

【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 7 年 7 月 1 日(2025.7.1)

【公開番号】特開 2023-4952(P2023-4952A)

【公開日】令和 5 年 1 月 17 日(2023.1.17)

【年通号数】公開公報(特許)2023-009

【出願番号】特願 2022-101003(P2022-101003)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/6869(2018.01)

C 1 2 Q 1/6816(2018.01)

C 1 2 Q 1/686(2018.01)

C 1 2 N 15/12(2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/6869 Z

C 1 2 Q 1/6816 Z Z N A

C 1 2 Q 1/686 Z

C 1 2 N 15/12

10

【手続補正書】

【提出日】令和 7 年 6 月 20 日(2025.6.20)

【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】

サンプル中の RNA または cDNA 鎖((006))の少なくとも一部の空間位置および配列情報を得るための方法であって、

30

a. 5 ~ 100 個のヌクレオチドを含むブリッジオリゴヌクレオチド(205)に部分的にハイブリダイズされ、オリゴヌクレオチドに結合可能なギャップ領域(206)が形成される、50 ~ 1000 個のヌクレオチドを含む第 1 の検出プローブオリゴヌクレオチド(204)を、その 3' および/または 5' 末端で、少なくとも 1 つの前記 RNA または cDNA 鎖の相補的部分にハイブリダイズさせる工程と、

b. 4 ~ 20 個のヌクレオチドを含み、前記サンプル中の前記 RNA または cDNA 鎖の前記空間情報を決定する、1 ~ 16 個のバーコードオリゴヌクレオチドで、前記ギャップ領域(206)を部分的に充填する工程と、

c. 50 ~ 1000 個のヌクレオチドを含む第 2 の検出プローブオリゴヌクレオチド(204')を、その 3' および/または 5' 末端で、同じまたは cDNA 鎖の前記相補的部分に部分的にハイブリダイズさせかつそれぞれ他端で前記ブリッジオリゴヌクレオチド(205)に部分的にハイブリダイズさせて、環状テンプレートを形成する工程と、

d. 前記環状テンプレートを、複数のコンカテマーを含むロロニー内でローリングサークル増幅可能なポリメラーゼにより増幅する工程と、

e. 前記ロロニーのヌクレオチド配列を決定する工程とを含む、方法。

【請求項 2】

サンプル中の RNA または cDNA 鎖((006))の少なくとも一部の空間位置および配列情報を得るための方法であって、

f. それぞれ 50 ~ 1000 個のヌクレオチドを含む第 1 のオリゴヌクレオチド(20

50

4) および第2のオリゴヌクレオチド(204')を含み、これらが5~100個のヌクレオチドを含む部分的にハイブリダイズされたブリッジオリゴヌクレオチド(205)により連結され、前記第1のオリゴヌクレオチド(204)と前記第2のオリゴヌクレオチド(204')との間にブリッジギャップ領域(206)が形成される、検出プローブオリゴヌクレオチドの3'および5'末端を、前記少なくとも1つのRNAまたはcDNA鎖の前記相補的部分にハイブリダイズさせる工程と、

g. 4~20個のヌクレオチドを含み、前記サンプル中の前記RNAまたはcDNAの前記空間情報を決定する、1~16個のバーコードオリゴヌクレオチドで、前記ブリッジギャップ領域(206)を充填して、環状テンプレートを形成する工程と、

h. 前記環状テンプレートを、複数のコンカテマーを含むロロニー内でローリングサークル増幅可能なポリメラーゼにより増幅する工程と、 10

i. 前記ロロニーの前記ヌクレオチド配列を決定する工程とを含む、方法。

#### 【請求項3】

前記検出プローブオリゴヌクレオチドが、それぞれ50~1000個のヌクレオチドを含む第1の検出プローブオリゴヌクレオチド(204)および第2の検出プローブオリゴヌクレオチド(204')を、それぞれの3'および5'末端で、前記少なくとも1つのRNAまたはcDNA鎖の相補的部分にハイブリダイズさせ、続いて、前記第1(204)と第2のオリゴヌクレオチド(204')とを、前記ブリッジオリゴヌクレオチド(205)に部分的にハイブリダイズさせて連結させることにより、前記少なくとも1つのRNAまたはcDNA鎖にハイブリダイズされることを特徴とする、請求項2記載の方法。 20

#### 【請求項4】

前記検出プローブオリゴヌクレオチドが、

第1のオリゴヌクレオチド(204)を第2のオリゴヌクレオチド(204')にライゲーションし、ついで、得られたオリゴヌクレオチドを前記少なくとも1つのRNAまたはcDNA鎖の前記相補的部分にハイブリダイズさせ、続いて、前記得られたオリゴヌクレオチドの未結合末端を前記ブリッジオリゴヌクレオチド(205)に部分的にハイブリダイズさせて連結させる

ことにより、前記少なくとも1つのRNAまたはcDNA鎖にハイブリダイズされることを特徴とする、請求項2記載の方法。 30

#### 【請求項5】

前記検出プローブオリゴヌクレオチドが前記少なくとも1つのRNAまたはcDNA鎖の前記相補的部分にハイブリダイズされ、これにより、前記検出プローブオリゴヌクレオチドの前記第1のオリゴヌクレオチド(204)と前記第2のオリゴヌクレオチド(204')との間に1~150個のヌクレオチドのギャップ(207')が形成されることを特徴とする、請求項1または2記載の方法。

#### 【請求項6】

前記ギャップ(207')が前記少なくとも1つのRNAまたはcDNA鎖の隣接部分に相補的なヌクレオチドで充填され、これにより、第1の標的配列(207)が得られることを特徴とする、請求項5記載の方法。 40

#### 【請求項7】

前記少なくとも1つのRNAまたはcDNAにハイブリダイズされた前記第1および/または第2のオリゴヌクレオチドの一部を使用して、第2の標的配列を得ることを特徴とする、請求項1または2記載の方法。

#### 【請求項8】

前記サンプル中の前記環状テンプレートの前記空間情報が、前記第1および/または第2の標的配列に連結されることを特徴とする、請求項7記載の方法。

#### 【請求項9】

前記ブリッジギャップ領域(206)が、ハイブリダイズ後に光で前記光開裂性保護基を除去して、同じかまたは異なる光開裂性保護基を含むバーコードオリゴヌクレオチドを 50

前記ブリッジオリゴヌクレオチド（２０５）の相補的部分にハイブリダイズさせることにより、少なくとも部分的に充填されることを特徴とする、請求項１または２記載の方法。

【請求項１０】

前記環状テンプレートが、ローリングサークル増幅ポリメラーゼについてのプライミング部位として、バーコードオリゴヌクレオチドのうちの１つに相補的なプライマーオリゴヌクレオチドを提供する（ハイブリダイズさせる）ことにより選択的に増殖されることを特徴とする、請求項１または２記載の方法。

【請求項１１】

前記サンプルが、表面に固定され、透過処理されることを特徴とする、請求項１または２記載の方法。

10

【請求項１２】

前記サンプルが組織として提供され、一本鎖環状テンプレートが、前記サンプルから単離され、ローリングサークル増幅により *ex situ* で複製されることを特徴とする、請求項１または２記載の方法。

【請求項１３】

前記サンプルが組織として提供され、一本鎖環状テンプレートが、ローリングサークル増幅により前記組織上に複製されることを特徴とする、請求項１または２記載の方法。

20

30

40

50