(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3602142号
(P3602142)
(45)発行日　平成16年12月15日(2004.12.15)　(24)登録日　平成16年10月1日(2004.10.1)

(51)Int.Cl.[7]	F I
C12Q 1/68	C12Q 1/68 A
C12N 15/09	C12N 15/00 ZNAA

請求項の数 10　(全 58 頁)

(21)出願番号	特願平9-537326
(86)(22)出願日	平成9年4月15日(1997.4.15)
(65)公表番号	特表2000-508539(P2000-508539A)
(43)公表日	平成12年7月11日(2000.7.11)
(86)国際出願番号	PCT/US1997/006293
(87)国際公開番号	WO1997/039138
(87)国際公開日	平成9年10月23日(1997.10.23)
審査請求日	平成13年2月8日(2001.2.8)
(31)優先権主張番号	08/632,575
(32)優先日	平成8年4月15日(1996.4.15)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者　593089149
プロメガ　コーポレイション
Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ
アメリカ合衆国　ウィスコンシン　５３７１１－５３９９　マディソン　ウッズ　ホロー　ロード　２８００番地
(74)代理人　100059959
弁理士　中村　稔
(74)代理人　100067013
弁理士　大塚　文昭
(74)代理人　100065189
弁理士　宍戸　嘉一
(74)代理人　100074228
弁理士　今城　俊夫

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＳＴＲ座位の多重増幅

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
１以上のDNAサンプルに由来する少なくとも４つのSTR座位に存在する対立遺伝子を同時測定する方法であって、
ａ）分析する少なくとも１つのDNAサンプルを得る工程、
ｂ）分析する該DNAサンプルの一緒に増幅することができる少なくとも４つのSTR座位からなるセットを選択する工程であって、該少なくとも４つの座位からなるセットが、
D3S1539、D7S820、D13S317、D5S818;
D17S1298、D7S820、D13S317、D5S818;
D20S481、D7S820、D13S317、D5S818;
D9S930、D7S820、D13S317、D5S818;
D10S1239、D7S820、D13S317、D5S818;
D14S118、D7S820、D13S317、D5S818;
D14S562、D7S820、D13S317、D5S818;
D14S548、D7S820、D13S317、D5S818;
D16S490、D7S820、D13S317、D5S818;
D17S1299、D7S820、D13S317、D5S818;
D16S539、D7S820、D13S317、D5S818;
D22S683、D7S820、D13S317、D5S818;
D16S753、D7S820、D13S317、D5S818;及び、

D16S539、D7S820、D13S317、HUMvMFA31
からなる群より選ばれる工程、
ｃ）多重増幅反応において、該座位のセットを同時増幅する工程であって、反応産物が、該セット内において同時増幅した各座位に由来する増幅した対立遺伝子の混合物である工程、及び、
ｄ）該混合物中の該増幅した対立遺伝子を評価し、該DNAサンプル内のセットにおける分析された各座位に存在する対立遺伝子を測定する工程、
を含むことを特徴とする方法。
【請求項２】
少なくとも４つの座位からなるセットが、少なくとも６つの座位からなるセットであり、該少なくとも６つの座位からなるセットが、
D16S539、D7S820、D13S317、D5S818、HUMCSF1PO、HUMTPOX及び、
D16S539、D7S820、D13S317、D5S818、HUMF13A01、HUMFESFPSからなる群より選ばれる６つの座位からなるセットを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
少なくとも４つの座位からなるセットが、少なくとも７つの座位からなるセットであり、該少なくとも７つの座位からなるセットが、
D16S539、D7S820、D13S317、D5S818、HUMCSF1PO、HUMTPOX、HUMTH01及び、
D16S539、D7S820、D13S317、D5S818、HUMF13A01、HUMFESFPS、HUMBFXIIIからなる群より選ばれる７つの座位からなるセットを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項４】
少なくとも４つの座位からなるセットが、少なくとも８つの座位からなるセットであり、該少なくとも８つの座位からなるセットが、
D16S539、D7S820、D13S317、D5S818、HUMCSF1PO、HUMTPOX、HUMTH01、HUMvWFA31及び、
D16S539、D7S820、D13S317、D5S818、HUMF13A01、HUMFESFPS、HUMBFXIII、HUMLIPOLからなる群より選ばれる８つの座位からなるセットを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項５】
該多重増幅反応が、分析する少なくとも４つの座位に隣接する少なくとも４つのプライマー対を含み、
該多重増幅反応に使用する各プライマー対の少なくとも１つが、
該セット中の座位の１つがD7S820であるとき、配列番号１及び配列番号２からなる群より選ばれる配列を有しており、
該セット中の座位の１つがD13S317であるとき、配列番号３及び配列番号４からなる群より選ばれる配列を有しており、
該セット中の座位の１つがD5S818であるとき、配列番号５及び配列番号６からなる群より選ばれる配列を有しており、
該セット中の座位の１つがD3S1539であるとき、配列番号７、配列番号８及び配列番号49からなる群より選ばれる配列を有しており、
該セット中の座位の１つがD17S1298であるとき、配列番号９及び配列番号10からなる群より選ばれる配列を有しており、
該セット中の座位の１つがD20S481であるとき、配列番号11、配列番号12、配列番号52及び配列番号53からなる群より選ばれる配列を有しており、
該セット中の座位の１つがD9S930であるとき、配列番号13、配列番号14、配列番号55及び配列番号61からなる群より選ばれる配列を有しており、
該セット中の座位の１つがD10S1239であるとき、配列番号15、配列番号16及び配列番号54からなる群より選ばれる配列を有しており、
該セット中の座位の１つがD14S118であるとき、配列番号17及び配列番号18からなる群より選ばれる配列を有しており、
該セット中の座位の１つがD14S562であるとき、配列番号19及び配列番号20からなる群より選ばれる配列を有しており、

該セット中の座位の１つがD14S548であるとき、配列番号21及び配列番号22からなる群より選ばれる配列を有しており、
該セット中の座位の１つがD16S490であるとき、配列番号23及び配列番号24からなる群より選ばれる配列を有しており、
該セット中の座位の１つがD16S753であるとき、配列番号25及び配列番号26からなる群より選ばれる配列を有しており、
該セット中の座位の１つがD17S1299であるとき、配列番号27及び配列番号28からなる群より選ばれる配列を有しており、
該セット中の座位の１つがD16S539であるとき、配列番号29、配列番号30及び配列番号58からなる群より選ばれる配列を有しており、
該セット中の座位の１つがD22S683であるとき、配列番号31及び配列番号32からなる群より選ばれる配列を有しており、
該セット中の座位の１つがHUMCSF1POであるとき、配列番号33及び配列番号34からなる群より選ばれる配列を有しており、
該セット中の座位の１つがHUMTPOXであるとき、配列番号35及び配列番号36からなる群より選ばれる配列を有しており、
該セット中の座位の１つがHUMTH01であるとき、配列番37及び配列番号38からなる群より選ばれる配列を有しており、
該セット中の座位の１つがHUMvWFA31であるとき、配列番号39、配列番号40、配列番号59及び配列番号60からなる群より選ばれる配列を有しており、
該セット中の座位の１つがHUMF13A01であるとき、配列番号41及び配列番号42からなる群より選ばれる配列を有しており、
該セット中の座位の１つがHUMFESFPSであるとき、配列番号43及び配列番号44からなる群より選ばれる配列を有しており、
該セット中の座位の１つがHUMBFXIIIであるとき、配列番号45及び配列番号46からなる群より選ばれる配列を有しており、及び、
該セット中の座位の１つがHUMLIPOLであるとき、配列番号47及び配列番号48からなる群より選ばれる配列を有している、
請求項１～４のいずれか１項に記載の方法。

【請求項６】

１以上のDNAサンプルに由来する３つのSTR座位に存在する対立遺伝子を同時測定する方法であって、
ａ）分析する少なくとも１つのDNAサンプルを得る工程、
ｂ）分析するDNAサンプルの一緒に増幅することができる少なくとも３つのSTR座位からなるセットを選択する工程であって、該少なくとも３つのSTR座位からなるセットが、D16S539、D7S820、D13S317である３つのSTR座位からなるセットを含む工程、
ｃ）多重増幅反応において、該少なくとも３つの座位からなるセットを同時増幅する工程であって、反応産物が、該セットにおいて同時増幅した各座位に由来する増幅した対立遺伝子の混合物である工程、及び、
ｄ）該混合物中の該増幅した対立遺伝子を評価し、該DNAサンプル内のセットにおける分析された各少なくとも３つの座位に存在する対立遺伝子を測定する工程、
を含むことを特徴とする方法。

【請求項７】

多重増幅反応が、３対のプライマーのセットを含み、各プライマー対が、該反応において同時増幅する３つの座位のセット内の座位の１つに隣接しており、
各プライマー対が、該反応において同時増幅した座位からなるセットにおける座位の対立遺伝子とハイブリダイズするように設計されており、
D7S820が同時増幅する座位のセット内の１つであるとき、該プライマーの少なくとも１つが配列番号１及び配列番号２からなる群より選ばれる配列を有し、
D13S317が同時増幅する座位のセット内の１つであるとき、該プライマーの少なくとも１

つが配列番号３及び配列番号４からなる群より選ばれる配列を有し、
D16S539が同時増幅する座位のセット内の１つであるとき、該プライマーの少なくとも１つが配列番号29及び配列番号30からなる群より選ばれる配列を有している、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
少なくとも３つの座位におけるSTR配列を同時分析するためのキットであって、少なくとも３つのSTR座位からなるセットを同時増幅するためのオリゴヌクレオチドプライマーを有する容器を含んでおり、該座位のセットが、
D16S539、D7S820、D13S317;
D3S1539、D7S820、D13S317、D5S818;
D17S1298、D7S820、D13S317、D5S818;
D20S481、D7S820、D13S317、D5S818;
D9S930、D7S820、D13S317、D5S818;
D10S1239、D7S820、D13S317、D5S818;
D14S118、D7S820、D13S317、D5S818;
D14S562、D7S820、D13S317、D5S818;
D14S548、D7S820、D13S317、D5S818;
D16S490、D7S820、D13S317、D5S818;
D17S1299、D7S820、D13S317、D5S818;
D16S539、D7S820、D13S317、D5S818;
D22S683、D7S820、D13S317、D5S818;
D16S753、D7S820、D13S317、D5S818;
D16S539、D7S820、D13S317、HUMvWFA31;
D16S539、D7S820、D13S317、D5S818、HUMCSFlPO、HUMTPOX;
D16S539、D7S820、D13S317、D5S818、HUMF13A01、HUMFESFPS;
D16S539、D7S820、D13S317、D5S818、HUMCSF1PO、HUMTPOX、HUMTH01;
D16S539、D7S820、D13S317、D5S818、HUMF13A01、HUMFESFPS、HUMBFXIII;
D16S539、D7S820、D13S317、D5S818、HUMCSF1PO、HUMTPOX、HUMTH01、HUMvWFA31及び、
D16S539、D7S820、D13S317、D5S818、HUMF13A01、HUMFESFPS、HUMBFXIII、HUMLIPOLからなる群より選ばれることを特徴とするキット。
【請求項９】
各オリゴヌクレオチドプライマーが、選択した座位のセットにおける３つの座位のうちの１つとハイブリダイズするように設計されており、
該セット中の座位の１つがD7S820であるとき、該プライマーの少なくとも１つが配列番号１及び配列番号２からなる群より選ばれる配列を有しており、
該セット中の座位の１つがD13S317であるとき、該プライマーの少なくとも１つが配列番号３及び配列番号４からなる群より選ばれる配列を有しており、
該セット中の座位の１つがD5S818であるとき、該プライマーの少なくとも１つが配列番号５及び配列番号６からなる群より選ばれる配列を有しており、
該セット中の座位の１つがD3S1539であるとき、該プライマーの少なくとも１つが配列番号７、配列番号８及び配列番号49からなる群より選ばれる配列を有しており、
該セット中の座位の１つがD17S1298であるとき、該プライマーの少なくとも１つが配列番号９及び配列番号10からなる群より選ばれる配列を有しており、
該セット中の座位の１つがD20S481であるとき、該プライマーの少なくとも１つが配列番号11、配列番号12、配列番号52及び配列番号53からなる群より選ばれる配列を有しており、
該セット中の座位の１つがD9S930であるとき、該プライマーの少なくとも１つが配列番号13、配列番号14、配列番号55及び配列番号61からなる群より選ばれる配列を有しており、
該セット中の座位の１つがD10S1239であるとき、該プライマーの少なくとも１つが配列番号15、配列番号16及び配列番号54からなる群より選ばれる配列を有しており、

該セット中の座位の１つがD14S118であるとき、該プライマーの少なくとも１つが配列番号17及び配列番号18からなる群より選ばれる配列を有しており、
該セット中の座位の１つがD14S562であるとき、該プライマーの少なくとも１つが配列番号19及び配列番号20からなる群より選ばれる配列を有しており、
該セット中の座位の１つがD14S548であるとき、該プライマーの少なくとも１つが配列番号21及び配列番号22からなる群より選ばれる配列を有しており、
該セット中の座位の１つがD16S490であるとき、該プライマーの少なくとも１つが配列番号23及び配列番号24からなる群より選ばれる配列を有しており、
該セット中の座位の１つがD16S753であるとき、該プライマーの少なくとも１つが配列番号25及び配列番号26からなる群より選ばれる配列を有しており、
該セット中の座位の１つがD17S1299であるとき、該プライマーの少なくとも１つが配列番号27及び配列番号28からなる群より選ばれる配列を有しており、
該セット中の座位の１つがD16S539であるとき、該プライマーの少なくとも１つが配列番号29、配列番号30及び配列番号58からなる群より選ばれる配列を有しており、
該セット中の座位の１つがD22S683であるとき、該プライマーの少なくとも１つが配列番号31及び配列番号32からなる群より選ばれる配列を有しており、
該セット中の座位の１つがHUMCSF1POであるとき、該プライマーの少なくとも１つが配列番号33及び配列番号34からなる群より選ばれる配列を有しており、
該セット中の座位の１つがHUMTPOXであるとき、該プライマーの少なくとも１つが配列番号35及び配列番号36からなる群より選ばれる配列を有しており、
該セット中の座位の１つがHUMTH01であるとき、該プライマーの少なくとも１つが配列番号37及び配列番号38からなる群より選ばれる配列を有しており、
該セット中の座位の１つがHUMvWFA31であるとき、該プライマーの少なくとも１つが配列番号39、配列番号40及び配列番号60からなる群より選ばれる配列を有しており、
該セット中の座位の１つがHUMF13A01であるとき、該プライマーの少なくとも１つが配列番号41及び配列番号42からなる群より選ばれる配列を有しており、
該セット中の座位の１つがHUMFESFPSであるとき、該プライマーの少なくとも１つが配列番号43及び配列番号44からなる群より選ばれる配列を有しており、
該セット中の座位の１つがHUMBFXIIIであるとき、該プライマーの少なくとも１つが配列番号45及び配列番号46からなる群より選ばれる配列を有しており、
該セット中の座位の１つがHUMLIPOLであるとき、該プライマーの少なくとも１つが配列番号47及び配列番号48からなる群より選ばれる配列を有している、
請求項８に記載のキット。

【請求項１０】

１以上のDNAサンプルに由来する少なくとも４つのSTR座位に存在する対立遺伝子を同時測定する方法であって、
ａ）分析する少なくとも１つのDNAサンプルを得る工程、
ｂ）分析するDNAサンプルの一緒に増幅することができる少なくとも４つの座位からなるセットを選択する工程であって、該セット内の３つの座位が、D7S820、D13S317及びD5S818である工程、
ｃ）多重増幅反応において、該座位のセットを同時増幅する工程であって、反応産物が、該セット内の同時増幅した各座位に由来する増幅した対立遺伝子の混合物である工程、及び、
ｄ）該混合物中の該増幅した対立遺伝子を評価し、該DNAサンプル内のセットにおける分析された各座位に存在する対立遺伝子を測定する工程、
を含み、
ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて増幅した該対立遺伝子を評価して対立遺伝子を分離し、分離した対立遺伝子のポリアクリルアミドゲルを形成することを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

関連出願のクロスリファレンス
本出願は、米国特許出願第08/316,544号（出願日1994年９月30日）の一部係属出願である。親出願の全ての開示は参照することにより本明細書に組み込まれる。
連邦政府後援研究又は開発に関する記載
適用せず。
発明の背景
本発明は、一般的に、ゲノム系における遺伝子マーカーの検出に向けられる。より詳細には、本発明は、多重系（multiplex system）内に含まれる各座位の対立遺伝子を１回の反応で測定するための、ポリメラーゼ連鎖反応又はその他の増幅系を使用した、多数の別個の多型性座位の同時増幅に向けられる。
近年、遺伝子マーカーとしての多型性STR（polymorphic short tandem repeats）の発見及び開発が、連鎖地図の開発、不健全な遺伝子（diseased gene）の同定及び特徴付け並びにDNAタイピング（DNA typing）の単純化及び精密化における進歩を刺激してきた。
少なくともヒトゲノムにおける多数の座位は、多型性STR領域を含んでいる（Adamson,D.,et al.（1995）"A collection of ordered tetranuc leotide－repeat markers from the human genome,"Am.J.Hum.Genet.57:619－628;Murray,J.C.,et al.（1994）"A comprehensive human linkage map with centimorgan density,"Science 265:2049－2054;Hudson,T.J.,Engelstein,M.,Lee,M.K.,Ho,E.C.,Rubenfield,M.J.,Adams,C.P.,Housman,D.E.,and Dracopoli,N.C.（1992）"Isolation and chromosomal assignment of 100 highly informative human simple sequence repeat polymorphisms,"Genomics 13:622－629）。STR座位は、長さ３～７塩基の短い反復配列要素から構成される。ヒトゲノムには、2,000,000の予想される三量体又は四量体STRが、15kb毎に１つの頻度で存在していると推測されている（Edwards et al.（1991）"DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats."Am.J.Hum.Genet.49:746－756;Beckman,J.S.,and Weber,J.L.（1992）"Survery of human and rat microsatellites,"Genomics 12:627－631）。Edwardsら（1991）により研究されたSTR座位のほぼ半数が多型性であり、遺伝子マーカーの豊富な供給源を提供している。
特定の座位におけるSTR単位の数の変動は、対立遺伝子間及び個体間におけるその部位のDNAの長さの変化を引き起こす。そのような長さの多型性は、VNTR（variable number tandem repeat）座位（Nakamura,Y.,et al.（1987）"Variable number of tandem repeat（VNTR）markers for human gene mapping,"Science 235:1616－1622）及びミニサテライト座位（Jeffreys,A.J.,et al.（1985）"Hypervariable'minisatellite'regions in human DNA,"Nature 314:67－73）（両者ともにSTR座位よりもかなり長い反復単位を含んでいる）を暗示している。長さの多型性は、ミニサテライト座位のジヌクレオチド反復形態（Litt,M.and Luty,J.A.（1989）"A hypervariable microsatellite revealed by in－vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscleactin gene,"Am.J.Hum.Genet.44:397－401,Tautz,D.,et al.（1986）"Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation,"Nature 322:652－656,Weber,J.L.and May,P.E.（1989）"Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction,"Am.J.Hum.Genet.44:388－396;Beckmann and Weber,（1992））、STR座位よりも短い反復単位を有するマイクロサテライト座位形態を暗示している。
多型性STR座位は、ヒト同定用、父性検査用及び遺伝子マッピング用マーカーとして極めて有用である。STR座位は、直列型反復配列（tandem repeat）に隣接する領域において同定された特異的プライマー配列を用いたポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により増幅されるだろう。
これらの座位の対立遺伝子は、増幅した領域内に含まれる反復配列のコピー数により差別化され、放射能、蛍光、銀染色及び呈色を含むあらゆる適切な検出方法による電気泳動的分離にしたがい互いに区別される。
労力、材料及び分析時間を最小化するために、多数の座位及び／又はより多くのサンプルを同時に分析することが望ましい。この目的に対する１つのアプローチは、単一反応にお

