

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】令和2年10月8日(2020.10.8)

【公表番号】特表2019-533432(P2019-533432A)

【公表日】令和1年11月21日(2019.11.21)

【年通号数】公開・登録公報2019-047

【出願番号】特願2019-511921(P2019-511921)

【国際特許分類】

C 1 2 Q	1/6832	(2018.01)
C 1 2 Q	1/6841	(2018.01)
C 1 2 Q	1/6876	(2018.01)
C 4 0 B	40/06	(2006.01)
C 1 2 N	15/09	(2006.01)

【F I】

C 1 2 Q	1/6832	Z N A Z
C 1 2 Q	1/6841	Z
C 1 2 Q	1/6876	Z
C 4 0 B	40/06	
C 1 2 N	15/09	Z

【手続補正書】

【提出日】令和2年8月31日(2020.8.31)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 7 0

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 7 0】

実施例4：Oncotype Dxパネルの標的化F I S S E G

標的化F I S S E Qの作業の流れを示すための一例として、Oncotype Dx遺伝子パネルを使用した。図5は、ヒト乳がん組織生検試料の標的化F I S S E Qの例示的な画像を示している。標的化逆転写用プライマーのプールが、臨床的に関連のあるOncotype Dx遺伝子パネルの遺伝子において、逆転写反応を開始させる。この画像は、3D F I S S E Qヒドロゲル内及びオリジナルの組織試料内での分子同定を実証するために3次元回転される1塩基配列決定反応を示している。Oncotype Dx遺伝子の遺伝子発現プロファイルが算出される。図6は、図5から得られる配列決定の例示的な実験データの要約を示している。上部テキストは関連する実験データを含んでいる。左下のパネルは、組織画像上に重ね合わされた分子同定事象の位置を示している。下中央のパネルは、配列決定の質のメトリクスを示す同じ分子を示している。上中央のグラフは、バーコード配列上の各塩基についての配列決定シグナルの分布を示しており、高品質の配列決定データが示されている。右の表は、アッセイに含まれた遺伝子と、結合された配列バーコードとを示している。

本発明の態様の例を以下に示す。

<1> 細胞又は細胞マトリックスにおけるハイブリダイゼーション反応を増強するための方法であって、

(a) 前記細胞又は前記細胞マトリックス、並びに反応混合物を準備すること、

ここで、前記反応混合物は、(i) 標的核酸分子、(ii) 前記標的核酸分子の標的配列に対する配列相補性を有するプローブ、及び(iii) ポリマー骨格を含むハイブリダイゼーション反応増強剤を含み、前記ハイブリダイゼーション反応増強剤は、前記標的核

酸分子と前記標的分子の前記標的配列に対する配列相補性を有する前記プローブとの間のハイブリダイゼーション反応の速度を増強し、前記ハイブリダイゼーション増強剤は、前記ハイブリダイゼーション反応増強剤の不活性化を促進する官能基を含む；並びに、

(b) 前記標的核酸分子と前記標的核酸分子の前記標的配列に対する配列相補性を有する前記プローブとの間の前記ハイブリダイゼーション反応を実行するのに十分な条件を、前記反応混合物に適用すること、

ここで、前記ハイブリダイゼーション反応中、前記ハイブリダイゼーション反応増強剤は、前記ハイブリダイゼーション反応増強剤の非存在下で前記標的核酸分子と前記プローブとの間で実行される別のハイブリダイゼーション反応と比較して、前記標的核酸分子と前記標的分子の前記標的配列に対する配列相補性を有する前記プローブとの間の前記ハイブリダイゼーション反応の前記速度を増強する、

