｄｓＤＮＡ断片の配列を得ることが望ましい場合があるが、他の状況では、断片の小さな選択されたサブセット、例えばｃｆＤＮＡの断片のみを配列決定することが望ましい場合がある。

【０４７０】

図９Ａを参照して説明される以前から公知のプロセスフローと比較して、図９Ｂ～９Ｆは、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを使用して増幅アダプターを選択されたポリヌクレオチド断片にライゲーションするための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。操作Ａに示すように、ｄｓＤＮＡライブラリーを断片化することができる。そのような断片化は、例えば、ｃｆＤＮＡの場合、自然に起こり得るか、機械的若しくは酵素的に行われ得るか、又はＲＮＡライブラリーから生成され得る。断片のいくつかは、濃縮及び検出することが所望されるそれぞれの標的配列を含み得るが、他の断片は、そのような配列を必ずしも含まなくてもよい。例えば、図９Ａに示される断片Ｐ５は、標的配列９１０を含むが、他の断片は、他の標的配列を含み得、又はそのような標的配列を含まなくてもよい。

【０４７１】

図９Ａを参照して説明されたものと同様の方法で、得られた複数の断片は、図９Ａの操作Ｂに示すような方法で端部修復を使用して鈍らせることができる不均一な端部を有する

ことができる。次いで、５’末端は、図９Ａの操作Ｃに示されるような方法でリン酸化され得る。次いで、図９Ａの操作Ｄに示すような方法で、Ａテーリングを使用して非鋳型Ａヌクレオチドを３’末端に付加する。次いで、図９Ｃを参照して以下により詳細に記載されるような方法で、Ｙ字型（フォーク状）増幅アダプターは、標的配列９１０を含む断片に選択的にカップリングされ得るが、そのようなアダプターは、図９Ｂの操作Ｅに示されるような方法で、その配列を欠く任意の断片に付加されない。アダプターは、ＰＣＲ増幅後に両方の元の鎖の同定を可能にする配列を有し得る。例えば、アダプターは二本鎖ＵＭＩを含み得る。次いで、図９Ｂの操作Ｆに示すように、アダプターがライゲーションされた断片は、ＰＣＲを使用して増幅されてもよく、その間にサンプルインデックスが追加されてもよいが、アダプターがライゲーションされなかった断片は増幅されない。次いで、増幅された断片は配列決定され得るが、アダプターがライゲーションされなかった断片は配列決定されない。図９Ａに示されるプロセスフローから、実質的に、標的配列９１０を含む操作Ａにおいて存在するポリヌクレオチド断片のみが、最終的にそれにライゲーションされた増幅アダプターを有し得、したがって、増幅及び配列決定され得ることが理解される。したがって、図９Ｂに示されるプロセスフローは、所与のサンプル内の断片のサブセット、例えばｃｆＤＮＡの断片を選択的に配列決定する合理化された様式を提供する。

【０４７２】

図９Ｃは、アダプターが、標的配列９１０を含む断片Ｐ６に選択的にカップリングされ得る方法に関する更なる詳細を概略的に示す。図９Ｃに示されるように、操作Ａにおいて、断片Ｐ６を、リンカー９５３を介して増幅アダプター９５２にカップリングした酵素的に不活性化されたＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　９５１をそれぞれ含む第１及び第２の複合体９５０、９５０’と接触させることができる。例えば、複数の複合体９５０、９５０’を、断片化されたＡテールサンプルｄｓＤＮＡと混合することができる。Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ９５１の各々のｇＲＮＡは、ｄｓＤＮＡのそれぞれの一本鎖内の特定の領域（部分配列）を標的とすることができ、この領域は、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰが、互いにオフセットされ、かつ濃縮することが望まれる二本鎖標的領域９１０の両側にある位置でそれぞれの鎖にハイブリダイズするように互い違いにされ得る。例えば、図９Ｃの操作Ａに示されるような方法で、複合体９５０のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　９５１のｇＲＮＡは、標的配列９１０のフォワード（「ｆｗｄ」）である領域を標的としてもよく、複合体９５０’のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　９５１のｇＲＮＡは、標的配列９１０のリバース（「ｒｅｖ」）である領域を標的としてもよい。したがって、第１及び第２の複合体９５０、９５０’のガイド配列は、順方向及び逆方向において標的配列９１０に「隣接する」と考えられ得る。複合体の対応するＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰニッカーゼが、ｄｓＤＮＡ断片内の特定の配列に隣接する位置でそれぞれの鎖でハイブリダイズするように、任意の適切な数のｇＲＮＡが設計され得ることが理解されるであろう。例えば、複数の異なるｇＲＮＡ（例えば、１０００～１００，０００個のｇＲＮＡ、又は１００，０００個を超えるｇＲＮＡ）を使用して、サンプル内の目的の多くの異なる配列を同時に濃縮することができる。ｇＲＮＡは、必ずしも所与の標的配列９１０に「隣接する」必要はなく、むしろ標的配列当たり少なくとも２つのガイドが所与の断片Ｐ６内の対向する鎖に結合し得ることに留意されたい。ｇＲＮＡ及び対応する複合体は、そのようなｇＲＮＡが標的とする配列を欠く任意の断片に結合しなくてもよい。各断片が各末端にアダプターを受容するために少なくとも２つのＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを使用することは、特異性に役立つと予想されることに留意されたい。

【０４７３】

いくつかの例では、複合体９５０、９５０’のアダプター９５２は、図３Ｄ、図８Ｃ、又は図８Ｄを参照して説明されるものと同様のＹ字型アダプター対であり得るか、又はそれを含み得る。任意選択的に、アダプターは、図９Ｄを参照して説明されるような方法でＵＭＩを含み得る。追加的又は代替的に、アダプターは、断片上の任意のＡテールにハイブリダイズし得る不対Ｔｓを含み得る。これに関して、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　９５１の断片のそれぞれの部分配列への特異的結合は、比較的迅速かつ強力であることが予想

され、したがって、断片のＡテールへのＴ塩基アダプター対合の非特異的結合よりも有利であることに留意されたい。この選択性は、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　９５１をそれぞれの部分配列に高温でハイブリダイズさせることによって高められ得る。更に、複合体９５０、９５０’の濃度を低下させることによって望ましくないバックグラウンドライゲーションを減少させることができ、標準的なライゲーション条件と比較して有意に減少させることができる。例えば、これまでに公知の方法では、アダプターは、通常、テンプレートに対して大過剰（例えば、テンプレートに対して１０～１０００倍）であるが、本実施例では、アダプター９５２は、テンプレートよりも有意に低い濃度（例えば、テンプレートに対して０．００１～０．１倍）で提供され得、その結果、全断片の小部分のみが標的化されるので、低いバックグラウンドを提供する。

【０４７４】

図９Ｃに示される操作Ａから、第１及び第２の複合体９５０、９５０’のｇＲＮＡが所与の断片のそれぞれの部分配列にハイブリダイズする場合、それらの複合体のアダプター９５２は、その断片の末端に近接することが更に理解されるであろう。したがって、図９Ｃの操作Ｂに示すように、複合体及び断片が操作Ｂ中に接触するリガーゼ（具体的には図示せず）を使用して、第１の複合体９５０の増幅アダプター９５２を断片Ｐ６の第１の末端にライゲーションすることができ、第２の複合体９５０’の増幅アダプター９５２を断片Ｐ６の第２の末端にライゲーションすることができる。リガーゼは更に、アダプターと断片の末端との間の結合をシールすることができる。非限定的な一例では、リガーゼは、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼを含み得る。Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　９５１のｇＲＮＡが特異的である部分配列に隣接する標的配列を含む断片Ｐ６のそれぞれの末端へのアダプター９５２のライゲーションに続いて、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　９５１を加熱殺菌して除去するか、又はプロテイナーゼＫ、ＳＤＳ、若しくはプロテアーゼなどの適切な試薬を使用して除去してもよい。任意の残りのリンカー９５３は、アダプター９５２にカップリングしたままであり得、したがって、図９Ｃに示されるような方法で、標的配列９１０を含む断片にカップリングしたままであり得る。次いで、アダプター（単数又は複数）９５２にカップリングした断片は、本明細書中の他の箇所に記載されるような方法で増幅及び配列決定され得る。標的配列９１０を欠く任意の断片は、アダプター９５２にカップリングされなくてもよく、したがって増幅及び配列決定されなくてもよい。したがって、標的配列９１０を含む断片が濃縮される。

【０４７５】

図９Ｃに示された操作は、任意の適切な順序で行われ得ることが理解されるであろう。いくつかの例では、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　９５１は、それぞれの部分配列にハイブリダイズされ、したがって、リガーゼが添加され、それらのアダプターをその断片の末端にライゲーションするために使用される前に行われる別個の操作において、アダプター９５２を対応する断片Ｐ６の末端に近接させる。他の例では、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　９５１は、リガーゼがそれらのアダプターをその断片の末端に比較的迅速にライゲーションし得るように、リガーゼの存在下でそれぞれの部分配列にハイブリダイズする。あるいはそのような例では、ライゲーション操作をＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰハイブリダイゼーション操作から分離するための「スイッチ」として一定期間後にＡＴＰを添加してもよく、その結果、ライゲーションが行われる前に（新たに添加されたＡＴＰによって活性化されるリガーゼの存在下で）ハイブリダイゼーションが実質的に行われる得る（不活性リガーゼの存在下で）。

【０４７６】

追加的又は代替的に、いくつかの例では、標的配列９１０を含む断片は、図８Ａ～８Ｈを参照して説明されたものと同様の方法で、基材に選択的にカップリングされ得る。例えば、ｇＲＮＡ、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　９５１、又はアダプター９５２などの複合体９５０、９５０’の任意の適切な部分は、官能化され得、次いで、そのような官能化を介して基材にカップリングされ得る。例えば、複合体は、タグ又はタグパートナーにカップリングされ得、基材は、複合体を基材にカップリングするように反応するタグパートナー

又はタグにカップリングされ得る。標的配列９１０を含まず、したがって複合体９５０、９５０’に結合しない任意の断片もまた、基材にカップリングせず（例えば、基材においてタグパートナー又はタグと反応するタグ又はタグパートナーを欠いているため）、洗い流され得る。例示的に、タグパートナーはＳＮＡＰタンパク質を含み得、タグはＯ－ベンジルグアニンを含み得る；タグパートナーはＣＬＩＰタンパク質を含み得、タグはＯ－ベンジルシトシンを含み得る；タグパートナーはＳｐｙＴａｇを含み得、タグはＳｐｙＣａｔｃｈｅｒを含み得る；タグパートナーはＳｐｙＣａｔｃｈｅｒを含み得、タグはＳｐｙＴａｇを含み得る；タグパートナーはビオチンを含み得、タグはストレプトアビジンを含み得る；タグパートナーはストレプトアビジンを含み得、タグはビオチンを含み得る；タグパートナーはＮＴＡを含み得、タグはＨｉｓタグを含み得る；タグパートナーはＨｉｓタグを含み得、タグはＮＴＡを含み得る；タグパートナーは、抗体（例えば抗ＦＬＡＧ抗体）を含み得、タグは、抗体が選択的である抗原（例えばＦＬＡＧタグ）を含み得る；タグパートナーは抗原（例えばＦＬＡＧタグ）を含み得、タグは、抗原に対して選択的な抗体（例えば抗ＦＬＡＧ抗体）を含み得る；又はタグパートナーは第１のオリゴヌクレオチドを含み得、タグは、第１のオリゴヌクレオチドに相補的であり、第１のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズする第２のオリゴヌクレオチドを含み得る。タグパートナーは、任意の適切な結合を介して、例えば、共有結合を介して、又は非共有結合を介して基材にカップリングされ得る。同様に、タグはそれぞれ、任意の適切なカップリングを介して、例えば共有結合を介して、又は非共有結合を介して複合体９５０、９５０’にカップリングされ得る。

【０４７７】

複合体９５０、９５０’は、任意の適切な方法で調製され得ることが理解されるであろう。図９Ｂを参照して上述したように、複合体９５０、９５０’は、特定の部分配列を標的とするｇＲＮＡを含み、リンカー９５３を介してアダプター９５２にカップリングされているＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　９５１を含み得る。図９Ｄは、複合体９５０の例示的な構成を概略的に示す。図９Ｄに示される例Ａ及び例Ｂの両方において、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　９５１のＣａｓは、ｇＲＮＡが相補的である配列において標的ポリヌクレオチドを切断しないように操作され得、例えば、ｄＣａｓ９を含み得る。図９Ｄに示される例Ａ及び例Ｂの両方において、Ｙ字型増幅アダプター９５２は、図８Ａ～８Ｈを参照して説明されたものと同様の方法で、リード１（Ａ１４）アダプター及びリード２（Ｂ１５）アダプター並びにＭＥ／ＭＥ’領域を含み得る。任意選択的に、アダプター９５２は、断片のＡテールにハイブリダイズするための不対Ｔを含み得る。あるいはアダプター９５２を平滑末端にライゲーションしてもよい。追加的又は代替的に、アダプター９５２は、図９Ｄに示されるような二本鎖二重鎖ＵＭＩを含み得る。図９Ｄに示される例Ａでは、アダプター９５２は、リンカー９５３、例えば、タンパク質ベースのリンカーを介して、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　９５１のＣａｓタンパク質にコンジュゲートされる。例えば、Ｃａｓタンパク質及びテザー９５３は、本明細書の他の箇所に記載されるような方法で、又はＡｉｒｄ ｅｔ ａｌ．，「Ｉｎｃｒｅａｓｉｎｇ Ｃａｓ－９ ｍｅｄｉａｔｅｄ ｈｏｍｏｌｏｇｙ－ｄｉｒｅｃｔｅｄ ｒｅｐａｉｒ ｅｆｆｉｃｉｅｎｃｙ ｔｈｒｏｕｇｈ ｃｏｖａｌｅｎｔ ｔｅｔｈｅｒｉｎｇ ｏｆ ＤＮＡ ｒｅｐａｉｒ ｔｅｍｐｌａｔｅ」，Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ Ｂｉｏｌｏｇｙ １，５４（２０１８），ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０３８／ｓ４２００３－０１８－００５４－２に記載されるような方法で、共発現され得るか、又は発現後に互いに適切にカップリングされ得る。図９Ｄに示される例Ｂでは、アダプター９５２は、本明細書の他の箇所に記載されるような方法で、リンカー９５３、例えば、オリゴヌクレオチドベースのリンカーを介して、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　９５１のｇＲＮＡにカップリングされる。しかしながら、リンカー９５３は、任意の適切なタンパク質、ポリヌクレオチド、又はポリマー（例えば、ＰＥＧ）を含み得ることが理解されるであろう。

【０４７８】

所望の標的配列９１０を含む断片を濃縮するために、複数の異なる部分配列が使用され

得ることが更に理解されるであろう。例えば、図９Ｅの操作Ａは、複数のｇＲＮＡ（「ガイド」）が、断片Ｐ６の標的配列９１０の上及びその周囲にタイル状に配置されるように設計され得る方法を示す。断片内のそれぞれの部分配列に結合すると、そのようなｇＲＮＡを含む複合体９５０は、図９Ｅの操作Ｂに示されるような方法で、標的配列９１０の一部又は全部にわたってその断片を飽和させ得る。この戦略は、複合体９５０をその配列にカップリングさせる可能性を高め、したがって、それぞれのアダプター９５２をそれらの末端へのライゲーションのためにその断片の末端に十分に近接して配置することによって、ランダムに断片化された及び／又は標的配列９１０内に切断を含み得る断片を濃縮するのに役立ち得、その結果、断片はその後増幅され、配列決定され得る。例えば、リンカー９５３の長さに基づいて、アダプター９５２は、それぞれの複合体のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰがカップリングされる部分配列の規定された数の塩基対内、例えば、約５～３０塩基対、又は約１０～２５塩基対、又は約１５～２０塩基対内にある断片末端にライゲーションされ得る。

【０４７９】

図９Ｆは、二本鎖ポリヌクレオチドの断片を生成する例示的な方法９０００における操作のフローを示す。図９Ｆに示される方法９０００は、第１及び第２の複合体を二本鎖ポリヌクレオチド中の第１及び第２の部分配列にそれぞれハイブリダイズさせること（操作９００１）を含み得る。第１及び第２の複合体の各々は、増幅アダプターにカップリングしたＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）を含み得る。例えば、図９Ｃの操作Ａを参照して説明されるような方法で、複合体９５０、９５０’はそれぞれ、増幅アダプター９５２にカップリングしたＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　９５１を含み得る。非限定的な例では、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰはｄＣａｓ　９を含み得る。

【０４８０】

任意選択的に、各複合体は、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを増幅アダプターにカップリングするリンカー９５３を更に含み得る。いくつかの例では、複合体は、図９Ｄを参照して説明されるような方法で調製されてもよい。例えば、リンカーは、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのＣａｓにカップリングされ得る。又は、例えば、リンカーは、ｇＲＮＡにカップリングされ得る。いくつかの例では、リンカーは、タンパク質、ポリヌクレオチド、又はポリマーを含み得る。いくつかの例では、増幅アダプターはＹ字型である。追加的又は代替的に、増幅アダプターはそれぞれ、固有の分子識別子を含み得る。追加的又は代替的に、方法９０００は、ハイブリダイズの前に二本鎖ポリヌクレオチドをＡテーリングすることを更に含み得、増幅アダプターは、Ａテールとハイブリダイズするための不対Ｔを含む。あるいは増幅アダプターを平滑末端にライゲーションしてもよい。

【０４８１】

複合体９５０、９５０’のｇＲＮＡは、増幅アダプターがそのような末端にライゲーションされ得るポリヌクレオチドのそれぞれの末端に十分に近い位置で、二本鎖ポリヌクレオチドＰ６のそれぞれの鎖上の部分配列に、例えば、隣接する標的配列９１０にハイブリダイズするように選択され得る。いくつかの例では、第１の部分配列は、二本鎖ポリヌクレオチドの第１の鎖に沿った標的配列の３’側であり、第２の部分配列は、二本鎖ポリヌクレオチドの第２の鎖に沿った標的配列の３’側である。

【０４８２】

図９Ｆに示される方法９０００は、ハイブリダイズされた第１及び第２の複合体の増幅アダプターを、二本鎖ポリヌクレオチドの第１及び第２の末端にそれぞれライゲーションすること（操作９００２）を更に含み得る。例えば、図９Ｃの操作Ｂを参照して説明されるような方法で、複合体９５０、９５０’のそれぞれの部分配列へのハイブリダイゼーションは、対応する増幅アダプター９５２を、ポリヌクレオチドのそれぞれの末端に十分に近接させ、そこにライゲーションさせる。ライゲーションは、リガーゼを使用することを含み得る。図９Ｃの操作Ｂを参照して説明されるような方法で、リガーゼは、任意選択的に、ハイブリダイズ中に存在し得る。リガーゼは、ハイブリダイズ中に不活性であっても

よく、ＡＴＰを使用してライゲーションのために活性化されてもよい。あるいはリガーゼは、ハイブリダイズ後に加えてもよい。

【０４８３】

図９Ｆに図示される方法９０００は、例えば、図９Ｃの操作Ｃを参照して説明されるような方法で、二本鎖ポリヌクレオチドから第１及び第２の複合体のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを除去すること（操作９００３）を更に含み得る。複合体がリンカー９５３を含む例では、リンカーは、例えば、図９Ｃを参照して説明されるような方法で、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰが除去されるとき、任意選択的に増幅アダプターにカップリングしたままであってもよい。

【０４８４】

図９Ｆに示される方法９０００は、例えば、本明細書の他の箇所に記載されるような方法で、増幅アダプターがライゲーションされた二本鎖ポリヌクレオチドを配列決定すること（操作９００４）を含み得る。

【０４８５】

５’オーバーハングを有する断片の生成、及びそれへのアダプターのカップリング

いくつかの例では、本明細書で提供される方法及び組成物は、標的化増幅及び／又は標的化配列決定のための長く面倒なワークフローの問題を解決する。本開示から明らかであるように、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰは、標的濃縮方法の一部としてポリヌクレオチドの断片を生成するために使用され得る。増幅アダプターは、本明細書の他の箇所に記載されているような方法で、いくつかの追加の工程を使用して、例えば末端修復、Ａテーリング、及びアダプターライゲーションを使用して付加され得る。ここで図１０Ａ～１０Ｃを参照して説明されるように、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを使用して、５’オーバーハングを有する断片を生成することができ、この断片に、５’オーバーハングも有する増幅アダプターを、比較的少ない単純な工程で容易にライゲーションすることができる。本明細書で提供されるように、断片化による迅速なＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰベースの濃縮と合理化されたアダプター付加との組み合わせは、標的配列決定用途のためのより迅速かつより容易な完全なワークフローを提供する。特に、特定のタイプのＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを使用して、末端修復又はＡテーリングを必要とせずに、アダプターライゲーションの準備ができている断片を生成することができる。

【０４８６】

図１０Ａ及び図１０Ｃは、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを使用して断片を生成し、それにアダプターをカップリングするための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。最初に図１０Ａを参照すると、操作Ａにおいて、ポリヌクレオチドＰ８は、濃縮し、増幅し、配列決定することが望ましい標的配列１０１０を含み得る。例示的に、標的配列１０１０は、約１５０～６００塩基対長、又は本明細書に例示されるような任意の他の長さであり得る。本明細書の他の箇所で提供されるものと同様の方法で、操作Ｂにおいて、ポリヌクレオチドＰ８は、標的配列１０１０に隣接するポリヌクレオチドＰ８中の第１の（「ｆｗｄ」）配列及び第２の（「ｒｅｖ」）配列に特異的にハイブリダイズするガイドＲＮＡ配列を有する第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　１０５１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　１０５１’と接触させられ得る。第１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ１０５１、１０５１’はそれぞれ、ポリヌクレオチドの第１及び第２の配列を切断して、標的配列を間に持つ第１及び第２の末端を有する断片を生成するためのものであり得る。例えば、図１０Ａの操作Ｃに示すように、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　１０５１は、ポリヌクレオチドＰ８中の第１の配列（「ｆｗｄ」）にハイブリダイズしてもよく、第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　１０５１’は、ポリヌクレオチド中の第２の配列（「ｒｅｖ」）にハイブリダイズしてもよい。本明細書の他の箇所に記載されるような方法で、第１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　１０５１、１０５１’は、標的配列１０１０に隣接する位置でポリヌクレオチドＰ８を切断して、標的配列１０１０を含む断片を生成してもよい。任意選択的に、図１０Ｂを参照して説明されるような方法で、操作Ｃにおいて生成される断片の第１の末端は、任意選択的に、少なくとも１つの塩基の第

１の５’オーバーハングを有し得、断片の第２の末端は、任意選択的に、少なくとも１つの塩基の第２の５’オーバーハングを有し得る。すなわち、例えば、図１０Ｂを参照して説明されるような、そのようなオーバーハングを生成する特定のタイプのＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰが任意選択的に使用されてもよい。

【０４８７】

図１０Ａの操作Ｄに示されるように、そして図１０Ｂを参照して以下に記載される方法で、増幅アダプター（例えば、Ｙ字型アダプターにおけるＡ１４配列及びＢ１５配列）は、断片の第１の末端及び第２の末端にライゲーションされ得る。任意選択的に、図１０Ｂを参照して説明されるような方法で、第１の増幅アダプターは、任意選択的に、断片の第１の末端における５’オーバーハングに相補的な５’オーバーハングを有し得、第２の増幅アダプターは、断片の第２の末端における５’オーバーハングに相補的な５’オーバーハングを有し得る。図１０Ａの操作Ｅに示すように、アダプターがカップリングされた断片は、サンプルインデックス（ｉ７及びその相補体）並びに配列決定アダプター（例えば、Ｐ５及びＰ７アダプター並びにその相補体）を付加するように増幅され得る（例えば、ＰＣＲを使用する）。増幅中、各断片は、標的領域の「上部」及び「下部」の鎖が分岐アダプター構造のライゲーションに起因して異なる配向を生成することから、双方向シーケンシングリードで使用するための双方向アンプリコンを生成する。これは、２つのシーケンシングリードが、標的配列１０１０のいずれかの末端から行われ得ることを意味し、追加のカバレッジを提供する。増幅はまた、多重化配列決定における使用のために、更なるクラスター化配列（例えば、Ｐ５、Ｐ７）及びサンプルインデックス配列（例えば、ｉ５、ｉ７）を加える。図１０Ａ～１０Ｂに示されるアダプター配列（例えば、Ａ１４、Ｂ１５、ＭＥ）は、Ｉｌｌｕｍｉｎａ配列決定に使用され得る例であるが、所望に応じて任意の他の適切な配列に切り替えられ得る。次いで、増幅及び配列決定アダプターがカップリングされた、得られた濃縮断片を配列決定して、標的配列１０１０を同定することができる。

