(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7618028号
(P7618028)

(45)発行日　令和7年1月20日(2025.1.20)

(24)登録日　令和7年1月9日(2025.1.9)

(51)国際特許分類		FI		
C12N 15/11	*(2006.01)*	C12N	15/11	Z
C12Q 1/686	*(2018.01)*	C12Q	1/686	Z
C12Q 1/6876	*(2018.01)*	C12Q	1/6876	Z ZNA

請求項の数　28　（全112頁）

(21)出願番号　特願2023-521681(P2023-521681)
(86)(22)出願日　令和3年10月7日(2021.10.7)
(65)公表番号　特表2023-545097(P2023-545097A)
(43)公表日　令和5年10月26日(2023.10.26)
(86)国際出願番号　PCT/GB2021/052594
(87)国際公開番号　WO2022/074392
(87)国際公開日　令和4年4月14日(2022.4.14)
審査請求日　令和5年10月30日(2023.10.30)
(31)優先権主張番号　2015943.0
(32)優先日　令和2年10月8日(2020.10.8)
(33)優先権主張国・地域又は機関　英国(GB)
早期審査対象出願
前置審査

(73)特許権者　519340400
インペリアル・カレッジ・イノベーションズ・リミテッド
IMPERIAL COLLEGE INNOVATIONS LIMITED
イギリス、エス・ダブリュ・７ ２・エイ・ゼット ロンドン、エキシビション・ロード、インペリアル・カレッジ内、ファカルティ・ビルディング、レベル・１
(74)代理人　100103894
弁理士　家入 健
(72)発明者　ゲルツ ジョン
イギリス エスダブリュー７ ２エーゼット，ロンドン，エキシビション ロード

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　核酸の増幅に基づく定量化のための方法及び手段

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

試料中の少なくとも第１の標的ポリヌクレオチド及び少なくとも第２の標的ポリヌクレオチドを増幅する方法であって、

ａ）少なくとも前記第１の標的ポリヌクレオチド及び少なくとも前記第２の標的ポリヌクレオチドを潜在的に含む試料、

ｂ）第１の調整された競合ポリヌクレオチド及び第２の調整された競合ポリヌクレオチド、

ｃ）少なくとも第１のプライマーであって、

前記試料中の第１の標的ポリヌクレオチド、及び

前記第１の調整された競合ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができる、少なくとも第１のプライマー、を提供することと、

前記第１及び第２の標的ポリヌクレオチド並びに前記第１の調整された競合ポリヌクレオチド及び前記第２の調整された競合ポリヌクレオチドが増幅されるように、プライマー伸長反応を開始することと、を含み、

増幅が、第１の標的生成物、第２の標的生成物、第１の調整された競合生成物、及び第２の調整された競合生成物をもたらし、

前記第１の標的ポリヌクレオチドの増幅動態が、前記第１の調整された競合ポリヌクレオチドの増幅動態と同じではないか、又は前記第１の調整された競合ポリヌクレオチドの増幅動態と実質的に類似していないように設計され、当該設計は、

ａ）前記第１の標的ポリヌクレオチドの長さと比較して、前記第１の調整された競合ポリヌクレオチドの長さを増加または減少させること；および/または
ｂ）前記第１の標的ポリヌクレオチドのＧＣ含量と比較して、前記第１の調整された競合ポリヌクレオチドのＧＣ含量を増加または減少させることを含む、
方法。
【請求項２】
第２のプライマーを提供することを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
ａ）前記第２のプライマーが、前記第１の標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができ、前記第１及び第２のプライマーが、標的の反対側の鎖上でハイブリダイズして、第１の標的ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）生成物の生成をもたらし、
ｂ）前記第２のプライマーが、前記第１の調整された競合ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができ、前記第１及び第２のプライマーが、前記第１の調整された競合ポリヌクレオチドの反対側の鎖上でハイブリダイズして、第１の調整された競合ＰＣＲ生成物の生成をもたらし、
ｃ）前記第２のプライマーが、
ｉ）前記第１の調整された競合ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができ、前記第１及び第２のプライマーが、前記第１の調整された競合ポリヌクレオチドの反対側の鎖上でハイブリダイズして、第１の調整された競合ＰＣＲ生成物の生成をもたらし、
ｉｉ）前記第２の調整された競合ポリヌクレオチドにハイブリダイズし、プライマー伸長反応を開始することができ、それにより、前記第２の調整された競合ポリヌクレオチドが増幅されて、前記第２の調整された競合生成物の生成をもたらし、更なるプライマーと組み合わせて、前記第２のプライマー及び前記更なるプライマーが、前記第２の調整された競合ポリヌクレオチドの反対側の鎖上でハイブリダイズして、第１の標的ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）生成物の生成をもたらし、かつ／又は
ｄ）前記第２のプライマーが、
ｉ）前記第１の標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができ、前記第１及び第２のプライマーが、前記標的の反対側の鎖上でハイブリダイズして、第１の標的ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）生成物の生成をもたらし、
ｉｉ）前記第１又は第２の調整された競合ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができず、
前記方法が、前記第１及び第２の調整された競合ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができる第３のプライマーを含む、請求項２に記載の方法。
【請求項４】
ａ）　ｉ）増幅される前記第１の標的ポリヌクレオチドの配列及び少なくとも前記第１の調整された競合ポリヌクレオチドの配列、並びに
ｉｉ）増幅される前記第２の標的ポリヌクレオチドの配列及び少なくとも前記第２の調整された競合ポリヌクレオチドの配列が、
１つ以上の状態に対する前記標的の予測的関係に近似又は再現又は一致するような様式で、前記第１の標的ポリヌクレオチド及び前記第２の標的ポリヌクレオチドの初期濃度とともに変化する第１の標的増幅生成物及び第２の標的増幅生成物の最終量をもたらすように選択される、及び／又は、
ｂ）前記第１の標的ポリヌクレオチドの増幅率及び前記第２の標的ポリヌクレオチドの増幅率が、所定の重み付けに一致する、
請求項１～３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５】
前記第１の調整された競合生成物が、
ｉ）前記第１の標的生成物よりも少なくとも５ヌクレオチド短く、又は、前記第１の標的生成物よりも少なくとも１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１１０、１２０、１３

