

【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 12 Q 1/6869(2018.01)

10

C 12 Q 1/6816(2018.01)

C 12 Q 1/686(2018.01)

C 12 N 15/12(2006.01)

【F I】

C 12 Q 1/6869 Z

C 12 Q 1/6816 ZZNA

C 12 Q 1/686 Z

C 12 N 15/12

【手続補正書】

20

【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40分に部分的にハイブリダイズさせかつそれぞれの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カル增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(2 0 4 ')を含み、これらが 5 ~ 1 0 0 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プリッジオリゴヌクレオチド(2 0 5)により連結され、前記第 1 のオリゴヌクレオチド(2 0 4)と前記第 2 のオリゴヌクレオチド(2 0 4 ')との間にプリッジギャップ領域(2 0 6)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 R N A または c D N A 鎮の前記相補的部分にハイブリダイズさせる工程と、

g . 4 ~ 2 0 個のヌクレオチドを含み、前記サンプル中の前記 R N A または c D N A の前記空間情報を決定する、1 ~ 1 6 個のバーコードオリゴヌクレオチドで、前記プリッジギャップ領域(2 0 6)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 5 0 ~ 1 0 0 0 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(2 0 4)および第 2 の検出プローブオリゴヌクレオチド(2 0 4 ')を、それぞれの 3 ' および 5 ' 末端で、前記少なくとも 1 つの R N A または c D N A 鎮の相補的部分にハイブリダイズさせ、続いて、前記第 1 (2 0 4)と第 2 のオリゴヌクレオチド(2 0 4 ')とを、前記プリッジオリゴヌクレオチド(2 0 5)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 R N A または c D N A 鎮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(2 0 4)を第 2 のオリゴヌクレオチド(2 0 4 ')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 R N A または c D N A 鎮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プリッジオリゴヌクレオチド(2 0 5)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 R N A または c D N A 鎮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 R N A または c D N A 鎮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(2 0 4)と前記第 2 のオリゴヌクレオチド(2 0 4 ')との間に 1 ~ 1 5 0 個のヌクレオチドのギャップ(2 0 7 ')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(2 0 7 ')が前記少なくとも 1 つの R N A または c D N A 鎮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(2 0 7)が得られることを特徴とする、請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

前記少なくとも 1 つの R N A または c D N A 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。 40

【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を、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】

前記プリッジギャップ領域(2 0 6)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

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