

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載
 【部門区分】第1部門第1区分
 【発行日】令和3年5月13日(2021.5.13)

【公表番号】特表2020-517298(P2020-517298A)
 【公表日】令和2年6月18日(2020.6.18)
 【年通号数】公開・登録公報2020-024
 【出願番号】特願2020-507488(P2020-507488)
 【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/6844 (2018.01)

C 4 0 B 40/06 (2006.01)

C 1 2 Q 1/686 (2018.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/6844 Z

C 4 0 B 40/06 Z N A

C 1 2 Q 1/686 Z

C 1 2 N 15/09 Z

【手続補正書】

【提出日】令和3年4月2日(2021.4.2)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

1組のアダプターを一本鎖ポリヌクレオチドのライブラリーにライゲーションすることを含む方法であって、

前記ライゲーションが、一本鎖DNA(ssDNA)リガーゼによって触媒され；

各一本鎖ポリヌクレオチドが、5'末端でのライゲーションを防止するために前記5'末端でブロックされており；

各アダプターが、前記アダプターがライゲーションされる前記一本鎖ポリヌクレオチドに目印を付けるユニーク分子識別子(UMI)配列を含み、3'末端でのライゲーションを防止するために前記3'末端でブロックされており；かつ

前記アダプターの5'末端が、前記ssDNAリガーゼによって前記一本鎖ポリヌクレオチドの3'末端にライゲーションされて直鎖状ライゲーション生成物を形成し、

それによって、直鎖状一本鎖ライゲーション生成物のライブラリーを得る、方法。

【請求項2】

前記ライゲーションステップ前に、試料から一本鎖ポリヌクレオチドの前記ライブラリーを得るステップをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記試料が、生物学的試料であり、必要に応じて、(1)前記生物学的試料が、いかなる処理も行わずに被験体から直接得られているか；(2)前記生物学的試料中のポリヌクレオチドが、亜硫酸水素塩変換に供されていないか；または(3)前記生物学的試料中のポリヌクレオチドが、部分的なもしくは完全な亜硫酸水素塩変換に供されている、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記生物学的試料が、疾患または状態、例として、がんまたは新生物を有するか、またはそれを有する疑いのある被験体からのものである、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

前記生物学的試料が、循環腫瘍DNA (ctDNA)を含む試料、例として、血液、血清、血漿もしくは体液試料またはそれらの任意の組み合わせである、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記ssDNAリガーゼが、ThermusバクテリオファージRNAリガーゼ、例として、バクテリオファージTS2126 RNAリガーゼ(例えば、CircLigase(商標)およびCircLigase II(商標))、古細菌RNAリガーゼ、例として、Methanobacterium thermoautotrophicum RNAリガーゼ1、T4 RNAリガーゼI、熱安定性5' App DNA/RNAリガーゼ、T4 RNAリガーゼ2、切断型T4 RNAリガーゼ2、例えば、T4 RNAリガーゼ2切断型、T4 RNAリガーゼ2切断型K227Q、T4 RNAリガーゼ2切断型KQまたはT4 DNAリガーゼである、請求項1から5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

各一本鎖ポリヌクレオチドの前記ブロックが、その5'末端でのライゲーションを防止するための脱リン酸化を含む、または
各アダプターの前記ブロックが、その3'末端でのライゲーションを防止するための、炭素スパーサー、ddCTP、ddATP、ddTTP、ddGTP、ヘキサンジオール、トリエチレングリコールおよび/またはヘキサエチレングリコールを含む、
請求項1から6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

各アダプターが、前記5'末端において、前記UMI配列に対して5'側であるジヌクレオチド配列、例として、GA(5'~3')、GG(5'~3')、AA(5'~3')またはAG(5'~3')を含む、請求項1から7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

各アダプター中の前記UMI配列が、約6~約15核酸残基の長さであり、例えば、前記UMI配列が、12merである、請求項1から8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

前記ライゲーション反応が、密集剤、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)、例として、PEG4000もしくはPEG6000、デキストランおよび/またはフィコールの存在下で行われる、請求項1から9のいずれかに記載の方法。

【請求項11】

直鎖状一本鎖ライゲーション生成物の前記ライブラリーを直鎖状二本鎖ライゲーション生成物のライブラリーに変換することをさらに含む、請求項1から10のいずれかに記載の方法。