を含む、前記方法。

<2> (b) の後に、前記官能基に、前記ハイブリダイゼーション反応増強剤を不活性化するのに十分な条件を適用することをさらに含む、<1>に記載の方法。

<3> 前記ハイブリダイゼーション反応増強剤を不活性化することをさらに含む、<2>に記載の方法。

<4> 酵素反応を開始させることをさらに含み、前記酵素反応は、逆転写、ライゲーション、DNA重合を含む、<3>に記載の方法。

<5> 前記官能基が水和性基である、<1>に記載の方法。

<6> 前記水和性基が、イオン性基、電解質基又は親水性基である、<5>に記載の方法。

<7> 前記ハイブリダイゼーション反応増強剤が、前記ポリマー骨格と前記水和性基との間に切断可能なリンカーを含む、<5>に記載の方法。

<8> 前記切断可能なリンカーが、-ヒドロキシ酸、-ケト酸、ジスルフィド結合、又は他の種類の化学結合を含む、<7>に記載の方法。

<9> 前記官能基が切断可能である、<1>に記載の方法。

<10> 前記官能基の切断を誘起することをさらに含む、<9>に記載の方法。

<11> 前記官能基を洗浄除去することをさらに含む、<10>に記載の方法。

<12> 酵素反応を開始させることをさらに含む、<11>に記載の方法。

<13> 前記ハイブリダイゼーション増強剤が、さらに、前記酵素反応を増強するよう構成されている、<12>に記載の方法。

<14> 前記酵素反応が、逆転写、ライゲーション、DNA重合を含む、<12>に記載の方法。

<15> イオン性基に中性の電荷を持たせることにより、又は水和性基を弱水和状態にすることにより、前記官能基が選択的に不活性化されるよう構成されている、<1>に記載の方法。

<16> 前記細胞又は前記細胞マトリックスがヒドロゲルに組み込まれている、<1>に記載の方法。

<17> 前記反応混合物が緩衝剤をさらに含む、<1>に記載の方法。

<18> 前記緩衝剤が塩を含む、<17>に記載の方法。

<19> 前記緩衝剤が、オフターゲット配列へのプローブの非特異的結合を低減するよう構成されたブロッキング剤を含む、<17>に記載の方法。

<20> 前記緩衝剤が、DNAのアニーリング特性を変化させるよう構成された薬剤を含む、<17>に記載の方法。

<21> 前記ポリマー骨格がイオン性ポリマー骨格である、<1>に記載の方法。

<22> 前記ハイブリダイゼーション増強剤が、ポリイオン性ポリマー、高分子電解質ポリマー、親水性ポリマー又は水和性ポリマーを含む、<21>に記載の方法。

<23> 細胞の1又は複数の標的核酸分子のin situ核酸配列検出用又は同定用のプローブセットであって、

前記プローブセットは、複数の標的特異的配列、複数のアダプター配列及び複数のバー

コード配列を含む複数のプローブを含み、

前記複数のプローブのうちの1つであるプローブは、(i)前記細胞の前記1又は複数の標的核酸分子のうちの1つである標的核酸分子の標的配列に相補的な前記複数の標的特異的配列のうちの1つである配列；(ii)前記配列に連結し、前記複数のアダプター配列のうちの1つであるアダプター配列、ここで、前記アダプター配列は増幅反応用のプライマー用の結合部位を含む；及び、(iii)前記アダプター配列に連結し、前記複数のバーコード配列のうちの1つであるバーコード配列、ここで、前記バーコード配列は前記標的配列又は前記標的核酸分子の前記少なくとも前記一部の検出又は同定を可能にするよう構成されており、前記複数のバーコード配列は前記複数のプローブの間で異なっている；

を含む、前記プローブセット。

<24> 前記バーコード配列が、特定の遺伝子に対応する遺伝子バーコードを含み、前記遺伝子バーコードが、特定の遺伝子の検出を可能にするように構成された、<23>に記載のプローブセット。