ける多数の座位の同時増幅を含んでいる。「多重」増幅と呼ばれる方法が、広く文献に記載されている。多重増幅セットは、ヒトの遺伝子疾患、例えばデュシェンヌ型筋ジストロフィー（Chamberlain,J.S.,et al.（1988）"Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification,"Nucleic Acid Res.19:11141－11156;Chamberlain,J.S.,et al.（1989）,"Multiple PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy,"In PCR Protocols,A Guide to Methods and Application（ed.Gelfand,D.H.,et al.）pp.272－281.Academic Press,San Diego,CA;Beggs,A.H.,et al.（1990）"Detection of 98％DMD/BMD gene deletions by PCR,"Hum.Genet.86:45－48;Clemens,P.R.,et al.（1991）."Carrier detection and prenatal diagnosis in Duchenne and Becker muscular dystrophy families,using dinucleotide repeat polymorphisms,"Am J. Hum.Genet.49:951－960;Schwartz,J.S.,et al.（1992）"Fluorescent multiple linkage analysis and carrier detection for Duchenne/Becker's muscular dystrophy,"Am J.Hum.Genet.51:721－729;Covone,A.E.,et al.（1992）"Screening Duchenne and Becker muscular dystrophy patients for deletions in 30 exons of the dystrophin gene by three－multiplex PCR,"Am.J.Hum.Genet.51:675－677）、レッシュ・ナイハン症候群（Gibbs,R.A.,et al.（1990）"Multiple DNA deletion detection and exon sequencing of the hypoxanthine phosphoribosyl transferase gene in Lesch－Nyhan families,"Genomics 7:235－244）、嚢胞性線維症（Estivill,X.,et al.（1991）"Prenatal diagnosis of cystic fibrosis by multiplex PCR of mutation and microsatellite alleles,"Lancet 338:458;Fortina,P.,et al.（1992）"Non－radioactive detection of the most common mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene by multiplex polymerase chain reaction,"Hum.Genet.90:375－378;Ferrie,R.M.,et al.（1992）"Development,Multiplexing,and application of ARMS tests for common mutations in the CFTR gene,"Am.J.Hum.Genet.51:251－262;Morral,N.and Estivill,X.（1992）"Multiplex PCR amplification of three microsatellites within the CFTR gene,"Genomics 51:1362－1364）及び網膜芽細胞腫（Lohmann,D.,et al.（1992）"Detection of small RB1 gene deletions in retinoblastoma by multiplex PCR and high－resolution gel electrophoresis,"Hum.Genet.89:49－53）などに関連する遺伝子の解析用に広く開発されてきた。多型性マイクロサテライトマーカーの多重増幅（Clemens et al.（1991）;Schwartz et al.（1992）;Huang,T.H.－M.,et al.（1992）"Genetic mapping of four dinucleotide repeat loci DXS435,DXS45,DXS454,DXS424,on the X chromosome using the multiplex polymerase chain reaction,"Genomics 13:375－380）及びSTRマーカーの多重増幅（Edwards,A.,et al.（1992）"Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups,"Genomics 12:241－253;Kimpton,C.P.,et al.（1993）"Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci,"PCR Methods and Applications 3:13－22;Hammond,H.A.,et al.（1994）"Evaluation of 13 STR loci for use in personal identification applications,"Am.J.Hum.Genet.55:175－189;Schumm,J.W.et al.（1994）"Development of nonisotopic multiplex amplification sets for analysis of polymorphic STR loci,"in"The Fourth International Symposium on Human Identification 1993,"pp.177－187;Oldroyd,N.J.,et al.（1995）"A highly discriminating octoplex short tandem repeat polymerase chain reaction system suitable for human individual identification,"Electrophoresis 16:334－337）が記載されている。

これらの増幅産物は、通常、当業者に既知の幾つかの電気泳動法の１つにより分離する。増幅産物の周知の検出方法の幾つかが記載されている。幾つかのケースにおいては、増幅した断片の臭化エチジウム染色又は銀染色が使用されているが、他方では、増幅した物質の２本鎖の１つのみを標識する方法を使用することが好ましい。この例としては、ある座位を増幅する前に、２つのプライマーの１つを放射性標識又は蛍光標識することが含まれる。検出に対するより洗練されたアプローチの１つは、異なる蛍光標識を使用して、異なる座位を示す増幅物質を検出することであるが、電気泳動にしたがう同一の空間が存在す

る。異なる座位の産物は、フィルター又は一度に１つの蛍光標識を可視化することができるその他の識別力のある検出器を用いて差別化される。
国際公開第93/18177号及び第93/18178号パンフレット（Fortinaら）について言及すると、対立遺伝子特異的多重ポリメラーゼ連鎖反応系を使用した、嚢胞性線維症及びβ－サラセミアなどの疾患の診断方法及び診断キットに向けられている。Fortinaらにしたがうと、多重PCRを多数の標的配列の同時増幅に使用し、アガロースゲルの２つのレーンを使用して変異対立遺伝子をスキャンする。
Ballabio,A.らは、("PCR Tests for Cystic Fibrosis Deletion,"Nature,343:220（1991））で、F508嚢胞性線維症変異検出用の２つの異なる色素で標識した蛍光プライマーを使用しての、単一の管での、多重対立遺伝子特異的PCR試験を開示している。
特定の座位についての多重増幅手順が存在するが、その他の型の座位、例えば特定のSTR座位における対立遺伝子検出についての多重増幅手順の使用が強く望まれている。そのような座位の多重増幅を可能にするプライマーを同定することも望まれている。
発明の要約
本発明の目的は、多重系内に含まれる各座位の対立遺伝子を１回の反応で測定するための、PCR又はその他の増幅系を使用した、多数の別個の多型性STR座位の同時増幅のための方法及び材料を提供することである。本明細書に開示する特定のSTR座位のセットの多重分析については、従来技術において開示されていない。STR座位の多重増幅に有用であることが示されている、以下に示す本明細書に開示された多数のプライマーの配列についても過去においてまったく開示されていない。
特定の座位を含む多重増幅に特異的な方法、キット及びプライマーを提供することも本発明の目的である。
これら及びその他の目的は、各多重系の個々の座位に存在する対立遺伝子を同時分析又は測定するための方法及び材料に向けられている本発明により扱われる（address）。一般的に、本発明の方法は、（ａ）分析する少なくとも１つのDNAサンプルを得る工程であって、DNAサンプルが一緒に増幅することができる少なくとも２つの座位を有している工程、（ｂ）DNAサンプル中のSTR配列を増幅する工程、及び（ｃ）使用した系の多型性を明らかにする方法で、増幅した物質を検出する工程からなる。
より詳細には、本発明の方法は、１以上のDNAサンプルに由来する少なくとも３つの直列型反復座位に存在する対立遺伝子を同時測定する方法であって、以下に示す工程：
（ａ）分析する少なくとも１つのDNAサンプルを得る工程であって、DNAサンプルが増幅することができる少なくとも３つの座位のセットを有しており、座位のセットが本明細書に開示された特定の群又はセットから選ばれる工程、
（ｂ）多重増幅反応において座位のセットを同時増幅する工程であって、反応産物がセット中の同時増幅した各座位に由来する増幅した対立遺伝子の混合物である工程、
（ｃ）混合物中の増幅した対立遺伝子を評価して、DNAサンプル内のセットにおける分析した各座位に存在する対立遺伝子を測定する工程からなる。
本発明の１つ態様においては、３つのSTR座位を一緒に増幅する。３つの同時増幅する座位のセットは、
D3S1539、D19S253、D13S317;
D10S1239、D9S930、D20S481;
D10S1239、D4S2368、D20S481;
D10S1239、D9S930、D4S2368;
D16S539、D7S820、D13S317;及び、
D10S1239、D9S930、D13S317からなる群より選ばれる。
本発明の方法のより好ましい態様においては、DNAサンプルは、一緒に増幅することができる少なくとも４つのSTR座位を有し、同時増幅する座位のセットは、
D3S1539、D4S2368、D5S818、D7S820、D9S930、D10S1239、D13S317、D14S118、D14S548、D14S562、D16S490、D16S539、D16S753、D17S1298、D17S1299、D19S253、D20S481、D22S683、HUMCSF1PO、HUMTPOX、HUMTH01、HUMFESFPS、HUMF13A01、HUMBFXIII、HUMLIPOL、HUMvWF

A31からなる群より選ばれる。
より好ましくは、一緒に増幅する少なくとも４つのSTR座位のセットは、以下に示す４つの座位：
D3S1539、D7S820、D13S317、D5S818;
D17S1298、D7S820、D13S317、D5S818;
D20S481、D7S820、D13S317、D5S818;
D9S930、D7S820、D13S317、D5S818;
D10S1239、D7S820、D13S317、D5S818;
D14S118、D7S820、D13S317、D5S818;
D14S562、D7S820、D13S317、D5S818;
D14S548、D7S820、D13S317、D5S818;
D16S490、D7S820、D13S317、D5S818;
D17S1299、D7S820、D13S317、D5S818;
D16S539、D7S820、D13S317、D5S818;
D22S683、D7S820、D13S317、D5S818;
D16S753、D7S820、D13S317、D5S818;
D3S1539、D19S253、D13S317、D20S481;
D3S1539、D19S253、D4S2368、D20S481;
D10S1239、D9S930、D4S2368、D20S481;及び、
D16S539、D7S820、D13S317、HUMvWFA31からなるセットより選ばれる。
より好ましくは、一緒に増幅するSTR座位のセットは、６つの座位のセットであり、以下に示す座位のセット：
D16S539、D7S820、D13S317、D5S818、HUMCSF1PO、HUMTPOX;及び、
D16S539、D7S820、D13S317、D5S818、HUMF13A01、HUMFESFPSから選ばれる。
更に、より好ましくは、一緒に増幅するSTR座位のセットは、７つの座位のセットであり、以下に示す座位のセット：
D16S539、D7S820、D13S317、D5S818、HUMCSF1PO、HUMTPOX、HUMTH01;及び、
D16S539、D7S820、D13S317、D5S818、HUMF13A01、HUMFESFPS、HUMBFXIIIから選ばれる。
更に、より好ましくは、一緒に増幅するSTR座位のセットは、８つの座位のセットであり、以下に示す座位のセット：
D16S539、D7S820、D13S317、D5S818、HUMCSF1PO、HUMTPOX、HUMTH01、HUMvWFA31;及び、D16S539、D7S820、D13S317、D5S818、HUMF13A01、HUMFESFPS、HUMBFXIII、HUMLIPOLから選ばれる。
本発明の方法の多重増幅反応工程は、好ましくは、反応において同時増幅する座位のセットにおける各座位に隣接（フランキング）するプライマー対を使用して行われる。より好ましくは、対立遺伝子をゲル電気泳動により分離するとき、反応において同時増幅したセット内のその他の座位の対立遺伝子とは重複しない各座位由来の対立遺伝子を生成する多重増幅反応用に、プライマー対を選択する。更に、より好ましくは、多重増幅反応において使用するプライマーの各対の１つの配列は、以下に示すプライマー配列：
セット内の座位の１つがD7S820であるとき、配列番号１、配列番号2;
セット内の座位の１つがD13S317であるとき、配列番号３、配列番号4;
セット内の座位の１つがD5S818であるとき、配列番号５、配列番号6;
セット内の座位の１つがD3S1539であるとき、配列番号７、配列番号８、配列番号49;
セット内の座位の１つがD17S1298であるとき、配列番号９、配列番号10;
セット内の座位の１つがD20S481であるとき、配列番号11、配列番号12、配列番号52、配列番号53;
セット内の座位の１つがD9S930であるとき、配列番号13、配列番号14、配列番号55、配列番号61;
セット内の座位の１つがD10S1239であるとき、配列番号15、配列番号16、配列番号54;
セット内の座位の１つがD14S118であるとき、配列番号17、配列番号18;

セット内の座位の１つがD14S562であるとき、配列番号19、配列番号20;
セット内の座位の１つがD14S548であるとき、配列番号21、配列番号22;
セット内の座位の１つがD16S490であるとき、配列番号23、配列番号24;
セット内の座位の１つがD16S753であるとき、配列番号25、配列番号26;
セット内の座位の１つがD17S1299であるとき、配列番号27、配列番号28;
セット内の座位の１つがD16S539であるとき、配列番号29、配列番号30、配列番号58;
セット内の座位の１つがD22S683であるとき、配列番号31、配列番号32、
セット内の座位の１つがHUMCSF1POであるとき、配列番号33、配列番号34、
セット内の座位の１つがHUMTPOXであるとき、配列番号35、配列番号36、
セット内の座位の１つがHUMTH01であるとき、配列番号37、配列番号38、
セット内の座位の１つがHUMvWFA31であるとき、配列番号39、配列番号40、配列番号59、配列番号60、
セット内の座位の１つがHUMF13A01であるとき、配列番号41、配列番号42、
セット内の座位の１つがHUMFESFPSであるとき、配列番号43、配列番号44、
セット内の座位の１つがHUMBFXIIIであるとき、配列番号45、配列番号46、
セット内の座位の１つがHUMLIPOLであるとき、配列番号47、配列番号48、
セット内の座位の１つがD19S253であるとき、配列番号50、配列番号51、
セット内の座位の１つがD4S2368であるとき、配列番号56、配列番号57からなる群より選ばれる。

本発明の方法において、増幅した対立遺伝子は、好ましくは増幅した対立遺伝子をサイズ標準（size standard）と比較することにより評価する。サイズ標準は、DNAマーカー及び座位特異的アレリックラダー（allelic ladder）アレリックラダー）からなるサイズ標準の群から選ばれる。対立遺伝子の評価は、好ましくは対立遺伝子を分離するポリアクリルアミドゲル電気泳動を使用して行われ、これにより分離した対立遺伝子を含むポリアクリルアミドゲルを形成する。ポリアクリルアミドゲル中の分離した対立遺伝子は、好ましくは適切な技術、例えば銀染色などを用いて可視化することにより測定する。より好ましくは蛍光分析により測定する。

蛍光分析は、好ましくは、多重増幅反応に使用する各プライマー対の１つのプライマーを、反応に使用する前に蛍光標識で標識することにより行う。各プライマーを標識するために使用する蛍光標識は、好ましくはフルオレセイン標識又はテトラメチルローダミン標識である。最も好ましくは、少なくとも２つの異なる標識を使用して、多重増幅反応に使用する異なるプライマーを標識する。

本発明の方法を使用して分析する少なくとも１つのDNAサンプルは、好ましくはヒト組織から分離したものであり、好ましくは血液、精液、膣細胞、毛髪、唾液、尿、骨、口腔サンプル、胎盤細胞又は胎児細胞を含む羊水及び前記組織のあらゆる混合物からなる群より選ばれる組織である。

代替の態様においては、本発明は、少なくとも３つの座位中のSTR配列を同時分析するためのキットであって、これは少なくとも３つのSTR座位のセットを同時増幅するためのオリゴヌクレオチドプライマー対を有する容器を含んでいる。ここで座位のセットは、以下に示す座位のセット：

D3S1539、D19S253、D13S317;
D10S1239、D9S930、D20S481;
D10S1239、D4S2368、D20S481;
D10S1239、D9S930、D4S2368;
D16S539、D7S820、D13S317;
D10S1239、D9S930、D13S317;
D3S1539、D7S820、D13S317、D5S818;
D17S1298、D7S820、D13S317、D5S818;
D20S481、D7S820、D13S317、D5S818;
D9S930、D7S820、D13S317、D5S818;

D10S1239、D7S820、D13S317、D5S818;
D14S118、D7S820、D13S317、D5S818;
D14S562、D7S820、D13S317、D5S818;
D14S548、D7S820、D13S317、D5S818;
D16S490、D7S820、D13S317、D5S818;
D17S1299、D7S820、D13S317、D5S818;
D16S539、D7S820、D13S317、D5S818;
D22S683、D7S820、D13S317、D5S818;
D16S753、D7S820、D13S317、D5S818;
D3S1539、D19S253、D13S317、D20S481;
D3S1539、D19S253、D4S2368、D20S481;
D10S1239、D9S930、D4S2368、D20S481;
D16S539、D7S820、D13S317、HUMvWFA31;
D16S539、D7S820、D13S317、D5S818、HUMCSF1PO、HUMTPOX;
D16S539、D7S820、D13S317、D5S818、HUMF13A01、HUMFESFPS;
D16S539、D7S820、D13S317、D5S818、HUMCSF1PO、HUMTPOX、HUMTH01;
D16S539、D7S820、D13S317、D5S818、HUMF13A01、HUMFESFPS、HUMBFXIII;
D16S539、D7S820、D13S317、D5S818、HUMCSF1PO、HUMTPOX、HUMTH01、HUMvWFA31;および、
D16S539、D7S820、D13S317、D5S818、HUMF13A01、HUMFESFPS、HUMBFXIII、HUMLIPOLから選ばれる。

キットに含まれる各プライマー対の少なくとも１つのプライマーは、好ましくは前記本発明の方法の記載に列挙した配列の群の１つから選ばれる配列を有している。

第三の態様においては、本発明は、ヒトDNAの特定のSTR座位を増幅するためのプライマー配列及びプライマー対である。ヒトDNAの多重分析のための本発明のプライマー及びプライマー対の使用は、以下に示される。本発明のプライマーは、本発明の方法の使用に適しており、本発明の方法の評価工程において、増幅した対立遺伝子をどのように測定するかどうかに依存して、標識化又は標識化されていない形態で使用することができる。

前記において簡潔に記載した種々の態様全てにおいて、本発明は、座位の特定の組合せと特定の条件を使用した、多型性遺伝子マーカーの検出及び分析用の高処理方法及び材料を提供する。評価工程に対して適切な検出技術を選択することにより、本発明の材料及び方法は、電源及びポリアクリルアミドゲル電気泳動用の標準装置又は蛍光ゲルスキャニング用の最新設備を有する装置、例えばフルオロイメージャー575（登録商標）FluorImager™ 575（モレキュラー・ダイナミックス（Molecular Dynamics）、サニーヴェール、カリフォルニア）若しくはヒタチFMBIO（登録商標）（Hitachi FMBIO™）（サンブルーノ、カリフォルニア）蛍光スキャナー又はABI373及びABIプリズム377（登録商標）（ABI Prism™ 377）DNAシークエンサー（応用バイオシステム部門、パーキンエルマー（Perkin Elmer）、フォスターシティ、カリフォルニア）のみを有する実験室において使用することができる。したがって、本発明の方法は、種々の用途及び実験室に適応する。

本発明において特定されるアプローチは、多重系（multiplex）に含まれる座位の分析において時間、労力及び材料を節約する。本発明の方法は、３以上、更には８以上の座位を、別々の管内で各座位を独立して増幅させる代わりに、１回の増幅反応を使用して、１つの管内で一緒に増幅させることを可能にする。

本発明は、法医学分析、父子鑑別、骨髄移植のモニター、連鎖地図作成並びに遺伝子疾患及びガンの検出の分野において特定の用途を有する。３以上の座位を同時に増幅及び分析することが可能になることにより、本発明の材料及び方法は、２つの異なる個体の血液又はその他の組織から分離したDNAの適合性の確実性を有意に増加させる。異なる個体の少量の組織を正確に区別することの必要性は、多数の有罪判決（及び無罪判決）がSTR座位の分析を含むDNAタイピング分析に依存している法医学用途において特に重要である。

科学者、特に法医学者は、２つの組織サンプルの適合性が統計学的に有意であることを保

証するための、DNAの多数の多型性座位の分析の必要性を長い間認めてきた（Presley,L.A.et al.（1993）"The implementation of the polymerase chain reaction（PCR）HLA DQ alpha typing by the FBI laboratory,"in"The Third International Symposium on Human Identification 1992,"pp.245－269;Bever,R.A.,et al.（1992）"Characterization of five VNTR loci by Hae III RFLP analysis:application to paternity testing,"in"The Second International Symposium on Human Identification 1991,"pp.103－128.）。しかしながら、本発明までに、１回の反応で３以上のSTR座位を同時に分析する方法はほとんど存在しなかった。多重増幅（Multiplexing）能力の重要性を明確に理解するためには、DNAタイピング分析の背後にあるいくつかの数学を理解することが役立つ。

説明目的のために、あらゆるSTR座位が、10に１の頻度で１つ遺伝子型（すなわち２つの対立遺伝子のパターン）を有すると仮定する。換言すれば、ランダムに選択した２つの個体が１つのSTRについて適合した型を有している可能性は1/10であると仮定するいうことである。しかしながら、２つの異なるSTR座位を分析する場合、両方の系が任意に適合する（random match）可能性は1/100となる。３つのSTR座位を分析する場合、３つの系それぞれが任意に適合する可能性は1/1000となる。結果として、３をこえる座位について分析すべきSTR座位の数の著しい増加が、一般集団内の任意適合の可能性を有意に減少させ、これにより容疑者のタイプと犯行現場の証拠とを比較することにより容疑者を正確に同定（又は推定）する機会が増加することを理解することは容易である。同様の論法を使用することにより、本発明の方法は、父子鑑定における疑わしい父親の同定の正確性、骨髄組織の正確な適合、連鎖地図の研究から得られる有意な結果の発見並びに遺伝子疾患及びガンの検出の可能性を増加させるだろう。

本発明の更なる目的、特徴及び利点は、以下に示す発明の詳細な説明及び図面より明らかになるだろう。

【図面の簡単な説明】

図１は、実施例１において、フルオロイメージャー（登録商標）蛍光スキャナー（モレキュラー・ダイナミックス、サニーヴェール、カリフォルニア）を用いて検出した、座位D3S1539、D7S820、D13S317及びD5S818の同時増幅産物の蛍光検出結果を示すレーザープリンター像である。

図２は、実施例２において、フルオロイメージャー（登録商標）蛍光スキャナー（モレキュラー・ダイナミックス、サニーヴェール、カリフォルニア）を用いて検出した、座位D17S1298、D7S820、D13S317及びD5S818の同時増幅産物の蛍光検出結果を示すレーザープリンター像である。

図３は、実施例３において、フルオロイメージャー（登録商標）蛍光スキャナー（モレキュラー・ダイナミックス、サニーヴェール、カリフォルニア）を用いて検出した、座位D17S1298、D7S820、S13S317及びD5S818の同時増幅産物の蛍光検出結果を示すレーザープリンター像である。