【請求項12】

各々が、前記アダプターに逆相補的であり、かつ/または前記アダプターにハイブリダイズ可能な配列を含む、1組のプライマー；および

標的配列(例えば、EGFR遺伝子配列)にハイブリダイズ可能なプライマーであって、必要に応じて、配列番号4~1529からなる群より選択される配列もしくはその相補的もしくは実質的に相補的な配列またはその数値範囲もしくは部分範囲を含むプライマーを使用して、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって、直鎖状二本鎖ライゲーション生成物の前記ライブラリーを増幅し、

それによって、前記標的配列の配列情報を含む直鎖状二本鎖ライゲーション生成物の増幅したライブラリーを得ることをさらに含む、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

各々が前記標的配列に特異的な配列を含む、複数のプライマーが、使用され、前記プライマーが、同じまたは異なる標的配列を有し、必要に応じて、前記複数のプライマーが、配列番号 4 ~ 1529 のうちの任意の 1 つもしくは複数もしくはその相補的もしくは実質的に相補的な配列またはその数値範囲もしくは部分範囲を含む、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記標的配列の前記配列情報が、変異、一塩基多型 (SNP)、コピー数多型 (CNV) またはエピジェネティック変化を含む、請求項 1 2 または 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

直鎖状二本鎖ライゲーション生成物の増幅し、精製したライブラリーをシーケンシングすることをさらに含む、請求項 1 2 から 1 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 6】

被験体における疾患もしくは状態、例えば、がんまたは新生物の診断および/または予後、被験体の処置、例えば、がんまたは新生物処置に対する応答性を予測すること、前記疾患/状態もしくは処置についての薬理遺伝学マーカーを同定すること、ならびに/または遺伝情報について集団をスクリーニングすることのために使用される、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

請求項 1 から 1 0 のいずれかに記載の方法によって生成された直鎖状一本鎖ライゲーション生成物のライブラリー、

請求項 1 1 に記載の方法によって生成された直鎖状二本鎖ライゲーション生成物のライブラリー、

請求項 1 2 から 1 4 のいずれかに記載の方法によって生成された直鎖状二本鎖ライゲーション生成物の増幅したライブラリー、あるいは

請求項 1 5 または 1 6 に記載の方法によって生成されたシーケンシングライブラリー

【請求項 1 8】

一本鎖 DNA (ssDNA) リガーゼ;

複数のアダプターであって、各アダプターが、3'末端でのライゲーションを防止するためにブロックされており、一方で、前記アダプターの5'末端が、直鎖状一本鎖ライゲーション生成物を形成するために一本鎖ポリヌクレオチドへのライゲーションに利用可能であり、各アダプターが、前記一本鎖ポリヌクレオチドに目印を付けるユニーク分子識別子 (UMI) 配列を含む、複数のアダプターを含む、ライゲーション生成物のライブラリーを構築するためのキット。

【請求項 1 9】

配列番号 4 ~ 1529 からなる群より選択される任意の 1 つもしくは複数の配列またはその数値範囲もしくは部分範囲を含むプライマー、

配列番号 4 ~ 1529 のうちの任意の 1 つもしくは複数、例えば、配列番号 4 ~ 1529 のうちの約 10、20、50、100、150、200、250 もしくは 300、400、500、600、700、800、900、1,000、1,100、1,200、1,300、1,400、1,500 もしくは 1529 個すべてもしくはその相補的もしくは実質的に相補的な配列またはその数値範囲もしくは部分範囲を含むプライマー組、

配列番号 4 ~ 1529 のうちの任意の 1 つもしくは複数、例えば、配列番号 4 ~ 1529 のうちの約 10、20、50、100、150、200、250 もしくは 300、400、500、600、700、800、900、1,000、1,100、1,200、1,300、1,400、1,500 もしくは 1529 個すべてもしくはその相補的もしくは実質的に相補的な配列またはその数値範囲もしくは部分範囲、および C A C T C T T T C C C T A C A C G A C G C (配列番号 3) またはその一部を含むプライマーを含むプライマー組、あるいは

配列番号 4 ~ 1529 のうちの任意の 1 つもしくは複数、例えば、配列番号 4 ~ 152

9のうち約10、20、50、100、150、200、250もしくは300、400、500、600、700、800、900、1,000、1,100、1,200、1,300、1,400、1,500もしくは1529個すべてもしくはその相補的もしくは実質的に相補的な配列もしくはその数値範囲もしくは部分範囲、CACTCTTTCCTACACGACGC(配列番号3)もしくはその一部を含むプライマー、および/またはAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTG(配列番号1)もしくはその一部を含むポリヌクレオチドを含むキット。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0005