【０４８８】

単一のポリヌクレオチドＰ８並びに対応する第１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ１０５１、１０５１’が図１０Ａに示されているが、このアプローチは、例えば、複数の異なるポリヌクレオチドを、第１及び第２の複数のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰと、それらのポリヌクレオチドを有する標的配列に隣接するポリヌクレオチドのうちの選択されたものにおける第１又は第２の配列に特異的にハイブリダイズするそれぞれのガイドＲＮＡ配列と接触させることによって、本明細書の他の箇所に提供されるような方法で容易にスケーリングされ得ることが理解されるであろう。

【０４８９】

図１０Ｂは、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを使用して５’オーバーハングを有する断片を生成し、それにアダプターをカップリングするための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。図１０Ｂの操作Ａで図示される組成物では、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　１０５１は、ポリヌクレオチドＰ８中の第１の配列にハイブリダイズされ、第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　１０５１’は、第１の配列から少なくとも標的配列１０１０だけ離間しているポリヌクレオチド中の第２の配列にハイブリダイズされる。第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰは、第１の鎖上のポリヌクレオチドＰ８を部位１０１１で切断し、部位１０１１から５’方向に少なくとも１塩基、例えば、２～５塩基、又は約５塩基オフセットされた部位１０１２で第２の鎖上のポリヌクレオチドＰ８を切断するように構成及び使用され得る。同様に、第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　１０５１’は、第１の鎖上のポリヌクレオチドＰ８を部位１０１１’で切断し、部位１０１１’から５’方向に少なくとも１塩基、例えば、２～５塩基、又は約５塩基オフセットされた第２の鎖上の部位１０１２’で切断するように構成され、使用され得る。Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　１０５１、１０５１’は、ｄｓＤＮＡ切断後に少なくとも１つの塩基の一本鎖５’オーバーハング領域を残す任意の適切なＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを含み得る。例示的にＣａｓは、Ｃａｓ１２ａ、例えば、Ｃａｓ１２ａ（Ｃｐｆ１又はＣ２ｃ１）若しくはＦｎＣａｓ１２ａ、又はＴｅｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，「Ｅｎｈａｎｃｅｄ　ｍａｍｍａｌｉａｎ　ｇｅｎｏ

ｍｅ ｅｄｉｔｉｎｇ ｂｙ ｎｅｗ Ｃａｓ１２ａ ｏｒｔｈｏｌｏｇｓ ｗｉｔｈ ｏｐｔｉｍｉｚｅｄ ｃｒＲＮＡ ｓｃａｆｆｏｌｄｓ」，Ｇｅｎｏｍｅ Ｂｉｏｌｏｇｙ ２０：１５（２０１９）（その全内容が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているようなＣａｓ１２ａオルソログを含み得る。

【０４９０】

図１０Ｂの操作Ｂに示される組成物において、操作Ａによって生成された断片１０５０の第１の末端は、少なくとも１塩基の第１の５’オーバーハング１０１５を有し得、断片の第２の末端は、少なくとも１塩基の第２の５’オーバーハング１０１６を有し得る。例えば、第１及び第２の５’オーバーハングは各々、約２～５塩基長、例示的には約５塩基長であり得る。オーバーハングは、必ずしもそうである必要はないが、互いに同じ長さであってもよい。断片の第１の末端において、オーバーハング１０１５を含む鎖は５’リン酸基を含み得、他方の鎖は３’ＯＨ基を含み得る。同様に、断片の第２の末端において、オーバーハング１０１６を含む鎖は５’リン酸基を含み得、他方の鎖は３’ＯＨ基を含み得る。第１及び第２の５’オーバーハング１０１５、１０１６は、例えば、第１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ ＲＮＰ １０５１、１０５１’のｇＲＮＡがそれぞれハイブリダイズするポリヌクレオチドＰ８中の特定の配列の結果として、互いに異なる配列を有し得る。

【０４９１】

図１０Ｂの操作Ｃに示される組成物において、断片１０５０は、５’オーバーハング１０１５、１０１６にそれぞれ相補的であるそれぞれの５’オーバーハング１０６５、１０６６を含むアダプター１０６０、１０６０’と接触させられる。５’オーバーハング１０６５、１０６６は、互いに同じ長さを有してもよく、又は互いに異なる長さを有してもよい。図１０Ｂに示される非限定的な例において、「ｆｗｄ」アダプター１０６０の５’オーバーハング１０６５は、断片１０５０の５’オーバーハング１０１５中の複数の塩基に相補的な複数の塩基を含み得るか、又は本質的にそれらからなり得る。５’オーバーハング１０６５は、５’オーバーハング１０１５と同じ長さを有してもよく、例えば、約２～５塩基長であってもよく、例えば、約５塩基長であってもよい。「ｒｅｖ」アダプター１０６０の５’オーバーハング１０６６は、断片１０５０の複数の塩基５’オーバーハング１０１６に相補的な複数の塩基を含み得るか、又は本質的にそれらからなり得る。５’オーバーハング１０６６は、５’オーバーハング１０１６と同じ長さを有してもよく、例えば、約２～５塩基長であってもよく、例えば、約５塩基長であってもよい。アダプター１０６０、１０６０’は、例えば、本明細書の他の場所に記載されるような、任意の他の適切な配列を含み得る。例えば、各アダプター１０６０、１０６０’は、任意選択のＵＭＩを有するＹ字型アダプター対を含み得る。図１０Ｂに示す非限定的な例では、アダプター１０６０、１０６０’は、フォワード増幅アダプター（例えば、Ａ１４、Ａ１４’）、リバース増幅アダプター（例えば、Ｂ１５、Ｂ１５’）を含み、任意選択的にＭＥ／ＭＥ’配列及び／又はＵＭＩ／ＵＭＩ’配列を含み得る。

【０４９２】

断片１０５０の第１及び第２の５’オーバーハング１０１５、１０１６は、互いに異なる配列を有し得るので、アダプター１０６０、１０６０’のオーバーハング１０６５、１０６６も同様に、互いに異なり、それぞれの断片オーバーハング１０１５、１０１６に相補的な配列を有し得る。例えば、増幅アダプター１０６０は、第１の５’オーバーハング１０１５に相補的であり、第２の５’オーバーハング１０１６に相補的でない５’オーバーハング１０６５を有し得、増幅アダプター１０６０’は、第２の５’オーバーハング１０１６に相補的であり、第１の５’オーバーハング１０１５に相補的でない５’オーバーハングを有し得る。したがって、増幅アダプター１０６０は、５’オーバーハング１０１５に特異的にハイブリダイズしてもよく、増幅アダプター１０６０’は、５’オーバーハング１０１６に特異的にハイブリダイズしてもよい。例示的に、５’オーバーハング１０１５は、５’オーバーハング１０６５の５塩基配列ＧＣＴＧＡがハイブリダイズすることができる５塩基配列ＣＧＡＣＴを含み得、５’オーバーハング１０１６は、オーバーハング１０６６の５塩基配列ＡＡＣＧＴがハイブリダイズすることができる５塩基配列ＴＴＧＣＡを含

み得る。これらの５塩基配列は、純粋に例示的であることが意図されることが理解されるであろう。

【０４９３】

アダプター１０６０、１０６０’は、任意の適切な方法で断片１０５０にライゲーションされて、図１０Ｂの操作Ｄに示されるような、アダプターがカップリングされた断片を形成し得る。例えば、図１０Ｂの操作Ｃで示される組成物は、第１の増幅アダプター１０６０を断片１０５０の第１の末端にライゲーションするため、及び第２の増幅アダプター１０６０’を断片１０５０の第２の末端にライゲーションするための少なくとも１つのリガーゼを含み得る。非限定的な一例では、リガーゼは、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼを含み得るが、他の適切なリガーゼが使用され得ることが理解されるであろう。そのようなライゲーションに続いて、図１０Ｂの操作Ｅに示すように、アダプターがカップリングされた断片は、サンプルインデックス（ｉ７及びその相補体）並びに配列決定アダプター（例えば、Ｐ５及びＰ７アダプター並びにその相補体）を付加するように増幅され得る（例えば、ＰＣＲを使用する）。次いで、増幅及び配列決定アダプターがカップリングされた、得られた濃縮断片を配列決定して、標的配列１０１０を同定することができる。

【０４９４】

単一のポリヌクレオチドＰ８、対応する第１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　１０５１、１０５１’、及び対応するアダプター１０６０、１０６０’が図１０Ｂに示されているが、このアプローチは、本明細書の他の箇所で提供されるような方法で容易にスケーリングされ得ることが理解されるであろう。例えば、図１０Ｂを参照して説明された操作Ａは、複数のポリヌクレオチド断片を生成するために使用され得る。図１０Ｂの操作Ｂに示すように、断片の各々は、標的配列を間に持つ第１及び第２の末端を有してもよく、第１の末端は少なくとも１つの塩基の第１の５’オーバーハングを有し、第２の末端は少なくとも１つの塩基の第２の５’オーバーハングを有する。第１及び第２の５’オーバーハングは、互いに、かつ他の断片の第１及び第２の５’オーバーハングとは異なる配列を有し得る。複数の断片は、図１０Ｂの操作Ｃを参照して説明されるような方法で、複数の第１の増幅アダプター及び複数の第２の増幅アダプターと接触させられ得る。第１の増幅アダプターの各々は、対応する断片の第１の５’オーバーハングに相補的であり、その断片の第２の５’オーバーハングに相補的でなく、他の断片の第１又は第２の５’オーバーハングに相補的でない第３の５’オーバーハングを有し得る。第２の増幅アダプターの各々は、対応する断片の第２の５’オーバーハングに相補的であり、その断片の第１の５’オーバーハングに相補的でなく、他の断片の第１又は第２の５’オーバーハングに相補的でない第４の５’オーバーハングを有し得る。増幅アダプターに関する「第３」又は「第４」の５’オーバーハングという用語の使用は、増幅アダプターのいずれかが３つ又は４つの５’オーバーハングを有することを示唆するのではなく、これらのそれぞれのオーバーハングを断片の第１及び第２のオーバーハングから区別するのを助けることを意図している。リガーゼは更に、例えば、図１０Ｂの操作Ｄを参照して説明されるような方法で、第１及び第３の５’オーバーハングが相補的である第１の末端に第１の増幅アダプターをライゲーションするために、並びに第２及び第４の５’オーバーハングが相補的である第２の末端に第２の増幅アダプターをライゲーションするために使用され得る。

【０４９５】

図１０Ｃは、ポリヌクレオチドの断片を生成する例示的な方法１００００における操作のフローを示す。方法１００００は、第１のＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質ガイドＲＮＡリボ核タンパク質（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）をポリヌクレオチド中の第１の配列にハイブリダイズさせること（操作１００００１）を含み得、第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを、第１の配列から少なくとも標的配列だけ離間しているポリヌクレオチド中の第２の配列にハイブリダイズさせること（操作１００００２）を含み得る。例えば、図１０Ａの操作Ｃ及び図１０Ｂの操作Ａを参照して説明されるような方法で、第１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰは、標的配列１０１０に隣接するように選択され得る。操作１００００１及び１００００２は、互いに同時に実行され得ることに留意されたい。方法１００００はまた、

第１及び第２の配列を第１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰで切断して、第１及び第２の末端並びに標的配列を間に持つ断片を生成することを含み得、第１の末端は少なくとも１つの塩基の第１の５’オーバーハングを有し、第２の末端は少なくとも１つの塩基の第２の５’オーバーハングを有する（操作１０００３）。例えば、ＣａｓはＣａｓ１２ａを含み得る。図１０Ｂを参照して説明されるような方法で、相補的５’オーバーハングを有する第１の増幅アダプターは、断片の第１の末端にライゲーションされてもよく、相補的５’オーバーハングを有する第２の増幅アダプターは、断片の第２の末端にライゲーションされてもよい。

【０４９６】

したがって、任意の適切な数のポリヌクレオチド中の標的配列は、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを使用して、目的の標的配列に特異的に隣接し、５’オーバーハングを有する断片を生成し、次いで、断片が選択的に増幅され得るように、相補的な５’オーバーハングを有する増幅アダプターを断片のオーバーハングに特異的にカップリングさせるプロセスによって濃縮され得ることが理解されるであろう。２つの特異性の層（Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを介して、及び増幅アダプター上の相補的５’オーバーハングライゲーションを介して）は、特に高レベルの濃縮を提供することができ、これは、得られた断片を配列決定する場合に有用であり得る。

【０４９７】

アダプター及びポリメラーゼ伸長を含む３’オーバーハングを有する断片の生成

いくつかの例では、本明細書で提供される方法及び組成物は、標的化増幅及び／又は標的化配列決定のための長く面倒なワークフローの問題を解決する。本開示から明らかであるように、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰは、標的濃縮方法の一部としてポリヌクレオチドの断片を生成するために使用され得る。増幅アダプターは、本明細書の他の箇所に記載されているような方法で、いくつかの追加の工程を使用して、例えば末端修復、Ａテーリング、及びアダプターライゲーションを使用して付加され得る。ここで図１１Ａ～１１Ｇを参照して説明されるように、ｇＲＮＡがプライマー結合部位及び増幅アダプター部位を含む修飾ｇＲＮＡを含むＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを使用して、増幅アダプターを含む３’オーバーハングを有する断片を生成してもよい。本明細書で提供されるように、断片化による迅速なＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰベースの濃縮と合理化されたアダプター付加との組み合わせは、標的配列決定用途のためのより迅速かつより容易な完全なワークフローを提供する。特に、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰは、末端修復、Ａ－テーリング、又はアダプターのフルセットのライゲーションを必要とせずに、増幅に必要なアダプターの少なくともサブセットを含む断片を生成するために使用され得る。

【０４９８】

図１１Ａ～１１Ｇは、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを使用して断片を生成し、それにアダプターをカップリングするための例示的な組成物及びプロセスフローにおける操作を概略的に示す。まず図１１Ａを参照すると、操作Ａにおいて、プライマー結合部位１１０１、増幅アダプター部位１１０２、及びＣＲＩＳＰＲプロトスペーサー１１０３を含む少なくとも１つのｇＲＮＡ　１１００が提供される。図１１Ａに示される非限定的な例では、増幅アダプター部位１１０２は、プライマー１１０１とＣＲＩＳＰＲプロトスペーサー１１０３との間に位置する。プライマー結合部位１１０１は、例えば、プライマー結合部位及びＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーが、本明細書でより詳細に記載されるような方法でポリヌクレオチドの相補鎖にハイブリダイズし得るように、ＣＲＩＳＰＲプロトスペーサー１１０３の少なくとも一部におおよそ相補的であり得る。ｇＲＮＡは、任意選択的に、増幅アダプター部位１１０２とＣＲＩＳＰＲプロトスペーサー１１０３との間に位置し得るループ１１０４及び／又は１１０５を含み得る。ループ及びＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーを含む伸長ｇＲＮＡに関する更なる詳細については、その全内容が参照により本明細書に組み込まれるＡｎｚａｌｏｎｅ　ｅｔ　ａｌ．，「Ｓｅａｒｃｈ－ａｎｄ－ｒｅｐｌａｃｅ　ｇｅｎｏｍｅ　ｅｄｉｔｉｎｇ　ｗｉｔｈｏｕｔ　ｄｏｕｂｌｅ－ｓｔｒａｎｄ　ｂｒｅａｋｓ　ｏｒ　ｄｏｎｏｒ　ＤＮＡ」、Ｎａｔｕｒｅ　５７６：１４９－１５７（２

０１９）を参照されたい。
【０４９９】
図１１Ａの操作Ｂに示されるように、操作ＡのｇＲＮＡのＣＲＩＳＰＲプロトスペーサー１１０３は、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　１１５０のＣａｓタンパク質１１５１によって結合され得る。図１１Ａの操作Ｂに示されるような方法で、プライマー結合部位１１０１及び増幅アダプター部位１１０２は、Ｃａｓタンパク質の外側に伸長してもよい。Ｃａｓタンパク質１１５１は、二本鎖ポリヌクレオチド切断を行うように構成されてもよく、例えば、Ｃａｓ９、Ｃａｓ１２ａ、又はＣａｓ１２ｆを含み得る。Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　１１５０は、ポリヌクレオチドＰ９と複合体を形成してもよく、第１のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサー１１０３は、ポリヌクレオチドＰ９の第１の鎖にハイブリダイズしており、第１のプライマー結合部位１１０１は、ポリヌクレオチドの第２の鎖にハイブリダイズしている。第１及び第２の鎖は、第１のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサー１１０３の配列に基づくそれぞれの位置で第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰによって切断され得る。そのような切断は、例えば、ポリヌクレオチドＰ９の第１の鎖への少なくとも第１のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサー１１０３のハイブリダイゼーションの後に行われ得る。いくつかの例では、そのような切断に続いて、第１のプライマー結合部位１１０１は、ポリヌクレオチドＰ９の第２の鎖にハイブリダイズする。
【０５００】
Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　１１５０のｇＲＮＡ　１１００は、本明細書の特定の他の例において使用され得るｇＲＮＡと比較して比較的長い３’伸長を含み、第２のポリヌクレオチド鎖の切断された３’末端に増幅アダプターを付着させるために使用され得るプライマー結合部位１１０１及びアダプター部位１１０２を含むことに留意されたい。より具体的には、図１１Ａの操作Ｃに示されるように、プライマー結合部位１１０１が、Ｃａｓ１１５１によって切断された３’末端付近の第２の鎖の部分１１５５にハイブリダイズする場合、アダプター部位１１０２は、プライマー結合部位１１０１と部分１１５５との間の二本鎖の３’側の位置に配置される。ポリメラーゼ（例えば、逆転写酵素（ＲＴ））は、二本鎖の部分１１５５をプライマーとして使用する操作Ｃに含まれ得、このプライマーから、３’末端がアダプター部位１１０２の配列に基づいて伸長される。したがって、ポリメラーゼは、Ｃａｓタンパク質１１５１によって引き起こされた第２の鎖の切断部においてアダプター部位１１０２のアンプリコン１１５６を生成してもよく、アンプリコンは増幅アダプターとして使用されてもよい。ポリメラーゼ（例えば、ＲＴ）は、任意選択的に、例えば、Ａｎｚａｌｏｎｅ　ｅｔ　ａｌ．に記載されているものと同様の方法で、Ｃａｓタンパク質１１５１にカップリングされてもよい。例えば、ＲＴ及びＣａｓタンパク質１１５１は、第１の融合タンパク質の構成要素であってもよく、又は他の方法で互いに適切にカップリングされてもよい。代替的に、ＲＴは、任意の適切な操作中、例えば、図１１Ａに示される操作Ｂ又は操作Ｃ中に追加され得る。
【０５０１】
操作Ｂでのポリヌクレオチドｐ９の二本鎖切断及び操作Ｃでの増幅アダプター１１５６の生成に続いて、ＲＴ及びＣａｓタンパク質１１５１は、例えば、熱又は任意の他の方法（例えば、プロテイナーゼＫ、プロテアーゼ、又はＳＤＳなどの試薬の使用）を使用してポリヌクレオチドＰ９から解離され得、図１１Ａの操作Ｄに図示される断片１１６０を生じる。断片１１６０は、増幅アダプター１１５６を含むか、又は本質的にそれからなる３’オーバーハングを含み得る。次いで、５’増幅アダプター１１５７を、アダプター１１５６の反対側の断片１１６０の切断５’末端にカップリングさせることができる。例えば、増幅アダプター１１５７は、アダプター１１５６の対応する部分配列に相補的であり、したがってハイブリダイズする部分配列１１５８を含み得る。ハイブリダイズされた増幅アダプター１１５７は、断片１１６０の切断された５’末端に対してＤＮＡリガーゼでシールされ、新たな５’末端を形成し得る。
【０５０２】
図１１Ａは、ポリヌクレオチドが第１の領域で切断され得、増幅アダプターが得られた

切断端に付加され得る方法を詳述するが、ポリヌクレオチドはまた、第２の領域で切断され得、増幅アダプターが得られた切断端に付加され得ることが理解されるべきである。すなわち、切断のセットは、増幅及び配列決定に適切な断片を形成するために使用され得る。断片は標的配列を含み得、切断工程及び増幅工程は、本明細書の他の箇所に記載されるものと同様の方法で標的配列を濃縮し得る。

【０５０３】

例えば、図１１Ｂの操作Ａに示されるように、ポリヌクレオチドＰ９は、図１１Ａを参照して説明されるものと同様に構成された第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　１１５０、及び第２のｇＲＮＡ　１１５０’を含む第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　１１００’と接触させられ得る。第２のｇＲＮＡ　１１００’は、ガイドＲＮＡ　１１００について記載したのと同様に構成された、第２のプライマー結合部位１１０１’、第２の増幅アダプター部位１１０２’、及び第２のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサー１１０３’を含み得る。本明細書の他の箇所に記載されるものと同様の方法で、第１及び第２のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサー１１０３、１１０３’は、標的配列１１１０に隣接する配列を標的化し得る。図１１Ｂに例示されるように、第２のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサー１１０３’は、第１の鎖（すなわち、第１のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサー１１０３がハイブリダイズする鎖と反対の鎖）にハイブリダイズしてもよく、第２のプライマー結合部位１１０１’は、第２の鎖（すなわち、プライマー結合部位１１０１がハイブリダイズする鎖と反対の鎖）にハイブリダイズする。図１１Ａを参照して説明されたものと同様の方法で、第２のＣａｓタンパク質１１５１’は、第２のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサー１１０３’に結合し、任意選択的に、Ｃａｓ９又は二本鎖ポリヌクレオチドに切断部を生成し得る他の適切なＣａｓタンパク質を含み得る。

【０５０４】

図１１Ａを参照して説明されるものと同様の方法で、ポリヌクレオチドＰ９の第１及び第２の鎖は、第１のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサー１１０３の配列に基づいてそれぞれの位置で第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　１１５０によって切断され得、また、第２のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサー１１０３’の配列に基づいてそれぞれの位置で第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　１１５０’によって切断され得る。図１１Ｂの操作Ａから理解され得るように、第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰによる第１及び第２の鎖の切断部は、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰによる第１及び第２の鎖の切断部から少なくとも標的配列１１１０だけ離間している。図１１Ｂの操作Ｂにおいて、図１１Ａの操作Ｃを参照して説明されるような方法で、第１のポリメラーゼ（例えば、ＲＴ）は、第１のＣａｓタンパク質１１５１によって引き起こされる第１の鎖の切断部に増幅アダプター部位１１０２のアンプリコンを作製するために提供されてもよく、第２のポリメラーゼ（例えば、ＲＴ）は、第２のＣａｓタンパク質によって引き起こされる第２の鎖の切断部に増幅アダプター部位１１０２’のアンプリコンを作製するために提供されてもよい。いくつかの例では、第２のポリメラーゼ（例えば、ＲＴ）を第２のＣａｓタンパク質にカップリングさせてもよい。例えば、第２のポリメラーゼ及び第２のＣａｓタンパク質１１５１’は、任意選択的に第２の融合タンパク質の構成要素であってもよい。

