

【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】平成24年9月6日(2012.9.6)

【公表番号】特表2011-528554(P2011-528554A)

【公表日】平成23年11月24日(2011.11.24)

【年通号数】公開・登録公報2011-047

【出願番号】特願2011-518950(P2011-518950)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 Q 1/68 A

【手続補正書】

【提出日】平成24年7月17日(2012.7.17)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 1 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 1 2】

本発明はさらに、単離された核酸と、本明細書に開示された新規なプローブおよびプライマーセットの様々な組み合わせとを含む試薬混合物を企図している。一実施形態では、試薬混合物は、単離された核酸；各々がフォワードプライマーおよびリバースプライマーを含む、R H D 遺伝子の 3 個以上のエクソンを増幅するための 3 種以上のプライマーセット；および 3 種以上の標識プローブを含む。別の実施形態では、試薬混合物は、単離された核酸；R H D 遺伝子の 4 個のエクソンを増幅するための 4 種のプライマーセット；および 4 種の標識プローブを含む。プライマーセットおよび標識プローブは好ましくは、ヒト R H D 遺伝子のエクソン 4、エクソン 5、エクソン 7 およびエクソン 10 から選択される 3 個以上のエクソンにハイブリダイズする。

したがって、本発明は、以下の項目を提供する：

(項目 1)

配列番号 1、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 17、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 22 および配列番号 23 からなる群より選択される配列を含む単離されたポリヌクレオチドであって、上記単離されたポリヌクレオチドが 50 未満の塩基を含む、単離されたポリヌクレオチド。

(項目 2)

上記ポリヌクレオチドがヒト R H D 遺伝子のエクソンにハイブリダイズする、項目 1 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

(項目 3)

配列番号 3、配列番号 6、配列番号 9、配列番号 12、配列番号 15、配列番号 18、配列番号 21 および配列番号 24 からなる群より選択される配列を含む単離されたポリヌクレオチドであって、上記単離されたポリヌクレオチドが 50 未満の塩基を含む、単離されたポリヌクレオチド。

(項目 4)

レポーター分子が上記ポリヌクレオチドの 5' 末端に結合し、クエンチャー分子が上記ポリヌクレオチドの 3' 末端に結合する、項目 3 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

(項目 5)

上記ポリヌクレオチドがヒト R H D 遺伝子のエクソンを検出する、項目 3 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

(項目 6)

配列番号 3 1、配列番号 3 2 または配列番号 3 3 に記載された配列を含む単離されたポリヌクレオチドであって、上記単離されたポリヌクレオチドが 5 0 未満の塩基を含む、単離されたポリヌクレオチド。

(項目 7)

上記ポリヌクレオチドがヒト Y 染色体を検出する、項目 6 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

(項目 8)

フォワードプライマーおよびリバースプライマーを含む少なくとも 1 種のプライマーセット、

少なくとも 1 種の標識プローブ、および

生物学的サンプルにおいて R H D 遺伝子を検出するための、上記少なくとも 1 種のプライマーセットおよび上記少なくとも 1 種のプローブの使用説明書
を含み、上記フォワードプライマーおよび上記リバースプライマーがヒト R H D 遺伝子のエクソンにハイブリダイズする、R h D ジェノタイピングキット。

(項目 9)

上記エクソンがヒト R H D 遺伝子のエクソン 4、エクソン 5、エクソン 7 またはエクソン 1 0 である、項目 8 に記載のキット。

(項目 1 0)

上記エクソンがエクソン 4 である、項目 9 に記載のキット。

(項目 1 1)

上記フォワードプライマーが配列番号 1 または配列番号 4 であり、上記リバースプライマーが配列番号 2 または配列番号 5 である、項目 1 0 に記載のキット。

(項目 1 2)

上記少なくとも 1 種の標識プローブが配列番号 3 または配列番号 6 である、項目 1 0 に記載のキット。

(項目 1 3)

上記エクソンがエクソン 5 である、項目 9 に記載のキット。

(項目 1 4)

上記フォワードプライマーが配列番号 7 または配列番号 1 0 であり、上記リバースプライマーが配列番号 8 または配列番号 1 1 である、項目 1 3 に記載のキット。

(項目 1 5)

上記少なくとも 1 種の標識プローブが配列番号 9 または配列番号 1 2 である、項目 1 3 に記載のキット。

(項目 1 6)