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0005】

当技術分野の上記の問題を克服するための解析技術の改善が要求されている。本開示は、この、および他の関連する要求に取り組む。

本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

1組のアダプターを一本鎖ポリヌクレオチドのライブラリーにライゲーションすることを含む方法であって、

前記ライゲーションが、一本鎖DNA(ssDNA)リガーゼによって触媒され；

各一本鎖ポリヌクレオチドが、5'末端でのライゲーションを防止するために前記5'末端でブロックされており；

各アダプターが、前記アダプターがライゲーションされる前記一本鎖ポリヌクレオチドに目印を付けるユニーク分子識別子(UMI)配列を含み、3'末端でのライゲーションを防止するために前記3'末端でブロックされており；かつ

前記アダプターの5'末端が、前記ssDNAリガーゼによって前記一本鎖ポリヌクレオチドの3'末端にライゲーションされて直鎖状ライゲーション生成物を形成し、

それによって、直鎖状一本鎖ライゲーション生成物のライブラリーを得る、

方法。

(項目2)

前記ライゲーションステップ前に、試料から一本鎖ポリヌクレオチドの前記ライブラリーを得るステップをさらに含む、項目1に記載の方法。

(項目3)

前記得るステップが、前記試料からの二本鎖ポリヌクレオチドを変性させることを含む、項目2に記載の方法。

(項目4)

前記試料が、生物学的試料であり、必要に応じて、(1)前記生物学的試料が、いかなる処理も行わずに被験体から直接得られるか；(2)前記生物学的試料中のポリヌクレオチドが、亜硫酸水素塩変換に供されていないか；または(3)前記生物学的試料中のポリヌクレオチドが、部分的なもしくは完全な亜硫酸水素塩変換に供されている、項目2または3に記載の方法。

(項目5)

前記生物学的試料が、疾患または状態、例として、がんまたは新生物を有するか、またはそれを有する疑いのある被験体からのものである、項目4に記載の方法。

(項目6)

前記生物学的試料が、循環腫瘍DNA(ctDNA)を含む試料、例として、血液、血清、血漿もしくは体液試料またはそれらの任意の組み合わせである、項目5に記載の方法。

(項目7)

前記一本鎖ポリヌクレオチドが、約20～約400核酸残基の長さである、項目1から6のいずれか一項に記載の方法。

(項目8)

前記ssDNAリガーゼが、ThermusバクテリオファージRNAリガーゼ、例として、バクテリオファージTS2126 RNAリガーゼ(例えば、CircLigase(商標)およびCircLigase II(商標))、古細菌RNAリガーゼ、例として、Methanobacterium thermoautotrophicum RNAリガーゼ1、T4 RNAリガーゼI、熱安定性5' App DNA/RNAリガーゼ、T4 RNAリガーゼ2、切断型T4 RNAリガーゼ2、例えば、T4 RNAリガーゼ2切断型、T4 RNAリガーゼ2切断型K227Q、T4 RNAリガーゼ2切断型KQまたはT4 DNAリガーゼである、項目1から7のいずれか一項に記載の方法。

(項目9)

各一本鎖ポリヌクレオチドの前記ブロックが、その5'末端でのライゲーションを防止するための脱リン酸化を含む、項目1から8のいずれか一項に記載の方法。

(項目10)

各アダプターの前記ブロックが、その3'末端でのライゲーションを防止するための、炭素スパーサー、ddCTP、ddATP、ddTTP、ddGTP、ヘキサンジオール、トリエチレングリコールおよび/またはヘキサエチレングリコールを含む、項目1から9のいずれか一項に記載の方法。

(項目11)

各アダプターが、前記5'末端において、前記UMI配列に対して5'側であるジヌクレオチド配列、例として、GA(5'～3')、GG(5'～3')、AA(5'～3')またはAG(5'～3')を含む、項目1から10のいずれか一項に記載の方法。

(項目12)

各アダプター中の前記UMI配列が、約6～約15核酸残基の長さであり、例えば、前記UMI配列が、12merである、項目1から11のいずれか一項に記載の方法。

(項目13)

前記ライゲーション反応が、密集剤の存在下で行われる、項目1から12のいずれかに記載の方法。

(項目14)

前記密集剤が、ポリエチレングリコール(PEG)、例として、PEG4000もしくはPEG6000、デキストランおよび/またはフィコールを含む、項目13に記載の方法。