【０５０５】

図１１Ｂに示す操作Ｃでは、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　１１５０、１１５０’及びポリメラーゼを除去して、第１及び第２の末端と、第１及び第２の末端の間に位置する標的配列１１１０とを含む部分二本鎖ポリヌクレオチド断片１１７０を得ることができる。第１の末端は、第１の増幅アダプター１１０２（例えば、Ａ１４’及び任意選択のＭＥ’配列又は第１のアダプター部位１１５６に含まれていた他の適切な配列）を含み得る第１の３’オーバーハング１１１５を含み得る。第２の末端は、第２の増幅アダプター１１５６’（例えば、Ａ１４’及び任意選択のＭＥ’配列又は第２のアダプター部位に含まれていた他の適切な配列）を含み得る第２の３’オーバーハング１１１５’を含み得る。図１１Ｂの操作Ｄに示されるように、次いで、５’増幅アダプター１１５７が、アダプター１１５６の反対側で、断片１１７０の切断５’末端にカップリングされ得る。例えば、増幅アダプター

１１５７は、アダプター１１５６の対応するＭＥ’（又は他の）配列に相補的であり、したがってそれにハイブリダイズするＭＥ（又は他の）配列を含み得る。同様に、増幅アダプター１１５７’は、アダプター１１５６’の対応するＭＥ’（又は他の）配列に相補的であり、したがってハイブリダイズするＭＥ（又は他の）配列を含み得る。ハイブリダイズした増幅アダプター１１５７、１１５７’は、断片１１６０の切断された５’末端に対してＤＮＡリガーゼでシールされて、新しい５’末端を形成し得る。

【０５０６】

図１１Ｂの操作Ｅに示すように、アダプター１１５６、１１５７、１１５６’、１１５７’がカップリングされた断片は、サンプルインデックス（ｉ５及びｉ７及びその相補体）並びに配列決定アダプター（例えば、Ｐ５及びＰ７アダプター並びにその相補体）を付加するように増幅され得る（例えば、ＰＣＲを使用する）。増幅中、各断片は、標的領域の「上部」及び「下部」の鎖が分岐アダプター構造のライゲーションに起因して異なる配向を生成することから、双方向シーケンシングリードで使用するための双方向アンプリコンを生成する。これは、２つのシーケンシングリードが、標的配列１１１０のいずれかの末端から行われ得ることを意味し、追加のカバレッジを提供する。増幅はまた、多重化配列決定における使用のために、更なるクラスター化配列（例えば、Ｐ５、Ｐ７）及びサンプルインデックス配列（例えば、ｉ５、ｉ７）を加える。図１１Ｂに示されるアダプター配列（例えば、Ａ１４、Ｂ１５、ＭＥ）は、Ｉｌｌｕｍｉｎａ配列決定に使用され得る例であるが、所望に応じて任意の他の適切な配列に切り替えられ得る。次いで、増幅及び配列決定アダプターがカップリングされた、得られた濃縮断片を配列決定して、標的配列１１１０を同定することができる。

【０５０７】

単一のポリヌクレオチドＰ９並びに対応する第１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ１１５０、１１５０’が図１１Ａ～図１１Ｂに示されているが、このアプローチは、例えば、複数の異なるポリヌクレオチドを、第１及び第２の複数のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰと、それらのポリヌクレオチドを有する標的配列に隣接するポリヌクレオチドのうちの選択されたものにおける第１又は第２の配列に特異的にハイブリダイズするそれぞれのガイドＲＮＡ配列（特にＣＲＩＳＰＲプロトスペーサー）と接触させることによって、本明細書の他の箇所に提供されるような方法で容易にスケーリングされ得ることが理解されるであろう。

【０５０８】

図１１Ｂは、濃縮される断片の両端に増幅アダプターを付加するためのプロセスフローの非限定的な例を示し、他のプロセスフローが適切に使用され得ることが理解されるであろう。図１１Ｃは、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　１１５０が、図１１Ａの操作Ａ及びＢ並びに図１１Ｂの操作Ａを参照して説明されるような方法で、ポリヌクレオチドＰ１０における切断部を生成するために使用される、操作Ａを含む例を示す。図１１Ｃの操作Ｂでは、ポリメラーゼ（例えば、ＲＴ）を使用して、図１１Ａの操作Ｃ及び図１１Ｂの操作Ｂを参照して説明されるような方法で、ｇＲＮＡ　１１００のプライマー結合部位１１０１にハイブリダイズされる鎖の部分をプライマーとして使用し、アダプター部位１１０２を鋳型として使用して、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　１１５０によって切断された３’末端を伸長して、切断された３’末端にカップリングされ、アダプター部位１１０２に相補的な配列を有するアンプリコンを生成する。図１１Ｃの操作Ｃでは、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ及びポリメラーゼが除去され、図１１Ａの操作Ｄ及び図１１Ｂの操作Ｃを参照して説明されるような方法で、３’アダプター（例えば、Ａ１４’及びＭＥ’配列）が露出される。

【０５０９】

図１１Ｃの操作Ｄにおいて、ポリヌクレオチドは、５’アダプターを含むトランスポソーム（例えば、Ｔｎ５又はＴｎ７）と接触されてもよく、トランスポソームは、ポリヌクレオチドを切断し、本明細書の他の箇所に記載されるような方法で、その切断された５’末端にアダプターを付加してもよい。この例では、トランスポソーム活性は非特異的である可能性があり、したがってランダムな位置でポリヌクレオチドをタグ付けする可能性が

あることに留意されたい。この操作は、操作ＡからＣのいずれかと同時に、その前に、又はその後に実行することができる。次いで、トランスポソームは、図１１Ｃの操作Ｅに示されるように除去されてもよく、結果として生じる断片は、５’及び３’アダプター（例えば、Ｂ１５及びＡ１４’）を含む第１の鎖と、増幅アダプターを欠く第２の鎖とを含んでもよいが、この鎖は、タグメンテーション中にトランスポソームによって付加されたＭＥ’配列を含み得る。断片は、図１１Ｃの操作Ｆに示されるように、サンプルインデックス（ｉ５及びｉ７及びその相補体）並びに配列決定アダプター（例えば、Ｐ５及びＰ７アダプター並びにその相補体）を付加するように増幅され得る（例えば、ＰＣＲを使用する）。増幅の間、Ａ１４及びＢ１５を含む断片は指数関数的に増幅する。次いで、増幅及び配列決定アダプターがカップリングされた、得られた濃縮断片を配列決定して、標的配列１１１０を同定することができる。

【０５１０】

図１１Ｄは、図１１Ｃを参照して説明した方法で行うことができる操作Ａ、Ｂ、及びＣも含む代替例を示す。図１１Ｄの操作Ｄにおいて、ポリヌクレオチドは、図４Ａ～４Ｊ又は図６Ａ～６Ｂを参照して説明されるようなＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ／トランスポザーゼ融合タンパク質と接触させられ得る。Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰは、ポリヌクレオチド中の特定の配列にハイブリダイズするが、ポリヌクレオチドを切断しないように不活性化され得る（例えば、ｄＣａｓ９又はＣａｓ１２ｋを含み得る）。融合タンパク質のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰがポリヌクレオチドにハイブリダイズすることに応答して、融合タンパク質のトランスポザーゼは、５’増幅アダプターを含むようにポリヌクレオチドをタグ付けし得る。流体及び／又は生化学的条件は、任意選択的にＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰがポリヌクレオチドにハイブリダイズした後までトランスポザーゼの活性を阻害するように、本明細書の他の箇所に記載されているような方法で制御され得る。この例では、トランスポソーム活性は非特異的であり得るが、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰは配列特異的であり、したがって、操作Ｂ中の切断とは反対側で標的配列に隣接するように選択された位置でポリヌクレオチドをタグ付けし得ることに留意されたい。この操作は、図１１Ｄの操作Ａ～Ｃのいずれかと同時に、その前に、又はその後に実行され得る。次いで、トランスポソームは、図１１Ｄの操作Ｅに示されるように除去されてもよく、結果として生じる断片は、５’及び３’アダプター（例えば、Ｂ１５及びＡ１４’）を含む第１の鎖と、増幅アダプターを欠く第２の鎖とを含んでもよいが、この鎖は、タグメンテーション中にトランスポソームによって付加されたＭＥ’配列を含み得る。断片は、図１１Ｄの操作Ｆに示されるように、サンプルインデックス（ｉ５及びｉ７及びその相補体）並びに配列決定アダプター（例えば、Ｐ５及びＰ７アダプター並びにその相補体）を付加するように増幅され得る（例えば、ＰＣＲを使用する）。増幅の間、Ａ１４及びＢ１５を含む断片は指数関数的に増幅する。次いで、増幅及び配列決定アダプターがカップリングされた、得られた濃縮断片を配列決定して、標的配列１１１０を同定することができる。

【０５１１】

図１１Ｅ及び図１１Ｆはそれぞれ、図１１Ｃ及び図１１Ｄのプロセスフローを使用して生成され得る断片を示す。図１１Ｃに示されるように、非特異的タグメンテーションは、ポリヌクレオチドの長さに沿ってランダムな位置で行われ得、ある範囲の断片サイズ及び標的配列１１１０を含まない断片のサブセットをもたらす。比較すると、図１１Ｄに示されるように、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ／トランスポザーゼ融合タンパク質を使用する特異的タグメンテーションは、標的配列１１１０を含む実質的に均一なサイズの断片を生じ得る。

【０５１２】

上記から、種々の異なる技術を使用して、合理化された方法での増幅及び配列決定における使用に適切なアダプターを有する断片を生成し得ることが理解される。方法１１００００は、方法における工程のフローを示す。方法は、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを、第１鎖及び第２鎖を含むポリヌクレオチドと接触させること（操作１１００１）を含み得る。Ｃａｓ－ｇＲＮＡは、プライマー、増幅アダプター部位、及びＣＲＩＳＰＲプロトスペーサ

ーを含むガイドＲＮＡを含み得る。Ｃａｓ－ｇＲＮＡはまた、ＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーに結合するＣａｓタンパク質を含み得る。方法１１０００はまた、ＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーを第１の鎖にハイブリダイズさせること（操作１１００２）を含み得る。方法１１０００はまた、プライマーを第２の鎖にハイブリダイズさせることを含み得る（操作１１００３）。ｇＲＮＡ、Ｃａｓタンパク質、そのようなＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのポリヌクレオチドとの接触、及びポリヌクレオチドの選択された領域への特定のｇＲＮＡ構成要素のハイブリダイゼーションの非限定的な例は、図１１Ａ～１１Ｄを参照して提供される。

【０５１３】

任意選択的に、方法１１０００は、例えば、図１１Ａ～１１Ｄを参照して説明されるような方法で、ＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーの配列に基づくそれぞれの位置で、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰによって第１及び第２の鎖を切断することを含み得る。任意選択的に、方法１１０００は、例えば、図１１Ａ～１１Ｄを参照して説明されるような方法で、第１の逆転写酵素を使用して、第１のＣａｓタンパク質によって引き起こされた第２の鎖の切断部に増幅アダプター部位のアンプリコンを生成することを更に含み得る。

【０５１４】

任意選択的に、方法１１０００は、ポリヌクレオチドを第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰと接触させることを含み得る。第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰは、第２のプライマー、第２の増幅アダプター部位、及び第２のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーを含む第２のガイドＲＮＡ；並びに第２のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーに結合する第２のＣａｓタンパク質を含み得る。方法１１０００は、第２のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーを第１の鎖にハイブリダイズさせることと、第２のプライマーを第２の鎖にハイブリダイズさせることとを含み得る。第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰは、任意選択的に、第２のＣＲＩＳＰＲプロトスペーサーの配列に基づいて、それぞれの位置で第１及び第２のものを切断し得る。第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰによる第１及び第２の鎖の切断部は、第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰによる第１及び第２の鎖の切断部から少なくとも標的配列だけ離間している可能性がある。第２の逆転写酵素を使用して、第２のＣａｓタンパク質によって引き起こされた第２の鎖の切断部に増幅アダプター部位のアンプリコンを生成してもよい。第１及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ並びに第１及び第２の逆転写酵素は、第１の末端及び第２の末端を有する部分二本鎖ポリヌクレオチド断片を生成することができ、第１の末端は第１の３’オーバーハングを含み、第２の末端は第２の３’オーバーハングを含み、標的配列が、例えば、図１１Ｂを参照して説明されるような方法で、第１の末端と第２の末端との間に位置する。第１の３’オーバーハングは、第１の増幅アダプター部位のアンプリコンを含んでいてもよく、第２の３’オーバーハングは、第２の増幅アダプター部位のアンプリコンを含んでいてもよい。方法１１０００は、例えば、図１１Ｂを参照して説明されるように、第３の増幅アダプターを第１の末端で第５’基にライゲーションすることと、第４の増幅アダプターを第２の末端の５’基にライゲーションすることと、第１、第２、第３、及び第４の増幅アダプターを使用して断片を増幅することと、増幅された断片を配列決定することとを更に含み得る。

【０５１５】

更なる考察

本明細書で提供されるプロセスフローの任意の適切な態様は、互いに任意の適切な組み合わせで実行され得ることが理解されるであろう。例えば、図１Ｋを参照して説明した方法１０００の任意の適切な操作、図２Ｊを参照して説明した方法２０００の任意の適切な操作、図２Ｋを参照して説明した方法２０１０の任意の適切な操作、図３Ｅを参照して説明した方法３０００の任意の適切な操作、図４Ｊを参照して説明した方法４０００の任意の適切な操作、図５Ｋを参照して説明した方法５０００の任意の適切な操作、図６Ａ～６Ｂを参照して説明した任意の適切な操作、図７Ａ～７Ｇを参照して説明した任意の適切な操作、図８Ｈを参照して説明した方法８０００の任意の適切な操作、図９Ｆを参照して説明した方法９０００の任意の適切な操作、図１０Ｃを参照して説明した方法１００００の

任意の適切な操作、及び／又は図１１Ｇを参照して説明した方法１１０００の任意の適切な操作である。純粋に例示的な一例として、方法１０００は、サンプルから１つの種の遺伝物質を実質的に除去するために使用され得、方法２０００、２０１０、３０００、４０００、８０００、９０００、１００００、又は１１０００からの操作は、配列決定のために残りのポリヌクレオチドを調製するために使用され得、方法５０００からの操作は、これらのポリヌクレオチドに対してエピジェネティックアッセイを行うために使用され得る。更に別の純粋に例示的な例として、方法１０００は、サンプルから１つの種の遺伝物質を実質的に除去するために使用されてもよく、方法５０００からの操作は、残りのポリヌクレオチドに対してエピジェネティックアッセイを行うために使用されてもよい。更に別の純粋に例示的な例として、方法２０００、２０１０、３０００、４０００、８０００、９０００、１００００、及び／又は１１０００からの操作を使用して、配列決定のためのポリヌクレオチドを調製することができ、方法５０００からの操作を使用して、それらのポリヌクレオチドに対してエピジェネティックアッセイを行うことができる。エピジェネティックアッセイの結果は、ポリヌクレオチドの配列と比較され得る。

【０５１６】

したがって、本開示は、遺伝子座を標的とするエピジェネティック同定のための方法であって、それに関連するエピジェネティックタンパク質を有するポリヌクレオチドを含む組成物を提供すること；ポリヌクレオチドを、ポリヌクレオチドの別個の第１の標的領域及び第２の標的領域にそれぞれ特異的にハイブリダイズする第１のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰとハイブリダイズさせ、ポリヌクレオチドを切断して、それらの間にハイブリダイズしたポリヌクレオチドの断片を提供すること（第１及び／又は第２のＲＮＰは、それに結合した標識を有する）；並びにハイブリダイズしたポリヌクレオチド断片及びＲＮＰを、標識に結合する捕捉エレメントで精製し、それによって、組成物を、それに関連するエピジェネティックタンパク質を有するポリヌクレオチドについて濃縮すること、を含み得る方法を提供することが理解され得る。

【０５１７】

いくつかの例では、本開示は、ポリヌクレオチドからＲＮＰを除去することを更に提供する。いくつかの例では、本開示は、ポリヌクレオチド及び関連するエピジェネティックタンパク質をアッセイすることを更に提供する。いくつかの例では、本開示は、遺伝子座を標的とする高マルチプレックスプロテオームオリゴ連結抗体アッセイ、及び／又は遺伝子座を標的とするＡＴＡＣ配列決定アッセイ、及び／又はＣｈＩＰ配列決定アッセイを用いて、ポリヌクレオチド及び関連するエピジェネティックタンパク質をアッセイすることを提供する。いくつかの例では、本開示は、エピジェネティックタンパク質の遺伝子座特異的指標を提供する。

【０５１８】

いくつかの例では、本開示は、２つ以上のエピジェネティックタンパク質の遺伝子座特異的同定を提供する。いくつかの例では、本開示は、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ及び第２のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの２対以上のポリヌクレオチドをハイブリダイズさせることを提供し、それらのポリヌクレオチドの異なる第１の標的領域及び第２の標的領域にそれぞれ特異的にハイブリダイズし、ポリヌクレオチドを切断して、それらの間にハイブリダイズしたポリヌクレオチドの複数の断片を提供する。いくつかの例では、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの各対の第１及び／又は第２のＲＮＰは、ハイブリダイズしたポリヌクレオチド断片を精製するためにそれに結合した標識及び標識に結合する捕捉エレメントを有するＲＮＰを有し、それによって、それに関連するエピジェネティックタンパク質を有するポリヌクレオチドのための組成物を濃縮する。

【０５１９】

いくつかの例では、本開示は、同じ染色体上の２つ以上のエピジェネティックタンパク質の遺伝子座特異的同定を提供する。いくつかの例では、本開示は、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの対を、同じゲノムであるが異なる染色体上のポリヌクレオチドにハイブリダイズさせることを提供する。いくつかの例では、本開示は、ゲノム中の２つ以上のエピジェネ

ティックタンパク質についての遺伝子座特異的指標を提供する。
【０５２０】
いくつかの例では、本開示は、ポリヌクレオチド及び関連するエピジェネティックタンパク質を、エピジェネティックタンパク質に対応するオリゴヌクレオチド標識で標識された抗エピジェネティックタンパク質抗体と接触させるステップを含む、遺伝子座を標的とする高マルチプレックスプロテオームオリゴ連結抗体アッセイを用いて、ポリヌクレオチド及び関連するエピジェネティックタンパク質をアッセイするステップを提供する。
【０５２１】
いくつかの例では、本開示は、例えば、図５Ｉ～５Ｊを参照して説明されるように、遺伝子座を標的とするＡＴＡＣ配列アッセイを用いてポリヌクレオチド及び関連するエピジェネティックなタンパクをアッセイすることを提供する。
【０５２２】
これまでに公知のＡＴＡＣ配列決定は、アッセイの単純さ及びクロマチン接近可能性の広範なゲノムワイドな評価に起因して、ＮＧＳベースのエピジェネティック研究が可能である。しかしながら、これまでのＡＴＡＣシーケンシングは、各ＤＮＡ部位に結合したタンパク質を直接同定することも、研究及び臨床マーカーに重要な結合部位及びエピジェネティック変化を深く解明することもできなかった（例えば、液体生検）。これまでに公知のＣｈＩＰ配列決定法は、目的のタンパク質に結合した抗体によって指向されるＴｎ５－プロテインＡタグメンテーションを含む方法を使用して、特定のタンパク質のＤＮＡ結合部位を直接分解する。以前から知られているエピジェネティックアッセイに関する更なる詳細については、例えば、それらの各々の内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、以下の参照文献を参照されたい：Ｋａｙａ－Ｏｋｕｒ ｅｔ ａｌ．，「ＣＵＴ＆Ｔａｇ ｆｏｒ ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ ｅｐｉｇｅｎｏｍｉｃ ｐｒｏｆｉｌｉｎｇ ｏｆ ｓｍａｌｌ ｓａｍｐｌｅｓ ａｎｄ ｓｉｎｇｌｅ ｃｅｌｌｓ」，Ｎａｔ Ｃｏｍｍ １０：１９３０，１－１０（２０１９）；Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，「ＣｏＢＡＴＣＨ ｆｏｒ ｈｉｇｈ－ｔｈｒｏｕｇｈｐｕｔ ｓｉｎｇｌｅ－ｃｅｌｌ ｅｐｉｇｅｎｏｍｉｃ ｐｒｏｆｉｌｉｎｇ」，Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ ７６（１）：２０６－２１６．ｅ７（２０１９）；Ａｉ ｅｔ ａｌ．，「Ｐｒｏｆｉｌｉｎｇ ｃｈｒｏｍａｔｉｎ ｓｔａｔｅｓ ｕｓｉｎｇ ｓｉｎｇｌｅ ｃｅｌｌ ｉｔＣＨＩＰ－ｓｅｑ」，Ｎａｔ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ ２１：１１６４－１１７２（２０１９）；及びＣａｒｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，「Ｍａｐｐｉｎｇ ｈｉｓｔｏｎｅ ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎｓ ｉｎ ｌｏｗ ｃｅｌｌ ｎｕｍｂｅｒ ａｎｄ ｓｉｎｇｌｅ ｃｅｌｌｓ ｕｓｉｎｇ ａｎｔｉｂｏｄｙ－ｇｕｉｄｅｄ ｃｈｒｏｍａｔｉｎ ｔａｇｍｅｎｔａｔｉｏｎ（ＡＣＴ－ｓｅｑ）」，Ｎａｔ Ｃｏｍｍ １０：３７４７，１－５（２０１９）。
【０５２３】
いくつかの例では、本開示は、例えば、図３Ａ～３Ｅを参照して説明されるように、外因性の固有の分子識別子（ＵＭＩ）を有するポリヌクレオチド断片を増強することを提供する。いくつかの例では、本開示は、外因性のＵＭＩを用いた標的配列決定ライブラリーの生成を提供する。いくつかの例では、ＵＭＩは、例えば、図４Ａ～４Ｊを参照して説明されるように、断片末端に多様性を生じさせるために重複するＤＮＡ結合フットプリントを有する複数のＣａｓヌクレアーゼを標的化することによって、ポリヌクレオチド断片の末端に作製される。これに関して、多様な断片末端自体は、断片末端にカップリングされ得る別個のＵＭＩ配列とは区別されるように、ＵＭＩを提供すると考えることができる。多様な断片末端は、Ｃａｓ９媒介性のネガティブ濃縮、ＣＲＩＳＰＲ－ＤＳ、又は他のデュアルＣａｓ９ベースのＣＲＩＳＰＲ標的化ＬＰ法などの任意の適切な配列決定又はアッセイ技術と併せて使用され得ることが理解されるであろう。
【０５２４】
いくつかの例では、本開示は、ゲノムＤＮＡ出発物質から、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ ＲＮＰが結合し、エキソヌクレアーゼ（ＩＩＩ、ＶＩＩ）からポリヌクレオチド領域を切断し、保護する、Ｃａｓ９媒介性のネガティブ濃縮方法を提供する。あるいはｄＣａｓ９を使用

してエキソヌクレアーゼ活性を遮断し、より柔軟な配列標的化を可能にすることができ、標的化領域をエキソヌクレアーゼ活性に曝露しないので、任意のｄＣａｓ９配向が可能である。図４Ａ～４Ｊを参照して説明されるようなＣａｓヌクレアーゼフットプリント重複は、１つのＣａｓヌクレアーゼのみが各断片末端に作用し得ることを確実にし得る。いくつかの例では、本開示は、非ランダムなＵＭＩ　Ｙアダプターを使用する標準的なライゲーションベースのＬＰ（ＥＲ、Ａテール、リグ）を提供する。いくつかの例では、本開示は、標的化ＰＣＲフリーを可能にする全長アダプターの使用を提供する。いくつかの例では、方法はまた、ＵＭＩなしで使用することができ、分子を分解するために非ランダムな固有の断片末端に依存する。方法は、ほとんどのアッセイ適用のための適切な断片末端複雑性を達成するために、より多くのＣａｓ９スタガリングカットを含む。いくつかの例では、本開示は、断片末端座標及びＵＭＩの組み合わせを使用して、分子を一意的に同定することを提供する。

【０５２５】

いくつかの例では、本開示は、例えば、図１Ａ～１Ｊを参照して説明されるような方法で、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓを使用して宿主反復要素を切断し、次いでエキソヌクレアーゼを使用してそれらを分解する、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ媒介ＤＮＡ脱宿主化を提供する。いくつかの例では、本開示は、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのプログラム可能なヌクレアーゼ活性を活用して、典型的にはゲノムポリヌクレオチドの＞５０％を構成し、ヒトゲノム全体に分布している反復要素を標的化することを提供する。いくつかの例では、本開示は、各ヒト染色体を２回以上特異的に切断するために、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰのセット（例えば、１０～１，０００，０００個のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ）を使用することを提供する。いくつかの例では、本開示は、切断されていない非宿主／微生物ＤＮＡ断片を保持しながら、宿主ＤＮＡ断片を選択的に分解するための方法を提供する。