<25> 前記バーコード配列が、標的領域に相補的な配列に対応する配列バーコードをさらに含み、

前記配列バーコードが、前記配列の検出を可能にするように構成されている、<24>に記載のプローブセット。

<26> 前記遺伝子バーコードが、前記バーコード配列の第一の配列集合によって規定され、

前記配列バーコードが、前記バーコード配列の残りの配列集合によって規定される、<25>に記載のプローブセット。

<27> 前記複数のバーコード配列が、種々の標的核酸分子の種々の標的配列の同定を可能にする、<23>に記載のプローブセット。

<28> 前記複数のアダプター配列が前記複数のプローブの間で同じである、<23>に記載のプローブセット。

<29> 前記アダプター配列が、前記増幅反応を実行するためのプライマーに相補的である、<23>に記載のプローブセット。

<30> 前記増幅反応がローリングサークル増幅(RCA)反応である、<29>に記載のプローブセット。

<31> 前記複数のバーコード配列のうちの1つのバーコード配列が、前記1つの標的領域の所定の配列の同定を可能にする、<23>に記載のプローブセット。

<32> 前記1つのアダプター配列が、前記核酸分子に相補的な1つの配列と前記バーコードとの間に位置する、<23>に記載のプローブセット。

<33> 前記1つのバーコード配列が、前記複数の標的特異的配列のうちの前記1つの配列と前記1つのアダプター配列との間に位置する、<23>に記載のプローブセット。

<34> 前記標的核酸分子が、リボ核酸(RNA)であり、

前記複数の配列のうちの前記1つの配列が、逆転写をプライミングするように構成された、<23>に記載のプローブセット。

<35> 前記複数の標的特異的配列のうちの前記1つ配列が各プローブの3'末端に位置する、<34>に記載のプローブセット。

<36> 前記複数の標的特異的配列のうちの前記1つの配列、前記アダプター配列、及び前記バーコード配列が前記1つのプローブの3'末端から5'末端へ向かって連続して配置されている、<35>に記載のプローブセット。

<37> 前記1つのプローブの5'末端がリン酸化されている、<23>に記載のプローブセット。

<38> 前記1つのプローブを核酸配列にハイブリダイズしてハイブリダイゼーション産物を生成すること、及び前記ハイブリダイゼーション産物を環状化すること、及び増幅反応を介して前記プローブライブラリを作製すること、を含む、<23>に記載の所定のプローブを用いたin situ核酸検出のためのプローブライブラリを作製する方法。

< 3 9 > ハイブリダイゼーション産物を環状化することが、前記プローブが前記核酸配列にアニールしているときにリガーゼにより環状化することを含む、< 3 8 >に記載の方法。

< 4 0 > 前記ハイブリダイゼーション産物を環状化することが、前記核酸配列と独立した追加のスプリントオリゴヌクレオチドを用いてリガーゼにより環状化することを含む、< 3 8 >に記載の方法。

< 4 1 > 前記ハイブリダイゼーション産物を環状化することが、逆転写酵素、DNAポリメラーゼ、又はリガーゼの補助により前記プローブにおけるギャップを充填することを含む、< 3 8 >に記載の方法。