(項目15)

直鎖状一本鎖ライゲーション生成物の前記ライブラリーを直鎖状二本鎖ライゲーション生成物のライブラリーに変換することをさらに含む、項目1から14のいずれかに記載の方法。

(項目16)

前記変換が、各々が、前記アダプターに逆相補的であり、かつ/または前記アダプターにハイブリダイズ可能な配列を含む、プライマーまたは1組のプライマーを使用する、項目15に記載の方法。

(項目17)

直鎖状二本鎖ライゲーション生成物の前記ライブラリーを増幅および/または精製することをさらに含む、項目15または16に記載の方法。

(項目18)

前記精製が、約50ヌクレオチド～約1000ヌクレオチドの長さのポリヌクレオチドを選択的に精製し、前記精製が、必要に応じて、ビーズベースまたはカラムベースであり、前記精製が、一方が前記直鎖状二本鎖ライゲーション生成物に結合し、もう一方が固体支持体(例として、ビーズ)に結合する特定の結合対(例として、ビオチン/ストレプト

アビジン)を使用することを含まない、項目17に記載の方法。

(項目19)

各々が、前記アダプターに逆相補的であり、かつ/または前記アダプターにハイブリダイズ可能な配列を含む、1組のプライマー;および

標的配列(例えば、E G F R 遺伝子配列)にハイブリダイズ可能なプライマーであって、必要に応じて、配列番号4~1529からなる群より選択される配列もしくはその相補的もしくは実質的に相補的な配列またはその数値範囲もしくは部分範囲を含むプライマーを使用して、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって、直鎖状二本鎖ライゲーション生成物の前記ライブラリーを増幅し、

それによって、前記標的配列の配列情報を含む直鎖状二本鎖ライゲーション生成物の増幅したライブラリーを得ること

をさらに含む、項目15から18のいずれかに記載の方法。

(項目20)

各々が前記標的配列に特異的な配列を含む、複数のプライマーが、使用され、前記プライマーが、同じまたは異なる標的配列を有し、必要に応じて、前記複数のプライマーが、配列番号4~1529のうちの任意の1つもしくは複数もしくはその相補的もしくは実質的に相補的な配列またはその数値範囲もしくは部分範囲を含む、項目19に記載の方法。

(項目21)

前記標的配列の前記配列情報が、変異、一塩基多型(SNP)、コピー数多型(CNV)またはエピジェネティック変化を含む、項目19または20に記載の方法。

(項目22)

前記変異が、点変異、挿入、欠失、インデル、逆位、トランケーション、融合、転座、増幅またはそれらの任意の組み合わせを含む、項目21に記載の方法。

(項目23)

直鎖状二本鎖ライゲーション生成物の前記増幅したライブラリーが、全ゲノムライブラリーではない、項目19から22のいずれかに記載の方法。

(項目24)

直鎖状二本鎖ライゲーション生成物の前記増幅したライブラリーを精製することをさらに含む、項目19から23のいずれかに記載の方法。

(項目25)

前記精製が、ビーズベースであり、約150ヌクレオチドを超える長さのポリヌクレオチドを選択的に精製し、前記精製が、一方が前記直鎖状二本鎖ライゲーション生成物に結合し、もう一方が固体支持体(例として、ビーズ)に結合する特定の結合対(例として、ビオチン/ストレプトアビジン)を使用することを含まない、項目24に記載の方法。

(項目26)

直鎖状二本鎖ライゲーション生成物の増幅し、精製したライブラリーをシーケンシングすることをさらに含む、項目24または25に記載の方法。

(項目27)

前記シーケンシングステップが、シーケンシングアダプターおよび/または試料特異的バーコードを各直鎖状二本鎖ライゲーション生成物に結合することを含む、項目26に記載の方法。

(項目28)

前記結合ステップが、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を使用して行われる、項目27に記載の方法。

(項目29)

前記シーケンシングの変換率(シーケンシングリードを生ずる、前記ライブラリーにおける一本鎖ポリヌクレオチドの割合)が、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%または少なくとも約90%である、項目26に記載の方法。

(項目30)

被験体における疾患もしくは状態の診断および/または予後、被験体の処置に対する応答性を予測すること、前記疾患/状態もしくは処置についての薬理遺伝学マーカーを同定すること、ならびに/または遺伝情報について集団をスクリーニングすることのために使用される、項目26から29のいずれか一項に記載の方法。

(項目31)