図４は、実施例４において、フルオロイメージャー（登録商標）蛍光スキャナー（モレキュラー・ダイナミックス、サニーヴェール、カリフォルニア）を用いて検出した、座位D20S481、D7S820、D13S317及びD5S818の同時増幅産物の蛍光検出結果を示すレーザープリンター像である。

図５は、実施例５において、フルオロイメージャー（登録商標）蛍光スキャナー（モレキュラー・ダイナミックス、サニーヴェール、カリフォルニア）を用いて検出した、座位D20S481、D7S820、D13S317及びD5S818の同時増幅産物の蛍光検出結果を示すレーザープリンター像である。

図６は、実施例６において、フルオロイメージャー（登録商標）蛍光スキャナー（モレキュラー・ダイナミックス、サニーヴェール、カリフォルニア）を用いて検出した、座位D9S930、D7S820、D13S317及びD5S818の同時増幅産物の蛍光検出結果を示すレーザープリンター像である。

図７は、実施例７において、フルオロイメージャー（登録商標）蛍光スキャナー（モレキュラー・ダイナミックス、サニーヴェール、カリフォルニア）を用いて検出した、座位D1

0S1239、D7S820、D13S317及びD5S818の同時増幅産物の蛍光検出結果を示すレーザープリンター像である。
図８は、実施例８において、フルオロイメージャー（登録商標）蛍光スキャナー（モレキュラー・ダイナミックス、サニーヴェール、カリフォルニア）を用いて検出した、座位D10S1239、D7S820、D13S317及びD5S818の同時増幅産物の蛍光検出結果を示すレーザープリンター像である。
図９は、実施例９において、フルオロイメージャー（登録商標）蛍光スキャナー（モレキュラー・ダイナミックス、サニーヴェール、カリフォルニア）を用いて検出した、座位D14S118、D7S820、D13S317及びD5S818の同時増幅産物の蛍光検出結果を示すレーザープリンター像である。
図10は、実施例10において、フルオロイメージャー（登録商標）蛍光スキャナー（モレキュラー・ダイナミックス、サニーヴェール、カリフォルニア）を用いて検出した、座位D14S562、D7S820、D13S317及びD5S818の同時増幅産物の蛍光検出結果を示すレーザープリンター像である。
図11は、実施例11において、フルオロイメージャー（登録商標）蛍光スキャナー（モレキュラー・ダイナミックス、サニーヴェール、カリフォルニア）を用いて検出した、座位D14S548、D7S820、D13S317及びD5S818の同時増幅産物の蛍光検出結果を示すレーザープリンター像である。
図12は、実施例12において、フルオロイメージャー（登録商標）蛍光スキャナー（モレキュラー・ダイナミックス、サニーヴェール、カリフォルニア）を用いて検出した、座位D16S490、D7S820、D13S317及びD5S818の同時増幅産物の蛍光検出結果を示すレーザープリンター像である。
図13は、実施例13において、フルオロイメージャー（登録商標）蛍光スキャナー（モレキュラー・ダイナミックス、サニーヴェール、カリフォルニア）を用いて検出した、座位D16S753、D7S820、D13S317及びD5S818の同時増幅産物の蛍光検出結果を示すレーザープリンター像である。
図14は、実施例14において、フルオロイメージャー（登録商標）蛍光スキャナー（モレキュラー・ダイナミックス、サニーヴェール、カリフォルニア）を用いて検出した、座位D17S1299、D7S820、D13S317及びD5S818の同時増幅産物の蛍光検出結果を示すレーザープリンター像である。
図15は、実施例15において、フルオロイメージャー（登録商標）蛍光スキャナー（モレキュラー・ダイナミックス、サニーヴェール、カリフォルニア）を用いて検出した、座位D16S539、D7S820、D13S317及びD5S818の同時増幅産物の蛍光検出結果を示すレーザープリンター像である。
図16は、実施例16において、フルオロイメージャー（登録商標）蛍光スキャナー（モレキュラー・ダイナミックス、サニーヴェール、カリフォルニア）を用いて検出した、座位D22S683、D7S820、D13S317及びD5S818の同時増幅産物の蛍光検出結果を示すレーザープリンター像である。
図17は、実施例17において、FMBIO（登録商標）蛍光スキャナー（登録商標）（ヒタチ・ソフトウェア・エンジニアリング（Hitachi Software Engineering）、サンブルーノ、カリフォルニア）を用いて検出した、座位D16S539、D7S820、D13S317、D5S818、HUMCSF1PO（「CSF1PO」）及びHUMTPOX（「TPOX」）の同時増幅産物の蛍光検出結果を示すレーザープリンター像である。
図18は、実施例18において、FMBIO（登録商標）蛍光スキャナー（登録商標）（ヒタチ・ソフトウェア・エンジニアリング、サンブルーノ、カリフォルニア）を用いて検出した、座位D16S539、D7S820、D13S317、D5S818、HUMCSF1PO（「CSF1PO」）、HUMTPOX（「TPOX」）及びHUMTH01（「TH01」）の同時増幅産物の蛍光検出結果を示すレーザープリンター像である。
図19は、実施例19において、FMBIO（登録商標）蛍光スキャナー（登録商標）（ヒタチ・ソフトウェア・エンジニアリング、サンブルーノ、カリフォルニア）を用いて検出した、

座位D16S539、D7S820、D13S317、D5S818、HUMCSF1PO（「CSF1PO」）、HUMTPOX（「TPOX」）、HUMTH01（「TH01」）及びHUMvWFA31（「vWA」）の同時増幅産物の蛍光検出結果を示すレーザープリンター像である。

図20は、実施例20において、FMBIO（登録商標）蛍光スキャナー（登録商標）（ヒタチ・ソフトウェア・エンジニアリング、サンブルーノ、カリフォルニア）を用いて検出した、座位D16S539、D7S820、D13S317、D5S818、HUMF13A01（「F13A01」）及びHUMFESFPS（「FESFPS」）の同時増幅産物の蛍光検出結果を示すレーザープリンター像である。

図21は、実施例21において、FMBIO（登録商標）蛍光スキャナー（登録商標）（ヒタチ・ソフトウェア・エンジニアリング、サンブルーノ、カリフォルニア）を用いて検出した、座位D16S539、D7S820、D13S317、D5S818、HUMF13A01（「F13A01」）、HUMFESFPS（「FESFPS」）及びHUMBFXIII（「F13B」）の同時増幅産物の蛍光検出結果を示すレーザープリンター像である。

図22は、実施例22において、FMBIO（登録商標）蛍光スキャナー（登録商標）（ヒタチ・ソフトウェア・エンジニアリング、サンブルーノ、カリフォルニア）を用いて検出した、座位D16S539、D7S820、D13S317、D5S818、HUMF13A01（「F13A01」）、HUMFESFPS（「FESFPS」）、HUMBFXIII（「F13B」）及びHUMLIPOL（「LPL」）の同時増幅産物の蛍光検出結果を示すレーザープリンター像である。

図23は、実施例23において、FMBIO（登録商標）蛍光スキャナー（登録商標）（ヒタチ・ソフトウェア・エンジニアリング、サンブルーノ、カリフォルニア）を用いて検出した、座位D16S539、D7S820、D13S317、D5S818、HUMCSF1PO（「CSF1PO」）、HUMTPOX（「TPOX」）、HUMTH01（「TH01」）及びHUMvWFA31（「vWA」）の同時増幅産物の蛍光検出結果を示すレーザープリンター像である。

図24は、実施例24において、フルオロイメージャー（登録商標）蛍光スキャナー（モレキュラー・ダイナミックス、サニーヴェール、カリフォルニア）を用いて検出した、座位D3S1539、D19S253、D13S317及びD20S481の同時増幅産物の蛍光検出結果を示すレーザープリンター像である。

図25は、実施例25において、フルオロイメージャー（登録商標）蛍光スキャナー（モレキュラー・ダイナミックス、サニーヴェール、カリフォルニア）を用いて検出した、座位D10S1239、D9S930、D4S2368及びD20S481の同時増幅産物の蛍光検出結果を示すレーザープリンター像である。

図26は、実施例26において、３つの座位D16S539、D7S820及びD13S317の同時増幅産物の銀染色検出結果を示す写真である。

図27は、実施例27において、４つの座位D16S539、D7S820、D13S317及びHUMvWFA31（「vWA」）の同時増幅産物の銀染色検出結果を示す写真である。

図28は、実施例28において、３つの座位D10S1239、D9S930及びD13S317の同時増幅産物の銀染色検出結果を示す写真である。

図29は、実施例29において、３つの座位D10S1239、D9S930及びD4S2368の同時増幅産物の銀染色検出結果を示す写真である。

図30は、実施例30において、４つの座位D10S1239、D9S930、D4S2368及びD20S481の同時増幅産物の銀染色検出結果を示す写真である。

図31は、実施例31において、３つの座位D3S1539、D19S253及びD13S317の同時増幅産物の銀染色検出結果を示す写真である。

図32は、実施例32において、４つの座位D3S1539、D19S253、D4S2368及びD20S481の同時増幅産物の銀染色検出結果を示す写真である。

図33は、実施例33において、４つの座位D3S1539、D19S253、D13S317及びD20S481の同時増幅産物の銀染色検出結果を示す写真である。

図34は、実施例34において、３つの座位D10S1239、D9S930及びD20S481の同時増幅産物の銀染色検出結果を示す写真である。

図35は、実施例35において、３つの座位D10S1239、D4S2368及びD20S481の同時増幅産物の銀染色検出結果を示す写真である。

発明の詳細な説明

A. 定義

以下に示す定義は、用語の範囲及び詳細の明確かつ矛盾のない理解を提供することを援助することを意図している。

アレリックラダー：座位に由来する増幅した対立遺伝子から構成される標準的な大きさのマーカー。

対立遺伝子:DNAのセグメントと関連する遺伝的変異。すなわち、同一の座位を占めるDNA配列の２以上の代替形態（alternate form）。

生化学命名法：本明細書においては、標準的な生化学命名法を使用して、アデニンをＡ、チミンをＴ、グアニンをＧ、シトシンをＣと表す。例えば、対応するヌクレオチドはデオキシグアノシン－5'－３リン酸（dGTP）である。

DNA多型性:DNA配列中の２以上の異なるヌクレオチド配列が、同一種群（same interbreeding population）に共存している状態。

座位：染色体上の特定の部位。座位の対立遺伝子は、相同染色体の同一部位に位置している。

座位特異的プライマー：増幅方法を使用する条件下、座位の少なくとも１つの対立遺伝子について規定された座位又はその相補鎖の部分と特異的にハイブリダイズするが、その他のDNA配列とは効率的にハイブリダイズしないプライマー。

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）：変性、プライマーを用いたアニーリング及びDNAポリメラーゼを用いた伸張のサイクルを使用して、標的DNA配列のコピー数を約10^6倍又はそれ以上に増幅する技術。核酸増幅用ポリメラーゼ連鎖反応は、米国特許第4,683,195号及び第4,683,202号明細書によりカバーされている。これらの方法の記載については参照することにより本明細書に組み込まれる。

多型性STR座位：ゲノムDNAの特定の領域における反復配列要素の数（及び配列の正味の長さ）が、対立遺伝子間及び個体間で変化しているSTR座位。

多型情報量（polymorphism information content）（PIC）：ある座位に存在する多型性の量の尺度（Botstein et al.,1980）。PIC値は０～1.0の範囲にあり、高い値は多型性の程度が高いことを示している。通常、この尺度は、一般に使用される尺度、例えばヘテロ接合性よりも小さい値を示す。有益性の高い（約70%をこえるヘテロ接合性）マーカーについては、ヘテロ接合性とPICとの間の差異はわずかである。

一次反応：精製ヒトゲノムDNAをPCR用の鋳型として使用した初期反応。

プライマー：プライマーの3'末端が最近接状態（closest proximity）にあるように、座位の対立鎖とハイブリダイズする、２つの１本鎖オリゴヌクレオチド又はDNA断片。

プライマー対：プライマー１及びプライマー２を含む２つのプライマーであって、プライマー１は、増幅するDNA配列の一方の１本鎖と一方の末端でハイブリダイズし、プライマー２は、増幅するDNA配列の相補鎖上の他方の末端とハイブリダイズする。

プライマー部位：プライマーがハイブリダイズする標的DNAの領域。

二次反応：一次反応の希釈を使用して、PCR用鋳型として同一又は異なるプライマー対を用いての再増幅。

STR座位：長さ３～７塩基対の、短い、反復配列要素を含むヒトゲノム領域。

B. 多重反応成分の選択

本発明の方法は、適切な座位のセット、プライマー及びを選択して、大きさにおいて重複しない多数の同時増幅した座位に由来する増幅した対立遺伝子、又は大きさにおいて重複している増幅した対立遺伝子を互いに区別できるようにする方法で標識した同時増幅した座位に由来する増幅した対立遺伝子を生成することを企図している。更に、本発明の方法は、１回の増幅プロトコルを用いての使用に適合するSTR座位の選択を企図している。本明細書に記載する座位の特定の組み合わせは、本出願に特有である。座位の組み合わせは、前記２つの理由により又は、適切な産物収量を生成しない１以上の座位若しくは本発明の反応において生成する真正の対立遺伝子を表さない断片との組合せで拒絶されるだろう。

本明細書に開示した組み合わせに加えて、成功する組み合わせを、座位の組み合わせの試行錯誤、プライマー対配列の選択、及び全ての含まれる座位が増幅する平衡（equilibrium）を同定するためのプライマー濃度の調節により生成することができる。本発明の方法及び材料を開示した後において、本発明の方法及びキットにおける使用のための、座位、プライマー対及び増幅技術の種々の選択方法は、当業者に容易に示唆されるだろう。そのような方法の全ては、請求の範囲内にあることが意図される。

本発明の方法の実施において特に重要なのは、多重増幅反応工程において一緒に増幅する個々の座位から生成する、増幅した対立遺伝子の大きさの範囲である。現在の技術を使用しての分析を容易にするために、500塩基よりも小さい断片の増幅により検出することができる系が最も好ましい。最も好ましい座位の組み合わせ、プライマー及び増幅技術は、前記の発明の概要に記載されている。

プライマーの不適切な選択により、幾つかの好ましくない影響、例えば増幅の不足、多数の部位における増幅、プライマーの二量体形成、異なる座位に由来するプライマー配列の好ましくない相互作用、別の座位由来の対立遺伝子と重複するある座位由来の対立遺伝子の生成又は、多重系と適合しない異なる座位用の増幅条件及びプロトコルの必要性が生じる。本発明の方法に使用するプライマーの合成は、当業者に既知のオリゴヌクレオチド合成用の標準的手順を使用して行うことができる。

C.　３より多い座位を使用した多重系を開発するための、３つの対立遺伝子の多重系の使用

多数の異なる技術のいずれかひとつを使用して、本発明の方法を使用して分析するSTR座位のセットを選択することができる。本発明の分析方法における使用に有用な座位のセットを開発するための１つの好ましい技術を以下に記載する。３つの座位を含む多重系を開発した後、それをコアとして使用して、３より多い座位を含む多重系を作成してもよい。第一の３つの座位を含む新しい組み合わせを作成した。例えば、座位D7S820、D13S317及びD5S818を含むコアの多重系を使用して、D16S539、D7S820、D13S317及びD5S818からなる多重系誘導体;HUMCSF1PO、HUMTPOX、D16S539、D7S820、D13S317及びD5S818からなる多重系誘導体;HUMCSF1PO、HUMTPOX、HUMTH01、D16S539、D7S820、D13S317及びD5S818からなる多重系誘導体及びHUMCSF1PO、HUMTPOX、HUMTH01、HUMvWFA31、D16S539、D7S820、D13S317及びD5S818からなる多重系誘導体を生成した。

座位のコアのセットを使用して、本発明の方法を使用した多重分析用のSTR座位の適切な誘導体のその他のセットを生成することができることが企図される。本発明の方法を使用して分析する座位を選択するために使用する方法にかかわらず、多重分析用に選択する全ての座位は以下に示す特徴を有していなければならない。（１）最小の滑り（minimal slippage）（例えば、増幅工程中の繰り返し配列の読み違いに由来するもの）を生成すること；（２）多重増幅工程中の増幅した対立遺伝子への塩基の付加または削除に由来する人工産物（artifact）がたとえ存在するとしても少数であること；（３）ポリメラーゼによる増幅反応の早すぎる終了に由来する人工産物がたとえ存在するとしても少数であること及び（４）連続的単一塩基の削除に由来する、与ある真性の増幅した対立遺伝子よりも低分子量の「トレーリング（trailing）」バンドが存在しないこと。Schumm et al.,"Development of Nonisotopic Multiplex Amplification Sets for Analysis of Polymorphic STR Loci,"Fourth International Symposium on Human Identification 1993,pp.177－187（pub.by Promega Corp.,1993）を参照のこと。

D.　DNAサンプルの調製

単一の座位の増幅に適合するあらゆるDNA調製方法を使用して、本発明の方法に使用するためのヒトゲノムDNAサンプルを調製することができる。以下に示す文献に記載される方法を含む多数の方法が、本発明の方法に使用するためのゲノムDNAサンプル調製に適しているが、これに限定されるものではない。Patel,P.I.,et al.（1984）"Organization of the HPRT gene and related sequences in the human genome,"Somat Cell Mol Genet 10:483－493,and Gill,P.,et al.（1985）"Forensic application of DNA'fingerprints',"Nature 318:577－579。

本発明の方法に使用する前に、DNA濃度を、あらゆる標準的なDNA検出方法を使用して測定することができる。しかしながら、DNA濃度は、好ましくは、Brunk C.F.,et al.4（1979）"Assay for nanogram quantities of DNA in cellular homogenates,"Anal Biochem 92:497－500に記載されるような測定技術を使用して蛍光定量的に測定する。より好ましくは、DNA濃度は、Waye et al.（1979）Waye,J.S.,et al.（1991）"Sensitive and specific quantification of human genomic deoxyribonucleic acid（DNA）in forensic science specimens:casework examples,"J.Forensic Sci.,36:1198－1203に記載されるような、DNA標準とヒト特異的プローブとのハイブリダイゼーション量と比較することにより測定する。増幅反応に多数の鋳型DNAを使用すると、真の対立遺伝子を示さない余計なバンドとして現れる人工産物が生じる。

E. DNAの増幅

ヒトゲノムDNAサンプルを単離し、その濃度の前記の様にして測定した後、標的の座位を、本発明の方法の多重増幅工程で同時増幅することができる。ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）（Saiki,R.K.,et al.（1985）"Enzymatic amplification of beta－globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia,"Science 230:1350－1354）、転写を基本とした増幅（Kwoh,D.Y.,and Kwoh,T.J.（1990）"Target amplification systems in nucleic acid－based diagnostic approaches,"American Biotechnology Laboratory,October,1990）及び鎖置換増幅（SDA）（Walker,G.T.,et al.（1992）"Isothermal in vitro amplification of DNA by a restriction enzyme－DNA Polymerase system,"Proc.Natl.Acad.Sci.,U.S.A.89:392－396）を含む多数の異なる増幅方法のいずれかひとつを使用して座位を増幅することができるが、これらに限定されるものではない。好ましくは、DNAサンプルを、プライマー対及びセット中の各座位に特有の熱サイクル条件を使用したPCR増幅に付する。以下に示す実施例に使用したプライマー配列を詳述している、本明細書の最後の配列表について言及すると、幾つかの配列は、本発明の代替の態様である。

本発明の方法に使用する座位の最も好ましい組合せに対する最も好ましい増幅プロトコルの詳細を、以下に示す実施例に記載する。各多重系に関連する特定の手順の更なる詳細を、実施例で言及する。実施例において使用した座位特異的プライマーの配列は、ハイブリダイゼーションで使用する条件下において、増幅する座位の対立遺伝子とハイブリダイズするのに十分であり、その他の座位の対立遺伝子の増幅を本質的に免れている多数のヌクレオチドを含んでいる。米国特許第5,192,659号明細書（Simons）について言及すると、遺伝子特異的プライマーのより詳細な記載について参照することにより、その教示は本明細書に組み込まれる。

F. DNA断片の分離及び検出

増幅した対立遺伝子のセットを、本発明の多重増幅工程から生成した後、増幅した対立遺伝子を評価する。本発明の方法の評価工程は、多数の異なる手段のいずれかひとつにより達成することができる。最も好ましい方法を以下に記載する。

好ましくは、電気泳動を使用して、多重増幅反応産物を分離する。より好ましくは変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動である（Sambrook,J.et al.（1989）In Molecular Cloning－A Laboratory Manual,2nd edition,Cold Spring Harbor Laboratory Press,pp.13.45－13.57を参照のこと）。最も好ましいゲル調製及び電気泳動手順並びに本発明の方法の評価工程に使用する条件を実施例１に記載する。変性ポリアクリルアミドゲル中におけるDNA断片の分離は、断片の大きさを基礎にして起こる。