< 4 2 > 前記核酸配列が、リボ核酸(RNA)配列又は相補的デオキシリボ核酸(cDNA)配列である、< 3 8 >に記載の方法。

< 4 3 > 前記核酸配列がデオキシリボ核酸(DNA)配列である、< 3 8 >に記載の方法。

< 4 4 > 前記複数のプローブが直鎖状プローブである、< 2 3 >に記載のプローブセット。

< 4 5 > 前記複数のプローブが環状プローブである、< 2 3 >に記載のプローブセット。

< 4 6 > 前記複数のプローブが分子反転プローブを含む、< 2 3 >に記載のプローブセット。

< 4 7 > 前記複数のプローブがパドロックプローブを含む、< 2 3 >に記載のプローブセット。

< 4 8 > 前記複数のプローブのうちの前記1つのプローブがプロセシング部位をさらに含む、< 2 3 >に記載のプローブセット。

< 4 9 > 前記プロセシング部位が追加の增幅領域を含む、< 4 8 >に記載のプローブセット。

< 5 0 > 前記追加の增幅領域がポリメラーゼ連鎖反応(PCR)プライマー配列を含む、< 4 9 >に記載のプローブセット。

< 5 1 > 前記プロセシング部位が追加の切断部位を含む、< 4 8 >に記載のプローブセット。

< 5 2 > 前記追加の切断部位を介して追加の增幅領域を切断除去することを含む、< 5 1 >に記載の複数のプローブを成熟させる方法。

< 5 3 > 前記複数のプローブのうちの前記1つのプローブが、環状化されるのに十分な長さを有する、< 2 3 >に記載のプローブセット。

< 5 4 > 前記十分な長さが35ヌクレオチド長以上である、< 5 3 >に記載のプローブセット。

< 5 5 > < 2 3 >に記載の複数のプローブのうちの前記1つのプローブを核酸配列にハイブリダイズさせること、及び

前記配列を枯渇させること、

を含む、< 2 3 >に記載の複数のプローブのうちの前記1つのプローブを用いて標的配列を枯渇させる方法。

< 5 6 > 前記枯渇がリボヌクレアーゼH消化を介して行われる、< 5 5 >に記載の方法。

< 5 7 > 前記枯渇がCas9又は他のタンパク質核酸複合体を介して行われる、< 5 5 >に記載の方法セット。

< 5 8 > 細胞の1又は複数の標的核酸分子をin situ核酸配列検出又は同定するための方法であって、

(a) 前記1又は複数の標的核酸分子及び複数のプローブを含む反応混合物を準備することであって、前記複数のプローブは複数の標的特異的配列、複数のアダプター配列及び複数のバーコード配列を含み、前記複数のプローブのうちの1つであるプローブは、(i)前記1又は複数の標的核酸分子のうちの1つである標的核酸分子の標的配列に相補的な

前記複数の標的特異的配列のうちの1つである配列；(i i)前記配列に連結し、前記複数のアダプター配列のうちの1つであるアダプター配列、ここで、前記アダプター配列は前記1つの配列が前記標的配列にハイブリダイズしたときに前記1つのプローブ上で増幅反応を行うためのものである；及び、(i i i)前記アダプター配列に連結し、前記複数のバーコード配列のうちの1つであるバーコード配列、ここで、前記バーコード配列は前記標的配列又は前記標的核酸分子の前記少なくとも前記一部の検出又は同定を可能にするように構成されており、前記複数のバーコード配列は前記複数のプローブの間で異なっている、前記バーコード配列、を含む、前記準備すること；

(b)前記反応混合物に、前記1つの配列を前記標的配列にハイブリダイズさせるのに十分な条件を適用すること；並びに

(c)前記バーコードを用いて、前記標的配列又は前記標的核酸分子の前記少なくとも前記一部を検出又は同定すること、
を含む、前記方法。

<59> (c)の前に、前記1つの配列が前記標的配列にハイブリダイズしたときに、前記1つのプローブに対して前記増幅反応を行うことをさらに含む、<58>に記載の方法。

<60> 前記標的核酸分子がリボ核酸分子であり、

(b)が、前記1つの配列に対して逆転写増幅を行うことで、前記1つのプローブの増幅産物として相補的デオキシリボ核酸分子を得るのに十分な条件を、前記1つの配列に適用することをさらに含む、<58>に記載の方法。

<61> 前記バーコード配列が、特定の遺伝子に対応する遺伝子バーコードを含み、前記遺伝子バーコードが、前記特定の遺伝子の検出を可能にするように構成された、<58>に記載の方法。

<62> 前記バーコード配列が、標的領域に相補的な1つの配列に対応する配列バーコードをさらに含み、

前記配列バーコードが、前記1つの配列の検出を可能にするように構成されている、<61>に記載の方法。

<63> 前記遺伝子バーコードが、前記バーコード配列の第一の配列集合によって規定され、前記配列バーコードが前記バーコード配列の残りの配列集合によって規定される、<62>に記載の方法。