前記疾患または状態が、がんまたは新生物であり、前記処置が、がんまたは新生物処置である、項目30に記載の方法。

(項目32)

項目1から14のいずれかに記載の方法によって生成された直鎖状一本鎖ライゲーション生成物のライブラリー。

(項目33)

項目15から18のいずれかに記載の方法によって生成された直鎖状二本鎖ライゲーション生成物のライブラリー。

(項目34)

項目19から25のいずれかに記載の方法によって生成された直鎖状二本鎖ライゲーション生成物の増幅したライブラリー。

(項目35)

項目26から31のいずれかに記載の方法によって生成されたシーケンシングライブラリー。

(項目36)

一本鎖DNA(ssDNA)リガーゼ；

複数のアダプターであって、各アダプターが、3'末端でのライゲーションを防止するためにブロックされており、一方で、前記アダプターの5'末端が、直鎖状一本鎖ライゲーション生成物を形成するために一本鎖ポリヌクレオチドへのライゲーションに利用可能であり、各アダプターが、前記一本鎖ポリヌクレオチドに目印を付けるユニーク分子識別子(UMI)配列を含む、複数のアダプターを含む、ライゲーション生成物のライブラリーを構築するためのキット。

(項目37)

試料からの二本鎖ポリヌクレオチドを変性させて前記一本鎖ポリヌクレオチドを得るための変性試薬をさらに含む、項目36に記載のキット。

(項目38)

前記ssDNAリガーゼが、ThermusバクテリオファージRNAリガーゼ、例として、バクテリオファージTS2126 RNAリガーゼ(例えば、CircLigase(商標)およびCircLigase II(商標))、古細菌RNAリガーゼ、例として、Methanobacterium thermoautotrophicum RNAリガーゼ1、T4 RNAリガーゼI、熱安定性5'App DNA/RNAリガーゼ、T4 RNAリガーゼ2、切断型T4 RNAリガーゼ2、例えば、T4 RNAリガーゼ2切断型、T4 RNAリガーゼ2切断型K227Q、T4 RNAリガーゼ2切断型KQまたはT4 DNAリガーゼである、項目36または37に記載のキット。

(項目39)

前記一本鎖ポリヌクレオチドの5'ホスフェート基を除去するための脱リン酸化試薬をさらに含む、項目36から38のいずれか一項に記載のキット。

(項目40)

各アダプターが、その3'末端でのライゲーションを防止するための、炭素スパーサー、ddCTP、ddATP、ddTTP、ddGTP、ヘキサンジオール、トリエチレングリコールおよび/またはヘキサエチレングリコールを含む、項目36から39のいずれか一項に記載のキット。

(項目41)

各アダプターが、その5'末端において、ジヌクレオチド配列、例として、GA(5'~3')、GG(5'~3')、AA(5'~3')またはAG(5'~3')を含む、

項目 3 6 から 4 0 のいずれか一項に記載のキット。

(項目 4 2)

各アダプター中の前記 U M I 配列が、約 6 ~ 約 1 5 核酸残基の長さであり、例えば、前記 U M I 配列が、1 2 m e r である、項目 3 6 から 4 1 のいずれか一項に記載のキット。

(項目 4 3)

ライゲーション反応のための密集剤をさらに含む、項目 3 6 から 4 2 のいずれか一項に記載のキット。

(項目 4 4)

前記密集剤が、ポリエチレングリコール (P E G)、例として、P E G 4 0 0 0 もしくは P E G 6 0 0 0、デキストランおよび / またはフィコールを含む、項目 1 3 に記載のキット。

(項目 4 5)

前記一本鎖ポリヌクレオチドを二本鎖ポリヌクレオチドに変換するための、各々が、前記アダプターに逆相補的であり、かつ / または前記アダプターにハイブリダイズ可能な配列を含む、プライマーまたは 1 組のプライマーをさらに含む、項目 3 6 から 4 4 のいずれかに記載のキット。

(項目 4 6)

プライマーダイマーを除去するための試薬をさらに含む、項目 4 5 に記載のキット。

(項目 4 7)

標的配列の配列情報を含む増幅した直鎖状二本鎖ライゲーション生成物を得るための、前記標的配列 (例えば、E G F R 遺伝子配列) に特異的な配列を含むプライマーであって、必要に応じて、配列番号 4 ~ 1 5 2 9 からなる群より選択される配列もしくはその相補的もしくは実質的に相補的な配列またはその数値範囲もしくは部分範囲を含むプライマーをさらに含む、項目 4 5 または 4 6 に記載のキット。