上記エクソンがエクソン 7 である、項目 9 に記載のキット。

(項目 1 7)

上記フォワードプライマーが配列番号 1 3 または配列番号 1 6 であり、上記リバースプライマーが配列番号 1 4 または配列番号 1 7 である、項目 1 6 に記載のキット。

(項目 1 8)

上記少なくとも 1 種の標識プローブが配列番号 1 5 または配列番号 1 8 である、項目 1 6 に記載のキット。

(項目 1 9)

上記エクソンがエクソン 1 0 である、項目 9 に記載のキット。

(項目 2 0)

上記フォワードプライマーが配列番号 1 9 または配列番号 2 2 であり、上記リバースプライマーが配列番号 2 0 または配列番号 2 3 である、項目 1 9 に記載のキット。

(項目 2 1)

上記少なくとも 1 種の標識プローブが配列番号 2 1 または配列番号 2 4 である、項目 1 9 に記載のキット。

(項目 2 2)

上記キットが 2 種以上のプライマーセットおよび 2 種以上の標識プローブを含む、項目 8 に記載のキット。

(項目 2 3)

上記 2 種以上のプライマーセットがヒト R H D 遺伝子の 1 個のエクソンにハイブリダイズする、項目 2 2 に記載のキット。

(項目 2 4)

上記 2 種以上のプライマーセットがヒト R H D 遺伝子の 2 個以上のエクソンにハイブリダイズする、項目 2 2 に記載のキット。

(項目 2 5)

溶解試薬をさらに含む、項目 8 に記載のキット。

(項目 2 6)

上記溶解試薬が S - (2 - グアニジノ - 4 - チアゾイル) - メチル - イソチオ尿素を含む、項目 2 5 に記載のキット。

(項目 2 7)

上記溶解試薬が S - (2 - グアニジノ - 4 - チアゾイル) - メチル - イソチオ尿素、ビタミン E、サポニン、D M S O、トリトン X - 1 0 0 および p H 7 . 2 ~ 7 . 4 の緩衝液を含む、項目 2 6 に記載のキット。

(項目 2 8)

被験体の R h D 遺伝子型を判定する方法であって、上記方法は、

上記被験体由来の 1 つまたは複数の細胞を含む生物学的サンプル中の細胞を溶解させて溶解混合物を形成する工程、

上記溶解混合物から核酸を抽出する工程、および

上記抽出された核酸において R H D 遺伝子の少なくとも 1 個のエクソンを検出する工程を含み、ここで、上記エクソンの有無から上記被験体の R h D 遺伝子型が示される、方法。

(項目 2 9)

上記被験体が胎児である、項目 2 8 に記載の方法。

(項目 3 0)

上記生物学的サンプルが胎児細胞を含む母親の生物学的サンプルである、項目 2 9 に記載の方法。

(項目 3 1)

上記母親の生物学的サンプルが全血サンプルである、項目 3 0 に記載の方法。

(項目 3 2)

上記胎児細胞が母親の細胞よりも優先的に溶解させられる、項目 3 0 に記載の方法。

(項目 3 3)

細胞を溶解させる上記工程が、上記母親の生物学的サンプルを溶解試薬と一定の時間接触させる工程を含み、上記溶解試薬が S - (2 - グアニジノ - 4 - チアゾイル) - メチル - イソチオ尿素を含む、項目 3 2 に記載の方法。

(項目 3 4)

上記溶解試薬が S - (2 - グアニジノ - 4 - チアゾイル) - メチル - イソチオ尿素、ビタミン E、サポニン、トリトン X - 1 0 0、D M S O および p H 7 . 2 ~ 7 . 4 の緩衝液を含む、項目 3 3 に記載の方法。

(項目 3 5)

上記時間が約 1 0 分から約 3 0 分である、項目 3 3 に記載の方法。

(項目 3 6)

R H D 遺伝子の少なくとも 1 個のエクソンの上記検出が、上記少なくとも 1 個のエクソ

ンを 1 種または複数種のプライマーセットで増幅する工程、および上記少なくとも 1 個のエクソンを 1 種または複数種の標識プローブで同定する工程を含む、項目 2 8 に記載の方法。

(項目 3 7)

上記 1 種または複数種のプライマーセットがフォワードプライマーおよびリバースプライマーを含む、項目 3 6 に記載の方法。

(項目 3 8)