<64> 標的核酸配列検出用の核酸配列ライブラリを作製する方法であって、一群の標的核酸配列を同定すること；

前記一群の標的核酸配列を標的とする複数の直鎖状プローブを設計すること；

前記複数の直鎖状プローブを前記標的核酸配列にハイブリダイズすること；

前記複数の直鎖状プローブを環状化すること；及び

蛍光in situ配列決定(FISHSEQ)で前記標的核酸配列を検出すること、
を含む、前記方法。

<65> 前記プローブが、核酸、DNAトランスポザーゼ、又はCas9を含むプローブ複合体である、<64>に記載の方法。

<66> 前記複数の直鎖状プローブが酵素によって環状化される、<64>に記載の方法。

<67> 前記酵素がリガーゼを含む、<66>に記載の方法。

<68> 環状化前の前記プローブに塩基を組み込むために、前記酵素が逆転写酵素、ポリメラーゼ、又はその両方をさらに含む、<67>に記載の方法。

<69> 前記複数の環状化プローブを増幅することをさらに含む、<64>に記載の方法。

<70> 前記複数の環状化プローブがローリングサークル増幅によって増幅される、<69>に記載の方法。

<71> 前記複数のプローブの各々がアダプター配列を含む、<64>に記載の方法。

<72> 前記複数のプローブの各々がバーコード配列をさらに含む、<71>に記載の

方法。

< 7 3 > 前記複数のプローブがDNAマイクロアレイによって合成される、< 6 4 >に記載の方法。

< 7 4 > 前記複数のプローブが、クラウディング剤の存在下で標的核酸配列にハイブリダイズされる、< 6 4 >に記載の方法。

< 7 5 > 前記配列決定が、合成による配列決定(SBS)、ライゲーションによる配列決定(SBL)、又はハイブリダイゼーションによる配列決定(SBH)である、< 6 4 >に記載の方法。

< 7 6 > 前記標的核酸がリボ核酸又はデオキシリボ核酸を含む、< 6 4 >に記載の方法。

。

< 7 7 > 前記デオキシ核酸が二本鎖デオキシ核酸である、< 7 6 >に記載の方法。

< 7 8 > 前記二本鎖デオキシ核酸が、熱融解又は酵素消化によって一本鎖デオキシ核酸に変換される、< 7 7 >に記載の方法。

< 7 9 > 前記複数のプローブが核酸アナログを含む、< 6 4 >に記載の方法。

< 8 0 > 前記核酸アナログがロックド核酸(LNA)を含む、< 7 9 >に記載の方法。

< 8 1 > 標的核酸配列検出用の核酸配列ライプラリを作製する方法であって、検出用の一群の標的核酸配列を同定すること；

前記一群の標的核酸配列から配列部分を含む参照配列データベースを作成すること；

前記参照配列データベースから候補配列部分を選択すること；

所定の判定基準に従って前記候補配列部分をスコア付けすることを含む、前記核酸配列ライプラリを計算により設計すること；

前記核酸配列ライプラリを合成すること；

前記核酸配列ライプラリを増幅すること；

前記核酸配列ライプラリを精製すること；及び

前記核酸配列ライプラリを標的核酸配列検出について検証すること、ここで、前記標的核酸配列検出は蛍光in situ配列決定(FISHSEQ)によるものである；を含む、前記方法。

< 8 2 > 前記核酸配列ライプラリが、前記標的核酸配列の前記候補配列部分に相補的な配列部分を含む、< 8 1 >に記載の方法。

< 8 3 > 前記核酸配列ライプラリがアダプター配列をさらに含む、< 8 2 >に記載の方法。

< 8 4 > 前記核酸配列ライプラリがバーコード配列をさらに含む、< 8 3 >に記載の方法。

< 8 5 > 前記核酸配列ライプラリが1種又は複数種のタンパク質と複合化される、< 8 1 >に記載の方法。

< 8 6 > 前記核酸配列ライプラリがDNAマイクロアレイ上で合成される、< 8 1 >に記載の方法。

< 8 7 > 前記核酸配列ライプラリが、ガイドRNAをFISHSEQ検出するための複合型CRISPR酵素となるガイドRNAを含み、前記ガイドRNAの各々がアダプター配列を含む、< 8 6 >に記載の方法。