【０５２６】

図１Ａ～１Ｋを参照して説明されるようないくつかの例では、本開示は、（ａ）エキソヌクレアーゼ処理から末端を保護するためにサンプル混合物中のＤＮＡを修飾することと、（ｂ）宿主（例えば、ヒト）反復要素を標的とするＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰでポリヌクレオチドを切断し、保護されていない宿主ＤＮＡ断片末端を露出させることと、（ｃ）１つ以上のエキソヌクレアーゼを適用して、保護されていないＤＮＡ末端を有する宿主ＤＮＡを選択的に分解することとを含む、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ　ＤＮＡ脱宿主化のための方法を提供する。いくつかの例では、操作（ａ）において、直鎖状非宿主ＤＮＡのエキソヌクレアーゼ媒介分解を阻害するために、ＤＮＡサンプルは、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰの前に、以下の方法のうちの１つ以上で前処理される。いくつかの例では、本開示は、ヘアピンアダプター又はエキソヌクレアーゼ活性に耐性の塩基修飾を含むＤＮＡアダプター（例えば、ホスホロチオエート結合又は３’リン酸は、ＥｘｏＩＩＩを含む多くのエキソヌクレアーゼ活性に対する保護を提供する）などを用いて、エキソヌクレアーゼ保護ＤＮＡアダプターをＤＮＡ分子の末端にライゲーションすることによって、直鎖状非宿主ＤＮＡのエキソヌクレアーゼ媒介性分解を阻害することを提供する。いくつかの例では、本開示は、５’リン酸のみでｄｓＤＮＡに５’→３’作用するラムダエキソヌクレアーゼ活性から保護するために、ＤＮＡ断片５’末端を脱リン酸化することによって直鎖状非宿主ＤＮＡのエキソヌクレアーゼ媒介分解を阻害することを提供する。この例では、宿主ＤＮＡ部位でのＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ切断は、ラムダエキソヌクレアーゼ切断のための基材である５’リン酸を曝露する。いくつかの例では、本開示は、エキソヌクレアーゼ保護修飾ヌクレオチドのターミナルトランスフェラーゼ３’付加でヌクレオチドを保護することによって、直鎖状非宿主ＤＮＡのエキソヌクレアーゼ媒介性分解を阻害することを提供する。いくつかの例では、Ｔａｑ　ＤＮＡポリメラーゼは、ホスホロチオエート結合ヌクレオチドを組み込むｄｓＤＮＡに非鋳型ヌクレオチドを付加するために使用される。

【０５２７】

いくつかの例では、本開示は、Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰヌクレアーゼを使用してＤＮＡを正確な位置で切断し、例えば、図２Ａ～２Ｋを参照して説明されるように、ＤＮＡ断

片化の長さ及び均一性を制御することを含む、その後の遺伝子座標的エピジェネティック同定などのために、ゲノムＤＮＡを均一に断片化する方法を提供する。方法は、二重鎖配列決定（ＤＳ）を使用して固有の分子を分解することを含むことができ、本明細書では全ゲノムＤＮＡ分析に使用することができる。二重ｓｇＲＮＡプールは、メタゲノム／混合サンプルに適用される場合、宿主ＤＮＡ枯渇のために使用することができる。例えば、その全内容が参照により本明細書に組み込まれるＣｒａｗｆｏｒｄ　ｅｔ　ａｌ．，「Ｄｅｐｌｅｔｉｏｎ　ｏｆ　ａｂｕｎｄａｎｔ　ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｂｙ　ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ（ＤＡＳＨ）：ｕｓｉｎｇ　Ｃａｓ９　ｔｏ　ｒｅｍｏｖｅ　ｕｎｗａｎｔｅｄ　ｈｉｇｈ－ａｂｕｎｄａｎｃｅ　ｓｐｅｃｉｅｓ　ｉｎ　ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ　ｌｉｂｒａｒｉｅｓ　ａｎｄ　ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ｃｏｕｎｔｉｎｇ　ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ」，Ｇｅｎｏｍｅ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　１７：４１，１－１３（２０１６）に記載されているように、ビオチン化／タグ化Ｃａｓ９を有するレガシーリボソーム－スタイルプルダウン－ロードｓｇＲＮＡプール、又はライブラリー調製後の宿主ライブラリー分子の低インプット適合性「ＤＡＳＨ」型枯渇Ｃａｓ９切断が使用されてもよい。

【０５２８】

ライブラリー調製後の宿主ライブラリー分子のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ切断によるサイズ制御された全ゲノム断片化のための例示的な方法は、図２Ａ～２Ｋを参照して説明される。複数のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ消化に基づく標的化ゲノム断片化アプローチは、同様の長さのＤＮＡ断片を生成する。これらの断片は、単純なサイズ選択によって濃縮することができ、標的濃縮をもたらす。更に、均一な長さの断片は、ＰＣＲ増幅バイアスを有意に減少させ得、リード有用性を高め得る。本開示は、配列決定エラーを補正するために二本鎖分子タグ付けを使用する、二重鎖配列決定による標的濃縮を提供する。ＣＲＩＳＰＲ－ＤＳ技術は、小さなゲノム領域の効率的な標的濃縮、均一なカバレッジ、超精密配列決定、及び低減されたＤＮＡインプットを可能にする。いくつかの例では、本開示は、複数のＣａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰを標的化領域に標的化することによってＤＮＡ断片末端多様性を生成するためのＵＭＩアプローチに関連して、このＣＲＩＳＰＲ－ＤＳ標的化アプローチを利用して、所与の数のＵＭＩを用いて分解可能なライブラリー複雑性を増加させ、個々のＣａｓ切断部位のシーケンシングカバレッジを増加させることができることを提供する。

【０５２９】

Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ切断は、主に平滑末端を生じるが、小さなオーバーハングも生じることが知られている。ライブラリー調製の末端修復操作中のエキソヌクレアーゼ活性は、切断部位／その付近の配列情報の喪失をもたらし得る。いくつかの例では、例えば図３Ａ～３Ｅを参照して説明されるような方法で、複数のガイドＲＮＡを用いて標的における切断部位をスタガリングすることは、局所的なカバレッジ損失を減少させ得る。Ｃａｓ－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ標的化の高い配列特異性のために、切断部位又はその付近の塩基の同一性は、確実に推論可能であることに留意されたい。

【０５３０】

いくつかの例では、本明細書で提供される方法は、標的ポリヌクレオチド及びトランスポゾン末端組成物が転位反応を受けて混合物を生成する条件下で、少なくとも１つのトランスポザーゼ及びオリゴヌクレオチドを含む少なくとも１つのトランスポゾン末端組成物を標的ポリヌクレオチドを含むサンプルに適用することを含み、標的ポリヌクレオチドは断片化されて複数の標的ポリヌクレオチド断片を生成し、したがってオリゴヌクレオチド配列を複数の標的ポリヌクレオチド断片の各々に組み込む。

【０５３１】

更なるコメント

本開示の実施は、別段の指示がない限り、分子生物学（組換え技術を含む）、微生物学、細胞生物学、生化学及び免疫学の従来の技術を使用することができ、これらは当業者の技術の範囲内である。そのような技術は、例えば、以下の文献に十分に説明されている：Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，２ⁿ

d ed.（Sambrook et al.，1989）；Oligonucleotide Synthesis（M.J.Gait，ed.，1984）；Animal Cell Culture（R.I.Freshney，ed.，1987）；Methods in Enzymology（Academic Press，Inc.）；Current Protocols in Molecular Biology（F.M.Ausubel et al.，eds.，1987、及び定期的な更新）；PCR：ポリメラーゼ連鎖反応（Mullis et al.，eds.，1994）；Remington，The Science and Practice of Pharmacy，20th ed.，（Lippincott，Williams & Wilkins 2003）、並びにRemington，The Science and Practice of Pharmacy，22th ed.，（Pharmaceutical Press and Philadelphia College of Pharmacy at University of the Sciences 2012）。

【0532】

本明細書に記載されている全ての特許及び刊行物は、それぞれの独立した特許及び刊行物が参照により組み込まれることが具体的かつ個別に示された場合と同程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

【0533】

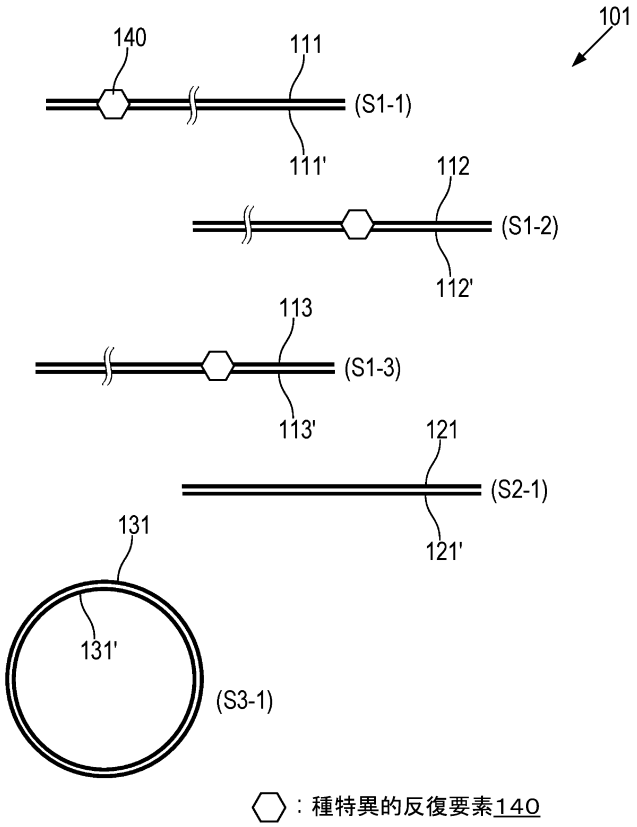
様々な例示的な例が上に記載されているが、様々な変更及び改変が、本発明から逸脱することなく、本明細書において行われ得ることは、当業者に明白であろう。添付の特許請求の範囲は、本発明の真の趣旨及び範囲内に収まる、このような変更及び改変の全てを包含することが意図される。

【0534】

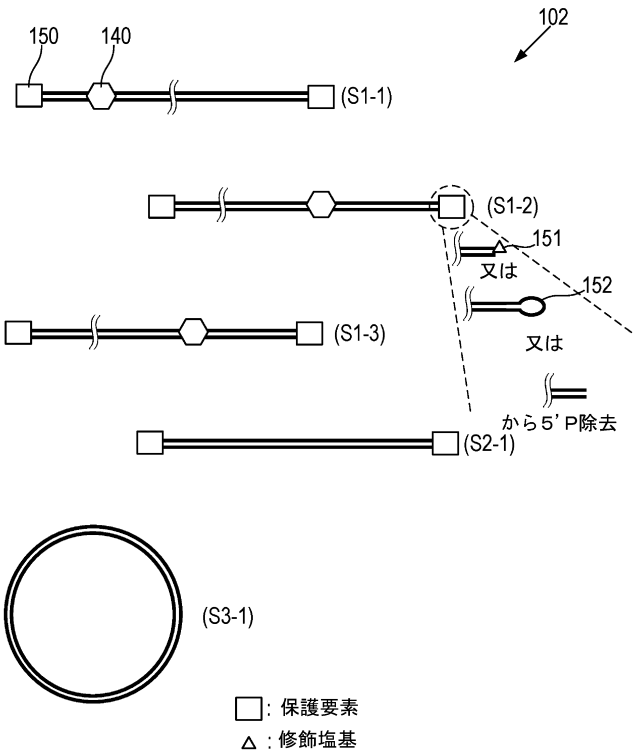
本明細書に記載されている利益を実現するため、本明細書に記載されている本開示の態様の各々の任意のそれぞれの特徴／例は、任意の適切な組み合わせで一緒に実施されてもよいこと、及びこれらの態様のいずれか１つ以上からの任意の特徴／例は、任意の適切な組み合わせで、本明細書に記載されている他の態様の特徴のいずれかと一緒に実施されてもよいことを理解すべきである。