上記少なくとも 1 個のエクソンがヒト R H D 遺伝子のエクソン 4、エクソン 5、エクソン 7 またはエクソン 1 0 である、項目 3 7 に記載の方法。

(項目 3 9)

上記少なくとも 1 個のエクソンがエクソン 4 である、項目 3 8 に記載の方法。

(項目 4 0)

上記フォワードプライマーが配列番号 1 または配列番号 4 であり、上記リバースプライマーが配列番号 2 または配列番号 5 である、項目 3 9 に記載の方法。

(項目 4 1)

上記 1 種または複数種の標識プローブが配列番号 3 または配列番号 6 である、項目 3 9 に記載の方法。

(項目 4 2)

上記少なくとも 1 個のエクソンがエクソン 5 である、項目 3 8 に記載の方法。

(項目 4 3)

上記フォワードプライマーが配列番号 7 または配列番号 1 0 であり、上記リバースプライマーが配列番号 8 または配列番号 1 1 である、項目 4 2 に記載の方法。

(項目 4 4)

上記 1 種または複数種の標識プローブが配列番号 9 または配列番号 1 2 である、項目 4 2 に記載の方法。

(項目 4 5)

上記少なくとも 1 個のエクソンがエクソン 7 である、項目 3 8 に記載の方法。

(項目 4 6)

上記フォワードプライマーが配列番号 1 3 または配列番号 1 6 であり、上記リバースプライマーが配列番号 1 4 または配列番号 1 7 である、項目 4 5 に記載の方法。

(項目 4 7)

上記 1 種または複数種の標識プローブが配列番号 1 5 または配列番号 1 8 である、項目 4 5 に記載の方法。

(項目 4 8)

上記少なくとも 1 個のエクソンがエクソン 1 0 である、項目 3 8 に記載の方法。

(項目 4 9)

上記フォワードプライマーが配列番号 1 9 または配列番号 2 2 であり、上記リバースプライマーが配列番号 2 0 または配列番号 2 3 である、項目 4 8 に記載の方法。

(項目 5 0)

上記 1 種または複数種の標識プローブが配列番号 2 1 または配列番号 2 4 である、項目 4 8 に記載の方法。

(項目 5 1)

2 種以上のプライマーセットが上記少なくとも 1 個のエクソンを増幅するために使用され、2 種以上の標識プローブが上記少なくとも 1 個のエクソンを同定するために使用される、項目 3 6 に記載の方法。

(項目 5 2)

上記 2 種以上のプライマーセットがヒト R H D 遺伝子の 1 個のエクソンを増幅する、項目 5 1 に記載の方法。

(項目 5 3)

上記 2 種以上のプライマーセットがヒト R H D 遺伝子の 2 個以上のエクソンを増幅する

、項目 5 1 に記載の方法。

(項目 5 4)

上記抽出された核酸において胎児 DNA の存在を確認する工程をさらに含む、項目 3 2 に記載の方法。

(項目 5 5)

胎児 DNA の存在を確認する上記工程が Y 染色体を検出する工程を含む、項目 5 4 に記載の方法。

(項目 5 6)

上記 Y 染色体が、フォワードプライマーおよびリバースプライマーを含む 1 種または複数種のプライマーセットで上記 Y 染色体上にある遺伝子を増幅する工程、および、上記遺伝子を 1 種または複数種の標識プローブで同定する工程により検出される、項目 5 5 に記載の方法。

(項目 5 7)

上記 Y 染色体上にある上記遺伝子が S R Y、F C Y および D A Z からなる群より選択される、項目 5 6 に記載の方法。

(項目 5 8)

上記遺伝子が D A Z である、項目 5 7 に記載の方法。

(項目 5 9)

上記フォワードプライマーが配列番号 3 1 であり、上記リバースプライマーが配列番号 3 2 である、項目 5 8 に記載の方法。

(項目 6 0)

上記 1 種または複数種の標識プローブが配列番号 3 3 である、項目 5 8 に記載の方法。

(項目 6 1)

胎児 DNA の存在を確認する上記工程が父系遺伝の対立遺伝子を検出する工程を含む、項目 5 4 に記載の方法。

(項目 6 2)