< 8 8 > 前記核酸配列の検証が、合成による配列決定(SBS)、ライゲーションによる配列決定(SBL)、又はハイブリダイゼーションによる配列決定(SBH)によるものである、< 8 1 >に記載の方法。

< 8 9 > 標的核酸配列検出が、合成による配列決定(SBS)、ライゲーションによる配列決定(SBL)、又はハイブリダイゼーションによる配列決定(SBH)によるものである、< 8 1 >に記載の方法。

< 9 0 > 前記核酸配列ライプラリが、検出のために前記一群の標的核酸配列にin situでハイブリダイズされる、< 8 1 >に記載の方法。

< 9 1 > 前記核酸配列ライプラリと前記一群の標的核酸配列との間のハイブリダイゼーションの酵素適合性増強のためのクラウディング剤が含まれる、< 9 0 >に記載の方法。

< 9 2 > 前記標的核酸配列にハイブリダイズした核酸配列ライプラリを環状化することをさらに含む、< 9 1 >に記載の方法。

< 9 3 > 前記核酸配列ライプラリが酵素によって環状化される、< 9 2 >に記載の方法。

。

< 9 4 > 前記酵素がリガーゼを含む、< 9 3 >に記載の方法。

< 9 5 > 前記酵素が、逆転写酵素、ポリメラーゼ、又はその両方をさらに含む、< 9 4 >に記載の方法。

< 9 6 > 前記核酸配列ライプラリは、スプリントオリゴヌクレオチドにハイブリダイズすると環状化される、< 9 2 >に記載の方法。

< 9 7 > 前記環状化核酸配列ライプラリが、ローリングサークル増幅によって増幅される、< 9 2 >に記載の方法。

< 9 8 > 前記標的核酸がリボ核酸又はデオキシリボ核酸を含む、< 8 1 >に記載の方法。

。

< 9 9 > 前記デオキシ核酸が二本鎖デオキシ核酸である、< 9 8 >に記載の方法。

< 1 0 0 > 前記二本鎖デオキシ核酸が、熱融解又は酵素消化によって一本鎖デオキシ核酸に変換される、< 9 9 >に記載の方法。

< 1 0 1 > 前記核酸配列ライプラリが核酸アナログを含む、< 8 1 >に記載の方法。

< 1 0 2 > 前記核酸アナログがロックド核酸（LNA）を含む、< 1 0 > 1に記載の方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

細胞の1又は複数の標的核酸分子を in situ 核酸配列検出又は同定するための方法であって、

(a) 前記1又は複数の標的核酸分子及び複数のプローブを含む反応混合物を含む前記細胞を準備することであって、前記複数のプローブは複数の標的特異的配列、複数のアダプター配列及び複数のバーコード配列を含み、前記複数のプローブのうちの1つであるプローブは、(i) 前記1又は複数の標的核酸分子のうちの1つである標的核酸分子の標的配列に相補的な、前記複数の標的特異的配列のうちの1つである標的特異的配列；(ii) 前記標的特異的配列に連結し、前記複数のアダプター配列のうちの1つであるアダプター配列、ここで、前記アダプター配列は前記1つの標的特異的配列が前記標的配列にハイブリダイズしたときに前記1つのプローブ上で増幅反応を行うためのものである；及び、(iii) 前記アダプター配列に連結し、前記複数のバーコード配列のうちの1つであるバーコード配列、ここで、前記バーコード配列は前記標的配列又は前記標的核酸分子の少なくとも一部の検出又は同定を可能にするように構成されており、前記複数のバーコード配列は前記複数のプローブの間で異なっている；を含む。

(b) 前記細胞において、前記反応混合物に、前記1つの標的特異的配列を前記標的配列にハイブリダイズさせるのに十分な条件を適用すること、並びに

(c) 前記バーコード配列を用いて、前記標的配列又は前記標的核酸分子の前記少なくとも一部を検出又は同定すること、
を含む、前記方法。

【請求項2】

前記細胞が固定されている、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記細胞がヒドロゲルに組み込まれている、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