増幅した対立遺伝子をポリアクリルアミドゲル中で分離した後、ゲル中の対立遺伝子及びその他のあらゆるDNA（例えば、DNAマーカー又はアレリックラダー）を可視化し、分析することができる。ゲル中のDNAの可視化は、銀染色、又は放射性同位体、蛍光物質、化学発光物質及び検出することができる基質と組合せた酵素などの報知物質（reporter）を含む多数の従来技術のいずれかひとつを使用して達成することができる。銀染色は、ゲル中の対立遺伝子を可視化する好ましい方法である（Bassam,B.J.,et al.（1991）"Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels,"Anal.Biochem.196:80－83

を参照のこと）。より好ましい方法は、多重反応における各座位用に放射性標識（Hammond et al.（1994）を参照のこと）又は蛍光標識（Schumm et al.,（1994）を参照のこと）したプライマーを使用し、それぞれオートラジオグラム又は蛍光定量的検出器を使用して標識した生成物を検出することである。対立遺伝子を可視化する先行技術の方法について記載している前記３つの文献は、参照することにより本明細書に組み込まれる。

DNAサンプル中に存在する対立遺伝子は、好ましくは、サンプル中の各座位に存在する対立遺伝子を測定するためのサイズ標準、例えばDNAマーカー又は座位特異的アレリックラダーと比較することにより測定する。２以上の多型性STR座位を含む多重増幅評価用の最も好ましいサイズ標準は、評価する各座位についてのアレリックラダーの組合せから構成される。例えば、Schummら（supra,p.178）のアレリックラダー及びラダー構築方法の記載を参照のこと。

各座位用の蛍光標識したプライマーを使用して生成した、２以上の多型性STR座位を含む多重増幅評価用の好ましいサイズ標準は、評価する座位についての蛍光標識したアレリックラダーの組合せから構成される。

個々の座位用のアレリックラダーの構築に続いて、アレリックラダーを混合し、増幅したサンプルのローディングと同時に、ロードしてもよい。各アレリックラダーは、対応の座位に由来するサンプル中の対立遺伝子と同等に移動（co－migrate）する。

データの永久記録は、オートマチック・プロセッサー・コンパチブル（Automatic Processor Compatible）（APC）フィルム（STRシステムズマニュアル＃TMD004、プロメガ・コーポレーション（Promega Corporation）、マディソン、ウィスコンシンから入手可能）又は蛍光検出装置（STRシステムズマニュアル＃TMD006、プロメガ・コーポレーション、マディソン、ウィスコンシンから入手可能）を使用して生成することができる。

G.　好ましい検出技術：蛍光検出

本発明の方法の最も好ましい態様のひとつにおいては、蛍光検出を使用して、多重増幅反応により生成した混合物中の増幅した対立遺伝子を評価する。以下に記載するのは、検出方法が好ましくはどのように行われるかを要約したものである。

自動蛍光イメージングの出現により、多重増幅産物の迅速な検出及び分析を達成することが可能になった。蛍光分析については、１つのフルオレセイン標識化プライマーを、各座位の増幅に含ませることができる。蛍光標識プライマーの２つの好ましい種類、すなわちフルオレセイン標識化（FL－）プライマー及びテトラメチルローダミン標識化（TMR－）プライマーの使用についての記載は、以下に示す実施例に含まれる。標識プライマーを使用しての、生成した増幅した断片の分離は、銀染色検出方法とまったく同様の様式で達成する。ゲルをスキャンし、非常に短時間、例えば３～20分間でデータをデジタル化する、フルオロイメージャー分析器（モレキュラー・ダイナミックス、サニーヴェール、カリフォルニアより入手可能）又はFMBIO（登録商標）（ヒタチ・コーポレーション（Hitachi Corporation）、サンブルーノ、カリフォルニアより入手可能）を使用して、得られたゲルを分析することができる。

要約すれば、本発明の方法は、評価工程において蛍光検出を使用することにより最も好ましく実施される。好ましい検出方法においては、多重増幅反応に使用するプライマーの各対の１つが、プライマーに結合する蛍光標識を有している。その結果、増幅反応より生成した増幅した対立遺伝子は、蛍光標識されている。本発明の最も好ましい態様においては、増幅した対立遺伝子を、ポリアクリルアミドゲル中で分離し、次いで分離した対立遺伝子を可視化し、蛍光イメージ分析器を使用して分析する。

蛍光検出は、放射性標識法及び検出法よりも好ましい。なぜなら、放射性物質の使用及びそれに伴う規制面及び安全面の問題が要求されないからである。

蛍光検出は、非放射性検出方法、例えば銀染色よりも好ましい。なぜなら、蛍光検出方法は、染色よりも少数のゲル人工産物（gel artifact）を示すからである。少数のゲル人工産物の原因は、おそらく、結合した標識を有する増幅したDNA断片のみが蛍光検出において検出されるが、一方、銀染色検出方法では、多重増幅反応より生成した増幅したあらゆるDNA断片が染色され、検出されるという事実にその大部分が帰する。銀染色を用いて染

色したポリアクリルアミドゲルは、銀染色のゲル自身への非特異的結合により、一般的にかなり高いバックグラウンドを有し、その結果、ゲル内で検出することができる個々のDNAバンドに対する感度が低下する。銀染色及び蛍光検出法を、以下に示す２つの実施例において比較する。

H. キット

本発明は、前記の方法を利用するキットにも向けられる。基本的なキットは、各座位用の１以上の座位特異的プライマーを有する容器を含んでいる。使用説明書を含んでいてもよい。

その他の任意のキット成分は、特定の座位のそれぞれに向けられたアレリックラダー、十分量の増幅用酵素、増幅を促進するための増幅緩衝液、ゲル電気泳動用の増幅物質調製用ローディング溶液（loading solution）、鋳型コントロール（template control）としてのヒトゲノムDNA、物質のゲル中での予想される移動を保証するサイズ標準並びに使用者を教育し、使用中の誤りを制限するためのプロトコル及びマニュアルを含んでいてもよい。キット中の種々の試薬の量は、多数の因子、例えば方法の最適の感度等に依存して変化させることができる。手動適用における使用のためのテストキット又は自動検出器若しくは分析器を用いての使用のためのテストキットを提供することは、本発明の範囲に含まれる。

実施例

以下に示す実施例は、本発明の利点を説明し、当業者が本発明を製造及び実施することを補助するために提供される。実施例は、どんなことがあっても、開示又は特許権による保護の範囲を制限することを意図していない。

ゲノムDNA単離及び定量化は、文献（Puers,C.,et al.（1993）"Identification of repeat sequence heterogeneity at the polymorphic short tandem repeat locus HUMTH01［AATG］$_n$and reassignment of alleles in population analysis by using a locus－specific allelic ladder,"Am.J.Hum.Genet.53:953－958）に記載されているものと本質的に同様にして行った。これらの方法は当業者に既知であり、好ましいものであるが、本発明の適用に対して要求されるものではない。

増幅産物は、0.4mm厚の４％変性ポリアクリルアミドゲル（アクリルアミド：ビス－アクリルアミド＝19:1）を用いた電気泳動により分離した。前記ゲルは7M尿素（Sambrook et al.,（1989））を含んでおり、銀染色分析に関する場合はガラスプレートに化学的に架橋していた（Kobayashi,Y.（1988）"A method to cast thin sequencing gels,"BRL Focus 10:73－74）。蛍光分析に関する場合は架橋を使用しなかった。DNAサンプルを、ローディング溶液2.5μｌ（10mM NaOH、95％ホルムアミド、0.05％ブロモフェノールブルー、0.05％キシレンシアノール）とを混合し、95℃で２分間変性し、ローディング前に氷中で冷却した。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した後、増幅した反応産物及びDNAサイズ標準コントロールを、銀染色、蛍光検出、放射性検出又は前記方法の組合せを使用して検出した。ある実施例においては、ゲル中の反応産物及びサイズ標準を、先行技術に記載されている標準的染色方法及び検出方法を使用した銀染色により検出した（Bassam et al.,（1991）を参照のこと）。染色したゲルの永久イメージは、オートマチック・プロセッサー・コンパチブルフィルム（APCフィルム、プロメガ・コーポレーション、カタログ番号DQ4411）に暴露することにより得た。その他の実施例においては、検出を、先行技術（Schumm et al.,（1994））に記載された方法を使用した蛍光スキャンにより行った。

以下に示す実施例は、本発明の方法の使用例であり、ある場合においては、本発明のプライマーの１種以上を使用して、１以上のDNAサンプルに由来する少なくとも３つのSTR座位に存在する対立遺伝子を同時に測定した例である。表１及び２は、以下に示す各実施例に記載した多重増幅反応において、どの座位のセットが同時増幅したかを要約したものである。２つの表とも、各多重反応における各座位の増幅にどのプライマー対を使用したかということも示している。表１は、本明細書に記載した多重反応に由来する増幅した対立遺伝子を蛍光スキャンニングを使用して検出した実施例のすべてを列挙している。一方、表

２は、銀染色を使用して、増幅した対立遺伝子を検出した実施例を列挙している。
表１に列挙した各プライマー対の１つのプライマーは、多重増幅反応における使用の前に、蛍光標識した。ある場合においては、異なる標識を使用して、異なる座位に対するプライマーを標識し、以下に示す実施例において使用する蛍光スキャナーを使用してスキャンしたときに、異なるプライマーを使用して生成した対立遺伝子が互いに区別できるようになるようにした。以下に示す実施例においては、２つの異なる蛍光標識を使用した。表１において、「FL」はフルオレセイン標識化を示し、「TMR」はテトラメチルローダミン標識化を示している。更に表１は、各実施例において、多重増幅反応に使用した各プライマー対のうちのどのプライマーが、標識されているか（例えば、「FL－２」は、多重増幅反応に使用する前に、フルオレセインを用いて5'末端を標識した配列番号２のプライマーを意味する）を示している。
同一の「FL」及び「TMR」という略語を以下の実施例において使用する。しかしながら、標識の略語は、本明細書に記載した増幅反応に使用した標識プライマーの配列番号の直前に置かれる（例えば、「FL－２」の代わりに、「FL－配列番号２」）。
以下に示す４組の実施例（実施例２及び３、４及び５、７及び８並びに19及び23）においては、同一のプライマーのセット及び分析する各STR座位用の各プライマー対の１つに共有結合により結合した同一の蛍光標識を使用して、同一の座位のセットを分析した。しかしながら、各実施例においては、異なるプライマーのセットを標識した。これらの実施例の組は、本発明の方法の多重増幅反応に使用する前に、プライマー対のどのプライマーを標識したかを問わず、同様の低いバックグラウンド及び同一の対立遺伝子測定結果が、検出方法として蛍光標識を使用した同一のプライマー対から得ることができることを示すために、本明細書に含まれる。

表1

実施例	増幅した座位	プライマー対の配列番号	使用した蛍光標識
1	D7S820 D13S317 D5S818	1, 2 3, 4 5, 6	FL-2 FL-4 FL-6
2	D7S820 D13S317 D5S818	1, 2 3, 4 5, 6	FL-2 FL-4 FL-6
3	D7S820 D13S317 D5S818	1, 2 3, 4 5, 6	FL-2 FL-4 FL-6
4	D7S820 D13S317 D5S818	1, 2 3, 4 5, 6	FL-2 FL-4 FL-6
5	D7S820 D13S317 D5S818	1, 2 3, 4 5, 6	FL-2 FL-4 FL-6
6	D7S820 D13S317 D5S818	1, 2 3, 4 5, 6	FL-2 FL-4 FL-6
7	D7S820 D13S317 D5S818	1, 2 3, 4 5, 6	FL-2 FL-4 FL-6
8	D7S820 D13S317 D5S818	1, 2 3, 4 5, 6	FL-2 FL-4 FL-6
9	D7S820 D13S317 D5S818	1, 2 3, 4 5, 6	FL-2 FL-4 FL-6
10	D7S820 D13S317 D5S818	1, 2 3, 4 5, 6	FL-2 FL-4 FL-6

11	D7S820 D13S317 D5S818	1, 2 3, 4 5, 6	FL-2 FL-4 FL-6
12	D7S820 D13S317 D5S818	1, 2 3, 4 5, 6	FL-2 FL-4 FL-6
13	D7S820 D13S317 D5S818	1, 2 3, 4 5, 6	FL-2 FL-4 FL-6
14	D7S820 D13S317 D5S818	1, 2 3, 4 5, 6	FL-2 FL-4 FL-6
15	D7S820 D13S317 D5S818	1, 2 3, 4 5, 6	FL-2 FL-4 FL-6
16	D7S820 D13S317 D5S818	1, 2 3, 4 5, 6	FL-2 FL-4 FL-6
17	D7S820 D13S317 D5S818 D16S539 HUMCSF1PO	1, 2 3, 4 5, 6 29, 30 33, 34	FL-2 FL-4 FL-6 FL-30 TMR-33
18	D7S820 D13S317 D5S818 D16S539 HUMCSF1PO	1, 2 3, 4 5, 6 29, 30 33, 34 35, 36	FL-2 FL-4 FL-6 FL-30 TMR-33 TMR-36
19	D7S820 D13S317 D5S818 D16S539 HUMCSF1PO	1, 2 3, 4 5, 6 29, 30 33, 34 35, 36	FL-2 FL-4 FL-6 FL-30 TMR-33 TMR-36

20	D7S820 D13S317 D5S818 D16S539 HUMF13A	1, 2 3, 4 5, 6 29, 30 41, 42	FL-2 FL-4 FL-6 FL-30 TMR-41
21	D7S820 D13S317 D5S818 D16S539 HUMF13A01	1, 2 3, 4 5, 6 29, 30 41, 42 43, 44	FL-2 FL-4 FL-6 FL-30 TMR-41 TMR-43
22	D7S820 D13S317 D5S818 D16S539 HUMF13A01	1, 2 3, 4 5, 6 29, 30 41, 42 43, 44	FL-2 FL-4 FL-6 FL-30 TMR-41 TMR-43
23	D7S820 D13S317 D5S818	1, 2 3, 4 5, 6	TMR-2 TMR-4 TMR-6
24	D3S1539 D19S253 D13S317	7, 49 50, 51 3, 4	FL-49 FL-50 FL-4
25	D10S1239 D9S930 D4S2368	15, 54 55, 14 56, 57	FL-15 FL-14 FL-57

幾つかのケースにおいては、同一の座位のセット及び同一のプライマー対が、表１及び表２に現れていることに注意すべきである。このような場合、同一の対立遺伝子のセットを、それぞれ蛍光染色及び銀染色を使用して分析した。セットが重複する２つのケースは、実施例24及び33並びに実施例25及び30である。これらの実施例は、いずれの方法を用いても同一の結果が得られたことを明確に示している。

表2

実施例	増幅した座位	プライマー対の配列番号
26	D16S539 D7S820	29, 58 1, 2
27	D16S539 D7S820 D13S317	29, 30 1, 2 3, 4
28	D10S1239 D9S930	15, 54 55, 61
29	D10S1239 D9S930	15, 54 55, 61
30	D10S1239 D9S930 D4S2368	15, 54 55, 14 56, 57
31	D3S1539 D19S253	7, 49 50, 51
32	D3S1539 D19S253 D4S2368	7, 49 50, 51 56, 57
33	D3S1539 D19S253 D13S317	7, 49 50, 51 3, 4
34	D10S1239 D9S930	15, 54 55, 14
35	D10S1239 D4S2368	15, 54 56, 57

実施例１

座位D3S1539、D7S820、D13S317及びD5S818の多重増幅の蛍光検出

本実施例においては、DNA鋳型を、１つの反応容器中、個々の座位D3S1539、D7S820、D13S317及びD5S818において、同時に増幅した。PCR増幅を、25μｌの１×STR緩衝液（50mM KCl、10mM Tris－HCl（25℃でpH9.0）、0.1%TritonX－100、1.5mM $MgCl_2$及び各200μMのdATP、dCTP、dGTP及びdTTP）中、5ngの鋳型及び0.04U TaqDNAポリメラーゼ／μｌを使用して行った。サーマルサイクラー480（パーキンエルマー（Perkin Elmer）、フォスターシティ、カリフォルニア）を、以下に示す増幅プロトコルを用いて使用した。96℃で２分間;94℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを10回;90℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを20回；続いて60℃で30分間のサイクルを１回

。
８種の増幅プライマーを、以下に示すように組合せて使用した。各々0.25μＭのD3S1539プライマー１（配列番号７）及び２（FL－配列番号８）、各々0.325μＭのD7S820プライマー１（配列番号１）及び２（FL－配列番号２）、各々0.219μＭのD13S317プライマー１（配列番号３）及び２（FL－配列番号４）、各々0.375μＭのD5S818プライマー１（配列番号５）及び２（FL－配列番号６）。
増幅した産物を、32cmゲル中、40Wで45分間、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、次いでフルオロイメージャー（登録商標）蛍光スキャナー（モレキュラー・ダイナミックス、サニーヴェール、カリフォルニア）を使用した蛍光シグナル検出により可視化した。
図１は、各座位の増幅した断片を示している。レーン１～５は、座位D3S1539、D7S820、D13S317及びD5S818において同時増幅したDNAサンプルを含んでいる。
実施例２
座位D17S1298、D7S820、D13S317及びD5S818の多重増幅の蛍光検出
本実施例においては、DNA鋳型を、１つの反応容器中、個々の座位D17S1298、D7S820、D13S317及びD5S818において、同時に増幅した。PCR増幅を、25μｌの１×STR緩衝液（50mM KCl、10mM　Tris－HCl（25℃でpH9.0）、0.1%TritonX－100、1.5mM　$MgCl_2$及び各200μＭのdATP、dCTP、dGTP及びdTTP）中、5ngの鋳型及び0.04U　TaqDNAポリメラーゼ／μｌを使用して行った。サーマルサイクラー480（パーキンエルマー、フォスターシティ、カリフォルニア）を以下に示す増幅プロトコルを用いて使用した。96℃で２分間;94℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを10回;90℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを20回；続いて60℃で30分間のサイクルを１回。
８種の増幅プライマーを、以下に示すように組合せて使用した。各々0.25μＭのD17S1298プライマー１（配列番号９）及び２（FL－配列番号10）、各々0.325μＭのD7S820プライマー１（配列番号１）及び２（FL－配列番号２）、各々0.219μＭのD13S317プライマー１（配列番号３）及び２（FL－配列番号４）、各々0.375μＭのD5S818プライマー１（配列番号５）及び２（FL－配列番号６）。
増幅した産物を、32cmゲル中、40Wで45分間、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、次いでフルオロイメージャー（登録商標）蛍光スキャナー（モレキュラー・ダイナミックス、サニーヴェール、カリフォルニア）を使用した蛍光シグナル検出により可視化した。
図２は、各座位の増幅した断片を示している。レーン１～５は、座位D17S1298、D7S820、D13S317及びD5S818において同時増幅したDNAサンプルを含んでいる。
実施例３
座位D17S1298、D7S820、D13S317及びD5S818の多重増幅の蛍光検出
座位D17S1298、D7S820、D13S317及びD5S818を、配列番号９をFL－配列番号９で置換して、かつFL－配列番号10を配列番号10で置換したことを除いて実施例２と同様にして増幅した。
増幅した産物を、32cmゲル中、40Wで45分間、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、次いでフルオロイメージャー（登録商標）蛍光スキャナー（モレキュラー・ダイナミックス、サニーヴェール、カリフォルニア）を使用した蛍光シグナル検出により可視化した。
図３は、各座位の増幅した断片を示している。レーン１～５は、座位D17S1298、D7S820、D13S317及びD5S818について同時増幅したDNAサンプルを含んでいる。
実施例４
座位D20S481、D7S820、D13S317及びD5S818の多重増幅の蛍光検出
本実施例においては、DNA鋳型を、１つの反応容器中、個々の座位D20S481、D7S820、D13S317及びD5S818において、同時に増幅した。PCR増幅を、25μｌの１×STR緩衝液（50mM　KCl、10mM　Tris－HCl（25℃でpH9.0）、0.1%TritonX－100、1.5mM　$MgCl_2$及び各200μＭのdATP、dCTP、dGTP及びdTTP）中、5ngの鋳型及び0.04U　TaqDNAポリメラーゼ／μｌを使