被験体の R h D 遺伝子型を判定する方法であって、上記方法は、

上記被験体由来の 1 つまたは複数の細胞を含む生物学的サンプルから核酸を抽出する工程、および

上記抽出された核酸において R H D 遺伝子の少なくとも 3 個のエクソンを検出する工程を含み、ここで、上記エクソンの有無から上記被験体の R h D 遺伝子型が示される、方法

。

(項目 6 3)

R H D 遺伝子の少なくとも 3 個のエクソンの上記検出が、上記少なくとも 3 個のエクソンを 3 種以上のプライマーセットで増幅する工程、および上記少なくとも 3 個のエクソンを 3 種以上の標識プローブで同定する工程を含む、項目 6 2 に記載の方法。

(項目 6 4)

上記少なくとも 3 個のエクソンがヒト R H D 遺伝子のエクソン 4、エクソン 5、エクソン 7 およびエクソン 1 0 からなる群より選択される、項目 6 2 に記載の方法。

(項目 6 5)

R H D 遺伝子の 4 個のエクソンが、上記抽出された核酸において検出される、項目 6 2 に記載の方法。

(項目 6 6)

上記 4 個のエクソンがヒト R H D 遺伝子のエクソン 4、エクソン 5、エクソン 7 およびエクソン 1 0 である、項目 6 5 に記載の方法。

(項目 6 7)

上記被験体が胎児である、項目 6 2 に記載の方法。

(項目 6 8)

上記生物学的サンプルが胎児細胞を含む母親の生物学的サンプルである、項目 6 7 に記載の方法。

(項目 6 9)

上記抽出された核酸において胎児 D N A の存在を確認する工程をさらに含む、項目 6 8 に記載の方法。

(項目 7 0)

胎児 D N A の存在を確認する上記工程が Y 染色体を検出する工程を含む、項目 6 9 に記載の方法。

(項目 7 1)

上記 Y 染色体が、上記 Y 染色体上にある遺伝子を 1 種または複数種のプライマーセットで増幅する工程、および、上記遺伝子を 1 種または複数種の標識プローブで同定する工程により検出される、項目 7 0 に記載の方法。

(項目 7 2)

上記 Y 染色体上にある上記遺伝子が S R Y 、 F C Y および D A Z からなる群より選択される、項目 7 1 に記載の方法。

(項目 7 3)

胎児 D N A の存在を確認する上記工程が父系遺伝の対立遺伝子を検出する工程を含む、項目 6 9 に記載の方法。

(項目 7 4)

単離された核酸、各々がフォワードプライマーおよびリバースプライマーを含む、 R H D 遺伝子の 3 個以上のエクソンを増幅するための 3 種以上のプライマーセット、ならびに 3 種以上の標識プローブを含む、試薬混合物。

(項目 7 5)

上記 3 個以上のエクソンがヒト R H D 遺伝子のエクソン 4 、エクソン 5 、エクソン 7 およびエクソン 1 0 からなる群より選択される、項目 7 4 に記載の試薬混合物。

(項目 7 6)

上記 3 種以上のプライマーセットの上記フォワードプライマーが配列番号 1 、配列番号 4 、配列番号 7 、配列番号 1 0 、配列番号 1 3 、配列番号 1 6 、配列番号 1 9 および配列番号 2 2 からなる群より選択される、項目 7 5 に記載の試薬混合物。

(項目 7 7)

上記 3 種以上のプライマーセットの上記リバースプライマーが配列番号 2 、配列番号 5 、配列番号 8 、配列番号 1 1 、配列番号 1 4 、配列番号 1 7 、配列番号 2 0 および配列番号 2 3 からなる群より選択される、項目 7 5 に記載の試薬混合物。

(項目 7 8)

上記 3 種以上の標識プローブが配列番号 3 、配列番号 6 、配列番号 9 、配列番号 1 2 、配列番号 1 5 、配列番号 1 8 、配列番号 2 1 および配列番号 2 4 からなる群より選択される、項目 7 5 に記載の試薬混合物。

(項目 7 9)

上記混合物が、単離された核酸、 R H D 遺伝子の 4 個のエクソンを増幅するための 4 種のプライマーセット、および 4 種の標識プローブを含む、項目 7 4 に記載の試薬混合物。

(項目 8 0)

上記 4 個のエクソンがヒト R H D 遺伝子のエクソン 4 、エクソン 5 、エクソン 7 およびエクソン 1 0 である、項目 7 9 に記載の試薬混合物。