前記標的核酸分子がリボ核酸分子であり、

(b)が、前記1つの配列に対して逆転写を行うことで相補的デオキシリボ核酸分子を得るのに十分な条件を、前記1つの配列に適用することをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記複数のバーコード配列が、前記1又は複数の標的核酸分子に含まれる種々の標的核酸分子の種々の標的配列の同定を可能にする、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

前記複数のアダプター配列が前記複数のプローブの間で同じである配列を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項7】

前記アダプター配列が、前記増幅反応を実行するためのプライマーに相補的である、請求項1に記載の方法。

【請求項8】

(c)の前に、前記プライマーを前記アダプター配列に結合することをさらに含む、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

(c)の前に、前記1つの標的特異的配列が前記標的配列にハイブリダイズしたときに、前記1つのプローブに対して前記増幅反応を行うことをさらに含む、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

前記1つのプローブが環状プローブである、請求項1に記載の方法。

【請求項11】

前記標的特異的配列、前記アダプター配列、及び前記バーコード配列が前記1つのプローブの3'末端から5'末端へ向かって連続して配置されている、請求項1に記載の方法。

【請求項12】

前記1つのプローブを環状化することをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項13】

前記環状化することが、前記プローブの前記標的特異的配列が前記標的配列にハイブリダイズしたときに、前記プローブの3'末端と前記プローブの5'末端をライゲーションすることを含む、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記環状化することが、リガーゼ及び前記標的核酸分子と独立したスプリントオリゴヌクレオチドを用いて、前記3'末端と前記5'末端をライゲーションすることを含む、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記環状化することが、逆転写酵素又はポリメラーゼの補助により、前記プローブの前記3'末端を伸長させて伸長産物を得ること、及び前記伸長産物の末端同士をライゲーションすることを含む、請求項13に記載の方法。

【請求項16】

前記反応混合物が複数の核酸結合タンパク質をさらに含み、ここで、前記複数の核酸結合タンパク質は、前記複数のプローブの前記1又は複数の標的核酸分子への結合を仲介する、請求項1に記載の方法。

【請求項17】

前記反応混合物が、前記標的核酸分子と前記プローブとの間のハイブリダイゼーション反応の速度を増強するハイブリダイゼーション反応増強剤をさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項18】

(b)の後に、前記ハイブリダイゼーション反応増強剤を前記細胞から除去することを

さらに含む、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 19】

細胞又は細胞マトリックスにおけるハイブリダイゼーション反応を増強するための方法であって、

(a) 前記細胞又は前記細胞マトリックス、及び反応混合物を準備すること、

ここで、前記反応混合物は、(i) 標的核酸分子、(i i) 前記標的核酸分子の標的配列に対する配列相補性を有するプローブ、及び(i i i) ポリマー骨格を含むハイブリダイゼーション反応増強剤を含み、前記ハイブリダイゼーション反応増強剤は、前記標的核酸分子と前記標的核酸分子の前記標的配列に対する配列相補性を有する前記プローブとの間のハイブリダイゼーション反応の速度を増強する；

(b) 前記標的核酸分子と前記標的核酸分子の前記標的配列に対する配列相補性を有する前記プローブとの間の前記ハイブリダイゼーション反応を実行するのに十分な条件を、前記反応混合物に適用すること、

ここで、前記ハイブリダイゼーション反応中、前記ハイブリダイゼーション反応増強剤は、前記標的核酸分子と前記標的分子の前記標的配列に対する配列相補性を有する前記プローブとの間の前記ハイブリダイゼーション反応を促進する；並びに

(c) 前記細胞又は前記細胞マトリックスから前記ハイブリダイゼーション反応増強剤を除去すること、

を含む、前記方法。

【請求項 20】

(c) における除去することが、前記細胞又は前記細胞マトリックスから前記ハイブリダイゼーション反応増強剤を洗浄除去することを含む、請求項 1 9 に記載の方法。