用して行った。サーマルサイクラー480（パーキンエルマー、フォスターシティ、カリフォルニア）を以下に示す増幅プロトコルを用いて使用した。96℃で２分間;94℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを10回;90℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを20回；続いて60℃で30分間のサイクルを１回。
８種の増幅プライマーを、以下に示すように組合せて使用した。各々0.25μMのD20S481プライマー１（配列番号11）及び２（FL－配列番号12）、各々0.325μMのD7S820プライマー１（配列番号１）及び２（FL－配列番号２）、各々0.219μMのD13S317プライマー１（配列番号３）及び２（FL－配列番号４）、各々0.375μMのD5S818プライマー１（配列番号５）及び２（FL－配列番号６）。
増幅した産物を、32cmゲル中、40Wで45分間、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、次いでフルオロイメージャー（登録商標）蛍光スキャナー（モレキュラー・ダイナミックス、サニーヴェール、カリフォルニア）を使用した蛍光シグナル検出により可視化した。
図４は、各座位の増幅した断片を示している。レーン１～５は、座位D20S481、D7S820、D13S317及びD5S818について同時増幅したDNAサンプルを含んでいる。
実施例５
座位D20S481、D7S820、D13S317及びD5S818の多重増幅の蛍光検出
座位D20S481、D7S820、D13S317及びD5S818を、配列番号11をFL－配列番号11で置換して、かつFL－配列番号12を配列番号12で置換したことを除いて実施例４と同様にして増幅した。
増幅した産物を、32cmゲル中、40Wで45分間、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、次いでフルオロイメージャー（登録商標）蛍光スキャナー（モレキュラー・ダイナミックス、サニーヴェール、カリフォルニア）を使用した蛍光シグナル検出により可視化した。
図５は、各座位の増幅した断片を示している。レーン１～５は、座位D20S481、D7S820、D13S317及びD5S818について同時増幅したDNAサンプルを含んでいる。
実施例６
座位D9S930、D7S820、D13S317及びD5S818の多重増幅の蛍光検出
本実施例においては、DNA鋳型を、１つの反応容器中、個々の座位D9S930、D7S820、D13S317及びD5S818において、同時に増幅した。PCR増幅を、25μｌの１×STR緩衝液（50mM　KCl、10mM　Tris－HCl（25℃でpH9.0）、0.1%TritonX－100、1.5mM　$MgCl_2$及び各200μMのdATP、dCTP、dGTP及びdTTP）中、5ngの鋳型及び0.04U　TaqDNAポリメラーゼ／μｌを使用して行った。サーマルサイクラー480（パーキンエルマー、フォスターシティ、カリフォルニア）を以下に示す増幅プロトコルを用いて使用した。96℃で２分間;94℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを10回;90℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを20回；続いて60℃で30分間のサイクルを１回。
８種の増幅プライマーを、以下に示すように組合せて使用した。各々0.70μMのD9S930プライマー１（配列番号13）及び２（FL－配列番号14）、各々0.325μMのD7S820プライマー１（配列番号１）及び２（FL－配列番号２）、各々0.22μMのD13S317プライマー１（配列番号３）及び２（FL－配列番号４）、各々0.375μMのD5S818プライマー１（配列番号５）及び２（FL－配列番号６）。
増幅した産物を、32cmゲル中、40Wで45分間、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、次いでフルオロイメージャー（登録商標）蛍光スキャナー（モレキュラー・ダイナミックス、サニーヴェール、カリフォルニア）を使用した蛍光シグナル検出により可視化した。
図６は、各座位の増幅した断片を示している。レーン１～５は、座位D9S930、D7S820、D13S317及びD5S818について同時増幅したDNAサンプルを含んでいる。
実施例７
座位D10S1239、D7S820、D13S317及びD5S818の多重増幅の蛍光検出
本実施例においては、DNA鋳型を、１つの反応容器中、個々の座位D10S1239、D7S820、D13

S317及びD5S818において、同時に増幅した。PCR増幅を、25μｌの１×STR緩衝液（50mM KCl、10mM Tris－HCl（25℃でpH9.0）、0.1%TritonX－100、1.5mM $MgCl_2$及び各200μMのdATP、dCTP、dGTP及びdTTP）中、5ngの鋳型及び0.04U TaqDNAポリメラーゼ／μｌを使用して行った。サーマルサイクラー480（パーキンエルマー、フォスターシティ、カリフォルニア）を以下に示す増幅プロトコルを用いて使用した。96℃で２分間;94℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを10回;90℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを20回；続いて60℃で30分間のサイクルを１回。

８種の増幅プライマーを、以下に示すように組合せて使用した。各々0.75μMのD10S1239プライマー１（配列番号15）及び２（FL－配列番号16）、各々0.325μMのD7S820プライマー１（配列番号１）及び２（FL－配列番号２）、各々0.22μMのD13S317プライマー１（配列番号３）及び２（FL－配列番号４）、各々0.375μMのD5S818プライマー１（配列番号５）及び２（FL－配列番号６）。

増幅した産物を、32cmゲル中、40Wで45分間、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、次いでフルオロイメージャー（登録商標）蛍光スキャナー（モレキュラー・ダイナミックス、サニーヴェール、カリフォルニア）を使用した蛍光シグナル検出により可視化した。

図７は、各座位の増幅した断片を示している。レーン１～５は、座位D10S1239、D7S820、D13S317及びD5S818について同時増幅したDNAサンプルを含んでいる。

実施例８

座位D10S1239、D7S820、D13S317及びD5S818の多重増幅の蛍光検出

座位D10S1239、D7S820、D13S317及びD5S818を、配列番号15をFL－配列番号15で置換して、かつFL－配列番号16を配列番号16で置換したことを除いて実施例７と同様にして増幅した。

増幅した産物を、32cmゲル中、40Wで45分間、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、次いでフルオロイメージャー（登録商標）蛍光スキャナー（モレキュラー・ダイナミックス、サニーヴェール、カリフォルニア）を使用した蛍光シグナル検出により可視化した。

図８は、各座位の増幅した断片を示している。レーン１～５は、座位D10S1239、D7S820、D13S317及びD5S818について同時増幅したDNAサンプルを含んでいる。

実施例９

座位D14S118、D7S820、D13S317及びD5S818の多重増幅の蛍光検出

本実施例においては、DNA鋳型を、１つの反応容器中、個々の座位D14S118、D7S820、D13S317及びD5S818において、同時に増幅した。PCR増幅を、25μｌの１×STR緩衝液（50mM KCl、10mM Tris－HCl（25℃でpH9.0）、0.1%TritonX－100、1.5mM $MgCl_2$及び各200μMのdATP、dCTP、dGTP及びdTTP）中、5ngの鋳型及び0.04U TaqDNAポリメラーゼ／μｌを使用して行った。サーマルサイクラー480（パーキンエルマー、フォスターシティ、カリフォルニア）を以下に示す増幅プロトコルを用いて使用した。96℃で２分間;94℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを10回;90℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを20回；続いて60℃で30分間のサイクルを１回。

８種の増幅プライマーを、以下に示すように組合せて使用した。各々0.50μMのD14S118プライマー１（配列番号17）及び２（FL－配列番号18）、各々0.325μMのD7S820プライマー１（配列番号１）及び２（FL－配列番号２）、各々0.22μMのD13S317プライマー１（配列番号３）及び２（FL－配列番号４）、各々0.375μMのD5S818プライマー１（配列番号５）及び２（FL－配列番号６）。

増幅した産物を、32cmゲル中、40Wで45分間、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、次いでフルオロイメージャー（登録商標）蛍光スキャナー（モレキュラー・ダイナミックス、サニーヴェール、カリフォルニア）を使用した蛍光シグナル検出により可視化した。

図９は、各座位の増幅した断片を示している。レーン１～５は、座位D14S118、D7S820、D13S317及びD5S818について同時増幅したDNAサンプルを含んでいる。

実施例10

座位D14S562、D7S820、D13S317及びD5S818の多重増幅の蛍光検出

本実施例においては、DNA鋳型を、１つの反応容器中、個々の座位D14S562、D7S820、D13S317及びD5S818において、同時に増幅した。PCR増幅を、25μｌの１×STR緩衝液（50mM　KCl、10mM　Tris－HCl（25℃でpH9.0）、0.1%TritonX－100、1.5mM　$MgCl_2$及び各200μＭのdATP、dCTP、dGTP及びdTTP）中、5ngの鋳型及び0.04U　TaqDNAポリメラーゼ／μｌを使用して行った。サーマルサイクラー480（パーキンエルマー、フォスターシティ、カリフォルニア）を以下に示す増幅プロトコルを用いて使用した。96℃で２分間;94℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを10回;90℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを20回；続いて60℃で30分間のサイクルを１回。

８種の増幅プライマーを、以下に示すように組合せて使用した。各々0.50μＭのD14S562プライマー１（FL－配列番号19）及び２（配列番号20）、各々0.325μＭのD7S820プライマー１（配列番号１）及び２（FL－配列番号２）、各々0.22μＭのD13S317プライマー１（配列番号３）及び２（FL－配列番号４）、各々0.375μＭのD5S818プライマー１（配列番号５）及び２（FL－配列番号６）。

増幅した産物を、32cmゲル中、40Wで45分間、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、次いでフルオロイメージャー（登録商標）蛍光スキャナー（モレキュラー・ダイナミックス、サニーヴェール、カリフォルニア）を使用した蛍光シグナル検出により可視化した。

図10は、各座位の増幅した断片を示している。レーン１～５は、座位D14S562、D7S820、D13S317及びD5S818について同時増幅したDNAサンプルを含んでいる。

実施例11

座位D14S548、D7S820、D13S317及びD5S818の多重増幅の蛍光検出

本実施例においては、DNA鋳型を、１つの反応容器中、個々の座位D14S548、D7S820、D13S317及びD5S818において、同時に増幅した。PCR増幅を、25μｌの１×STR緩衝液（50mM　KCl、10mM　Tris－HCl（25℃でpH9.0）、0.1%TritonX－100、1.5mM　$MgCl_2$及び各200μＭのdATP、dCTP、dGTP及びdTTP）中、5ngの鋳型及び0.04U　TaqDNAポリメラーゼ／μｌを使用して行った。サーマルサイクラー480（パーキンエルマー、フォスターシティ、カリフォルニア）を以下に示す増幅プロトコルを用いて使用した。96℃で２分間;94℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを10回;90℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを20回；続いて60℃で30分間のサイクルを１回。

８種の増幅プライマーを、以下に示すように組合せて使用した。各々0.50μＭのD14S548プライマー１（配列番号21）及び２（FL－配列番号22）、各々0.325μＭのD7S820プライマー１（配列番号１）及び２（FL－配列番号２）、各々0.22μＭのD13S317プライマー１（配列番号３）及び２（FL－配列番号４）、各々0.375μＭのD5S818プライマー１（配列番号５）及び２（FL－配列番号６）。

増幅した産物を、32cmゲル中、40Wで45分間、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、次いでフルオロイメージャー（登録商標）蛍光スキャナー（モレキュラー・ダイナミックス、サニーヴェール、カリフォルニア）を使用した蛍光シグナル検出により可視化した。

図11は、各座位の増幅した断片を示している。レーン１～５は、座位D14S548、D7S820、D13S317及びD5S818について同時増幅したDNAサンプルを含んでいる。

実施例12

座位D16S490、D7S820、D13S317及びD5S818の多重増幅の蛍光検出

本実施例においては、DNA鋳型を、１つの反応容器中、個々の座位D16S490、D7S820、D13S317及びD5S818において、同時に増幅した。PCR増幅を、25μｌの１×STR緩衝液（50mM　KCl、10mM　Tris－HCl（25℃でpH9.0）、0.1%TritonX－100、1.5mM　$MgCl_2$及び各200μＭのdATP、dCTP、dGTP及びdTTP）中、5ngの鋳型及び0.04U　TaqDNAポリメラーゼ／μｌを使用して行った。サーマルサイクラー480（パーキンエルマー、フォスターシティ、カリフォルニア）を以下に示す増幅プロトコルを用いて使用した。96℃で２分間;94℃で１分間

、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを10回;90℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを20回；続いて60℃で30分間のサイクルを１回。
８種の増幅プライマーを、以下に示すように組合せて使用した。各々0.50μMのD16S490プライマー１（FL－配列番号23）及び２（配列番号24）、各々0.325μMのD7S820プライマー１（配列番号１）及び２（FL－配列番号２）、各々0.22μMのD13S317プライマー１（配列番号３）及び２（FL－配列番号４）、各々0.375μMのD5S818プライマー１（配列番号５）及び２（FL－配列番号６）。
増幅した産物を、32cmゲル中、40Wで45分間、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、次いでフルオロイメージャー（登録商標）蛍光スキャナー（モレキュラー・ダイナミックス、サニーヴェール、カリフォルニア）を使用した蛍光シグナル検出により可視化した。
図12は、各座位の増幅した断片を示している。レーン１～５は、座位D16S490、D7S820、D13S317及びD5S818について同時増幅したDNAサンプルを含んでいる。
実施例13
座位D16S753、D7S820、D13S317及びD5S818の多重増幅の蛍光検出
本実施例においては、DNA鋳型を、１つの反応容器中、個々の座位D16S753、D7S820、D13S317及びD5S818において、同時に増幅した。PCR増幅を、25μｌの１×STR緩衝液（50mM　KCl、10mM　Tris－HCl（25℃でpH9.0）、0.1%TritonX－100、1.5mM　$MgCl_2$及び各200μMのdATP、dCTP、dGTP及びdTTP）中、5ngの鋳型及び0.04U　TaqDNAポリメラーゼ／μｌを使用して行った。サーマルサイクラー480（パーキンエルマー、フォスターシティ、カリフォルニア）を以下に示す増幅プロトコルを用いて使用した。96℃で２分間;94℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを10回;90℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを20回；続いて60℃で30分間のサイクルを１回。
８種の増幅プライマーを、以下に示すように組合せて使用した。各々0.50μMのD16S753プライマー１（配列番号25）及び２（FL－配列番号26）、各々0.325μMのD7S820プライマー１（配列番号１）及び２（FL－配列番号２）、各々0.22μMのD13S317プライマー１（配列番号３）及び２（FL－配列番号４）、各々0.375μMのD5S818プライマー１（配列番号５）及び２（FL－配列番号６）。
増幅した産物を、32cmゲル中、40Wで45分間、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、次いでフルオロイメージャー（登録商標）蛍光スキャナー（モレキュラー・ダイナミックス、サニーヴェール、カリフォルニア）を使用した蛍光シグナル検出により可視化した。
図13は、各座位の増幅した断片を示している。レーン１～５は、座位D16S753、D7S820、D13S317及びD5S818について同時増幅したDNAサンプルを含んでいる。
実施例14
座位D17S1299、D7S820、D13S317及びD5S818の多重増幅の蛍光検出
本実施例においては、DNA鋳型を、１つの反応容器中、個々の座位D17S1299、D7S820、D13S317及びD5S818において、同時に増幅した。PCR増幅を、25μｌの１×STR緩衝液（50mM　KCl、10mM　Tris－HCl（25℃でpH9.0）、0.1%TritonX－100、1.5mM　$MgCl_2$及び各200μMのdATP、dCTP、dGTP及びdTTP）中、5ngの鋳型及び0.04U　TaqDNAポリメラーゼ／μｌを使用して行った。サーマルサイクラー480（パーキンエルマー、フォスターシティ、カリフォルニア）を以下に示す増幅プロトコルを用いて使用した。96℃で２分間;94℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを10回;90℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを20回；続いて60℃で30分間のサイクルを１回。
８種の増幅プライマーを、以下に示すように組合せて使用した。各々0.50μMのD17S1299プライマー１（配列番号27）及び２（FL－配列番号28）、各々0.325μMのD7S820プライマー１（配列番号１）及び２（FL－配列番号２）、各々0.22μMのD13S317プライマー１（配列番号３）及び２（FL－配列番号４）、各々0.375μMのD5S818プライマー１（配列番号５）及び２（FL－配列番号６）。
増幅した産物を、32cmゲル中、40Wで45分間、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動によ

り分離し、次いでフルオロイメージャー（登録商標）蛍光スキャナー（モレキュラー・ダイナミックス、サニーヴェール、カリフォルニア）を使用した蛍光シグナル検出により可視化した。
図14は、各座位の増幅した断片を示している。レーン１～５は、座位D17S1299、D7S820、D13S317及びD5S818について同時増幅したDNAサンプルを含んでいる。
実施例15
座位D16S539、D7S820、D13S317及びD5S818の多重増幅の蛍光検出
本実施例においては、DNA鋳型を、１つの反応容器中、個々の座位D16S539、D7S820、D13S317及びD5S818において、同時に増幅した。PCR増幅を、25μｌの１×STR緩衝液（50mM　KCl、10mM　Tris－HCl（25℃でpH9.0）、0.1%TritonX－100、1.5mM　$MgCl_2$及び各200μMのdATP、dCTP、dGTP及びdTTP）中、5ngの鋳型及び0.04U　TaqDNAポリメラーゼ／μｌを使用して行った。サーマルサイクラー480（パーキンエルマー、フォスターシティ、カリフォルニア）を以下に示す増幅プロトコルを用いて使用した。96℃で２分間;94℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを10回;90℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを20回；続いて60℃で30分間のサイクルを１回。
８種の増幅プライマーを、以下に示すように組合せて使用した。各々0.60μMのD16S539プライマー１（配列番号29）及び２（FL－配列番号30）、各々0.325μMのD7S820プライマー１（配列番号１）及び２（FL－配列番号２）、各々0.22μMのD13S317プライマー１（配列番号３）及び２（FL－配列番号４）、各々0.50μMのD5S818プライマー１（配列番号５）及び２（FL－配列番号６）。
増幅した産物を、32cmゲル中、40Wで50分間、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、次いでフルオロイメージャー（登録商標）蛍光スキャナー（モレキュラー・ダイナミックス、サニーヴェール、カリフォルニア）を使用した蛍光シグナル検出により可視化した。
図15は、各座位の増幅した断片を示している。レーン１～５は、座位D16S539、D7S820、D13S317及びD5S818について同時増幅したDNAサンプルを含んでいる。
実施例16
座位D22S683、D7S820、D13S317及びD5S818の多重増幅の蛍光検出
本実施例においては、DNA鋳型を、１つの反応容器中、個々の座位D22S683、D7S820、D13S317及びD5S818において、同時に増幅した。PCR増幅を、25μｌの１×STR緩衝液（50mM　KCl、10mM　Tris－HCl（25℃でpH9.0）、0.1%TritonX－100、1.5mM　$MgCl_2$及び各200μMのdATP、dCTP、dGTP及びdTTP）中、5ngの鋳型及び0.04U　TaqDNAポリメラーゼ／μｌを使用して行った。サーマルサイクラー480（パーキンエルマー、フォスターシティ、カリフォルニア）を以下に示す増幅プロトコルを用いて使用した。96℃で２分間;94℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを10回;90℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを20回；続いて60℃で30分間のサイクルを１回。
８種の増幅プライマーを、以下に示すように組合せて使用した。各々0.50μMのD22S683プライマー１（配列番号31）及び２（FL－配列番号32）、各々0.325μMのD7S820プライマー１（配列番号１）及び２（FL－配列番号２）、各々0.22μMのD13S317プライマー１（配列番号３）及び２（FL－配列番号４）、各々0.375μMのD5S818プライマー１（配列番号５）及び２（FL－配列番号６）。
増幅した産物を、32cmゲル中、40Wで55分間、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、次いでフルオロイメージャー（登録商標）蛍光スキャナー（モレキュラー・ダイナミックス、サニーヴェール、カリフォルニア）を使用した蛍光シグナル検出により可視化した。
図16は、各座位の増幅した断片を示している。レーン１～５は、座位D22S683、D7S820、D13S317及びD5S818とともに同時増幅したDNAサンプルを含んでいる。
実施例17
座位D16S539、D7S820、D13S317及びD5S818、HUMCSF1PO及びHUMTPOXの多重増幅の蛍光検出
本実施例においては、DNA鋳型を、１つの反応容器中、個々の座位D16S539、D7S820、D13S

317、D5S818、HUMCSF1PO及びHUMTPOXにおいて、同時に増幅した。PCR増幅を、25μｌの１×STR緩衝液（50mM KCl、10mM Tris－HCl（25℃でpH9.0）、0.1%TritonX－100、1.5mM $MgCl_2$及び各200μMのdATP、dCTP、dGTP及びdTTP）中、5ngの鋳型及び0.06U TaqDNAポリメラーゼ／μｌを使用して行った。サーマルサイクラー480（パーキンエルマー、フォスターシティ、カリフォルニア）を以下に示す増幅プロトコルを用いて使用した。96℃で２分間;94℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを10回;90℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを20回；続いて60℃で30分間のサイクルを１回。

12種の増幅プライマーを、以下に示すように組合せて使用した。各々0.65μMのD16S539プライマー１（配列番号29）及び２（FL－配列番号30）、各々0.325μMのD7S820プライマー１（配列番号１）及び２（FL－配列番号２）、各々0.22μMのD13S317プライマー１（配列番号３）及び２（FL－配列番号４）、各々0.55μMのD5S818プライマー１（配列番号５）及び２（FL－配列番号６）、各0.40μMのHUMCSF1POプライマー（TMR－配列番号33）及び２（配列番号34）、各0.40μMのHUMTPOXプライマー１（配列番号35）及び２（TMR－配列番号36）。

増幅した産物を、32cmゲル中、40Wで50分間、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、次いでFMBIOフルオロイメージャー（登録商標）（ヒタチ・ソフトウェア・エンジニアリング、サンブルーノ、カリフォルニア）を使用した蛍光シグナル検出により可視化した。

図17は、同一のゲルを505nm及び625nmでスキャン（それぞれ、蛍光標識物質及びテトラメチルローダミン標識物質を明らかにする）したときの、各座位の増幅した断片を示している。レーン１～４は、座位D16S539、D7S820、D13S317、D5S818、HUMCSF1PO（「CSF1PO」）及びHUMTPOX（「TPOX」）について同時増幅したDNAサンプルを含んでいる。