【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】**

配列番号 1、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 17、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 22 および配列番号 23 からなる群より選択される配列を含む単離されたポリヌクレオチドであって、ここで、前記単離されたポリヌクレオチドが 50 未満の塩基を含み；かつ前記ポリヌクレオチドが、好ましくはヒト RHD 遺伝子のエクソンにハイブリダイズする、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 2】

配列番号 3、配列番号 6、配列番号 9、配列番号 12、配列番号 15、配列番号 18、配列番号 21 および配列番号 24 からなる群より選択される配列を含む単離されたポリヌクレオチドであって、前記単離されたポリヌクレオチドが 50 未満の塩基を含み；好ましくは

(a) レポーター分子が前記ポリヌクレオチドの 5' 末端に結合し、クエンチャー分子が前記ポリヌクレオチドの 3' 末端に結合するか、または

(b) 前記ポリヌクレオチドがヒト RHD 遺伝子のエクソンを検出する、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 3】

配列番号 31、配列番号 32 または配列番号 33 に記載された配列を含む単離されたポリヌクレオチドであって、前記単離されたポリヌクレオチドが 50 未満の塩基を含み；かつ前記ポリヌクレオチドが、好ましくはヒト Y 染色体を検出する、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 4】

フォワードプライマーおよびリバースプライマーを含む少なくとも 1 種のプライマーセット、

少なくとも 1 種の標識プローブ、および

生物学的サンプルにおいて RHD 遺伝子を検出するための、前記少なくとも 1 種のプライマーセットおよび前記少なくとも 1 種のプローブの使用説明書を含む、RhD ジェノタイピングキットであって、

前記フォワードプライマーおよび前記リバースプライマーがヒト RHD 遺伝子のエクソンにハイブリダイズする、RhD ジェノタイピングキット。

【請求項 5】

被験体の RhD 遺伝子型を判定する方法であって、前記方法は、

前記被験体由来の 1 つまたは複数の細胞を含む生物学的サンプル中の細胞を溶解させて溶解混合物を形成する工程、

前記溶解混合物から核酸を抽出する工程、および

前記抽出された核酸において RHD 遺伝子の少なくとも 1 個のエクソンを検出する工程を含み、ここで、前記エクソンの有無から前記被験体の RhD 遺伝子型が示される、方法。

【請求項 6】

前記被験体が胎児であり；そして好ましくは、前記生物学的サンプルが胎児細胞を含む母親の生物学的サンプルであり、そしてより好ましくは：

(a) 前記母親の生物学的サンプルが全血サンプルであるか、または

(b) 前記胎児細胞が母親の細胞よりも優先的に溶解させられ、そして好ましくは：

(i) 細胞を溶解させる前記工程が、好ましくは前記母親の生物学的サンプルを溶解試薬と一定の時間接触させる工程を含み、前記溶解試薬が S - (2 - グアニジノ - 4 - チアゾイル) - メチル - イソチオ尿素を含み；より好ましくは前記溶解試薬が S - (2 - グアニジノ - 4 - チアゾイル) - メチル - イソチオ尿素、ビタミン E、サポニン、トリトン X - 100、DMSO および pH 7.2 ~ 7.4 の緩衝液を含み、そして前記時間が、必要に応じて約 10 分から約 30 分であるか、または

(ii) 前記方法が、前記抽出された核酸において胎児 DNA の存在を確認する工程をさらに含み、ここで、好ましくは：

(A) 胎児 D N A の存在を確認する前記工程が、必要に応じて Y 染色体を検出する工程を含み；ここで、好ましくは、前記 Y 染色体が、フォワードプライマーおよびリバースプライマーを含む 1 種または複数種のプライマーセットで前記 Y 染色体上にある遺伝子を増幅する工程、および、前記遺伝子を 1 種または複数種の標識プローブで同定する工程により検出され、より好ましくは、前記 Y 染色体上にある前記遺伝子が S R Y、F C Y および D A Z からなる群より選択され；そして最も好ましくは、前記遺伝子が D A Z であり、そして必要に応じて、(I) 前記フォワードプライマーが配列番号 3 1 であり、前記リバースプライマーが配列番号 3 2 であるか、および / もしくは (I I) 前記 1 種または複数種の標識プローブが配列番号 3 3 であるか、または