【図面】

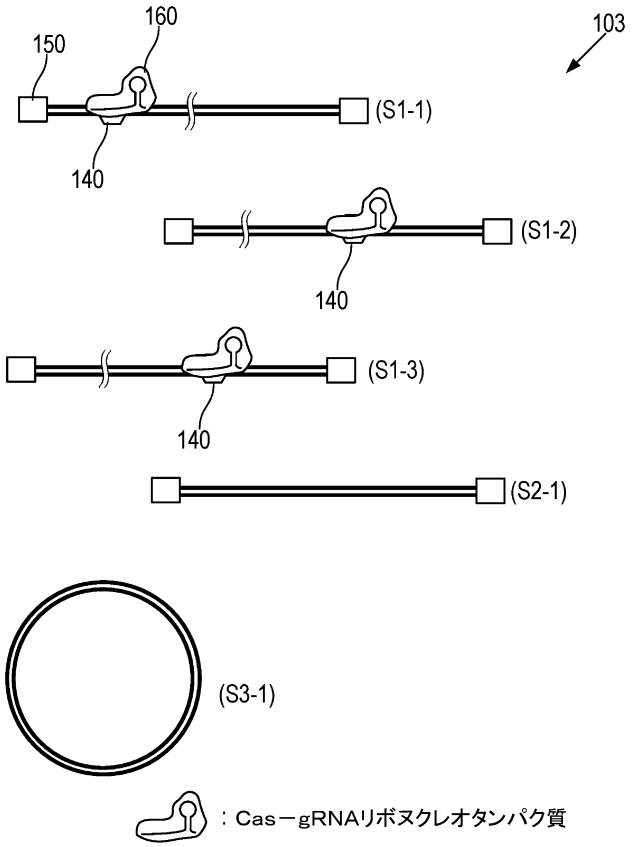
【図１Ａ】



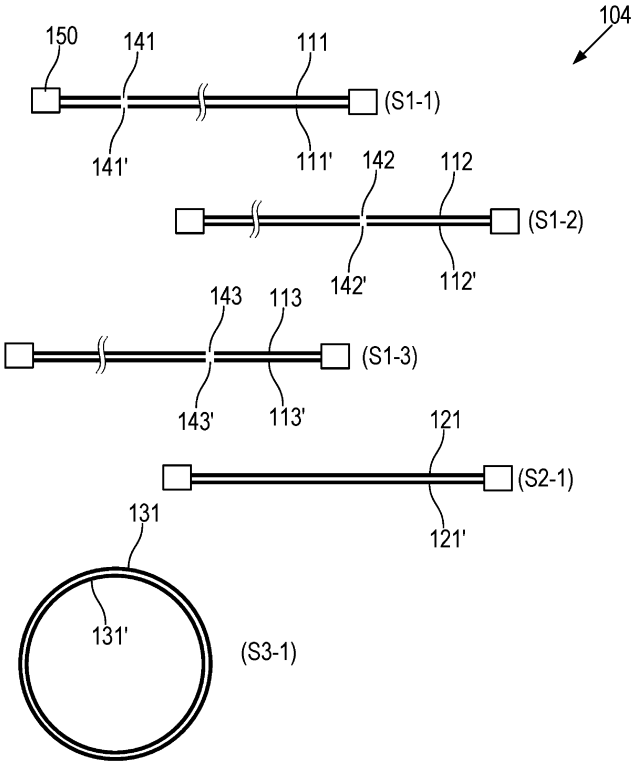
【図１Ｂ】



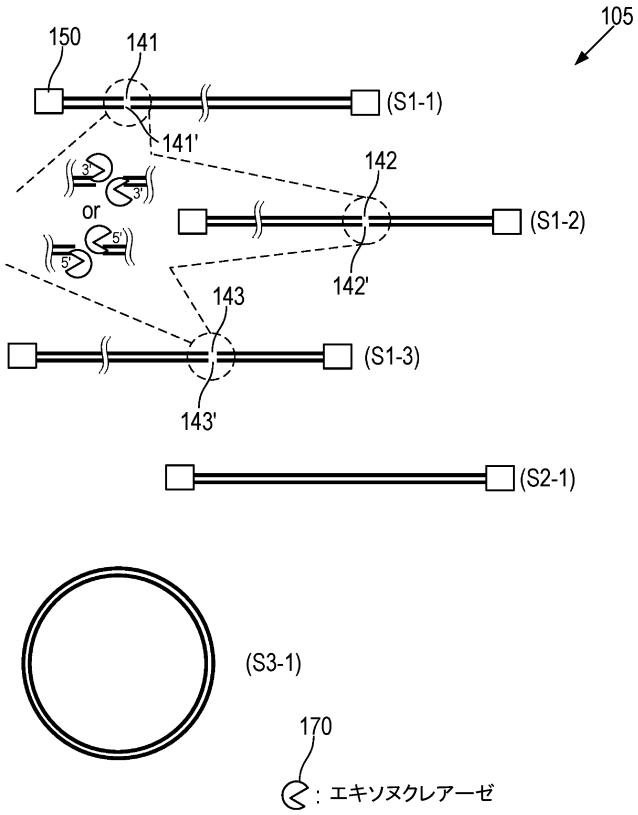
【図１Ｃ】



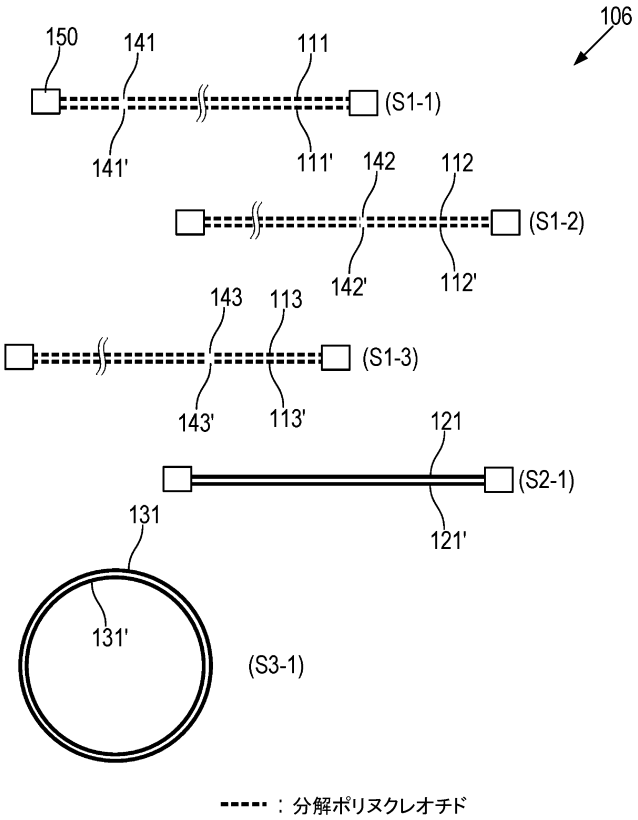
【図１Ｄ】



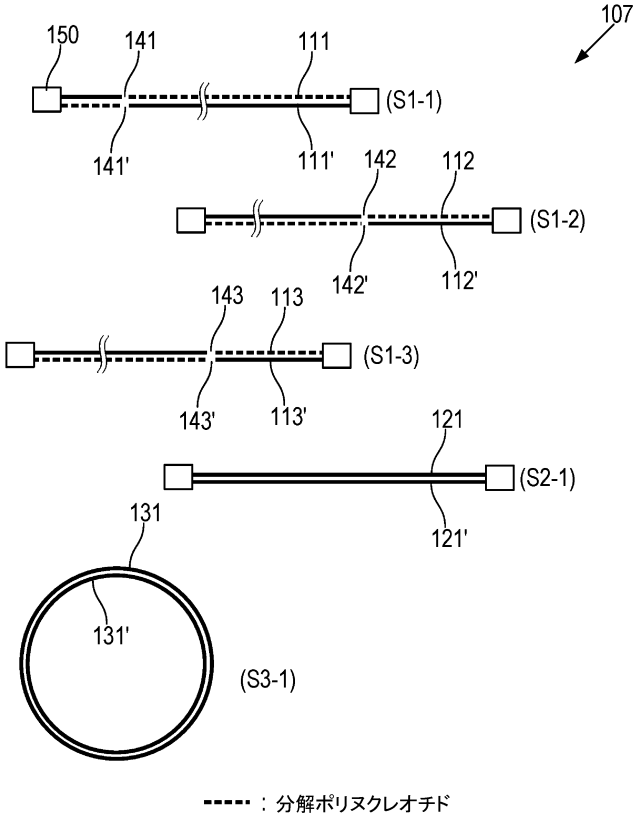
【図１Ｅ】



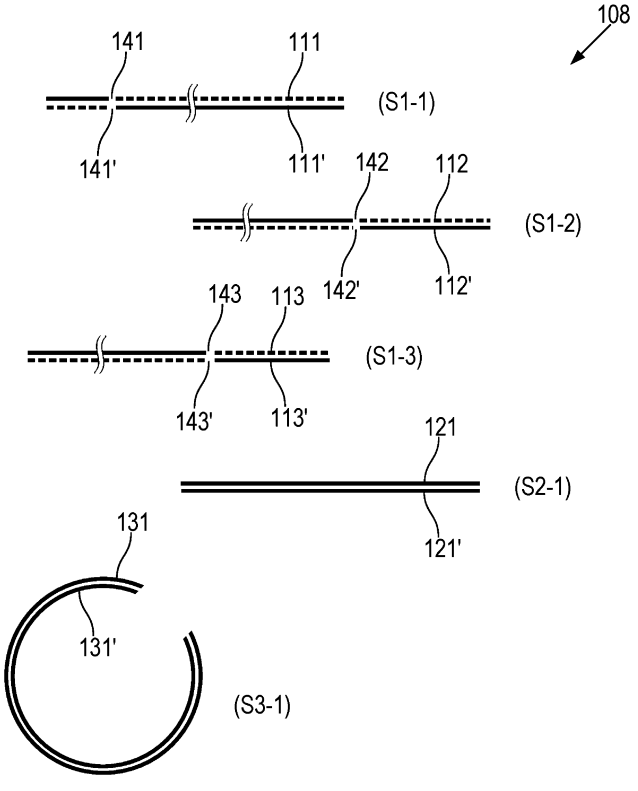
【図１Ｆ】



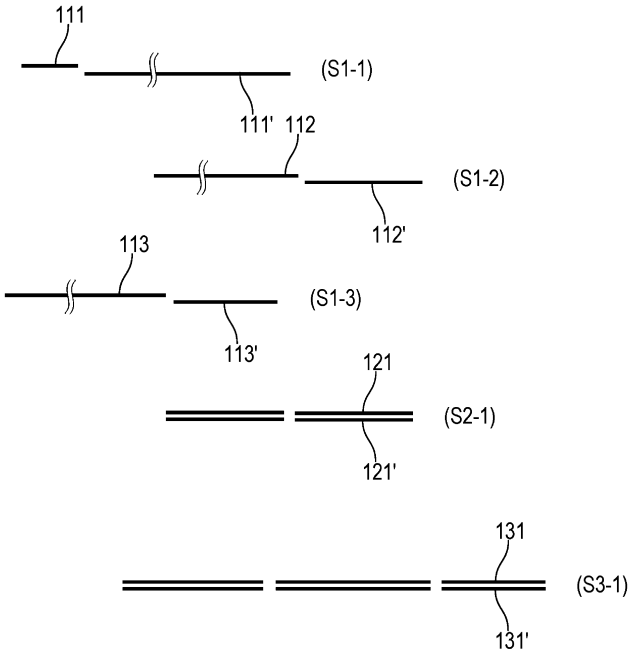
【図１Ｇ】



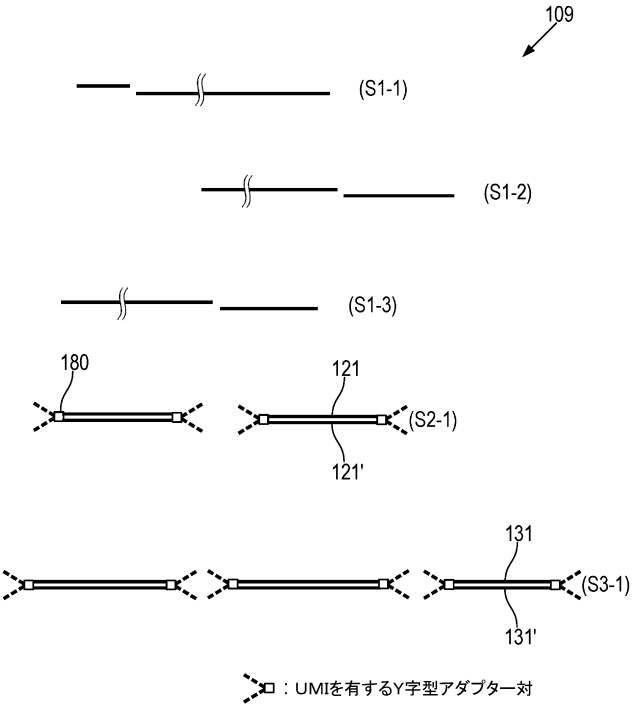
【図１Ｈ】



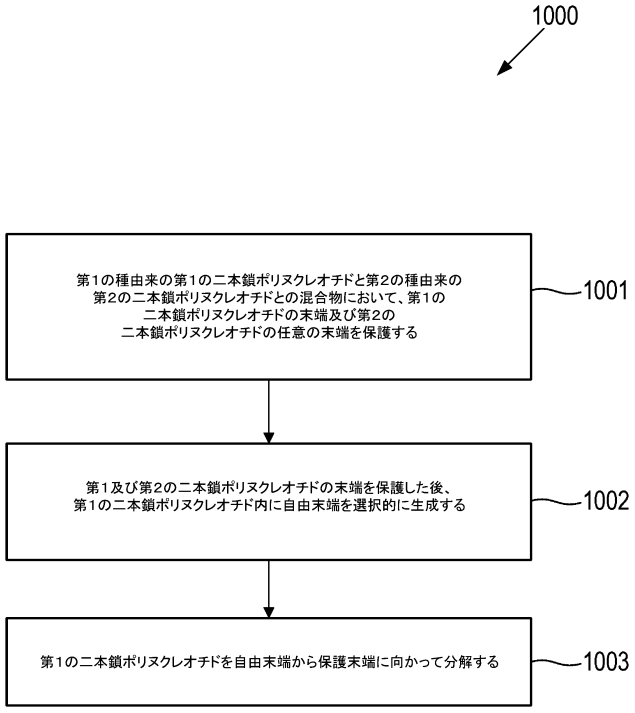
【図１Ｉ】



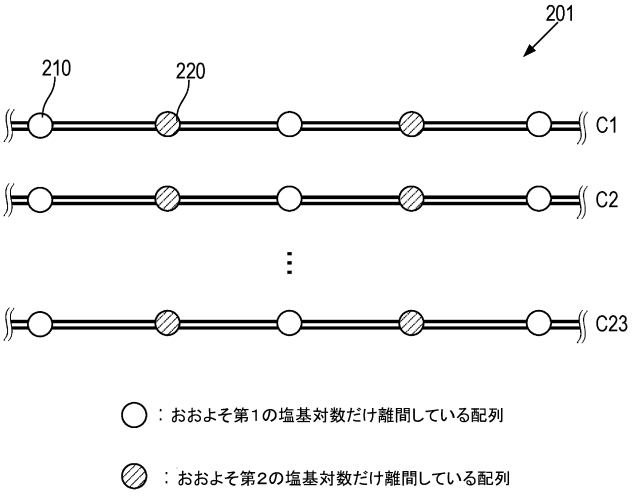
【図１Ｊ】



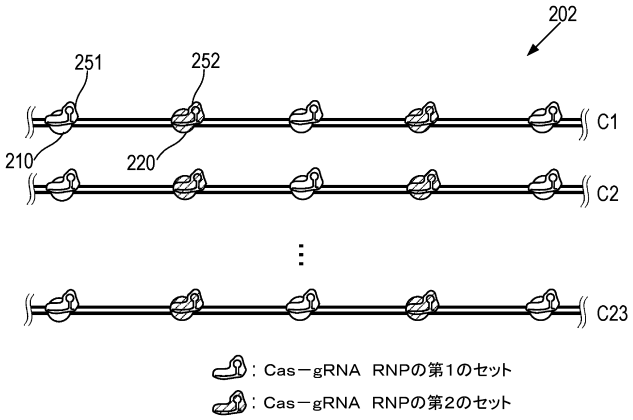
【図１Ｋ】



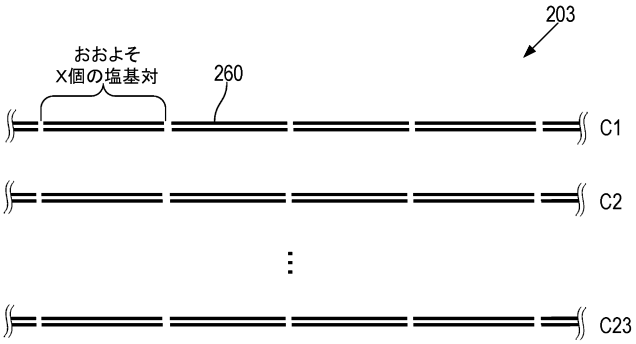
【図２Ａ】



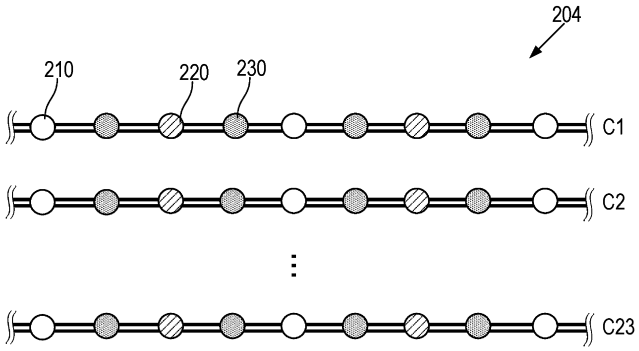
【図２Ｂ】



【図２Ｃ】



【図２Ｄ】

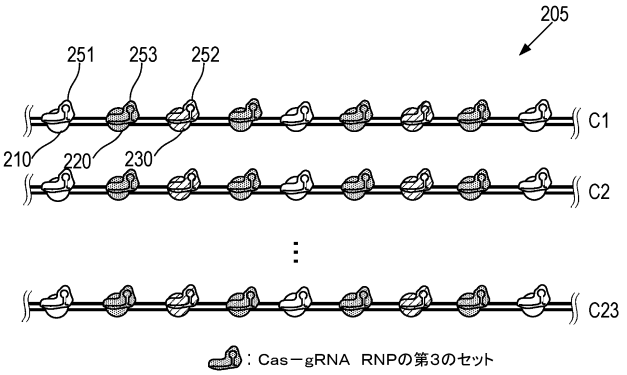


：おおよそ第1の塩基対数だけ離間している配列

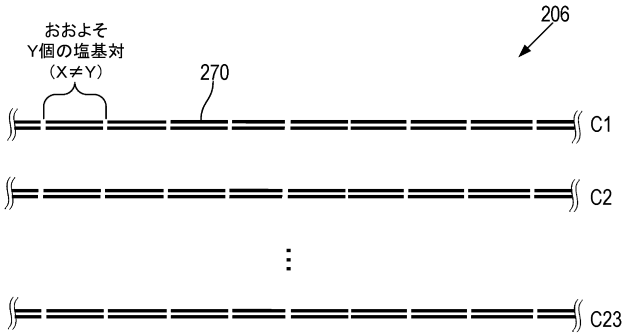
：おおよそ第2の塩基対数だけ離間している配列

：おおよそ第3の塩基対数だけ離間している配列

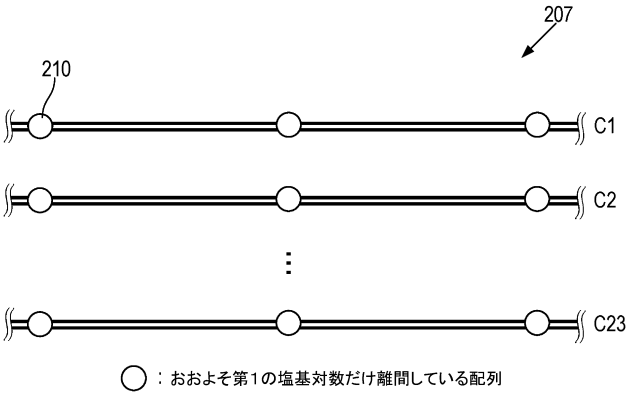
【図２Ｅ】



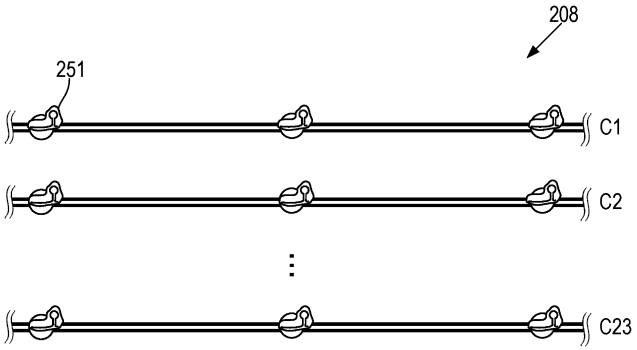
【図２Ｆ】



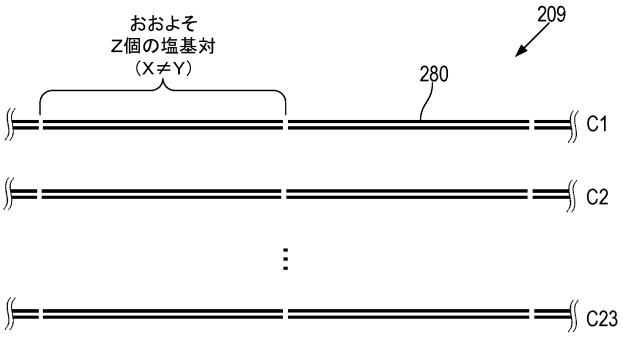
【図２Ｇ】



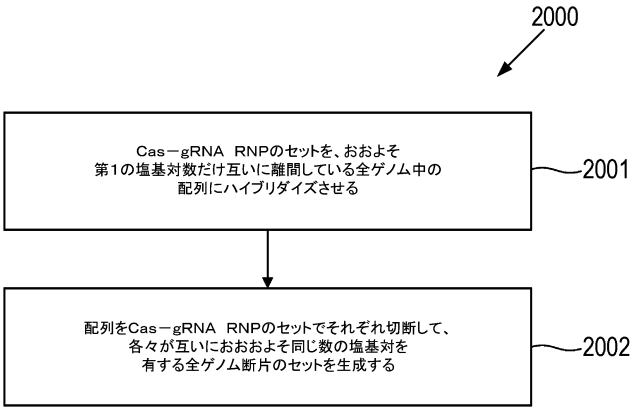
【図２Ｈ】



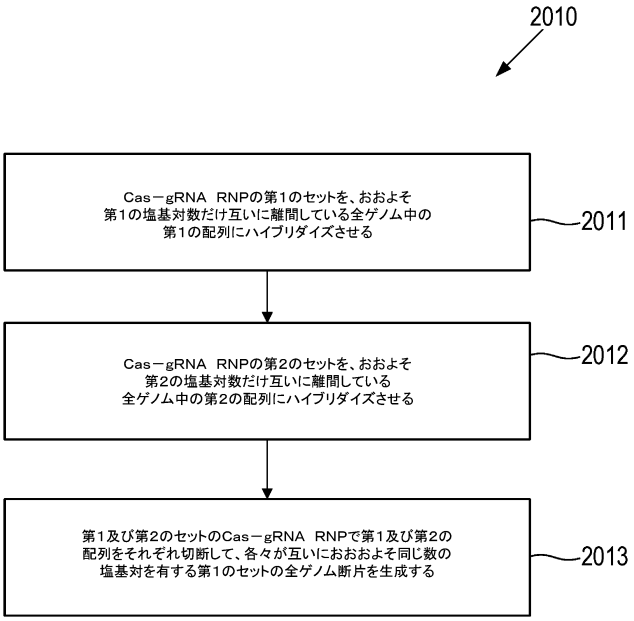
【図２Ｉ】



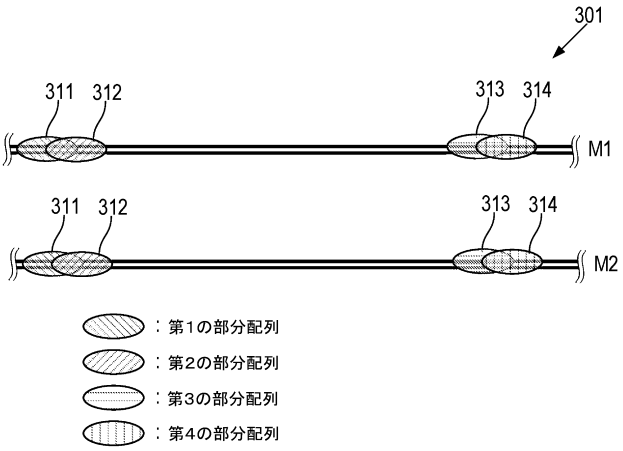
【図２Ｊ】



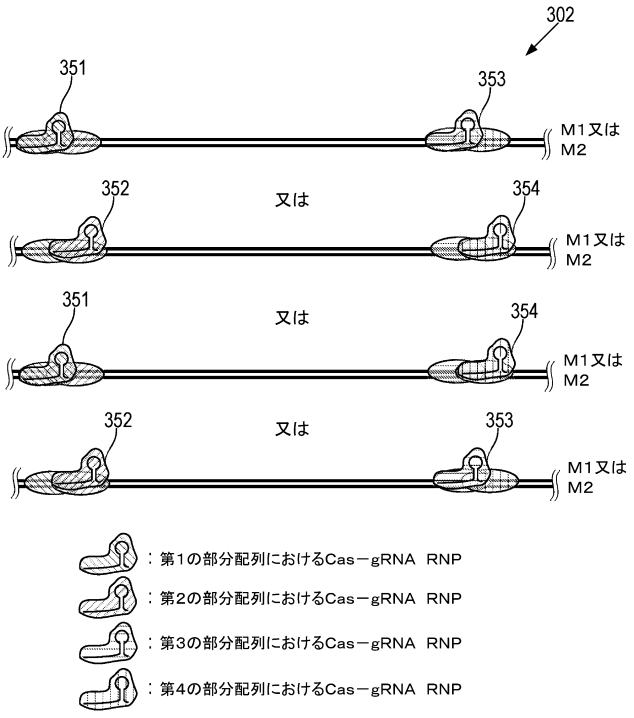
【図２Ｋ】



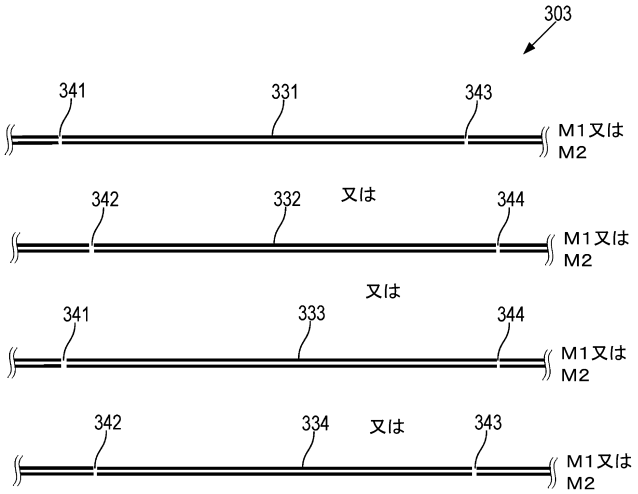
【図３Ａ】



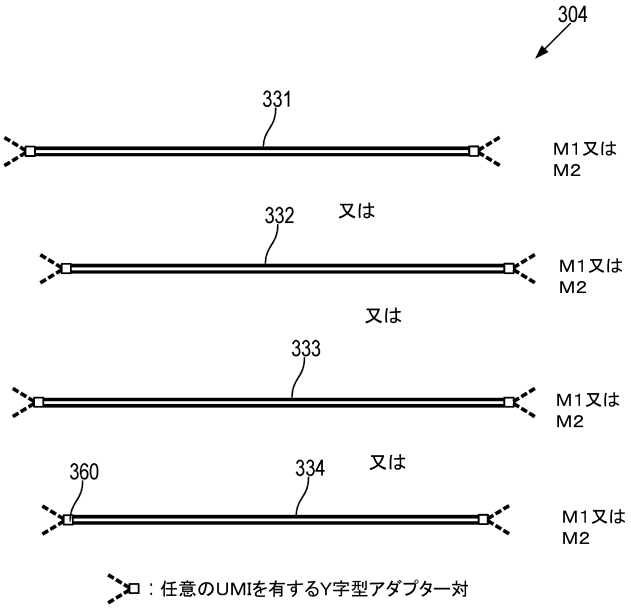
【図３Ｂ】



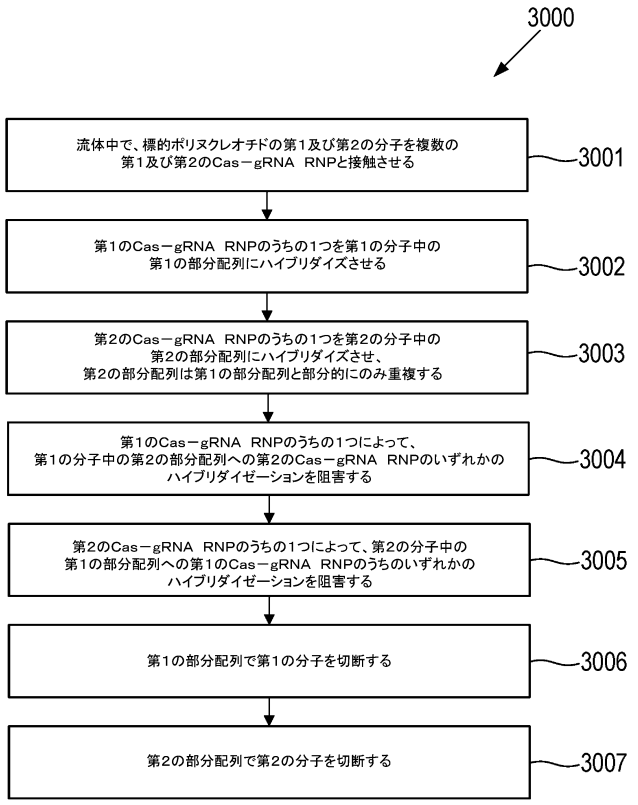
【図３Ｃ】



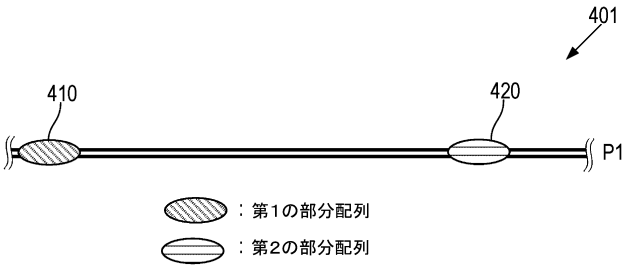
【図３Ｄ】



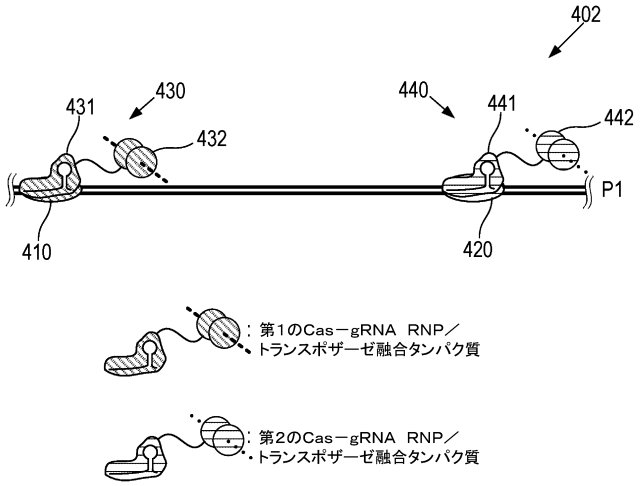
【図３Ｅ】



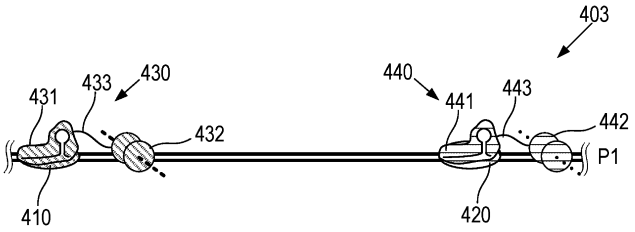
【図４Ａ】



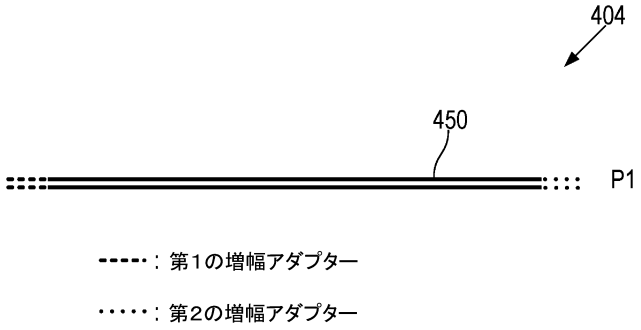
【図４Ｂ】