実施例18

座位D16S539、D7S820、D13S317及びD5S818、HUMCSF1PO、HUMTPOX及びHUMTH01の多重増幅の蛍光検出

本実施例においては、DNA鋳型を、１つの反応容器中、個々の座位D16S539、D7S820、D13S317、D5S818、HUMCSF1PO、HUMTPOX及びHUMTH01において、同時に増幅した。PCR増幅を、25μｌの１×STR緩衝液（50mM KCl、10mM Tris－HCl（25℃でpH9.0）、0.1%TritonX－100、1.5mM $MgCl_2$及び各200μMのdATP、dCTP、dGTP及びdTTP）中、5ngの鋳型及び0.07U TaqDNAポリメラーゼ／μｌを使用して行った。サーマルサイクラー480（パーキンエルマー、フォスターシティ、カリフォルニア）を以下に示す増幅プロトコルを用いて使用した。96℃で２分間;94℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを10回;90℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを20回；続いて60℃で30分間のサイクルを１回。

14種の増幅プライマーを、以下に示すように組合せて使用した。各々0.75μMのD16S539プライマー１（配列番号29）及び２（FL－配列番号30）、各々0.40μMのD7S820プライマー１（配列番号１）及び２（FL－配列番号２）、各々0.30μMのD13S317プライマー１（配列番号３）及び２（FL－配列番号４）、各々0.60μMのD5S818プライマー１（配列番号５）及び２（FL－配列番号６）、各0.30μMのHUMCSF1POプライマー（TMR－配列番号33）及び２（配列番号34）、各0.40μMのHUMTPOXプライマー１（配列番号35）及び２（TMR－配列番号35）、各0.40μMのHUMTH01プライマー１（配列番号37）及び２（TMR－配列番号38）。

増幅した産物を、32cmゲル中、40Wで50分間、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、次いでFMBIOフルオロイメージャー（登録商標）（ヒタチ・ソフトウェア・エンジニアリング、サンブルーノ、カリフォルニア）を使用した蛍光シグナル検出により可視化した。

図18は、同一のゲルを505nm及び625nmでスキャン（それぞれ、蛍光標識物質及びテトラメチルローダミン標識物質を明らかにする）したときの、各座位の増幅した断片を示している。レーン１～５は、座位D16S539、D7S820、D13S317、D5S818、HUMCSF1PO（「CSF1PO」

）、HUMTPOX（「TPOX」）及びHUMTH01（「TH01」）とともに同時増幅したDNAサンプルを含んでいる。

実施例19

座位D16S539、D7S820、D13S317及びD5S818、HUMCSF1PO、HUMTPOX、HUMTH01及びHUMvWFA31の多重増幅の蛍光検出

本実施例においては、DNA鋳型を、１つの反応容器中、個々の座位D16S539、D7S820、D13S317、D5S818、HUMCSF1PO、HUMTPOX、HUMTH01及びHUMvWFA31において、同時に増幅した。PCR増幅を、25μｌの１×STR緩衝液（50mM KCl、10mM Tris－HCl（25℃でpH9.0）、0.1%TritonX－100、1.5mM $MgCl_2$及び各200μMのdATP、dCTP、dGTP及びdTTP）中、5ngの鋳型及び0.08U TaqDNAポリメラーゼ／μｌを使用して行った。サーマルサイクラー480（パーキンエルマー、フォスターシティ、カリフォルニア）を以下に示す増幅プロトコルを用いて使用した。96℃で２分間;94℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを10回;90℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを20回；続いて60℃で30分間のサイクルを１回。

16種の増幅プライマーを、以下に示すように組合せて使用した。各々0.75μMのD16S539プライマー１（配列番号29）及び２（FL－配列番号30）、各々0.40μMのD7S820プライマー１（配列番号１）及び２（FL－配列番号２）、各々0.30μMのD13S317プライマー１（配列番号３）及び２（FL－配列番号４）、各々0.60μMのD5S818プライマー１（配列番号５）及び２（FL－配列番号６）、各0.30μMのHUMCSF1POプライマー（TMR－配列番号33）及び２（配列番号34）、各0.40μMのHUMTPOXプライマー１（配列番号35）及び２（TMR－配列番号36）、各0.40μMのHUMTH01プライマー１（配列番号37）及び２（TMR－配列番号38）、各0.40μMのHUMvWFA31プライマー１（配列番号39）及び２（TMR－配列番号40）。

増幅した産物を、32cmゲル中、40Wで50分間、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、次いでFMBIOフルオロイメージャー（登録商標）（ヒタチ・ソフトウェア・エンジニアリング、サンブルーノ、カリフォルニア）を使用した蛍光シグナル検出により可視化した。

図19は、同一のゲルを505nm及び625nmでスキャン（それぞれ、蛍光標識物質及びテトラメチルローダミン標識物質を明らかにする）したときの、各座位の増幅した断片を示している。レーン１～５は、座位D16S539、D7S820、D13S317、D5S818、HUMCSF1PO（「CSF1PO」）、HUMTPOX（「TPOX」）、HUMTH01（「TH01」）及びHUMvWFA31（「vWA」）について同時増幅したDNAサンプルを含んでいる。

実施例20

座位D16S539、D7S820、D13S317及びD5S818、HUMF13A1及びHUMFESFPSの多重増幅の蛍光検出

本実施例においては、DNA鋳型を、１つの反応容器中、個々の座位D16S539、D7S820、D13S317、D5S818、HUMF13A01及びHUMFESFPSにおいて、同時に増幅した。PCR増幅を、25μｌの１×STR緩衝液（50mM KCl、10mM Tris－HCl（25℃でpH9.0）、0.1%TritonX－100、1.5mM $MgCl_2$及び各200μMのdATP、dCTP、dGTP及びdTTP）中、5ngの鋳型及び0.06U TaqDNAポリメラーゼ／μｌを使用して行った。サーマルサイクラー480（パーキンエルマー、フォスターシティ、カリフォルニア）を以下に示す増幅プロトコルを用いて使用した。96℃で２分間;94℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを10回;90℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを20回；続いて60℃で30分間のサイクルを１回。

12種の増幅プライマーを、以下に示すように組合せて使用した。各々0.75μMのD16S539プライマー１（配列番号29）及び２（FL－配列番号30）、各々0.40μMのD7S820プライマー１（配列番号１）及び２（FL－配列番号２）、各々0.30μMのD13S317プライマー１（配列番号３）及び２（FL－配列番号４）、各々0.60μMのD5S818プライマー１（配列番号５）及び２（FL－配列番号６）、各0.10μMのHUMF13A01プライマー１（TMR－配列番号41）及び２（配列番号42）、各1.0μMのHUMFESFPSプライマー１（TMR－配列番号43）及び２（配列番号44）。

増幅した産物を、32cmゲル中、40Wで50分間、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、次いでFMBIOフルオロイメージャー（登録商標）（ヒタチ・ソフトウェア・エンジニアリング、サンブルーノ、カリフォルニア）を使用した蛍光シグナル検出により可視化した。

図20は、同一のゲルを505nm及び625nmでスキャン（それぞれ、蛍光標識物質及びテトラメチルローダミン標識物質を明らかにする）したときの、各座位の増幅した断片を示している。レーン１～５は、座位D16S539、D7S820、D13S317、D5S818、HUMF13A01（「F13A01」）及びHUMFESFPS（「FESFPS」）について同時増幅したDNAサンプルを含んでいる。

実施例21

座位D16S539、D7S820、D13S317及びD5S818、HUMF13A01、HUMFESFPS及びHUMBFXIIIの多重増幅の蛍光検出

本実施例においては、DNA鋳型を、１つの反応容器中、個々の座位D16S539、D7S820、D13S317、D5S818、HUMF13A01、HUMFESFPS及びHUMBFXIIIにおいて、同時に増幅した。PCR増幅を、25μｌの１×STR緩衝液（50mM　KCl、10mM　Tris－HCl（25℃でpH9.0）、0.1%TritonX－100、1.5mM　$MgCl_2$及び各200μＭのdATP、dCTP、dGTP及びdTTP）中、5ngの鋳型及び0.07U　TaqDNAポリメラーゼ／μｌを使用して行った。サーマルサイクラー480（パーキンエルマー、フォスターシティ、カリフォルニア）を以下に示す増幅プロトコルを用いて使用した。96℃で２分間;94℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを10回;90℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを20回；続いて60℃で30分間のサイクルを１回。

14種の増幅プライマーを、以下に示すように組合せて使用した。各々0.75μＭのD16S539プライマー１（配列番号29）及び２（FL－配列番号30）、各々0.40μＭのD7S820プライマー１（配列番号１）及び２（FL－配列番号２）、各々0.30μＭのD13S317プライマー１（配列番号３）及び２（FL－配列番号４）、各々0.60μＭのD5S818プライマー１（配列番号５）及び２（FL－配列番号６）、各0.10μＭのHUMF13A01プライマー（TMR－配列番号41）及び２（配列番号42）、各1.0μＭのHUMFESFPSプライマー１（TMR－配列番号43）及び２（配列番号44）、各0.50μＭのHUMBFXIIIプライマー１（TMR－配列番号45）及び２（配列番号46）。

増幅した産物を、32cmゲル中、40Wで50分間、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、次いでFMBIOフルオロイメージャー（登録商標）（ヒタチ・ソフトウェア・エンジニアリング、サンブルーノ、カリフォルニア）を使用した蛍光シグナル検出により可視化した。

図21は、同一のゲルを505nm及び625nmでスキャン（それぞれ、蛍光標識物質及びテトラメチルローダミン標識物質を明らかにする）したときの、各座位の増幅した断片を示している。レーン１～５は、座位D16S539、D7S820、D13S317、D5S818、HUMF13A01（「F13A01」）、HUMFESFPS（「FESFPS」）及びHUMBFXIII（「F13B」）について同時増幅したDNAサンプルを含んでいる。

実施例22

座位D16S539、D7S820、D13S317、D5S818、HUMF13A01、HUMFESFPS、HUMBFXIII及びHUMLIPOLの多重増幅の蛍光検出

本実施例においては、DNA鋳型を、１つの反応容器中、個々の座位D16S539、D7S820、D13S317、D5S818、HUMF13A01、HUMFESFPS、HUMBFXIII及びHUMLIPOLにおいて、同時に増幅した。PCR増幅を、25μｌの１×STR緩衝液（50mM　KCl、10mM　Tris－HCl（25℃でpH9.0）、0.1%TritonX－100、1.5mM　$MgCl_2$及び各200μＭのdATP、dCTP、dGTP及びdTTP）中、5ngの鋳型及び0.08U　TaqDNAポリメラーゼ／μｌを使用して行った。サーマルサイクラー480（パーキンエルマー、フォスターシティ、カリフォルニア）を以下に示す増幅プロトコルを用いて使用した。96℃で２分間;94℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを10回;90℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを20回；続いて60℃で30分間のサイクルを１回。

16種の増幅プライマーを、以下に示すように組合せて使用した。各々0.75μＭのD16S539

プライマー１（配列番号29）及び２（FL－配列番号30）、各々0.40μMのD7S820プライマー１（配列番号１）及び２（FL－配列番号２）、各々0.30μMのD13S317プライマー１（配列番号３）及び２（FL－配列番号４）、各々0.60μMのD5S818プライマー１（配列番号５）及び２（FL－配列番号６）、各0.10μMのHUMF13A01プライマー１（TMR－配列番号41）及び２（配列番号42）、各1.0μMのHUMFESFPSプライマー１（TMR－配列番号43）及び２（配列番号44）、各0.50μMのHUMBFXIIIプライマー１（TMR－配列番号45）及び２（配列番号46）、各0.20μMのHUMLIPOLプライマー１（TMR－配列番号47）及び２（配列番号48）。

増幅した産物を、32cmゲル中、40Wで50分間、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、次いでFMBIOフルオロイメージャー（登録商標）（ヒタチ・ソフトウェア・エンジニアリング、サンブルーノ、カリフォルニア）を使用した蛍光シグナル検出により可視化した。

図22は、同一のゲルを505nm及び625nmでスキャン（それぞれ、蛍光標識物質及びテトラメチルローダミン標識物質を明らかにする）したときの、各座位の増幅した断片を示している。レーン１～５は、座位D16S539、D7S820、D13S317、D5S818、HUMF13A01（「F13A01」）、HUMFESFPS（「FESFPS」）、HUMBFXIII（「F13B」）及びHUMLIPOL（「LPL」）について同時増幅したDNAサンプルを含んでいる。

実施例23

座位D16S539、D7S820、D13S317、D5S818、HUMCSF1PO、HUMTPOX、HUMTH01及びHUMvWFA31の多重増幅の蛍光検出

本実施例においては、DNA鋳型を、１つの反応容器中、個々の座位D16S539、D7S820、D13S317、D5S818、HUMCSF1PO、HUMTPOX、HUMTH01及びHUMvWFA31において、同時に増幅した。PCR増幅を、25μｌの１×STR緩衝液（50mM KCl、10mM Tris－HCl（25℃でpH9.0）、0.1％TritonX－100、1.5mM $MgCl_2$及び各200μMのdATP、dCTP、dGTP及びdTTP）中、5ngの鋳型及び0.08U TaqDNAポリメラーゼ／μｌを使用して行った。サーマルサイクラー480（パーキンエルマー、フォスターシティ、カリフォルニア）を以下に示す増幅プロトコルを用いて使用した。96℃で２分間;94℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを10回;90℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを20回；続いて60℃で30分間のサイクルを１回。

16種の増幅プライマーを、以下に示すように組合せて使用した。各々0.75μMのD16S539プライマー１（配列番号29）及び２（TMR－配列番号30）、各々0.40μMのD7S820プライマー１（配列番号１）及び２（TMR－配列番号２）、各々0.30μMのD13S317プライマー１（配列番号３）及び２（TMR－配列番号４）、各々0.60μMのD5S818プライマー１（配列番号５）及び２（TMR－配列番号６）、各0.40μMのHUMCSF1POプライマー１（FL－配列番号33）及び２（配列番号34）、各0.50μMのHUMTPOXプライマー１（配列番号35）及び２（FL－配列番号36）、各0.20μMのHUMTH01プライマー１（配列番号37）及び２（FL－配列番号38）、各0.55μMのHUMvWFA31プライマー１（配列番号39）及び２（FL－配列番号40）。

増幅した産物を、32cmゲル中、40Wで50分間、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、次いでFMBIOフルオロイメージャー（登録商標）（ヒタチ・ソフトウェア・エンジニアリング、サンブルーノ、カリフォルニア）を使用した蛍光シグナル検出により可視化した。

図23は、同一のゲルを505nm及び625nmでスキャン（それぞれ、蛍光標識物質及びテトラメチルローダミン標識物質を明らかにする）したときの、各座位の増幅した断片を示している。レーン１～３は、座位D16S539、D7S820、D13S317、D5S818、HUMCSF1PO（「CSF1PO」）、HUMTPOX（「TPOX」）、HUMTH01（「TH01」）及びHUMvWFA31（「vWA」）について同時増幅したDNAサンプルを含んでいる。

実施例24

座位D13S1539、D19S253、D13S317及びD20S481の多重増幅の蛍光検出

本実施例においては、DNA鋳型を、１つの反応容器中、個々の座位D3S1539、D19S253、D13

S317及びD20S481において、同時に増幅した。PCR増幅を、25μｌの１×STR緩衝液（50mM KCl、10mM Tris－HCl（25℃でpH9.0）、0.1%TritonX－100、1.5mM $MgCl_2$及び各200μMのdATP、dCTP、dGTP及びdTTP）中、5ngの鋳型及び0.04U TaqDNAポリメラーゼ／μｌを使用して行った。サーマルサイクラー480（パーキンエルマー、フォスターシティ、カリフォルニア）を以下に示す増幅プロトコルを用いて使用した。96℃で２分間;94℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを10回;90℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを20回；続いて60℃で30分間のサイクルを１回。

８種の増幅プライマーを、以下に示すように組合せて使用した。各々0.75μMのD3S1539プライマー１（配列番号７）及び２（FL－配列番号49）、各々0.75μMのD19S253プライマー１（FL－配列番号50）及び２（配列番号51）、各々0.50μMのD13S317プライマー１（配列番号３）及び２（FL－配列番号４）、各々0.50μMのD20S481プライマー１（配列番号52）及び２（FL－配列番号53）。

増幅した産物を、32cmゲル中、40Wで50分間、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、次いでフルオロイメージャー（登録商標）蛍光スキャナー（モレキュラー・ダイナミックス、サニーヴェール、カリフォルニア）を使用した蛍光シグナル検出により可視化した。

図24は、各座位の増幅した断片を示している。レーン１～５は、座位D3S1539、D19S253、D13S317及びD20S481について同時増幅したDNAサンプルを含んでいる。

実施例25

座位D10S1239、D9S930、D4S2368及びD20S481の多重増幅の蛍光検出

本実施例においては、DNA鋳型を、１つの反応容器中、個々の座位D10S1239、D9S930、D4S2368及びD20S481において、同時に増幅した。PCR増幅を、25μｌの１×STR緩衝液（50mM KCl、10mM Tris－HCl（25℃でpH9.0）、0.1%TritonX－100、1.5mM $MgCl_2$及び各200μMのdATP、dCTP、dGTP及びdTTP）中、5ngの鋳型及び0.04U TaqDNAポリメラーゼ／μｌを使用して行った。サーマルサイクラー480（パーキンエルマー、フォスターシティ、カリフォルニア）を以下に示す増幅プロトコルを用いて使用した。96℃で２分間;94℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを10回;90℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを20回；続いて60℃で30分間のサイクルを１回。

８種の増幅プライマーを、以下に示すように組合せて使用した。各々0.30μMのD10S1239プライマー１（FL－配列番号15）及び２（配列番号54）、各々0.40μMのD9S930プライマー１（配列番号55）及び２（FL－配列番号14）、各々0.50μMのD4S2368プライマー１（配列番号56）及び２（FL－配列番号57）、各々0.50μMのD20S481プライマー１（配列番号52）及び２（FL－配列番号53）。

増幅した産物を、32cmゲル中、40Wで50分間、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、次いでフルオロイメージャー（登録商標）蛍光スキャナー（モレキュラー・ダイナミックス、サニーヴェール、カリフォルニア）を使用した蛍光シグナル検出により可視化した。

図25は、各座位の増幅した断片を示している。レーン１～５は、座位D10S1239、D9S930、D4S2368及びD20S481について同時増幅したDNAサンプルを含んでいる。

実施例26

座位D16S539、D7S820及びD13S317の多重増幅の銀検出

本実施例においては、DNA鋳型を、１つの反応容器中、個々の座位D16S539、D7S820及びD13S317において、同時に増幅した。PCR増幅を、25μｌの１×STR緩衝液（50mM KCl、10mM Tris－HCl（25℃でpH9.0）、0.1%TritonX－100、1.5mM $MgCl_2$及び各200μMのdATP、dCTP、dGTP及びdTTP）中、５～25ngの鋳型及び0.03U TaqDNAポリメラーゼ／μｌを使用して行った。サーマルサイクラー480（パーキンエルマー、フォスターシティ、カリフォルニア）を以下に示す増幅プロトコルを用いて使用した。96℃で２分間;94℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを10回;90℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを20回；続いて60℃で30分間のサイクルを１回。

６種の増幅プライマーを、以下に示すように組合せて使用した。各々0.5μMのD16S539プ

ライマー１（配列番号29）及び２（配列番号58）、各々0.5μMのD7S820プライマー１（配列番号１）及び２（配列番号２）、各々0.5μMのD13S317プライマー１（配列番号３）及び２（配列番号４）。
増幅した産物を、32cmゲル中、40Wで50分間、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、次いでBassamら（1991）のプロトコルにしたがう銀染色分析により可視化した。
図26は、各座位の増幅した断片を示している。レーン１～４は、座位D16S539、D7S820及びD13S317について同時増幅したDNAサンプルを含んでいる。レーン５は、DNAテンプレートなしに同一の手順に付したサンプル、すなわち負の対照を示している。

実施例27

座位D16S539、D7S820、D13S317及びHUMvWFA31の多重増幅の銀検出

本実施例においては、DNA鋳型を、１つの反応容器中、個々の座位D16S539、D7S820、D13S317及びHUMvWFA31において、同時に増幅した。PCR増幅を、25μｌの１×STR緩衝液（50mM KCl、10mM Tris－HCl（25℃でpH9.0）、0.1%TritonX－100、1.5mM $MgCl_2$及び各200μMのdATP、dCTP、dGTP及びdTTP）中、5ngの鋳型及び0.04U TaqDNAポリメラーゼ／μｌを使用して行った。サーマルサイクラー480（パーキンエルマー、フォスターシティ、カリフォルニア）を以下に示す増幅プロトコルを用いて使用した。96℃で２分間;94℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを10回;90℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを20回；続いて60℃で30分間のサイクルを１回。
８種の増幅プライマーを、以下に示すように組合せて使用した。各々0.3μMのD16S539プライマー１（配列番号29）及び２（配列番号30）、各々0.3μMのD7S820プライマー１（配列番号１）及び２（配列番号２）、各々0.5μMのD13S317プライマー１（配列番号３）及び２（配列番号４）、各0.5μMのHUMvWFA31プライマー１（配列番号59）及び２（配列番号60）。
増幅した産物を、32cmゲル中、40Wで50分間、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、次いでBassamら（1991）のプロトコルにしたがう銀染色分析により可視化した。
図27は、各座位の増幅した断片を示している。レーン１～３は、座位D16S539、D7S820、D13S317及びHUMvWFA31（「vWA」）について同時増幅したDNAサンプルを含んでいる。