(B) 胎児 D N A の存在を確認する前記工程が父系遺伝の対立遺伝子を検出する工程を含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

R H D 遺伝子の少なくとも 1 個のエクソンの前記検出が、前記少なくとも 1 個のエクソンを 1 種または複数種のプライマーセットで増幅する工程、および前記少なくとも 1 個のエクソンを 1 種または複数種の標識プローブで同定する工程を含み；ここで、好ましくは、前記 1 種または複数種のプライマーセットがフォワードプライマーおよびリバースプライマーを含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

(a) 前記エクソンがエクソン 4 であり、そして好ましくは：

i . 前記フォワードプライマーが配列番号 1 または配列番号 4 であり、前記リバースプライマーが配列番号 2 または配列番号 5 であるか、および / または

i i . 前記少なくとも 1 種の標識プローブが配列番号 3 または配列番号 6 であるか、

(b) 前記エクソンがエクソン 5 であり、そして好ましくは：

i . 前記フォワードプライマーが配列番号 7 または配列番号 1 0 であり、前記リバースプライマーが配列番号 8 または配列番号 1 1 であるか、および / または

i i . 前記少なくとも 1 種の標識プローブが配列番号 9 または配列番号 1 2 であるか、

、

(c) 前記エクソンがエクソン 7 であり、そして好ましくは：

i . 前記フォワードプライマーが配列番号 1 3 または配列番号 1 6 であり、前記リバースプライマーが配列番号 1 4 または配列番号 1 7 であるか、および / または

i i . 前記少なくとも 1 種の標識プローブが配列番号 1 5 または配列番号 1 8 であるか、ならびに / あるいは

(d) 前記エクソンがエクソン 1 0 であり、そして好ましくは：

i . 前記フォワードプライマーが配列番号 1 9 または配列番号 2 2 であり、前記リバースプライマーが配列番号 2 0 または配列番号 2 3 であるか、および / または

i i . 前記少なくとも 1 種の標識プローブが配列番号 2 1 または配列番号 2 4 である、請求項 4 に記載のキット。

【請求項 9】

(a) 前記エクソンがエクソン 4 であり、そして好ましくは：

i . 前記フォワードプライマーが配列番号 1 または配列番号 4 であり、前記リバースプライマーが配列番号 2 または配列番号 5 であるか、および / または

i i . 前記少なくとも 1 種の標識プローブが配列番号 3 または配列番号 6 であるか、

(b) 前記エクソンがエクソン 5 であり、そして好ましくは：

i . 前記フォワードプライマーが配列番号 7 または配列番号 1 0 であり、前記リバースプライマーが配列番号 8 または配列番号 1 1 であるか、および / または

i i . 前記少なくとも 1 種の標識プローブが配列番号 9 または配列番号 1 2 であるか、

、

(c) 前記エクソンがエクソン 7 であり、そして好ましくは：

i . 前記フォワードプライマーが配列番号 1 3 または配列番号 1 6 であり、前記リバースプライマーが配列番号 1 4 または配列番号 1 7 であるか、および / または

i i . 前記少なくとも 1 種の標識プローブが配列番号 15 または配列番号 18 であるか、ならびに / あるいは

(d) 前記エクソンがエクソン 10 であり、そして好ましくは :

i . 前記フォワードプライマーが配列番号 19 または配列番号 22 であり、前記リバースプライマーが配列番号 20 または配列番号 23 であるか、および / または

i i . 前記少なくとも 1 種の標識プローブが配列番号 21 または配列番号 24 である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

前記キットが 2 種以上のプライマーセットおよび 2 種以上の標識プローブを含み、そして前記 2 種以上のプライマーセットが、必要に応じて以下 :

(a) ヒト RHD 遺伝子の 1 個のエクソン、または

(b) ヒト RHD 遺伝子の 2 個以上のエクソン

にハイブリダイズする、請求項 4 に記載のキット。

【請求項 11】

溶解試薬をさらに含む、請求項 4 に記載のキットであって、好ましくは前記溶解試薬が S - (2 - グアニジノ - 4 - チアゾイル) - メチル - イソチオ尿素を含み ; そしてより好ましくは、前記溶解試薬が S - (2 - グアニジノ - 4 - チアゾイル) - メチル - イソチオ尿素、ピタミン E、サポニン、DMSO、トリトン X - 100 および pH 7 . 2 ~ 7 . 4 の緩衝液を含む、請求項 4 に記載のキット。

