

【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 1 年 10 月 31 日 (2019.10.31)

【公表番号】特表 2018-516541 (P2018-516541A)  
 【公表日】平成 30 年 6 月 28 日 (2018.6.28)  
 【年通号数】公開・登録公報 2018-024  
 【出願番号】特願 2017-554045 (P2017-554045)  
 【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/68 (2018.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/68 Z N A A

C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】  
 【提出日】令和 1 年 9 月 20 日 (2019.9.20)  
 【手続補正 1】  
 【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】

組織試料内の核酸を空間的に検出する方法であって、

(a) 前記試料内の少なくとも 1 つの関心領域 (R O I) を同定するステップと、  
 (b) 少なくとも 1 つの種のオリゴヌクレオチドプローブを、前記 R O I 内の既定の位置の上に加え、さらに、前記オリゴヌクレオチドプローブが前記試料の前記核酸に結合するのを可能にするステップであり、それぞれの種の前記オリゴヌクレオチドプローブは独特なバーコード配列を含む、ステップと、  
 (c) 核酸 - オリゴヌクレオチドプローブの複合体を抽出するステップと、  
 (d) 抽出された前記核酸の分子を配列決定するステップと、  
 (e) 前記オリゴヌクレオチドプローブの 1 つ又は複数の前記バーコード配列を包含する配列決定された前記核酸の分子を、前記 1 つ又は複数のバーコード配列に基づき、前記 R O I 内の対応する標的核酸分子の最初の位置に関連づけて、前記標的核酸分子の空間分布を生成するステップであり、各位置が、ステップ (b) において結合する 1 つ又は複数の種のオリゴヌクレオチドプローブによって同定される、ステップと、  
 を含む方法。

【請求項 2】

ステップ (d) に先立ち、DNA 分子が、DNA 増幅を介して前記核酸 - オリゴヌクレオチドプローブの複合体から生成される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 DNA 分子の生成は、逆転写反応の後で生じる、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

ステップ (b) において、前記試料の核酸に対する前記オリゴヌクレオチドプローブの結合は、ハイブリダイゼーションを介して生じ、さらに、前記オリゴヌクレオチドプローブは、プライマーとして使用される、請求項 2 又は 3 に記載の方法。

【請求項 5】

ステップ (b) において、前記試料の核酸に対する前記オリゴヌクレオチドプローブの結合は、ライゲーションを介して生じる、請求項 1 乃至 3 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 6】**

ステップ ( e ) は、前記標的核酸分子の空間分布を、ステップ ( b ) の前又は後に得られた前記 R O I の画像又は前記 R O I が同定された前記組織試料の画像に関連づけるステップをさらに含む、請求項 1 乃至 5 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 7】**

二次元の空間マップを提供して前記標的核酸分子の空間分布を可視化するステップをさらに含む、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記二次元の空間マップを、ステップ ( b ) の前又は後に得られた前記 R O I の画像又は前記 R O I が同定された前記組織試料の画像でオーバーレイするステップをさらに含む、請求項 7 に記載の方法。

**【請求項 9】**

ステップ ( b ) において、少なくとも 2 つの異なる種のオリゴヌクレオチドプローブが 1 つの標的核酸分子に結合され、さらに、前記少なくとも 2 つの異なる種のオリゴヌクレオチドプローブの独特な組み合わせが、前記 R O I 内の前記標的核酸分子の位置を同定するために使用される、請求項 1 乃至 8 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 10】**

1 つの核酸分子に結合する前記オリゴヌクレオチドプローブの種のうち少なくとも 1 つが一般配列を含み、任意選択で、前記一般配列は前記標的核酸に相補的である、請求項 1 乃至 9 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 11】**

1 つの核酸分子に結合する前記オリゴヌクレオチドプローブの種のうち少なくとも 1 つが追加的配列を含み、前記追加的配列は、精製配列又はプライマーアライメント配列である、請求項 1 乃至 10 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 12】**

前記既定の位置は、セパレーションマスクによって画定される、請求項 1 乃至 11 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 13】**

前記セパレーションマスクは、任意選択で前記試料の上に印刷されるトップセパレーションマスクであるか、又は、フルセパレーションマスクであり、前記セパレーションマスクは、格子のセパレーションマスク、自由形状のセパレーションマスク又はその組み合わせである、請求項 12 に記載の方法。

**【請求項 14】**

ステップ ( b ) において、加えられる前記オリゴヌクレオチドプローブが異なる既定の位置間で混合しないように、前記オリゴヌクレオチドプローブは、液体移送技術によって、好ましくは、コンタクトプリント技術又はノンコンタクトプリント技術によって、前記既定の位置の上に加えられる、請求項 1 乃至 13 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 15】**

前記試料は、病理組織学的検体、好ましくは、脱パラフィンされたホルマリン固定パラフィン包埋 ( F F P E ) 試料、新鮮凍結 ( F F ) 試料若しくは新鮮試料、又は、細胞学的試料である、請求項 1 乃至 14 のいずれか一項に記載の方法。