実施例28

座位D10S1239、D9S930及びD13S317の多重増幅の銀検出

本実施例においては、DNA鋳型を、１つの反応容器中、個々の座位D10S1239、D9S930及びD13S317において、同時に増幅した。PCR増幅を、25μｌの１×STR緩衝液（50mM KCl、10mM Tris－HCl（25℃でpH9.0）、0.1%TritonX－100、1.5mM $MgCl_2$及び各200μMのdATP、dCTP、dGTP及びdTTP）中、5ngの鋳型及び0.03U TaqDNAポリメラーゼ／μｌを使用して行った。サーマルサイクラー480（パーキンエルマー、フォスターシティ、カリフォルニア）を以下に示す増幅プロトコルを用いて使用した。96℃で２分間;94℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを10回;90℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを20回。
６種の増幅プライマーを、以下に示すように組合せて使用した。各々1.0μMのD10S1239プライマー１（配列番号15）及び２（配列番号54）、各々0.3μMのD9S930プライマー１（配列番号55）及び２（配列番号61）、各々0.5μMのD13S317プライマー１（配列番号３）及び２（配列番号４）。
増幅した産物を、40cmゲル中、60Wで60分間、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、次いでBassamら（1991）のプロトコルにしたがう銀染色分析により可視化した。
図28は、各座位の増幅した断片を示している。レーン１～３は、座位D10S1239、D9S930及びD13S317について同時増幅したDNAサンプルを含んでいる。

実施例29

座位D10S1239、D9S930及びD4S2368の多重増幅の銀検出

本実施例においては、DNA鋳型を、１つの反応容器中、個々の座位D10S1239、D9S930及びD4S2368において、同時に増幅した。PCR増幅を、25μｌの１×STR緩衝液（50mM KCl、10mM Tris－HCl（25℃でpH9.0）、0.1%TritonX－100、1.5mM $MgCl_2$及び各200μMのdATP、dCTP、dGTP及びdTTP）中、ng数が未確定の鋳型及び0.03U TaqDNAポリメラーゼ／μｌを使用して行った。サーマルサイクラー480（パーキンエルマー、フォスターシティ、カリフォルニア）を以下に示す増幅プロトコルを用いて使用した。96℃で２分間;94℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを10回;90℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを20回、60℃で30分間のサイクルを１回。

６種の増幅プライマーを、以下に示すように組合せて使用した。各々1.0μMのD10S1239プライマー１（配列番号15）及び２（配列番号54）、各々0.3μMのD9S930プライマー１（配列番号55）及び２（配列番号61）、各々0.15μMのD4S2368プライマー１（配列番号56）及び２（配列番号57）。

増幅した産物を、40cmゲル中、60Wで60分間、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、次いでBassamら（1991）のプロトコルにしたがう銀染色分析により可視化した。

図29は、各座位の増幅した断片を示している。レーン１～６は、座位D10S1239、D9S930及びD4S2368とともに同時増幅したDNAサンプルを含んでいる。

実施例30

座位D10S1239、D9S930、D4S2368及びD20S481の多重増幅の銀検出

本実施例においては、DNA鋳型を、１つの反応容器中、個々の座位D10S1239、D9S930、D4S2368及びD20S481において、同時に増幅した。PCR増幅を、25μｌの１×STR緩衝液（50mM KCl、10mM Tris－HCl（25℃でpH9.0）、0.1%TritonX－100、1.5mM $MgCl_2$及び各200μMのdATP、dCTP、dGTP及びdTTP）中、ng数が未確定の鋳型及び0.04U TaqDNAポリメラーゼ／μｌを使用して行った。サーマルサイクラー480（パーキンエルマー、フォスターシティ、カリフォルニア）を以下に示す増幅プロトコルを用いて使用した。96℃で２分間;94℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを10回;90℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを20回;60℃で30分間のサイクルを１回。

８種の増幅プライマーを、以下に示すように組合せて使用した。各々1.0μMのD10S1239プライマー１（配列番号15）及び２（配列番号54）、各々4.0μMのD9S930プライマー１（配列番号55）及び２（配列番号14）、各々0.2μMのD4S2368プライマー１（配列番号56）及び２（配列番号57）、各々0.2μMのD20S481プライマー１（配列番号52）及び２（配列番号53）。

増幅した産物を、40cmゲル中、60Wで67分間、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、次いでBassamら（1991）のプロトコルにしたがう銀染色分析により可視化した。

図30は、各座位の増幅した断片を示している。レーン１～４は、座位D10S1239、D9S930、D4S2368及びD20S481とともに同時増幅したDNAサンプルを含んでいる。

実施例31

座位D3S1539、D19S253及びD13S317の多重増幅の銀検出

本実施例においては、DNA鋳型を、１つの反応容器中、個々の座位D3S1539、D19S253及びD13S317において、同時に増幅した。PCR増幅を、25μｌの１×STR緩衝液（50mM KCl、10mM Tris－HCl（25℃でpH9.0）、0.1%TritonX－100、1.5mM $MgCl_2$及び各200μMのdATP、dCTP、dGTP及びdTTP）中、5.0ngの鋳型及び0.03U TaqDNAポリメラーゼ／μｌを使用して行った。サーマルサイクラー480（パーキンエルマー、フォスターシティ、カリフォルニア）を以下に示す増幅プロトコルを用いて使用した。96℃で２分間;94℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを10回;90℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを20回。

６種の増幅プライマーを、以下に示すように組合せて使用した。各々1.0μMのD3S1539プライマー１（配列番号７）及び２（配列番号49）、各々1.0μMのD19S253プライマー１（配列番号50）及び２（配列番号51）、各々0.5μMのD13S317プライマー１（配列番号３）

及び２（配列番号４）。
増幅した産物を、40cmゲル中、60Wで65分間、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、次いでBassamら（1991）のプロトコルにしたがう銀染色分析により可視化した。
図31は、各座位の増幅した断片を示している。レーン１～４は、座位D3S1539、D19S253及びD13S317について同時増幅したDNAサンプルを含んでいる。レーン５は、DNA鋳型なしに同一の手順に付したサンプル、すなわち負の対照を示している。
実施例32
座位D3S1539、D19S253、D4S2368及びD20S481の多重増幅の銀検出
本実施例においては、DNA鋳型を、１つの反応容器中、個々の座位D3S1539、D19S253、D4S2368及びD20S481において、同時に増幅した。PCR増幅を、25μｌの１×STR緩衝液（50mM KCl、10mM Tris－HCl（25℃でpH9.0）、0.1%TritonX－100、1.5mM $MgCl_2$及び各200μMのdATP、dCTP、dGTP及びdTTP）中、5ngの鋳型及び0.04U TaqDNAポリメラーゼ／μｌを使用して行った。サーマルサイクラー480（パーキンエルマー、フォスターシティ、カリフォルニア）を以下に示す増幅プロトコルを用いて使用した。96℃で２分間;94℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを10回;90℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを20回。
８種の増幅プライマーを、以下に示すように組合せて使用した。各々1.0μMのD3S1539プライマー１（配列番号７）及び２（配列番号49）、各々0.5μMのD19S253プライマー１（配列番号50）及び２（配列番号51）、各々0.1μMのD4S2368プライマー１（配列番号56）及び２（配列番号57）、各々0.1μMのD20S481プライマー１（配列番号52）及び２（配列番号53）。
増幅した産物を、40cmゲル中、60Wで65分間、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、次いでBassamら（1991）のプロトコルにしたがう銀染色分析により可視化した。
図32は、各座位の増幅した断片を示している。レーン１～４は、座位D3S1539、D19S253、D4S2368及びD20S481について同時増幅したDNAサンプルを含んでいる。レーン５は、DNA鋳型なしに同一の手順に付したサンプル、すなわち負の対照を示している。
実施例33
座位D3S1539、D19S253、D13S317及びD20S481の多重増幅の銀検出
本実施例においては、DNA鋳型を、１つの反応容器中、個々の座位D3S1539、D19S253、D13S317及びD20S481において、同時に増幅した。PCR増幅を、25μｌの１×STR緩衝液（50mM KCl、10mM Tris－HCl（25℃でpH9.0）、0.1%TritonX－100、1.5mM $MgCl_2$及び各200μMのdATP、dCTP、dGTP及びdTTP）中、0.5～250ngの鋳型及び0.04U TaqDNAポリメラーゼ／μｌを使用して行った。サーマルサイクラー480（パーキンエルマー、フォスターシティ、カリフォルニア）を以下に示す増幅プロトコルを用いて使用した。96℃で２分間;94℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを10回;90℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを20回;60℃で30分間のサイクルを１回。
８種の増幅プライマーを、以下に示すように組合せて使用した。各々0.5μMのD3S1539プライマー１（配列番号７）及び２（配列番号49）、各々0.5μMのD19S253プライマー１（配列番号50）及び２（配列番号51）、各々0.5μMのD13S317プライマー１（配列番号３）及び２（配列番号４）、各々0.2μMのD20S481プライマー１（配列番号52）及び２（配列番号53）。
増幅した産物を、40cmゲル中、60Wで68分間、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、次いでBassamら（1991）のプロトコルにしたがう銀染色分析により可視化した。
図33は、各座位の増幅した断片を示している。レーン１～５は、座位D3S1539、D19S253及びD13S317及びD20S481について同時増幅したDNAサンプルを含んでいる。レーン６は、DNA鋳型なしに同一の手順に付したサンプル、すなわち負の対照を示している。
実施例34

座位D10S1239、D9S930及びD20S481の多重増幅の銀検出

本実施例においては、DNA鋳型を、１つの反応容器中、個々の座位D10S1239、D9S930及びD20S481において、同時に増幅した。PCR増幅を、25μｌの１×STR緩衝液（50mM　KCl、10mM　Tris－HCl（25℃でpH9.0）、0.1%TritonX－100、1.5mM　$MgCl_2$及び各200μMのdATP、dCTP、dGTP及びdTTP）中、0.5～250ngの鋳型及び0.03U　TaqDNAポリメラーゼ／μｌを使用して行った。サーマルサイクラー480（パーキンエルマー、フォスターシティ、カリフォルニア）を以下に示す増幅プロトコルを用いて使用した。96℃で２分間;94℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを10回;90℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを20回;60℃で30分間のサイクルを１回。

６種の増幅プライマーを、以下に示すように組合せて使用した。各々1.0μMのD10S1239プライマー１（配列番号15）及び２（配列番号54）、各々4.0μMのD9S930プライマー１（配列番号55）及び２（配列番号14）、各々0.2μMのD20S481プライマー１（配列番号52）及び２（配列番号53）。

増幅した産物を、40cmゲル中、60Wで68分間、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、次いでBassamら（1991）のプロトコルにしたがう銀染色分析により可視化した。

図34は、各座位の増幅した断片を示している。レーン１～５は、座位D10S1239、D9S930及びD20S481について同時増幅したDNAサンプルを含んでいる。レーン６は、DNA鋳型なしに同一の手順に付したサンプル、すなわち負の対照を示している。

実施例35

座位D10S1239、D4S2368及びD20S481の多重増幅の銀検出

本実施例においては、DNA鋳型を、１つの反応容器中、個々の座位D10S1239、D4S2368及びD20S481において、同時に増幅した。PCR増幅を、25μｌの１×STR緩衝液（50mM　KCl、10mM　Tris－HCl（25℃でpH9.0）、0.1%TritonX－100、1.5mM　$MgCl_2$及び各200μMのdATP、dCTP、dGTP及びdTTP）中、0.5～250ngの鋳型及び0.03U　TaqDNAポリメラーゼ／μｌを使用して行った。サーマルサイクラー480（パーキンエルマー、フォスターシティ、カリフォルニア）を以下に示す増幅プロトコルを用いて使用した。96℃で２分間;94℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを10回;90℃で１分間、60℃で１分間及び70℃で1.5分間のサイクルを20回;60℃で30分間のサイクルを１回。

６種の増幅プライマーを、以下に示すように組合せて使用した。各々1.0μMのD10S1239プライマー１（配列番号15）及び２（配列番号54）、各々0.2μMのD4S2368プライマー１（配列番号56）及び２（配列番号57）、各々0.2μMのD20S481プライマー１（配列番号52）及び２（配列番号53）。

増幅した産物を、40cmゲル中、60Wで68分間、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、次いでBassamら（1991）のプロトコルにしたがう銀染色分析により可視化した。

図35は、各座位の増幅した断片を示している。レーン１～５は、座位D10S1239、D4S2368及びD20S481について同時増幅したDNAサンプルを含んでいる。レーン６は、DNA鋳型なしに同一の手順に付したサンプル、すなわち負の対照を示している。

配列表

（２）配列番号１に関する情報

（ｉ）　配列の特徴：

（Ａ）配列の長さ:24

（Ｂ）配列の型：核酸

（Ｃ）鎖の数:1本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ii）　配列の種類：ヒトゲノムDNA

（iii）　ハイポセティカル配列:no

（viii）　ゲノム内での位置：

（Ｂ）染色体上の位置:D7S820

（xi）　配列：配列番号１
GAACACTTGT CATAGTTTAG AACG　24

（２）配列番号２に関する情報
（ｉ）　配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:23
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（viii）　ゲノム内での位置：
（Ｂ）染色体上の位置:D7S820
（xi）　配列：配列番号２
CTGAGGTATC AAAAACTCAG AGG　23

（２）配列番号３に関する情報
（ｉ）　配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:20
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（viii）　ゲノム内での位置：
（Ｂ）染色体上の位置:D13S317
（xi）　配列：配列番号３
ACAGAAGTCT GGGATGTGGA　20

（２）配列番号４に関する情報
（ｉ）　配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:20
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（viii）　ゲノム内での位置：
（Ｂ）染色体上の位置:D13S317
（xi）　配列：配列番号４
GCCCAAAAAG ACAGACAGAA　20

（２）配列番号５に関する情報
（ｉ）　配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:20
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（viii）　ゲノム内での位置：
（Ｂ）染色体上の位置:D5S818
（xi）　配列：配列番号５
GGGTGATTTT CCTCTTTGGT　20

（２）配列番号６に関する情報
（ｉ）　配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:20
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（viii）　ゲノム内での位置：
（Ｂ）染色体上の位置:D5S818

（xi） 配列：配列番号６
TGATTCCAAT CATAGCCACA 20
（２）配列番号７に関する情報
（ｉ） 配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:26
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（viii） ゲノム内での位置：
（Ｂ）染色体上の位置:D3S1539
（xi） 配列：配列番号７
TCTCTTTCCA TTACTCTCTC CATAGC 26
（２）配列番号８に関する情報
（ｉ） 配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:22
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（viii） ゲノム内での位置：
（Ｂ）染色体上の位置:D3S1539
（xi） 配列：配列番号８
AGTGCTGTTT TAGCTTCCAG GA 22
（２）配列番号９に関する情報
（ｉ） 配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:24
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（viii） ゲノム内での位置：
（Ｂ）染色体上の位置:D17S1298
（xi） 配列：配列番号９
GTAGGTCTTT TGGTTGCCAG TATG 24
（２）配列番号10に関する情報
（ｉ） 配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:24
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（viii） ゲノム内での位置：
（Ｂ）染色体上の位置:D17S1298
（xi） 配列：配列番号10
TGTCAGTAAA CCTGTGACCT GAGT 24
（２）配列番号11に関する情報
（ｉ） 配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:26
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（viii） ゲノム内での位置：
（Ｂ）染色体上の位置:D20S481

(xi) 配列：配列番号11
AATGGTGAGA AATGGGTTAT GAGTGC 26

(２) 配列番号12に関する情報
(ｉ) 配列の特徴：
(Ａ) 配列の長さ:25
(Ｂ) 配列の型：核酸
(Ｃ) 鎖の数:1本鎖
(Ｄ) トポロジー：直鎖状
(viii) ゲノム内での位置：
(Ｂ) 染色体上の位置:D20S481
(xi) 配列：配列番号12
TTTCCGGCTT TGTGTCATAA AACAG 25

(２) 配列番号13に関する情報
(ｉ) 配列の特徴：
(Ａ) 配列の長さ:20
(Ｂ) 配列の型：核酸
(Ｃ) 鎖の数:1本鎖
(Ｄ) トポロジー：直鎖状
(viii) ゲノム内での位置：
(Ｂ) 染色体上の位置:D9S930
(xi) 配列：配列番号13
TGGACAACAG AGTGAGATGC 20

(２) 配列番号14に関する情報
(ｉ) 配列の特徴：
(Ａ) 配列の長さ:23
(Ｂ) 配列の型：核酸
(Ｃ) 鎖の数:1本鎖
(Ｄ) トポロジー：直鎖状
(viii) ゲノム内での位置：
(Ｂ) 染色体上の位置:D9S930
(xi) 配列：配列番号14
GCTATGGGAA TTACAAGCAG GAA 23

(２) 配列番号15に関する情報
(ｉ) 配列の特徴：
(Ａ) 配列の長さ:26
(Ｂ) 配列の型：核酸
(Ｃ) 鎖の数:1本鎖
(Ｄ) トポロジー：直鎖状
(viii) ゲノム内での位置：
(Ｂ) 染色体上の位置:D10S1239
(xi) 配列：配列番号15
CTTTGAAATG GACCCCTAGC TAATGT 26

(２) 配列番号16に関する情報
(ｉ) 配列の特徴：
(Ａ) 配列の長さ:21
(Ｂ) 配列の型：核酸
(Ｃ) 鎖の数:1本鎖
(Ｄ) トポロジー：直鎖状
(viii) ゲノム内での位置：
(Ｂ) 染色体上の位置:D10S1239

(xi) 配列：配列番号16
CACCCTGTCC CCAGCTATCT G 21
（２）配列番号17に関する情報
（ｉ） 配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:19
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
(viii) ゲノム内での位置：
（Ｂ）染色体上の位置:D14S118
(xi) 配列：配列番号17
CAGCTTGGGC AACATAGGG 19
（２）配列番号18に関する情報
（ｉ） 配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:24
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
(viii) ゲノム内での位置：
（Ｂ）染色体上の位置:D14S118
(xi) 配列：配列番号18
CAAACTCCTG AGGTCAAACA ATCC 24
（２）配列番号19に関する情報
（ｉ） 配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:21
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
(viii) ゲノム内での位置：
（Ｂ）染色体上の位置:D14S562
(xi) 配列：配列番号19
CTTGGAGGGT GGGGTGGCTA A 21
（２）配列番号20に関する情報
（ｉ） 配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:24
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
(viii) ゲノム内での位置：
（Ｂ）染色体上の位置:D14S562
(xi) 配列：配列番号20
CGAAATTTTG TTGCCTTGCT CTGG 24
（２）配列番号21に関する情報
（ｉ） 配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:21
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
(viii) ゲノム内での位置：
（Ｂ）染色体上の位置:D14S548

（xi） 配列：配列番号21
CCTGGGCAAC AGAGTGAGAC T 21
（２）配列番号22に関する情報
（ｉ） 配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:24
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（viii） ゲノム内での位置：
（Ｂ）染色体上の位置:D14S548
（xi） 配列：配列番号22
ACCCAGCTTT AACAGTTTGT GCTT 24
（２）配列番号23に関する情報
（ｉ） 配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:23
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（viii） ゲノム内での位置：
（Ｂ）染色体上の位置:D16S490
（xi） 配列：配列番号23
GGGCGGACAC AGAATGTAAA ATC 23
（２）配列番号24に関する情報
（ｉ） 配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:24
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（viii） ゲノム内での位置：
（Ｂ）染色体上の位置:D16S490
（xi） 配列：配列番号24
AAACCCAAAT AGATGACAGG CACA 24
（２）配列番号25に関する情報
（ｉ） 配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:24
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（viii） ゲノム内での位置：
（Ｂ）染色体上の位置:D16S753
（xi） 配列：配列番号25
GCACTCCAGG CTGAATGACA GAAC 24
（２）配列番号26に関する情報
（ｉ） 配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:24
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（viii） ゲノム内での位置：
（Ｂ）染色体上の位置:D16S753

(xi) 配列：配列番号26
GCAGTGCCGC CTATTTTTGT GAAT 24

(２) 配列番号27に関する情報
(ｉ) 配列の特徴：
(Ａ) 配列の長さ:24
(Ｂ) 配列の型：核酸
(Ｃ) 鎖の数:1本鎖
(Ｄ) トポロジー：直鎖状
(viii) ゲノム内での位置：
(Ｂ) 染色体上の位置:D17S1299
(xi) 配列：配列番号27
ACCCTGATGA GATAGCACTT GAGC 24

(２) 配列番号28に関する情報
(ｉ) 配列の特徴：
(Ａ) 配列の長さ:24
(Ｂ) 配列の型：核酸
(Ｃ) 鎖の数:1本鎖
(Ｄ) トポロジー：直鎖状
(viii) ゲノム内での位置：
(Ｂ) 染色体上の位置:D17S1299
(xi) 配列：配列番号28
CACTGTGTGG AGGTGTAGCA GAGA 24