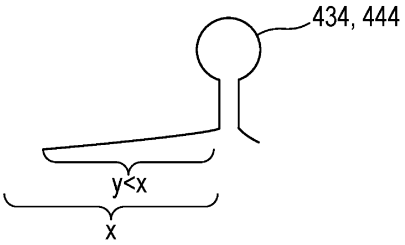
【図４Ｃ】



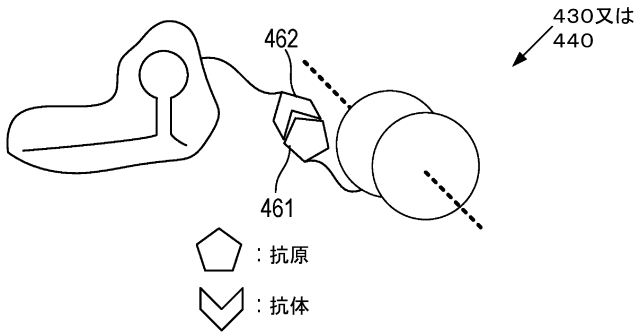
【図４Ｄ】



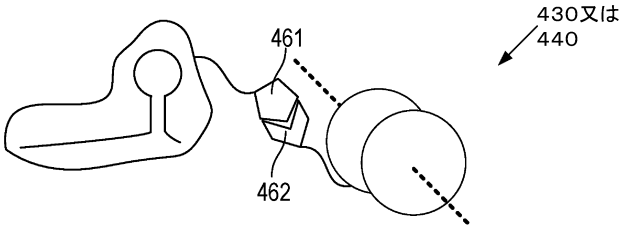
【図４Ｅ】



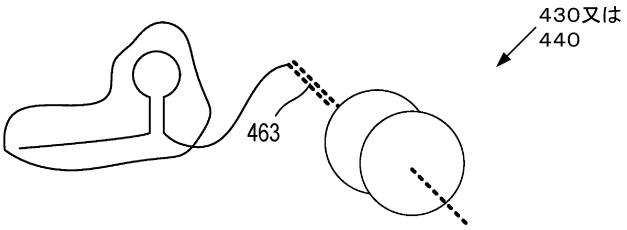
【図４Ｆ】



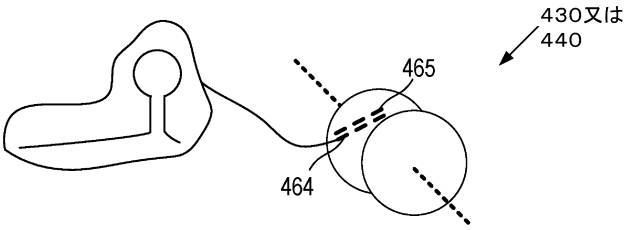
【図４Ｇ】



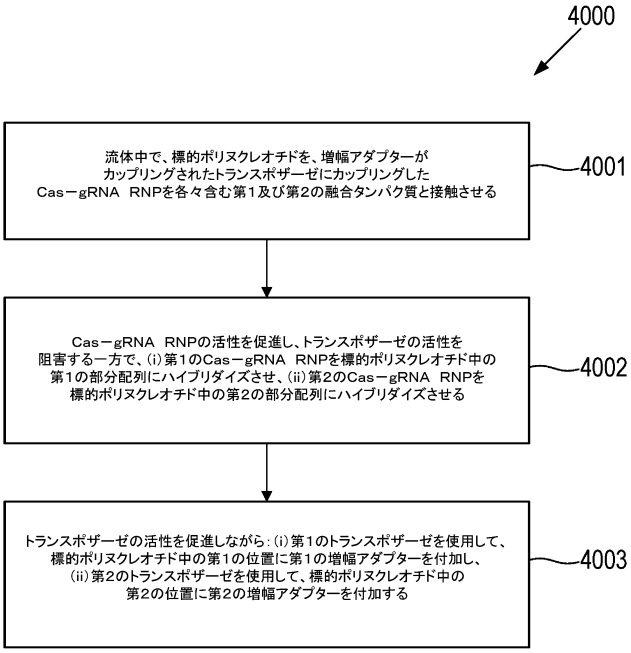
【図４Ｈ】



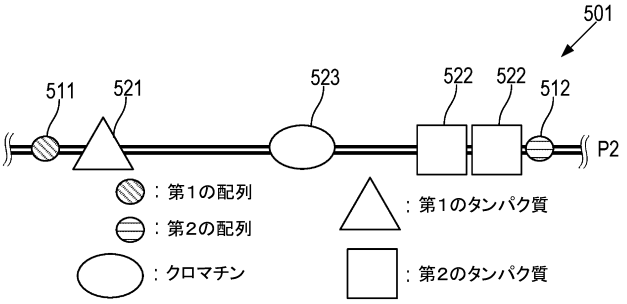
【図４Ｉ】



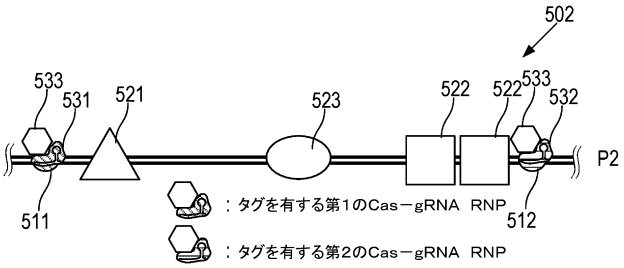
【図４Ｊ】



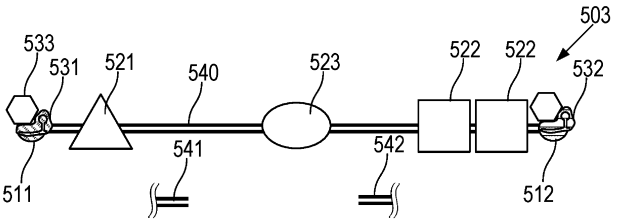
【図５Ａ】



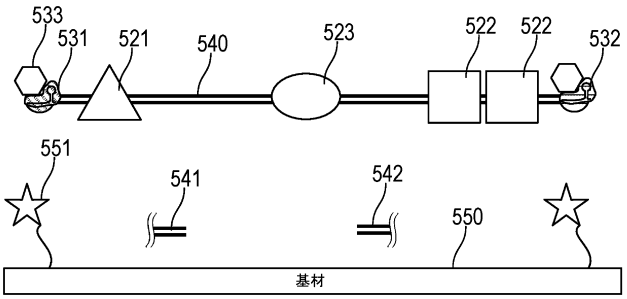
【図５Ｂ】



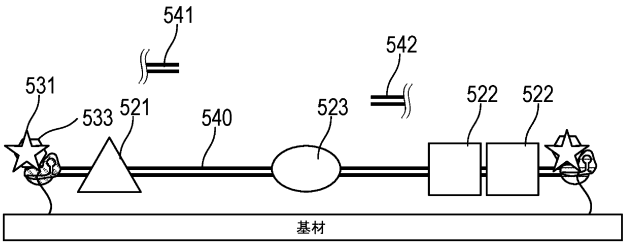
【図５Ｃ】



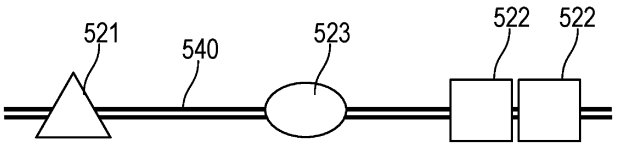
【図５Ｄ】



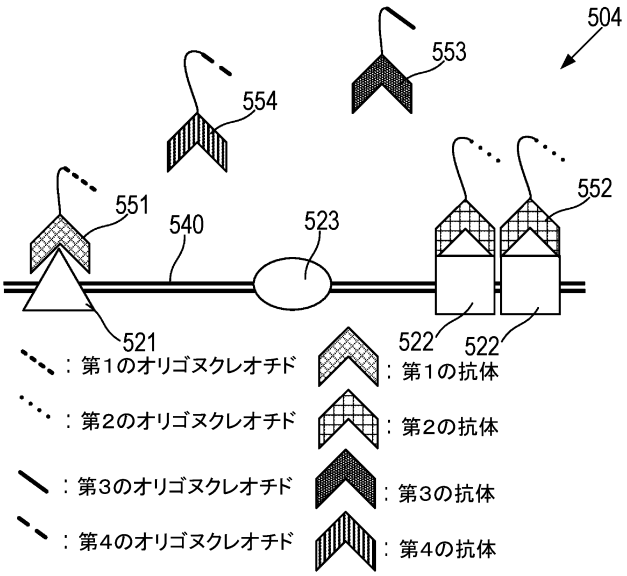
【図５Ｅ】



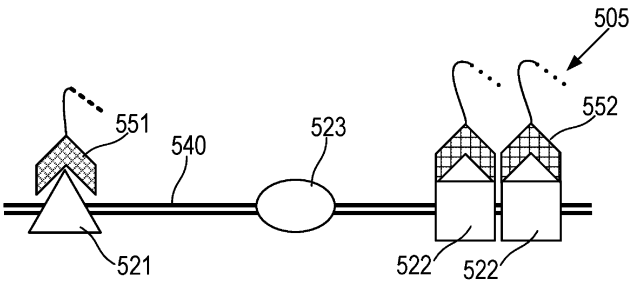
【図５Ｆ】



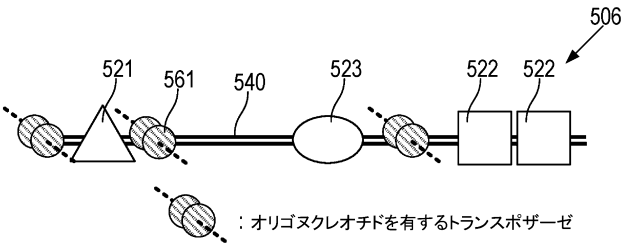
【図５Ｇ】



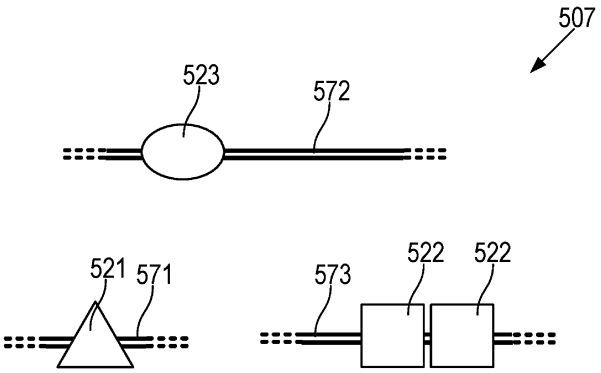
【図５Ｈ】



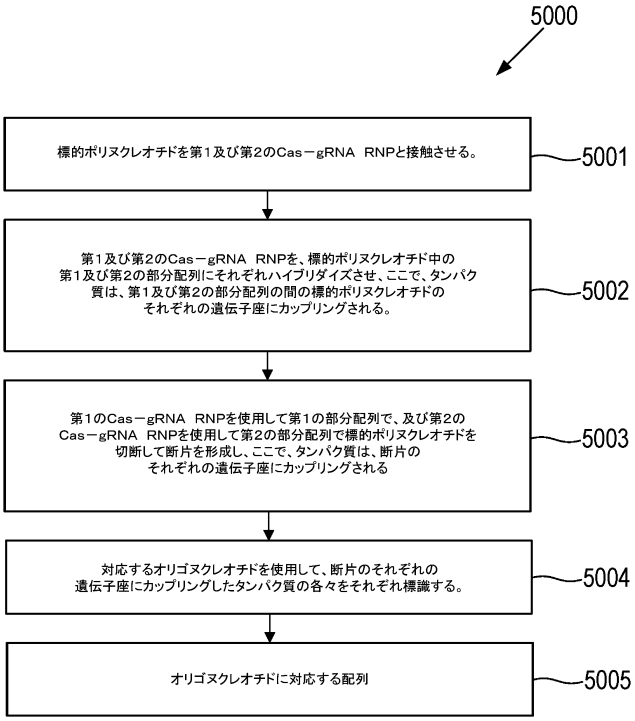
【図５Ｉ】



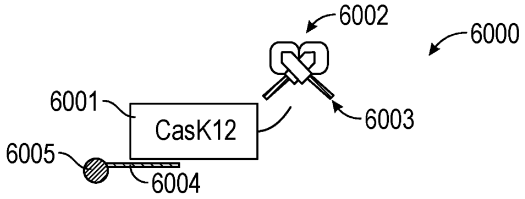
【図５Ｊ】



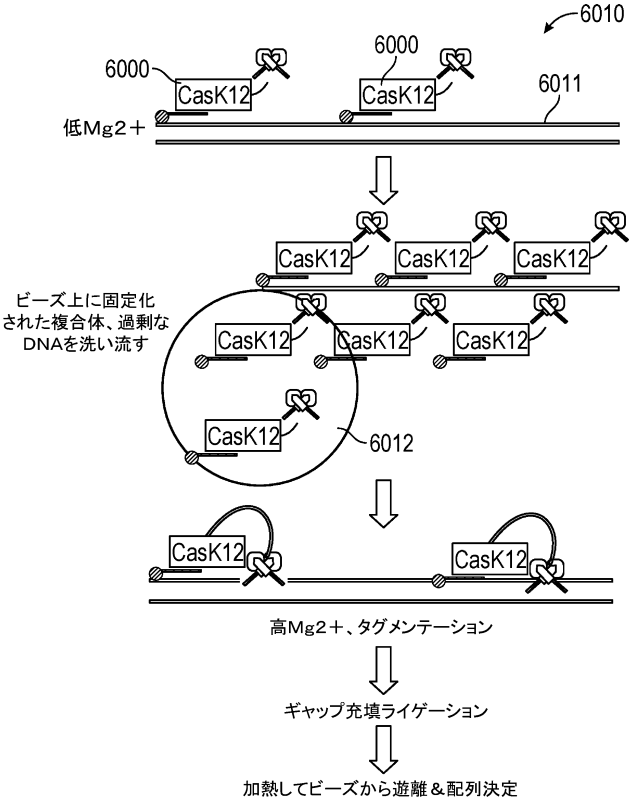
【図５Ｋ】



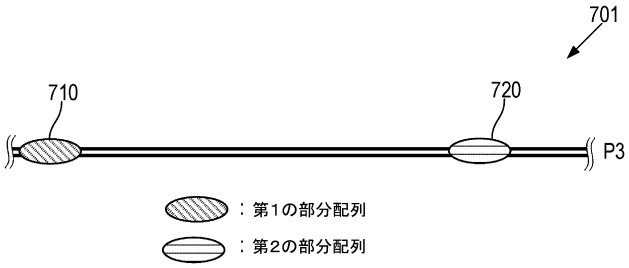
【図６Ａ】



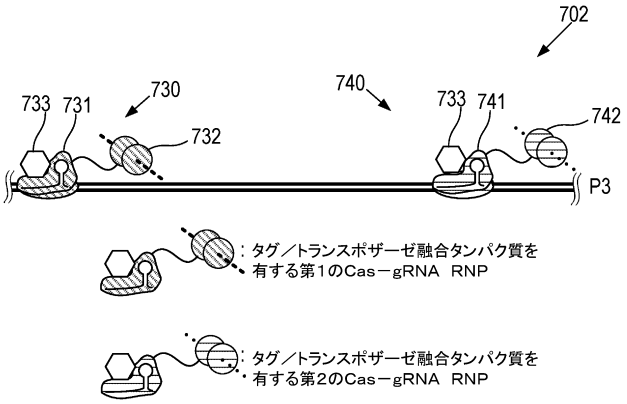
【図６Ｂ】



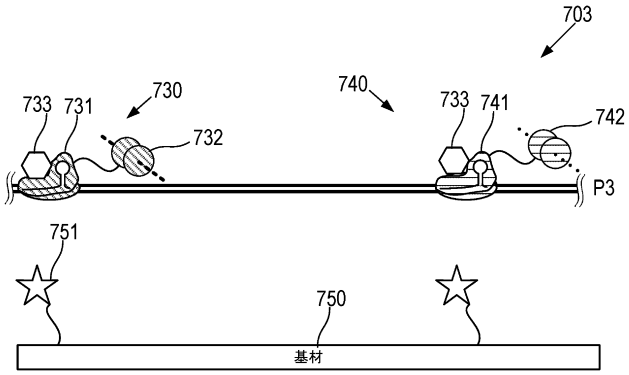
【図７Ａ】



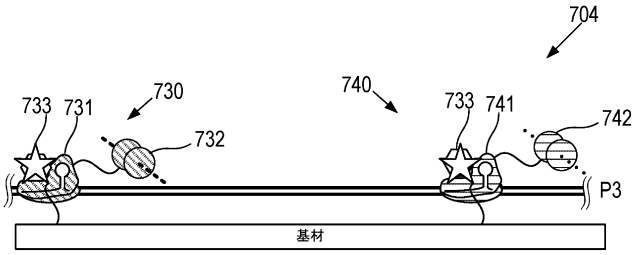
【図７Ｂ】



【図７Ｃ】

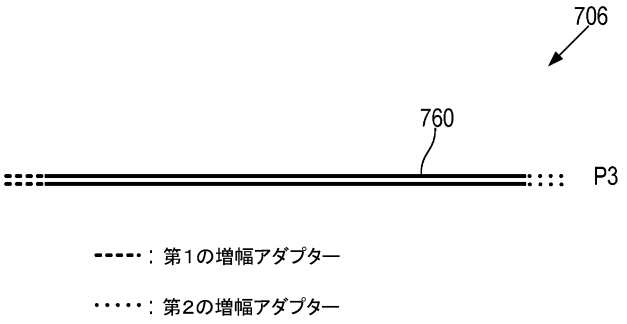


【図７Ｄ】

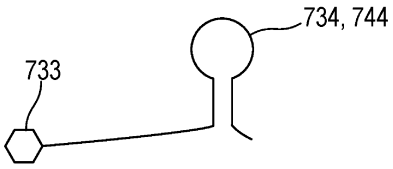


【図７Ｅ】

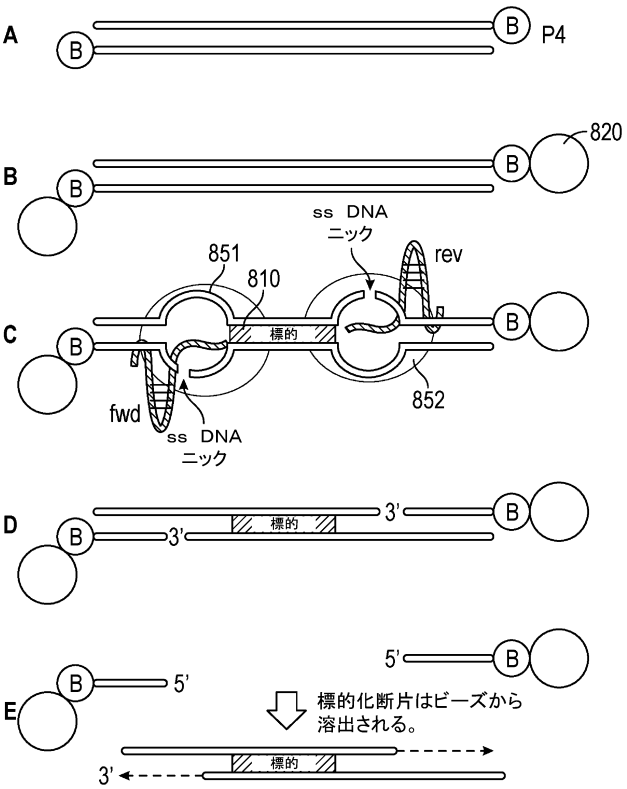
【図７Ｆ】



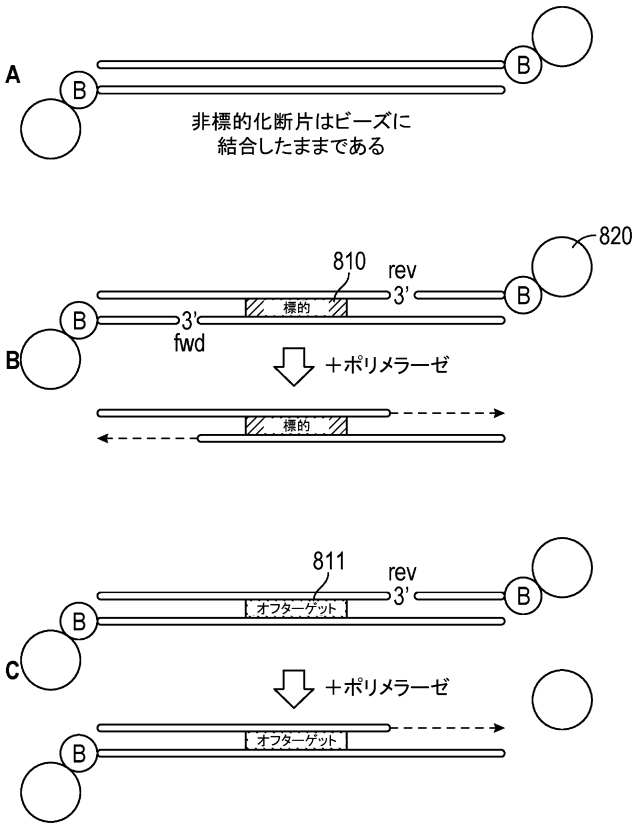
【図７Ｇ】



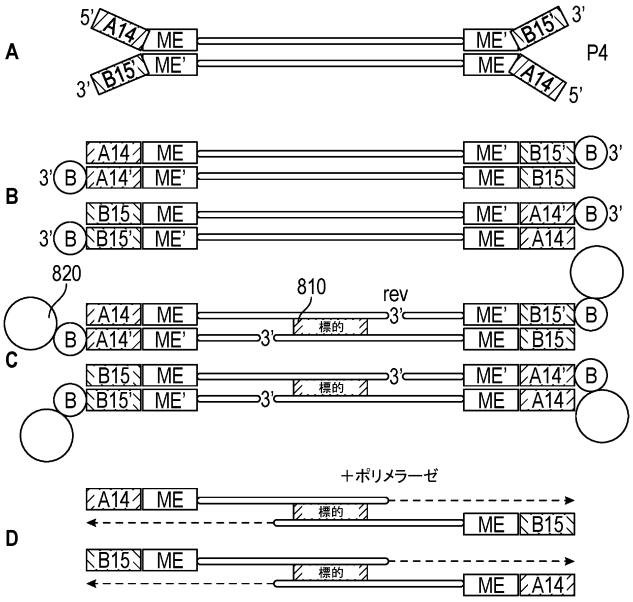
【図８Ａ】



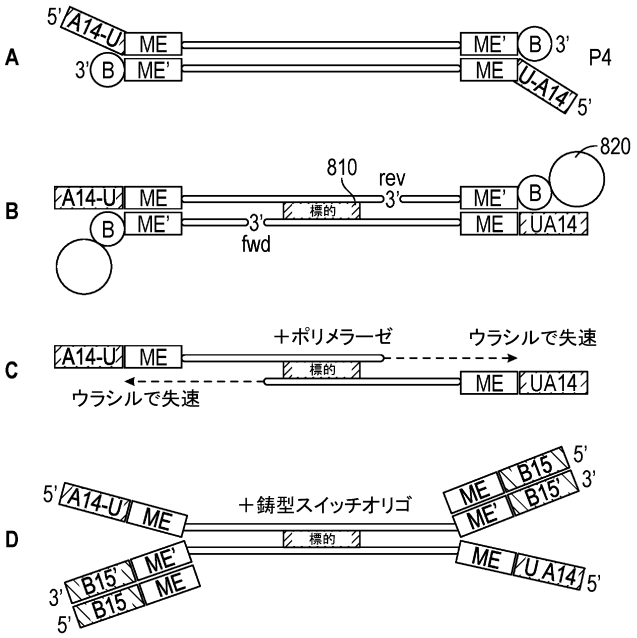
【図８Ｂ】



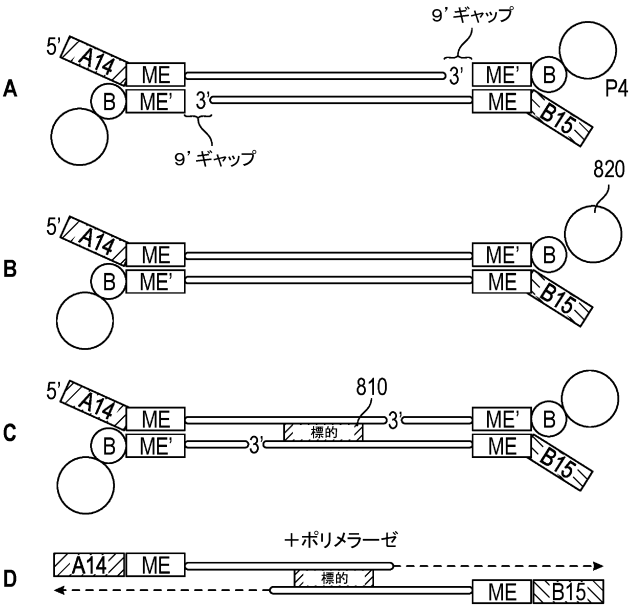
【図８Ｃ】



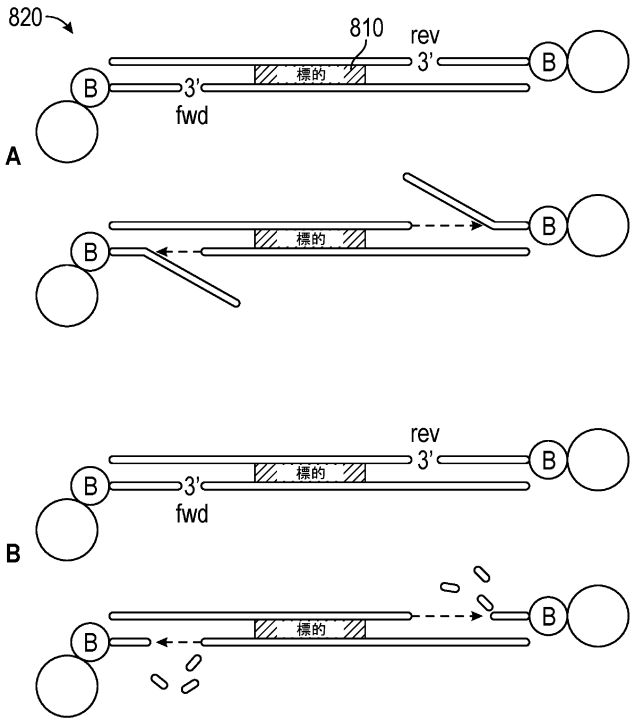
【図８Ｄ】