【請求項 12】

2 種以上のプライマーセットが前記少なくとも 1 個のエクソンを増幅するために使用され、2 種以上の標識プローブが前記少なくとも 1 個のエクソンを同定するために使用され、そして好ましくは :

(a) 前記 2 種以上のプライマーセットがヒト RHD 遺伝子の 1 個のエクソンを増幅するか、または

(b) 前記 2 種以上のプライマーセットがヒト RHD 遺伝子の 2 個以上のエクソンを増幅する、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 13】

被験体の R h D 遺伝子型を判定する方法であって、前記方法は、

前記被験体由来の 1 つまたは複数の細胞を含む生物学的サンプルから核酸を抽出する工程、および

前記抽出された核酸において RHD 遺伝子の少なくとも 3 個のエクソンを検出する工程を含み、ここで、前記エクソンの有無から前記被験体の R h D 遺伝子型が示され、ここで好ましくは :

(a) RHD 遺伝子の少なくとも 3 個のエクソンの前記検出が、前記少なくとも 3 個のエクソンを 3 種以上のプライマーセットで増幅する工程、および前記少なくとも 3 個のエクソンを 3 種以上の標識プローブで同定する工程を含むか、

(b) 前記少なくとも 3 個のエクソンが、好ましくはヒト RHD 遺伝子のエクソン 4、エクソン 5、エクソン 7 およびエクソン 10 からなる群より選択されるか、

(c) RHD 遺伝子の 4 個のエクソンが、前記抽出された核酸において検出され ; 好ましくは、前記 4 個のエクソンがヒト RHD 遺伝子のエクソン 4、エクソン 5、エクソン 7 およびエクソン 10 であるか、ならびに / あるいは

(d) 前記被験体が胎児であり ; そして好ましくは、前記生物学的サンプルが胎児細胞を含む母親の生物学的サンプルであり ; そして最も好ましくは、前記方法が、前記抽出された核酸において胎児 DNA の存在を確認する工程をさらに含み、そして必要に応じて :

i . 胎児 DNA の存在を確認する前記工程が Y 染色体を検出する工程を含み、ここで好ましくは、前記 Y 染色体が、前記 Y 染色体上にある遺伝子を 1 種または複数種のプライマーセットで増幅する工程、および、前記遺伝子を 1 種または複数種の標識プローブで同定する工程により検出され ; より好ましくは、前記 Y 染色体上にある前記遺伝子が S R Y、F C Y および D A Z からなる群より選択されるか、または

i i . 胎児 DNA の存在を確認する前記工程が父系遺伝の対立遺伝子を検出する工程を含む、方法。

【請求項 14】

単離された核酸、各々がフォワードプライマーおよびリバースプライマーを含む、RHD 遺伝子の 3 個以上のエクソンを増幅するための 3 種以上のプライマーセット、ならびに 3 種以上の標識プローブを含む、試薬混合物であって、ここで好ましくは：

(a) 前記 3 個以上のエクソンがヒト RHD 遺伝子のエクソン 4、エクソン 5、エクソン 7 およびエクソン 10 からなる群より選択され；より好ましくは：

(i) 前記 3 種以上のプライマーセットの前記フォワードプライマーが配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7、配列番号 10、配列番号 13、配列番号 16、配列番号 19 および配列番号 22 からなる群より選択されるか、

(i i) 前記 3 種以上のプライマーセットの前記リバースプライマーが配列番号 2、配列番号 5、配列番号 8、配列番号 11、配列番号 14、配列番号 17、配列番号 20 および配列番号 23 からなる群より選択されるか、または

(i i i) 前記 3 種以上の標識プローブが配列番号 3、配列番号 6、配列番号 9、配列番号 12、配列番号 15、配列番号 18、配列番号 21 および配列番号 24 からなる群より選択されるか、

あるいは

(b) 前記混合物が、単離された核酸、RHD 遺伝子の 4 個のエクソンを増幅するための 4 種のプライマーセット、および 4 種の標識プローブを含み、ここで好ましくは前記 4 個のエクソンがヒト RHD 遺伝子のエクソン 4、エクソン 5、エクソン 7 およびエクソン 10 である、試薬混合物。