(２) 配列番号29に関する情報
(ｉ) 配列の特徴：
(Ａ) 配列の長さ:24
(Ｂ) 配列の型：核酸
(Ｃ) 鎖の数:1本鎖
(Ｄ) トポロジー：直鎖状
(viii) ゲノム内での位置：
(Ｂ) 染色体上の位置:D16S539
(xi) 配列：配列番号29
GGGGGTCTAA GAGCTTGTAA AAAG 24

(２) 配列番号30に関する情報
(ｉ) 配列の特徴：
(Ａ) 配列の長さ:26
(Ｂ) 配列の型：核酸
(Ｃ) 鎖の数:1本鎖
(Ｄ) トポロジー：直鎖状
(viii) ゲノム内での位置：
(Ｂ) 染色体上の位置:D16S539
(xi) 配列：配列番号30
TGTGCATCTG TAAGCATGTA TCTATC 26

(２) 配列番号31に関する情報
(ｉ) 配列の特徴：
(Ａ) 配列の長さ:23
(Ｂ) 配列の型：核酸
(Ｃ) 鎖の数:1本鎖
(Ｄ) トポロジー：直鎖状
(viii) ゲノム内での位置：
(Ｂ) 染色体上の位置:D22S683

(xi) 配列：配列番号31
CGAAGGTTGC ATTGAGCCAA GAT 23
(２) 配列番号32に関する情報
(ｉ) 配列の特徴：
(Ａ) 配列の長さ:24
(Ｂ) 配列の型：核酸
(Ｃ) 鎖の数:1本鎖
(Ｄ) トポロジー：直鎖状
(viii) ゲノム内での位置：
(Ｂ) 染色体上の位置:D22S683
(xi) 配列：配列番号32
TGGTGGAAAT GCCTCATGTA GAAA 24
(２) 配列番号33に関する情報
(ｉ) 配列の特徴：
(Ａ) 配列の長さ:24
(Ｂ) 配列の型：核酸
(Ｃ) 鎖の数:1本鎖
(Ｄ) トポロジー：直鎖状
(viii) ゲノム内での位置：
(Ｂ) 染色体上の位置:HUMCSF1PO
(xi) 配列：配列番号33
AACCTGAGTC TGCCAAGGAC TAGC 24
(２) 配列番号34に関する情報
(ｉ) 配列の特徴：
(Ａ) 配列の長さ:24
(Ｂ) 配列の型：核酸
(Ｃ) 鎖の数:1本鎖
(Ｄ) トポロジー：直鎖状
(viii) ゲノム内での位置：
(Ｂ) 染色体上の位置:HUMCSF1PO
(xi) 配列：配列番号34
TTCCACACAC CACTGGCCAT CTTC 24
(２) 配列番号35に関する情報
(ｉ) 配列の特徴：
(Ａ) 配列の長さ:24
(Ｂ) 配列の型：核酸
(Ｃ) 鎖の数:1本鎖
(Ｄ) トポロジー：直鎖状
(viii) ゲノム内での位置：
(Ｂ) 染色体上の位置:HUMTPOX
(xi) 配列：配列番号35
ACTGGCACAG AACAGGCACT TAGG 24
(２) 配列番号36に関する情報
(ｉ) 配列の特徴：
(Ａ) 配列の長さ:24
(Ｂ) 配列の型：核酸
(Ｃ) 鎖の数:1本鎖
(Ｄ) トポロジー：直鎖状
(viii) ゲノム内での位置：
(Ｂ) 染色体上の位置:HUMTPOX

(xi) 配列：配列番号36
GGAGGAACTG GGAACCACAC AGGT 24

(２) 配列番号37に関する情報
(ｉ) 配列の特徴：
(Ａ) 配列の長さ:24
(Ｂ) 配列の型：核酸
(Ｃ) 鎖の数:1本鎖
(Ｄ) トポロジー：直鎖状
(viii) ゲノム内での位置：
(Ｂ) 染色体上の位置:HUMTH01
(xi) 配列：配列番号37
ATTCAAAGGG TATCTGGGCT CTGG 24

(２) 配列番号38に関する情報
(ｉ) 配列の特徴：
(Ａ) 配列の長さ:24
(Ｂ) 配列の型：核酸
(Ｃ) 鎖の数:1本鎖
(Ｄ) トポロジー：直鎖状
(viii) ゲノム内での位置：
(Ｂ) 染色体上の位置:HUMTH01
(xi) 配列：配列番号38
GTGGGCTGAA AAGCTCCCGA TTAT 24

(２) 配列番号39に関する情報
(ｉ) 配列の特徴：
(Ａ) 配列の長さ:29
(Ｂ) 配列の型：核酸
(Ｃ) 鎖の数:1本鎖
(Ｄ) トポロジー：直鎖状
(viii) ゲノム内での位置：
(Ｂ) 染色体上の位置:HUMvWFA31
(xi) 配列：配列番号39
GAAAGCCCTA GTGGATGATA AGAATAATC 29

(２) 配列番号40に関する情報
(ｉ) 配列の特徴：
(Ａ) 配列の長さ:30
(Ｂ) 配列の型：核酸
(Ｃ) 鎖の数:1本鎖
(Ｄ) トポロジー：直鎖状
(viii) ゲノム内での位置：
(Ｂ) 染色体上の位置:HUMvWFA31
(xi) 配列：配列番号40
GGACAGATGA TAAATACATA GGATGGATGG 30

(２) 配列番号41に関する情報
(ｉ) 配列の特徴：
(Ａ) 配列の長さ:24
(Ｂ) 配列の型：核酸
(Ｃ) 鎖の数:1本鎖
(Ｄ) トポロジー：直鎖状
(viii) ゲノム内での位置：
(Ｂ) 染色体上の位置:HUMF13A01

（xi） 配列：配列番号41
GAGGTTGCAC TCCAGCCTTT GCAA 24
（２）配列番号42に関する情報
（ｉ） 配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:24
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（viii） ゲノム内での位置：
（Ｂ）染色体上の位置:HUMF13A01
（xi） 配列：配列番号42
TTCCTGAATC ATCCCAGAGC CACA 24
（２）配列番号43に関する情報
（ｉ） 配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:23
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（viii） ゲノム内での位置：
（Ｂ）染色体上の位置:HUMFESFPS
（xi） 配列：配列番号43
GCTGTTAATT CATGTAGGGA AGG 23
（２）配列番号44に関する情報
（ｉ） 配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:24
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（viii） ゲノム内での位置：
（Ｂ）染色体上の位置:HUMFESFPS
（xi） 配列：配列番号44
GTAGTCCCAG CTACTTGGCT ACTC 24
（２）配列番号45に関する情報
（ｉ） 配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:20
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（viii） ゲノム内での位置：
（Ｂ）染色体上の位置:HUMBFXIII
（xi） 配列：配列番号45
TGAGGTGGTG TACTACCATA 20
（２）配列番号46に関する情報
（ｉ） 配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:20
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（viii） ゲノム内での位置：
（Ｂ）染色体上の位置:HUMBFXIII

（xi） 配列：配列番号46
GATCATGCCA TTGCACTCTA 20
（２）配列番号47に関する情報
（ｉ） 配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:24
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（viii） ゲノム内での位置：
（Ｂ）染色体上の位置:HUMLIPOL
（xi） 配列：配列番号47
CTGACCAAGG ATAGTGGGAT ATAG 24
（２）配列番号48に関する情報
（ｉ） 配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:23
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（viii） ゲノム内での位置：
（Ｂ）染色体上の位置:HUMLIPOL
（xi） 配列：配列番号48
GGTAACTGAG CGAGACTGTG TCT 23
（２）配列番号49に関する情報
（ｉ） 配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:18
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（viii） ゲノム内での位置：
（Ｂ）染色体上の位置:D3S1539
（xi） 配列：配列番号49
CCACCCTTTC AGCACCAG 18
（２）配列番号50に関する情報
（ｉ） 配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:20
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（viii） ゲノム内での位置：
（Ｂ）染色体上の位置:D19S253
（xi） 配列：配列番号50
ATAGACAGAC AGACGGACTG 20
（２）配列番号51に関する情報
（ｉ） 配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:19
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（viii） ゲノム内での位置：
（Ｂ）染色体上の位置:D19S253

（xi） 配列：配列番号51
GGGAGTGGAG ATTACCCCT 19
（２）配列番号52に関する情報
（ｉ） 配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:21
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（viii） ゲノム内での位置：
（Ｂ）染色体上の位置:D20S481
（xi） 配列：配列番号52
AAAGCTCTCT GAAGCAGGTG T 21
（２）配列番号53に関する情報
（ｉ） 配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:24
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（viii） ゲノム内での位置：
（Ｂ）染色体上の位置:D20S481
（xi） 配列：配列番号53
CAGATTGCAC TAGAAAGAGA GGAA 24
（２）配列番号54に関する情報
（ｉ） 配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:23
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（viii） ゲノム内での位置：
（Ｂ）染色体上の位置:D10S1239
（xi） 配列：配列番号54
CACCCTGTCC CCAGCTATCT GGA 23
（２）配列番号55に関する情報
（ｉ） 配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:27
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（viii） ゲノム内での位置：
（Ｂ）染色体上の位置:D9S930
（xi） 配列：配列番号55
AGTTGAATCT TGAGTCTCTC AGAGTCA 27
（２）配列番号56に関する情報
（ｉ） 配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:24
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（viii） ゲノム内での位置：
（Ｂ）染色体上の位置:D4S2368

(xi) 配列：配列番号56
TGTACTCATT TTCCCGCAAT GATG 24

(２) 配列番号57に関する情報
(ｉ) 配列の特徴：
(Ａ) 配列の長さ:24
(Ｂ) 配列の型：核酸
(Ｃ) 鎖の数:1本鎖
(Ｄ) トポロジー：直鎖状
(viii) ゲノム内での位置：
(Ｂ) 染色体上の位置:D4S2368
(xi) 配列：配列番号57
TCAGAAAGTA GGGTCTGGGC TCTT 24

(２) 配列番号58に関する情報
(ｉ) 配列の特徴：
(Ａ) 配列の長さ:28
(Ｂ) 配列の型：核酸
(Ｃ) 鎖の数:1本鎖
(Ｄ) トポロジー：直鎖状
(viii) ゲノム内での位置：
(Ｂ) 染色体上の位置:D16S539
(xi) 配列：配列番号58
TGTGCATCTG TAAGCATGTA TCTATCAT 28

(２) 配列番号59に関する情報
(ｉ) 配列の特徴：
(Ａ) 配列の長さ:32
(Ｂ) 配列の型：核酸
(Ｃ) 鎖の数:1本鎖
(Ｄ) トポロジー：直鎖状
(viii) ゲノム内での位置：
(Ｂ) 染色体上の位置:HUMvWFA31
(xi) 配列：配列番号59
GAAAGCCCTA GTGGATGATA AGAATAATCA GT 32

(２) 配列番号60に関する情報
(ｉ) 配列の特徴：
(Ａ) 配列の長さ:33
(Ｂ) 配列の型：核酸
(Ｃ) 鎖の数:1本鎖
(Ｄ) トポロジー：直鎖状
(viii) ゲノム内での位置：
(Ｂ) 染色体上の位置:HUMvWFA31
(xi) 配列：配列番号60
GGACAGATGA TAAATACATA GGATGGATGG ATA 33

(２) 配列番号61に関する情報
(ｉ) 配列の特徴：
(Ａ) 配列の長さ:25
(Ｂ) 配列の型：核酸
(Ｃ) 鎖の数:1本鎖
(Ｄ) トポロジー：直鎖状
(viii) ゲノム内での位置：
(Ｂ) 染色体上の位置:D9S930

（xi） 配列：配列番号61

GCTATGGGAA TTACAAGCAG GAAAC 25

【図１】

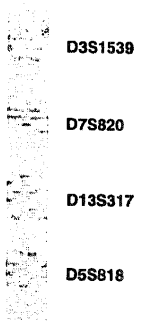


FIGURE 1

【図２】

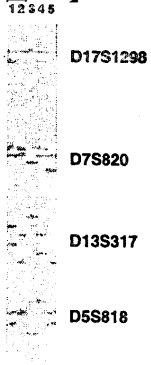


FIGURE 2

【図３】

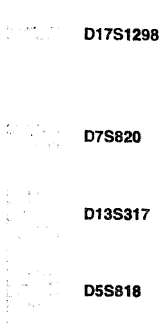


FIGURE 3

【図４】

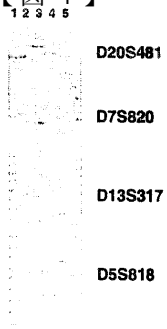


FIGURE 4

【図５】

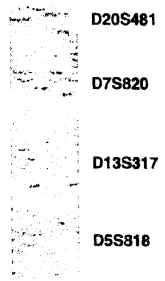


FIGURE 5

【図６】



FIGURE 6

【図７】

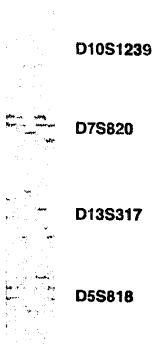


FIGURE 7

【図８】

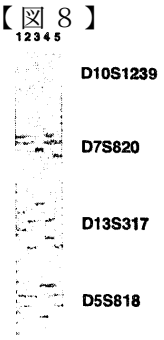


FIGURE 8

【図９】

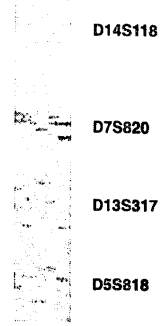


FIGURE 9

【図１０】

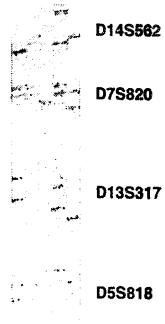


FIGURE 10

【図１１】

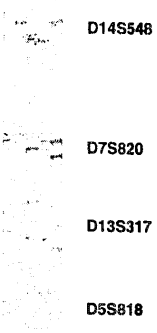


FIGURE 11

【図１２】

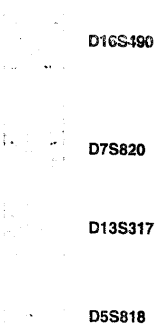


FIGURE 12

【図１３】

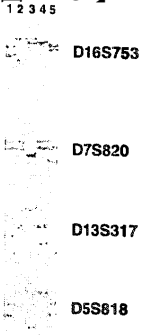


FIGURE 13

【図１４】

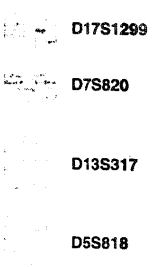


FIGURE 14

【図１５】

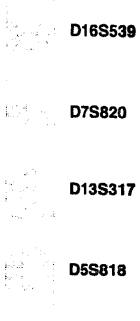


FIGURE 15

【図１６】

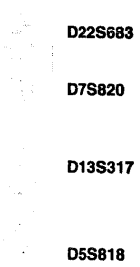


FIGURE 16

【図１７】

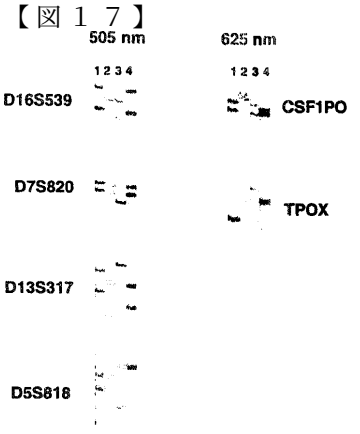


FIGURE 17

【図１８】

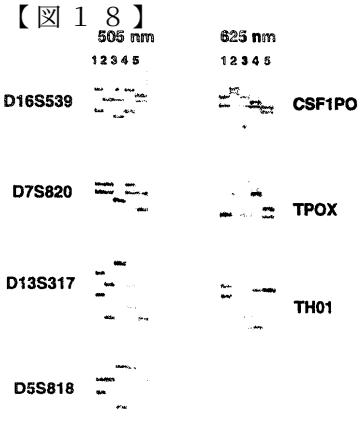


FIGURE 18

【図２４】

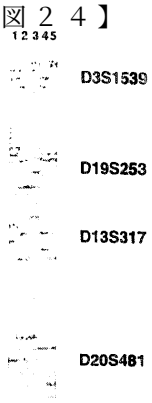


FIGURE 24

【図２５】

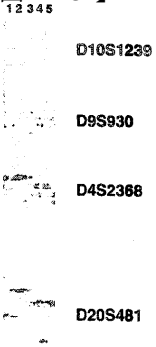


FIGURE 25

【図２６】



FIGURE 26

【図２７】

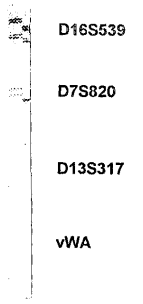


FIGURE 27

【図２８】

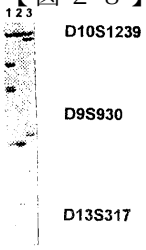


FIGURE 28

【図１９】

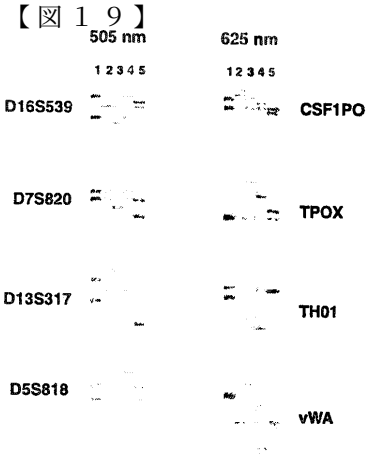


FIGURE 19

【図２９】

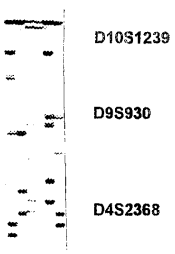


FIGURE 29

【図３０】



FIGURE 30

【図３１】

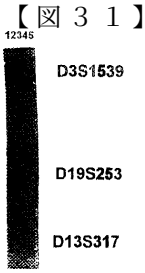


FIGURE 31

【図２０】

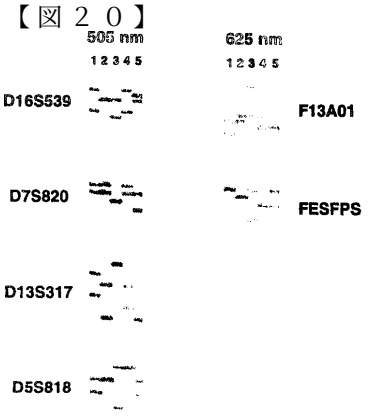


FIGURE 20

【図３２】



FIGURE 32

【図３３】

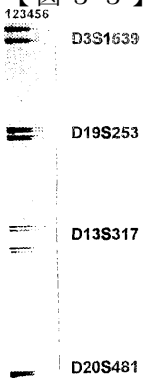


FIGURE 33

【図２１】

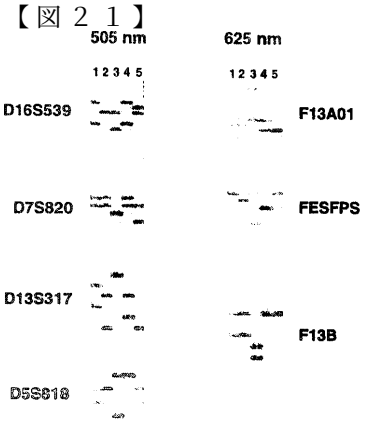


FIGURE 21

【図３４】

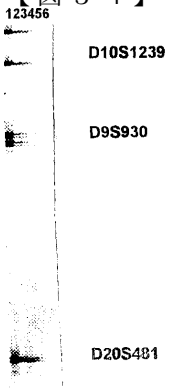


FIGURE 34

【図３５】



FIGURE 35

【図２２】



FIGURE 22

【図２３】

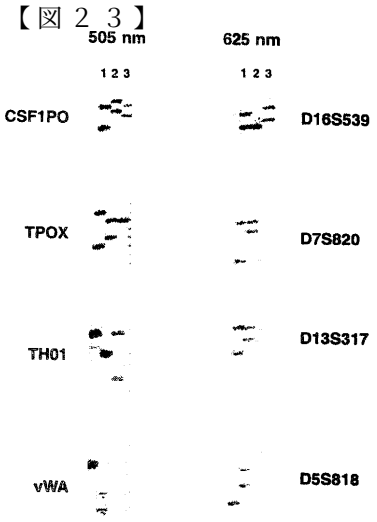


FIGURE 23

フロントページの続き

(74)代理人　100084009
　　弁理士　小川　信夫
(74)代理人　100082821
　　弁理士　村社　厚夫
(72)発明者　シューム　ジェームズ　ダブリュー
　　アメリカ合衆国　ウィスコンシン州　５３７１１　マディソン　ティンバー　リッジ　トレイル　５８４３
(72)発明者　ミッカ　キャサリン　エイ
　　アメリカ合衆国　ウィスコンシン州　５３５７５　オレゴン　パドック　プレイス　１８４２
(72)発明者　ラバック　ドーン　アール
　　アメリカ合衆国　ウィスコンシン州　５３５３２　デフォレスト　ウェンデル　ウェイ　６６４９

審査官　深草　亜子

(56)参考文献　国際公開第９６／０１０６４８（WO，Ａ１）
　　Genomics，1995年,Vol.30,p.450-458

(58)調査した分野(Int.Cl.^{7}，ＤＢ名)
　　C12Q　1/68