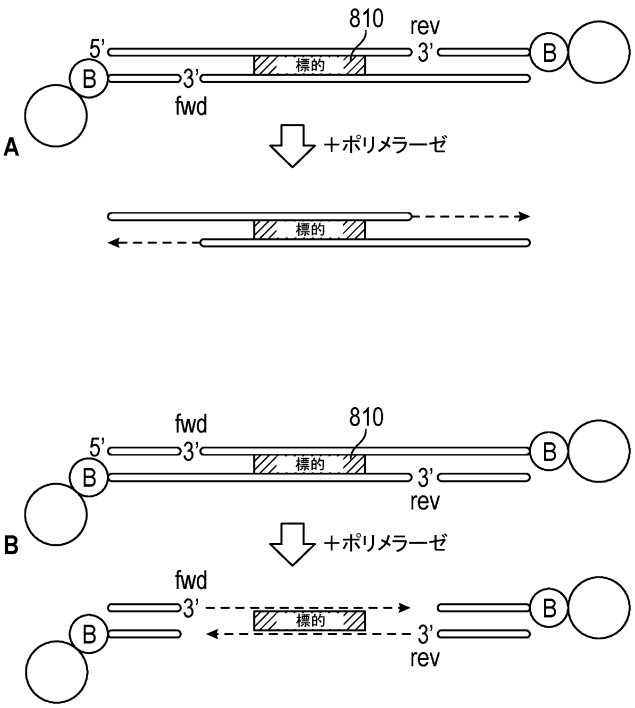
【図８Ｅ】



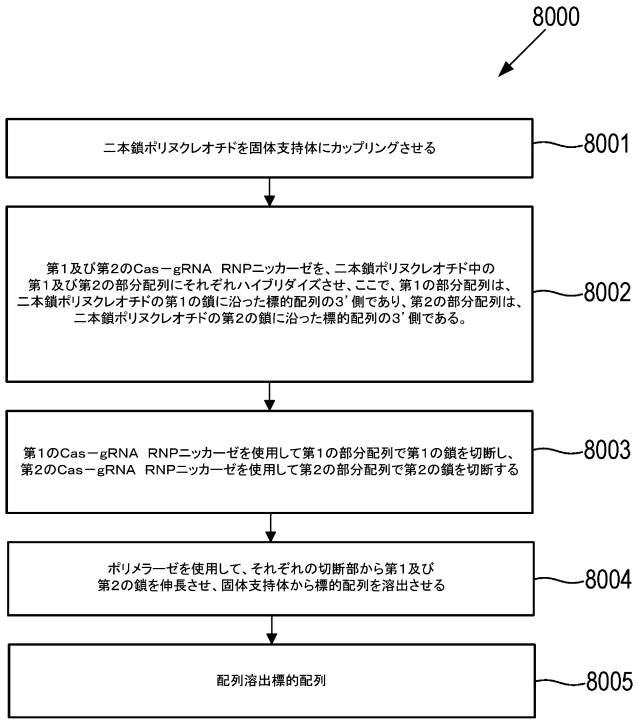
【図８Ｆ】



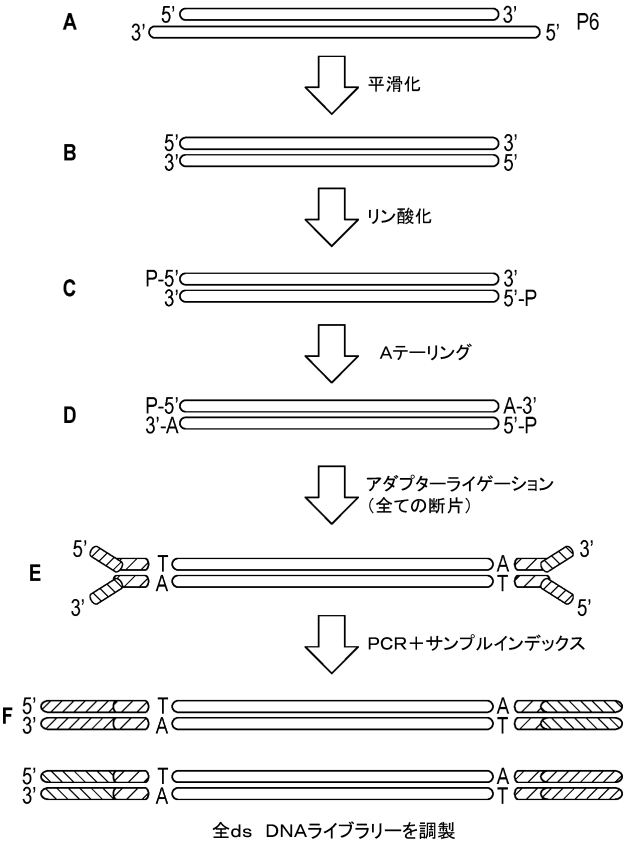
【図８Ｇ】



【図８Ｈ】

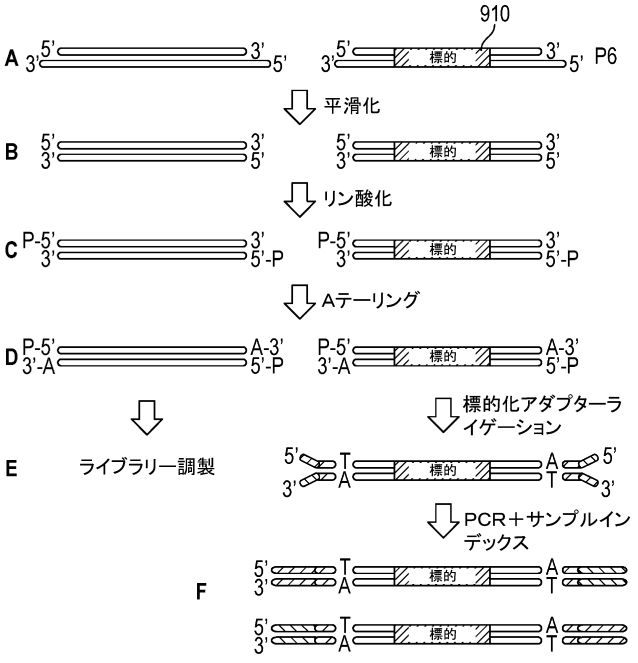


【図９Ａ】



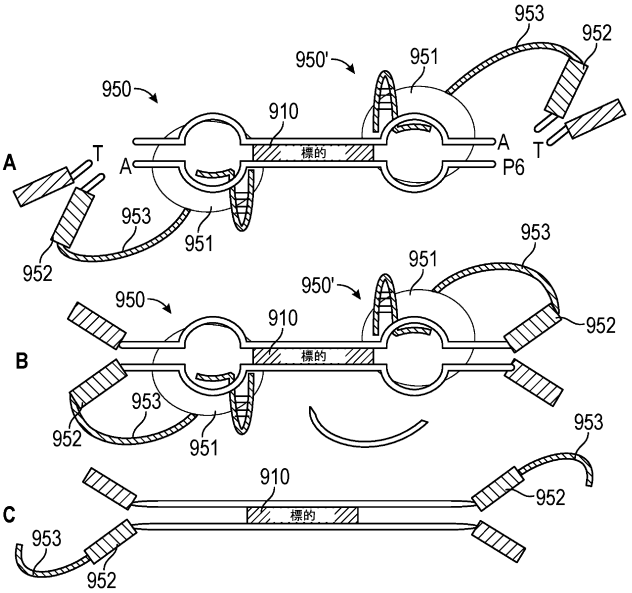
全ds　DNAライブラリーを調製

【図９Ｂ】

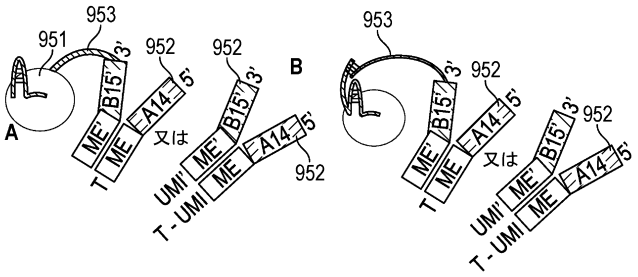


標的化ds　DNAライブラリーを調製

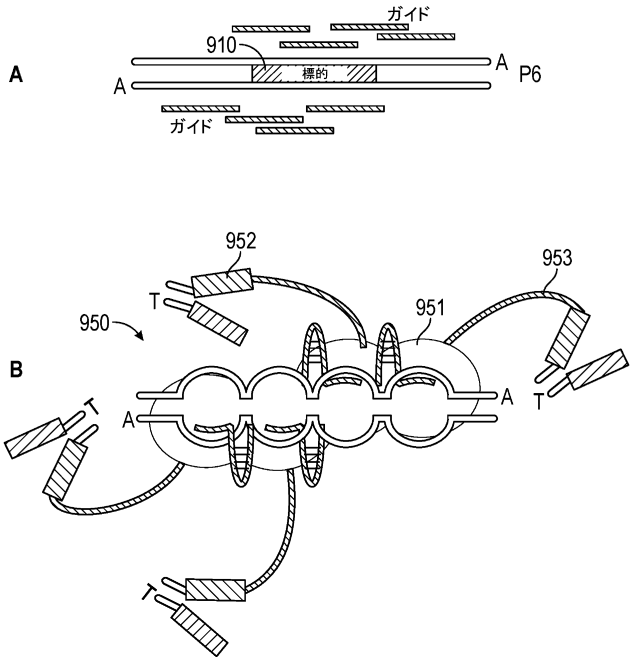
【図９Ｃ】



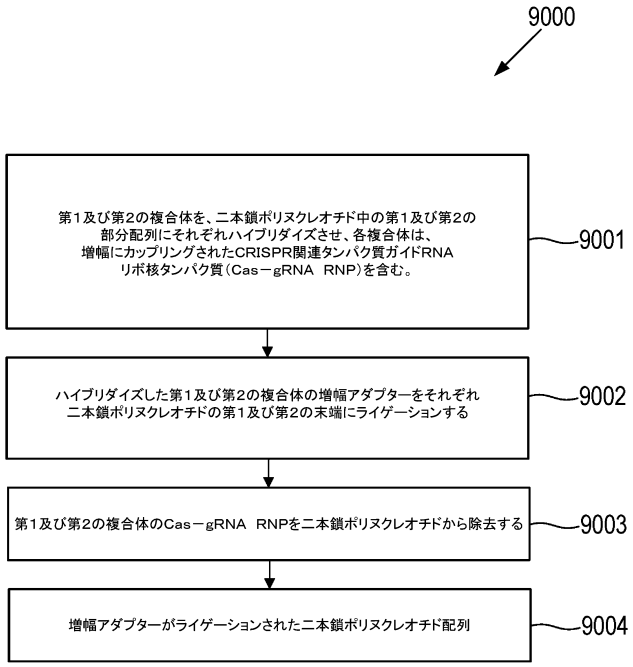
【図９Ｄ】



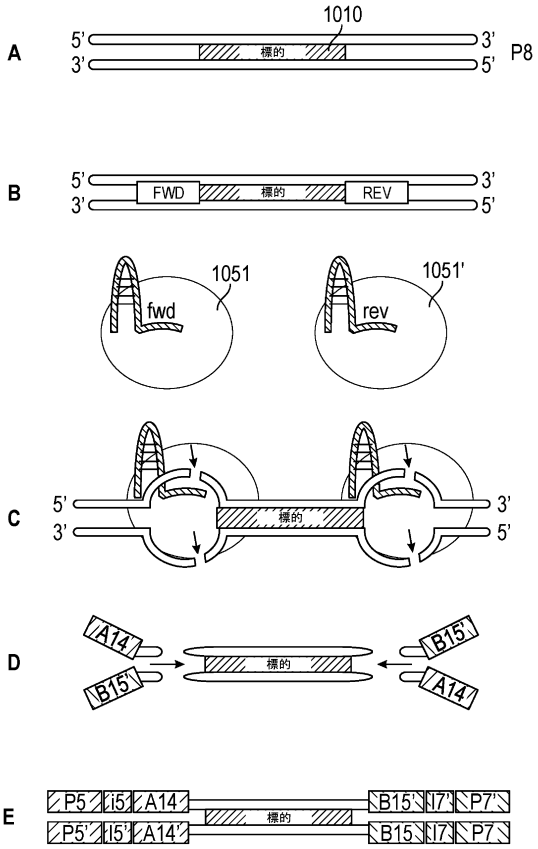
【図９Ｅ】



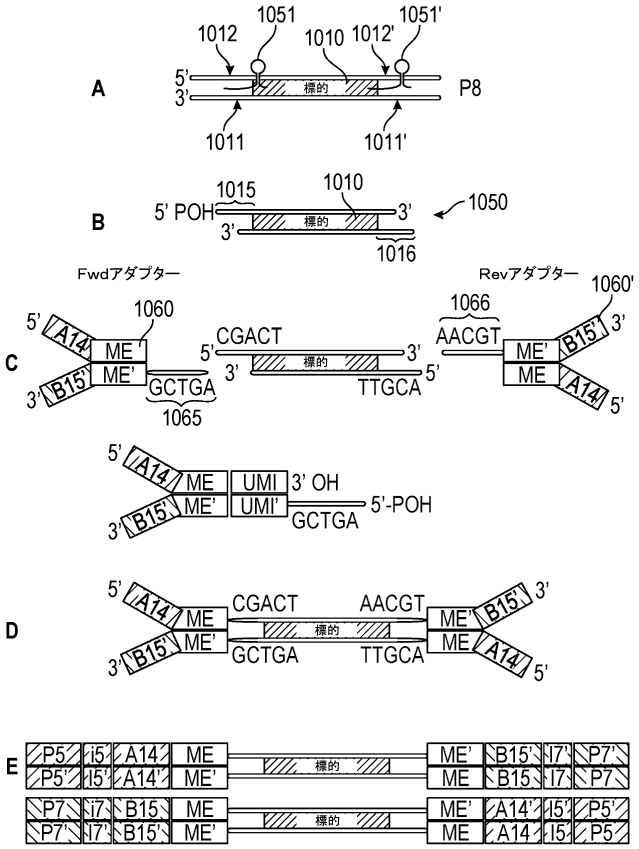
【図９Ｆ】



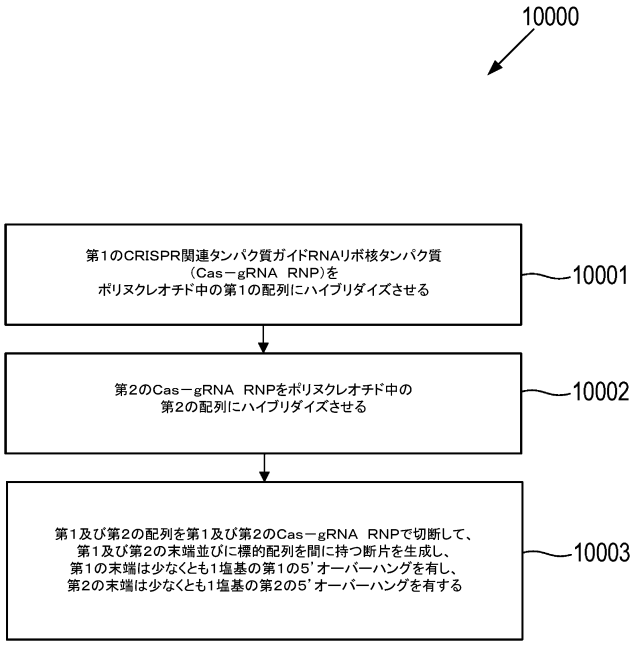
【図１０Ａ】



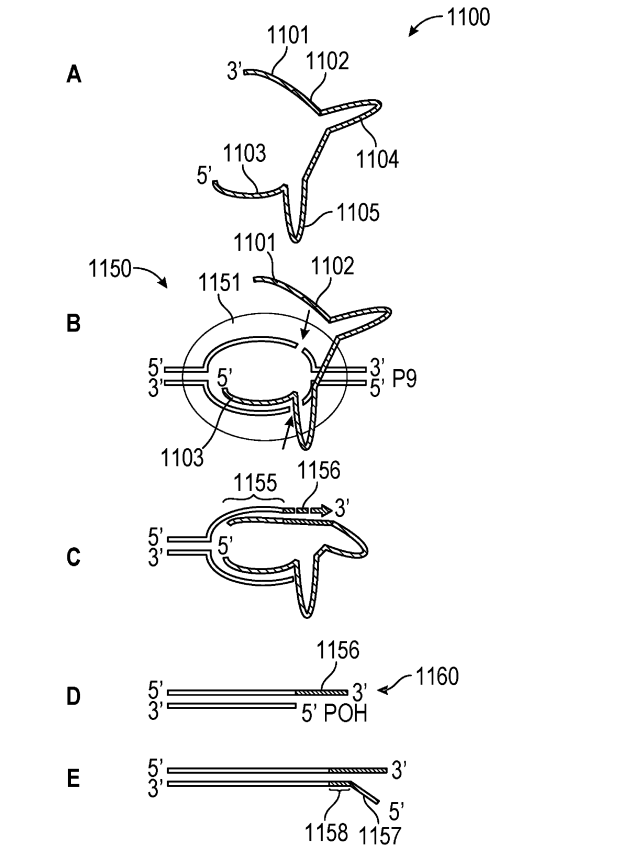
【図１０Ｂ】



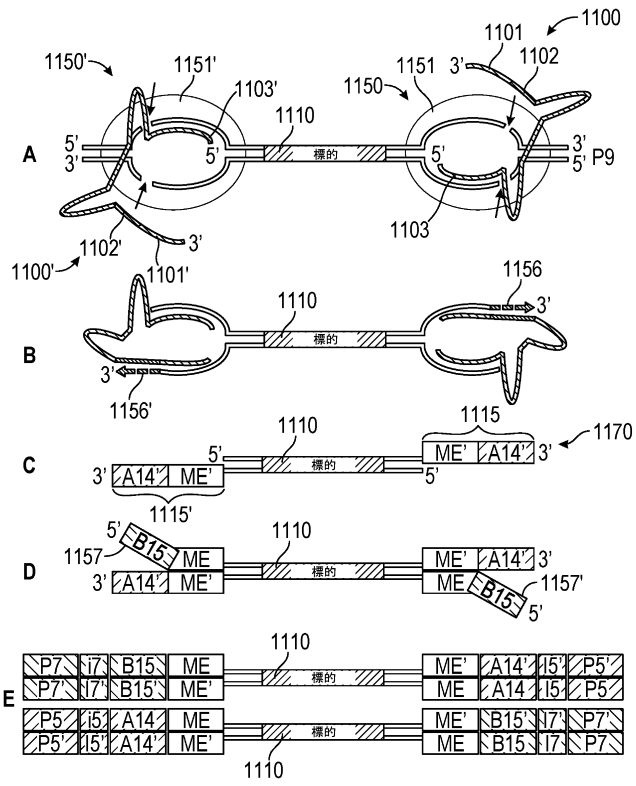
【図１０Ｃ】



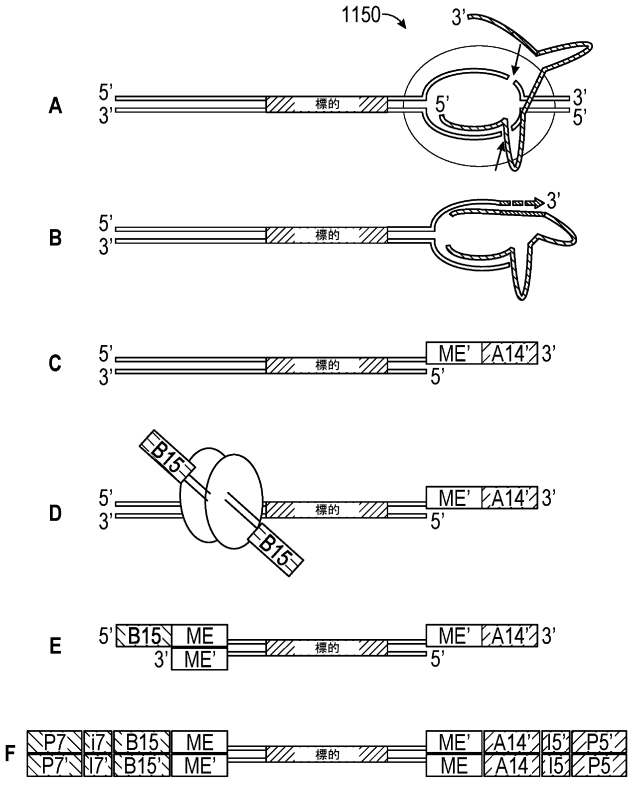
【図１１Ａ】



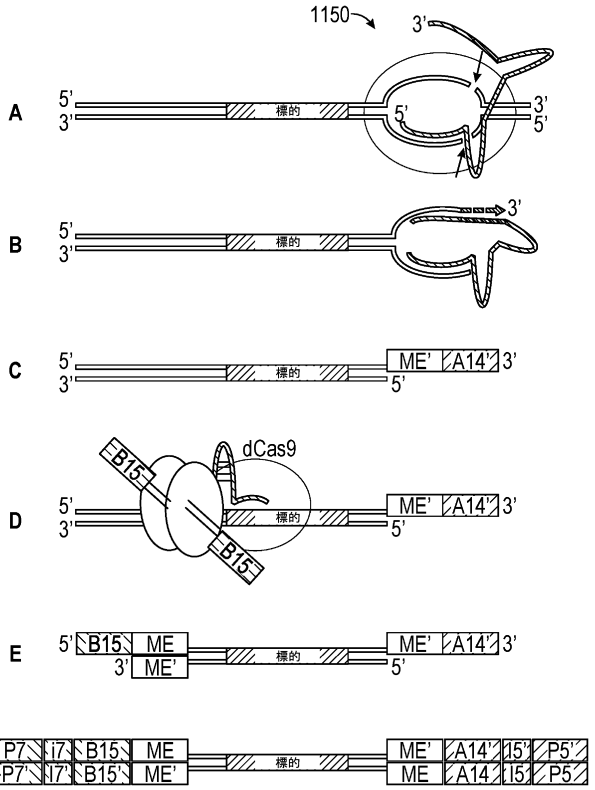
【図１１Ｂ】



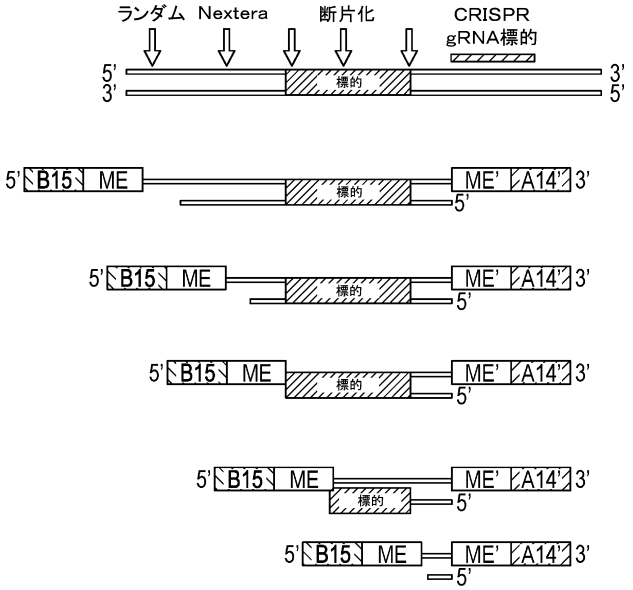
【図１１Ｃ】



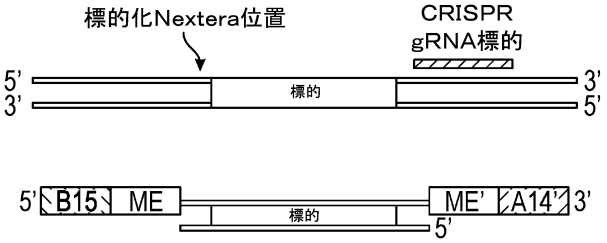
【図１１Ｄ】



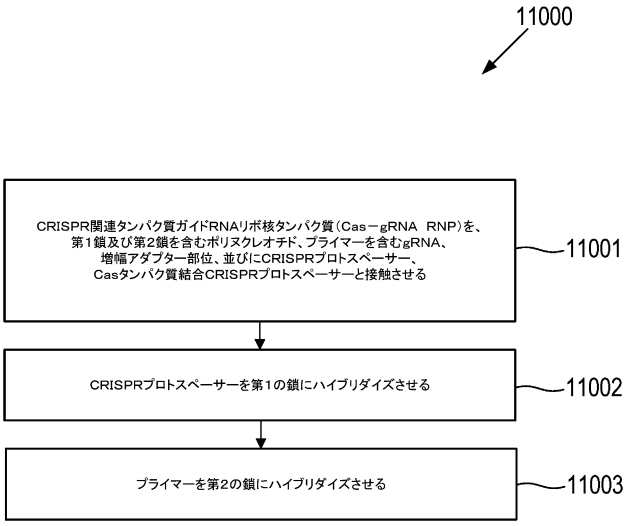
【図１１Ｅ】



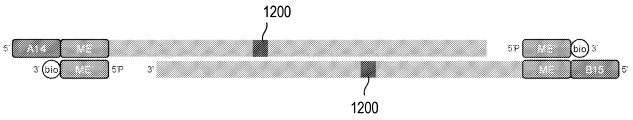
【図１１Ｆ】



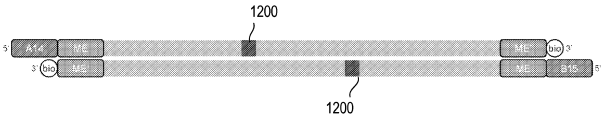
【図１１Ｇ】



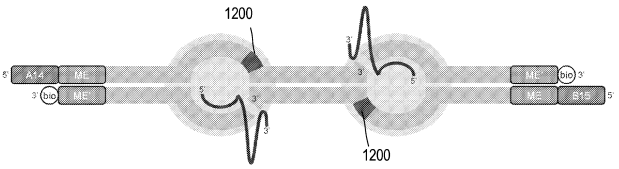
【図１２】



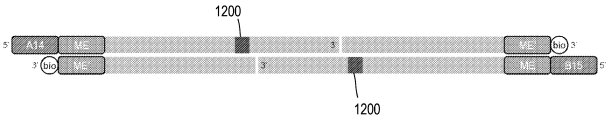
【図１３】



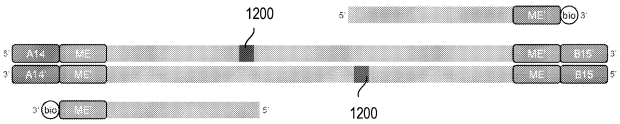
【図１４】



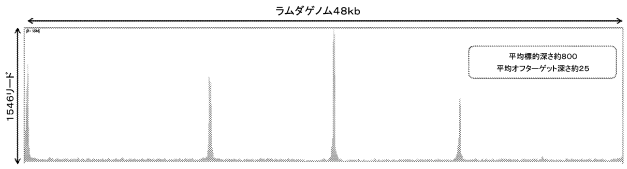
【図１５】



【図１６】



【図１７】



【手続補正書】
【提出日】令和５年１２月１日(２０２３.１２.１)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】配列表
【補正方法】追加
【補正の内容】
【配列表】
２０２４５１０２０６０００００１.ａｐｐ

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/019252

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/10 C12N9/22 C40B40/08
ADD.