(項目 4 8)

複数のプライマーを含み、各々が前記標的配列に特異的な配列を含み、前記プライマーが、同じまたは異なる標的配列を有し、必要に応じて、前記複数のプライマーが、配列番号 4 ~ 1 5 2 9 のうちの任意の 1 つもしくは複数もしくはその相補的もしくは実質的に相補的な配列またはその数値範囲もしくは部分範囲を含む、項目 4 7 に記載のキット。

(項目 4 9)

前記増幅した直鎖状二本鎖ライゲーション生成物をシーケンシングするための、シーケンシングアダプターおよび / または試料特異的バーコードをさらに含む、項目 4 7 または 4 8 に記載のキット。

(項目 5 0)

各構成成分のための別々のバイアルおよび / または前記構成成分を使用するための指示をさらに含む、項目 3 6 から 4 9 のいずれか一項に記載のキット。

(項目 5 1)

被験体から循環腫瘍 D N A (c t D N A) を含む試料を得るための指示および / または前記試料、例として、血液、血清、血漿もしくは体液試料もしくはそれらの任意の組み合わせから一本鎖ポリヌクレオチドを得るための指示をさらに含む、項目 5 0 に記載のキット。

(項目 5 2)

A G A T C G G A A G A G C G T C G T G T A G G G A A A G A G T G (配列番号 1) またはその一部、例えば、約 1 8 ~ 2 2 個のヌクレオチド残基を含む一部を含むポリヌクレオチド。

(項目 5 3)

$N_1 \sim N_i$ が、任意の核酸残基、例えば、A、T、C または G であり、 i が、約 4 ~ 約 2 5 の整数である、 $N_1 \dots N_i$ A G A T C G G A A G A G C G T C G T G T A G G G A A A G A G T G またはその一部を含む、項目 5 2 に記載のポリヌクレオチド。

(項目 5 4)

N が、任意の核酸残基、例えば、A、T、C または G である、G A N N N N N N N N N N N N N A G A T C G G A A G A G C G T C G T G T A G G G A A A G A G T G (配列番号 2) またはその一部、例えば、約 32 ~ 36 個のヌクレオチド残基を含む一部を含む、項目 52 または 53 に記載のポリヌクレオチド。

(項目 55)

C A C T C T T T C C C T A C A C G A C G C (配列番号 3) またはその一部、例えば、約 12 ~ 20 個のヌクレオチド残基を含む一部を含むポリヌクレオチド。

(項目 56)

配列番号 4 ~ 1529 からなる群より選択される任意の 1 つもしくは複数の配列またはその数値範囲もしくは部分範囲を含むプライマー。

(項目 57)

配列番号 4 ~ 1529 のうちの任意の 1 つもしくは複数の、例えば、配列番号 4 ~ 1529 のうちの約 10、20、50、100、150、200、250 もしくは 300、400、500、600、700、800、900、1,000、1,100、1,200、1,300、1,400、1,500 もしくは 1529 個すべてもしくはその相補的もしくは実質的に相補的な配列またはその数値範囲もしくは部分範囲を含むプライマー組。

(項目 58)

配列番号 4 ~ 1529 のうちの任意の 1 つもしくは複数の、例えば、配列番号 4 ~ 1529 のうちの約 10、20、50、100、150、200、250 もしくは 300、400、500、600、700、800、900、1,000、1,100、1,200、1,300、1,400、1,500 もしくは 1529 個すべてもしくはその相補的もしくは実質的に相補的な配列またはその数値範囲もしくは部分範囲、および

C A C T C T T T C C C T A C A C G A C G C (配列番号 3) またはその一部を含むプライマー

を含むプライマー組。

(項目 59)

配列番号 4 ~ 1529 のうちの任意の 1 つもしくは複数の、例えば、配列番号 4 ~ 1529 のうちの約 10、20、50、100、150、200、250 もしくは 300、400、500、600、700、800、900、1,000、1,100、1,200、1,300、1,400、1,500 もしくは 1529 個すべてもしくはその相補的もしくは実質的に相補的な配列もしくはその数値範囲もしくは部分範囲、

C A C T C T T T C C C T A C A C G A C G C (配列番号 3) もしくはその一部を含むプライマー、および / または

A G A T C G G A A G A G C G T C G T G T A G G G A A A G A G T G (配列番号 1) もしくはその一部を含むポリヌクレオチド

を含むキット。