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)
C12N C40B

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)
EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 03/020974 A2 (UNIV HONG KONG CHINESE [CN]; LO YUK MING DENNIS [CN] ET AL.) 13 March 2003 (2003-03-13)	1-37
A	EP 2 722 402 A1 (ANALYTIK JENA AG [DE]) 23 April 2014 (2014-04-23)	1-37
A	PICKAR-OLIVER ADRIAN ET AL: "The next generation of CRISPR-Cas technologies and applications", NATURE REVIEWS MOLECULAR CELL BIOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP UK, LONDON, vol. 20, no. 8, 30 May 2019 (2019-05-30), pages 490-507, XP037038726, ISSN: 1471-0072, DOI: 10.1038/S41580-019-0131-5 [retrieved on 2019-05-30]	1-37

-/--

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C.
[x] 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
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
1 June 2022	10/08/2022

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Bassias, Ioannis

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/019252

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LEE JUN HYUNG ET AL: "Epigenetic Footprints of CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing in Plants", FRONTIERS IN PLANT SCIENCE, vol. 10, 31 January 2020 (2020-01-31), XP055926324, DOI: 10.3389/fpls.2019.01720	1-37
A	NAEEM MUHAMMAD ET AL: "Latest Developed Strategies to Minimize the Off-Target Effects in CRISPR-Cas-Mediated Genome Editing", CELLS, vol. 9, no. 7, 2 July 2020 (2020-07-02), page 1608, XP055926414, DOI: 10.3390/cells9071608 Retrieved from the Internet: URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7407193/pdf/cells-09-01608.pdf>	1-37
A	CHRISTOPHER A. VAKULSKAS ET AL: "A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells", NATURE MEDICINE, vol. 24, no. 8, 6 August 2018 (2018-08-06), pages 1216-1224, XP055759641, New York ISSN: 1078-8956, DOI: 10.1038/s41591-018-0137-0 cited in the application	1-37

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/019252

Box No. I 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:

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/019252

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:

see additional sheet

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 an 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.:
1-37

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.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (April 2005)

International Application No. PCT/US2022/019252

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-37

A method of treating a mixture of first double-stranded polynucleotides from a first species and second double-stranded polynucleotides from a second species, the method comprising: protecting ends of the first double-stranded polynucleotides and any ends of the second double-stranded polynucleotides; after protecting the ends of the first and second double-stranded polynucleotides, selectively generating free ends within the first double-stranded polynucleotides; and degrading the first double-stranded polynucleotides from the free ends toward the protected ends and a composition comprising said first and second double-stranded polynucleotides and CRISPR-associated protein guide RNA ribonucleoproteins (Cas-gRNA RNPs) hybridized to sequences that are present within the first double-stranded polynucleotides and that are not present within the second double-stranded polynucleotides.

---

2. claims: 38, 39

A method of treating a mixture of first double-stranded polynucleotides from a first species and second double-stranded polynucleotides from a second species, the method comprising: selectively making the first double-stranded polynucleotides in the mixture single-stranded; subsequently selectively ligating amplification primers to any remaining double-stranded polynucleotides in the mixture; and subsequently amplifying any double-stranded polynucleotides in the mixture to which amplification primers were ligated and a composition comprising said first and second polynucleotides and amplification primers ligated to ends of the second double-stranded polynucleotides and substantially not ligated to any ends of the first double-stranded polynucleotides.

---

3. claims: 40-98

A method of generating fragments of a whole genome (WG), the method comprising: within a first sample of the WG: hybridizing a first set of CRISPR-associated protein guide RNA ribonucleoproteins (Cas-gRNA RNPs) to first sequences in the WG that are spaced apart from one another by approximately a first number of base pairs; hybridizing a second set of Cas-gRNA RNPs to second sequences in the WG that are spaced apart from one another by approximately a second number of base pairs; and respectively cutting the first and second sequences with the first and second sets of

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Cas-gRNA RNPs in the first sample to generate a first set of WG fragments each having approximately the same number of base pairs as one another, a composition, comprising: a sample of a whole genome (WG);a first set of CRISPR-associated protein guide RNA ribonucleoproteins (Cas-gRNA RNPs) hybridized to first sequences in the WG that are spaced apart from one another by approximately a first number of base pairs; and a second set of Cas-gRNA RNPs hybridized to second sequences in the WG that are spaced apart from one another by approximately a second number of base pairs, the first and second sets of Cas-gRNA RNPs respectively being for cutting the first and second sequences within the sample to generate WG fragments each having approximately the same number of base pairs as one another and a further composition comprising additionally to the composition mentioned before a third set of Cas-gRNA RNPs hybridized to third sequences in the WG that are spaced apart from one another by approximately a third number of base pairs, the first, second, and third sets of Cas-gRNA RNPs respectively being for cutting the first, second, and third sequences within the sample to generate WG fragments each having approximately the same number of base pairs as one another.

---

4. claims: 99-125

A method of generating fragments of a whole genome (WG), the method comprising: hybridizing a set of CRISPR-associated protein guide RNA ribonucleoproteins (Cas-gRNA RNPs) to sequences in the WG that are spaced apart from one another by approximately a number of base pairs; and respectively cutting the sequences with the set of Cas-gRNA RNPs to generate a set of WG fragments each having approximately the same number of base pairs as one another, a composition, comprising: a sample of a whole genome (WG); and a set of CRISPR-associated protein guide RNA ribonucleoproteins (Cas-gRNA RNPs) hybridized to sequences in the WG that are spaced apart from one another by approximately a number of base pairs, the set of Cas-gRNA RNPs respectively being for cutting the sequences within the sample to generate WG fragments each having approximately the same number of base pairs as one another and a further composition, comprising a set of at least about 1,000,000 WG fragments each having approximately the same number of base pairs as one another.

---

5. claims: 126-148

A method of cutting molecules of a target polynucleotide having a sequence, the method comprising: contacting, in a fluid, first and second molecules of the target polynucleotide with a plurality of first and second CRISPR-associated protein guide RNA ribonucleoproteins (Cas-gRNA RNPs); hybridizing one of the first Cas-gRNA RNPs

International Application No. PCT/US2022/019252

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

to a first subsequence in the first molecule; hybridizing one of the second Cas-gRNA RNPs to a second subsequence in the second molecule, the second subsequence only partially overlapping with the first subsequence; inhibiting, by the one of the first Cas-gRNA RNPs, hybridization of any of the second Cas-gRNA RNPs to the second subsequence in the first molecule; inhibiting, by the one of the second Cas-gRNA RNPs, hybridization of any of the first Cas-gRNA RNPs to the first subsequence in the second molecule;cutting the first molecule at the first subsequence; andcutting the second molecule at the second subsequence and a method of sequencing a target polynucleotide, the method comprising: generating first and second fragments of the target polynucleotide using the method of any one of claims 134 to 144; ligating amplification adapters to ends of the first and second fragments;respectively generating amplicons of the first and second fragments having the amplification adapters ligated thereto; andsequencing the amplicons of the first and second fragments.

---

6. claims: 149-167

A composition, comprising: first and second molecules of a target polynucleotide having a sequence; and a plurality of first and second CRISPR-associated protein guide RNA ribonucleoproteins (Cas-gRNA RNPs), one of the first Cas-gRNA RNPs being hybridized to a first subsequence in the first molecule and inhibiting hybridization of any of the second Cas-gRNA RNPs to a second subsequence in the first molecule, the second subsequence only partially overlapping with the first subsequence, and one of the second Cas-gRNA RNPs being hybridized to the second subsequence in the second molecule and inhibiting hybridization of any of the first Cas-gRNA RNPs to the first subsequence in the second molecule.

---

7. claims: 168-179

A composition, comprising: first and second molecules of a target polynucleotide having a sequence, the first molecule having a first end at a first subsequence, the second molecule having a first end at a second subsequence, wherein the first subsequence only partially overlaps with the second subsequence.

---

8. claims: 180-207

A method of generating a fragment of a target polynucleotide having a sequence, the method comprising: contacting, in a fluid, the target polynucleotide with first and second fusion proteins, the first fusion protein comprising a first CRISPR-associated protein guide RNA ribonucleoprotein

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

(Cas-gRNA RNP) coupled to a first transposase having a first amplification adapter coupled thereto, the second fusion protein comprising a second Cas-gRNA RNP coupled to a second transposase having a second amplification adapter coupled thereto;while promoting activity of the first and second Cas-gRNA RNPs and inhibiting activity of the first and second transposases: hybridizing the first Cas-gRNA RNP to a first subsequence in the target polynucleotide; and hybridizing the second Cas-gRNA RNP to a second subsequence in the target polynucleotide; and then while promoting activity of the first and second transposases: using the first transposase to add the first amplification adapter to a first location in the target polynucleotide; and using the second transposase to add the second amplification adapter to a second location in the target polynucleotide and a method of sequencing a target polynucleotide, the method comprising: generating a fragment of the target polynucleotide using the method of any one of claims 188 to 206 or 294 to 302; generating amplicons of the fragment; and sequencing the amplicons.

---

9. claims: 208-236

A composition, comprising: a target polynucleotide having a sequence; and a first fusion protein comprising a first CRISPR-associated protein guide RNA ribonucleoprotein (Cas-gRNA RNP) coupled to a first transposase having a first amplification adapter coupled thereto, the first Cas-gRNA RNP being hybridized to a first subsequence in the target polynucleotide.

---

10. claims: 237-262

A method of characterizing proteins coupled to respective loci of a target polynucleotide, the method comprising: contacting the target polynucleotide with first and second CRISPR-associated protein guide RNA ribonucleoproteins (Cas-gRNA RNPs); respectively hybridizing the first and second Cas-gRNA RNPs to first and second subsequences in the target polynucleotide, wherein the proteins are coupled to respective loci of the target polynucleotide between the first and second subsequences; cutting the target polynucleotide at the first subsequence using the first Cas-gRNA RNP and at the second subsequence using the second Cas-gRNA RNP to form a fragment, wherein the proteins are coupled to respective loci of the fragment; using corresponding oligonucleotides to respectively label each of the proteins coupled to the respective loci of the fragment; and sequencing the corresponding oligonucleotides.

---

11. claims: 263-272

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

A composition, comprising: a fragment of a target polynucleotide, wherein proteins are coupled to respective loci of the fragment; and a mixture of antibodies that are specific to different proteins, each of the antibodies being coupled to a corresponding oligonucleotide, wherein, for any antibodies in the mixture that are specific to the proteins coupled to the respective loci of the fragment, those antibodies and the corresponding oligonucleotides are coupled to those proteins.

---

12. claims: 273-284

A composition, comprising: a fragment of a target polynucleotide, wherein proteins are coupled to respective loci of the fragment; and a plurality of transposases, each of the transposases being coupled to a corresponding oligonucleotide, the proteins coupled to the respective loci of the fragment inhibiting activity of the transposases at the loci; and the transposases adding the corresponding oligonucleotides to the fragment at locations other than the loci.

---

13. claims: 285-311

A composition, comprising: a target polynucleotide having a plurality of subsequences; and a plurality of complexes each comprising an ShCAST (Scytonema hofmanni CRISPR associated transposase) coupled to guide RNA (gRNA), the ShCAST having an amplification adapter coupled thereto, each of the complexes being hybridized to a corresponding one of the subsequences in the target polynucleotide.

---

14. claims: 312-328

A method of generating a fragment of a double-stranded polynucleotide, the method comprising: coupling the double-stranded polynucleotide to a substrate; respectively hybridizing first and second CRISPR-associated protein guide RNA ribonucleoprotein (Cas-gRNA RNP) nickases to first and second subsequences in the double-stranded polynucleotide, the first subsequence being 3' of a target sequence along a first strand of the double-stranded polynucleotide, and the second subsequence being 3' of the target sequence along a second strand of the double-stranded polynucleotide; cutting the first strand at the first subsequence using the first Cas-gRNA RNP nickase; cutting the second strand at the second subsequence using the second Cas-gRNA RNP nickase; using a polymerase to extend the first and second strands from the respective cuts and elute the target sequence from the substrate; and sequencing the eluted target sequence and a composition, comprising: a double-stranded polynucleotide coupled to a substrate; and first and second

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

CRISPR-associated protein guide RNA ribonucleoprotein (Cas-gRNA RNP) nickases respectively hybridized to first and second subsequences in the double-stranded polynucleotide, the first subsequence being 3' of a target sequence along a first strand of the double-stranded polynucleotide, and the second subsequence being 3' of the target sequence along a second strand of the double-stranded polynucleotide.

---

15. claims: 329-353

A method of generating a fragment of a double-stranded polynucleotide, the method comprising: respectively hybridizing first and second complexes to first and second subsequences in the double-stranded polynucleotide, each of the first and second complexes comprising a CRISPR-associated protein guide RNA ribonucleoprotein (Cas-gRNA RNP) coupled to an amplification adaptor; respectively ligating the amplification adaptors of the hybridized first and second complexes to first and second ends of the double-stranded polynucleotide; removing the Cas-gRNA RNPs of the first and second complexes from the double-stranded polynucleotide; and sequencing the double-stranded polynucleotide having the amplification adaptors ligated thereto and a composition, comprising: a fragment of a double-stranded polynucleotide; and first and second complexes hybridized to first and second subsequences in the double-stranded polynucleotide, each of the first and second complexes comprising a CRISPR-associated protein guide RNA ribonucleoprotein (Cas-gRNA RNP) coupled to an amplification adaptor.

---

16. claims: 354-366

A method of generating a fragment of a polynucleotide, the method comprising: hybridizing a first CRISPR-associated protein guide RNA ribonucleoprotein (Cas-gRNA RNP) to a first sequence in the polynucleotide; hybridizing a second Cas-gRNA RNP to a second sequence in the polynucleotide that is spaced apart from the first sequence by at least a target sequence; and cutting the first and second sequences with the first and second Cas-gRNA RNPs to generate a fragment comprising first and second ends and the target sequence therebetween, the first end having a first 5' overhang of at least one base, the second end having a second 5' overhang of at least one base, and a composition, comprising: a polynucleotide; a first CRISPR-associated protein guide RNA ribonucleoprotein (Cas-gRNA RNP) hybridized to a first sequence in the polynucleotide; and a second Cas-gRNA RNP hybridized to a second sequence in the polynucleotide that is spaced apart from the first sequence by at least a target sequence, the first and second Cas-gRNA RNPs respectively being for cutting the first and second sequences of the polynucleotide to generate a fragment having first and

International Application No. PCT/US2022/019252

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

second ends with the target sequence therebetween, the first end having a first 5' overhang of at least one base, the second end having a second 5' overhang of at least one base.

---

17. claims: 367-372

A composition, comprising: a polynucleotide fragment each having first and second ends with the target sequence therebetween, the first end having a first 5' overhang of at least one base, the second end having a second 5' overhang of at least one base, the first and second 5' overhangs having different sequences than one another; a first amplification adaptor having a third 5' overhang that is complementary to the first 5' overhang and is not complementary to the second 5' overhang; and a second amplification adaptor having a fourth 5' overhang that is complementary to the second 5' overhang and is not complementary to the first 5' overhang.

---

18. claims: 373-379

A composition, comprising: a plurality of polynucleotide fragments each having first and second ends with the target sequence therebetween, the first end having a first 5' overhang of at least one base, the second end having a second 5' overhang of at least one base, the first and second 5' overhangs having different sequences than one another and than the first and second 5' overhangs of other fragments.

---

19. claims: 380-385

A composition, comprising: a plurality of polynucleotides; a plurality of first CRISPR-associated protein guide RNA ribonucleoprotein (Cas-gRNA RNPs) hybridized to respective first sequences in the polynucleotide; and a plurality of second Cas-gRNA RNPs hybridized to respective second sequences in the polynucleotide that are spaced apart from the respective first sequence by at least a respective target sequence, the first and second pluralities of Cas-gRNA RNPs respectively being for cutting the first and second sequences of the respective polynucleotides to generate fragments respectively having first and second ends within the respective target sequence therebetween, the first end having a first 5' overhang of at least one base, the second end having a second 5' overhang of at least one base.

---

20. claims: 386-395

A guide RNA, comprising a primer binding site, an

International Application No. PCT/US2022/019252

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

amplification adaptor site, and a CRISPR protospacer and a CRISPR-associated protein guide RNA ribonucleoprotein (Cas-gRNA RNP), comprising: the gRNA of any one of claims 386 to 391; and a Cas protein binding the CRISPR protospacer.

---

21. claims: 396-415

A complex, comprising: a polynucleotide comprising first and second strands; and a first CRISPR-associated protein guide RNA ribonucleoprotein (Cas-gRNA RNP), comprising: a first guide RNA comprising a first primer binding site, a first amplification adaptor site, and a first CRISPR protospacer; and a first Cas protein binding the first CRISPR protospacer, wherein the first CRISPR protospacer is hybridized to the first strand and the first primer binding site is hybridized to the second strand.

---

22. claims: 416-419

A partially double-stranded polynucleotide fragment, comprising: a first end comprising a first 3' overhang; a second end; and a target sequence located between the first and second ends.

---

23. claims: 420-443

A method, comprising: contacting a first CRISPR-associated protein guide RNA ribonucleoprotein (Cas-gRNA RNP) with a polynucleotide comprising first and second strands, wherein the first Cas-gRNA comprises: a first guide RNA comprising a first primer binding site, a first amplification adaptor site, and a first CRISPR protospacer; and a first Cas protein binding the first CRISPR protospacer; hybridizing the first CRISPR protospacer to the first strand; and hybridizing the first primer binding site to the second strand.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2022/019252

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03020974 A2	13-03-2003	AT 353977 T	15-03-2007
		AU 2002324135 A1	18-03-2003
		CA 2456140 A1	13-03-2003
		CA 2887218 A1	13-03-2003
		CA 2973165 A1	13-03-2003
		CA 3012120 A1	13-03-2003
		CN 1665936 A	07-09-2005
		DE 60218182 T2	07-02-2008
		DK 1421211 T3	29-05-2007
		EP 1421211 A2	26-05-2004
		ES 2280562 T3	16-09-2007
		HK 1076840 A1	27-01-2006
		JP 2005501566 A	20-01-2005
		PT 1421211 E	30-03-2007
		US 2003044388 A1	06-03-2003
		US 2005282185 A1	22-12-2005
		US 2009170102 A1	02-07-2009
		US 2012190029 A1	26-07-2012
		US 2013337443 A1	19-12-2013
		US 2015232949 A1	20-08-2015
		US 2020208225 A1	02-07-2020
		WO 03020974 A2	13-03-2003
EP 2722402 A1	23-04-2014	DE 102012219142 A1	12-06-2014
		EP 2722402 A1	23-04-2014
		US 2014127687 A1	08-05-2014

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C12N	*15/33 (2006.01)*	C12N	15/33		
C40B	*40/06 (2006.01)*	C40B	40/06		
C12Q	*1/6874(2018.01)*	C12Q	1/6874	Z	
C12Q	*1/6844(2018.01)*	C12Q	1/6844	Z	
C12Q	*1/6876(2018.01)*	C12Q	1/6876	Z	

(32)優先日　令和3年3月18日(2021.3.18)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/246,879
(32)優先日　令和3年9月22日(2021.9.22)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/228,344
(32)優先日　令和3年8月2日(2021.8.2)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/163,381
(32)優先日　令和3年3月19日(2021.3.19)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　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,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,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,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

５２００
(72)発明者　サラ シュルツァバージャー
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９２１２２ サン ディエゴ イルミナ ウェイ ５２００
(72)発明者　エマ ベル
英国 シービー２１ ６ディーエフ ケンブリッジ グレート アビントン グランタ パーク １９
(72)発明者　オリバー ミラー
英国 シービー２１ ６ディーエフ ケンブリッジ グレート アビントン グランタ パーク １９
(72)発明者　キム シュナイダー
英国 シービー２１ ６ディーエフ ケンブリッジ グレート アビントン グランタ パーク １９
(72)発明者　エステル マスグレイブ‐ブラウン
英国 シービー２１ ６ディーエフ ケンブリッジ グレート アビントン グランタ パーク １９
(72)発明者　ニアル ゴームリー
英国 シービー２１ ６ディーエフ ケンブリッジ グレート アビントン グランタ パーク １９
(72)発明者　アンドリュー スラッター
英国 シービー２１ ６ディーエフ ケンブリッジ グレート アビントン グランタ パーク １９
(72)発明者　フェング チェン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９２１２２ サン ディエゴ イルミナ ウェイ ５２００

Fターム（参考）　4B063　QA13 QQ02 QQ42 QR08 QR14 QR20 QR62 QS34 QS39 QX10

【要約の続き】
【選択図】図１Ｋ