０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、若しくは少なくとも３３０ヌクレオチド短いか、又は

ｉｉ）前記第１の標的生成物よりも少なくとも５ヌクレオチド長く、又は、前記第１の標的生成物よりも少なくとも１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、若しくは少なくとも３３０ヌクレオチド長く、及び／又は

前記第２の調整された競合生成物が、

ｉ）前記第２の標的生成物よりも少なくとも５ヌクレオチド短く、又は、前記第２の標的生成物よりも少なくとも１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、若しくは少なくとも３３０ヌクレオチド短いか、又は

ｉｉ）前記第２の標的生成物よりも少なくとも５ヌクレオチド長く、又は、前記第２の標的生成物よりも少なくとも１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、若しくは少なくとも３３０ヌクレオチド長く、及び／又は、

増幅される第１の標的ポリヌクレオチド部分及び増幅される第１の競合ポリヌクレオチドのＧＣ含有量の差は、少なくとも１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、又は少なくとも９０％若しくは９５％である、請求項１～４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６】

前記第１の標的増幅生成物、前記第２の標的増幅生成物、前記第１の調整された競合増幅生成物、及び前記第２の調整された競合増幅生成物が検出される、請求項１～５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項７】

前記方法が、１つ以上のプローブ群を提供することを含み、各プローブ群が、第１の標識で標識された少なくとも１つのプローブポリヌクレオチド及び第２の標識で標識された少なくとも１つのプローブポリヌクレオチドを含み、

前記第１の標識と前記第２の標識とが異なる、請求項１～６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項８】

ａ）前記第１の標識で標識された前記少なくとも１つのプローブが、前記第１の標的生成物にハイブリダイズすることができ、第２の標識で標識された前記少なくとも１つのプローブが、前記第１の調整された競合生成物にハイブリダイズすることができ、

ｂ）前記第１の標識で標識された前記少なくとも１つのプローブが、前記第１の調整された競合生成物にハイブリダイズすることができ、前記第２の標識で標識された前記少なくとも１つのプローブが、前記第２の調整された競合生成物にハイブリダイズすることができる、請求項７に記載の方法。

【請求項９】

いずれのプローブも、前記第１の標的生成物にハイブリダイズすることができない、請求項８に記載の方法。

【請求項１０】

前記第１及び第２の標識が、フルオロフォアである、請求項７～９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１】
各プローブが、クエンチャーを含み、かつ／又は
前記第１の標識がＦＡＭであり、前記第２の標識がＨＥＸであるか、若しくは前記第１の標識がＨＥＸであり、前記第２の標識がＦＡＭである、請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】
ａ）単一のプローブ群内に、
前記第１の標識で各々標識された少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、若しくは少なくとも１００個の異なるプローブ、かつ／又は
前記第２の標識で各々標識された少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、若しくは少なくとも１００個の異なるプローブが存在し、
ｂ）前記方法が、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、又は少なくとも１００個の異なるプローブ群を提供することを含み、
特定の標識が、２つ以上のプローブ群で使用されない、請求項７～１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３】
前記プローブ上に存在する標識が、前記第１の標識及び前記第２の標識のみである、請求項７～１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４】
特定の状態の正の予測的関係に関連する標的ポリヌクレオチド生成物にハイブリダイズすることができる各プローブが、前記第１の標識で標識され、前記調整された競合ポリヌクレオチド生成物にハイブリダイズすることができる対応するプローブが、前記第２の標識で標識され、
かつ／又は
前記特定の状態の負の予測的関係に関連する標的ポリヌクレオチド生成物にハイブリダイズすることができる各プローブが、前記第２の標識で標識され、前記調整された競合ポリヌクレオチド生成物にハイブリダイズすることができる対応するプローブが、前記第１の標識で標識される、請求項７～１３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１５】
前記方法が、使用される全てのフルオロフォアの単一の読み取りを行うことによって、全ての増幅生成物の相対存在量を検出することを含む、請求項７～１４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６】
前記方法が、少なくとも３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、又は少なくとも１００個の標的ポリヌクレオチドの増幅のためのものである、請求項１～１５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１７】
試料中の少なくとも２つのオリゴヌクレオチドの相対存在量又は少なくとも２つの変異の存在若しくは不在によって提供される差次的遺伝子調節シグネチャを、単一の値に変換し、
前記方法が、請求項１～１６のいずれか一項に記載の試料中の少なくとも第１の標的ポリヌクレオチド及び少なくとも第２の標的ポリヌクレオチドを増幅する方法を含み、前記

方法が、第１のフルオロフォアを含む第１のプローブと第２のフルオロフォアを含む第２のプローブとの使用を含み、前記方法が、前記第１のフルオロフォアと前記第２のフルオロフォアとの間におけるシグナル強度の差を測定するステップを含む、
方法。
【請求項１８】
サンプル中の少なくとも第１の標的ポリヌクレオチドと少なくとも第２の標的ポリヌクレオチドの増幅結果に基づいて、サンプルが特定の状態にある相対確率を決定する方法であって、対象から提供されたサンプルに対して請求項１～１７のいずれか一項に記載の方法を実行することを含む、方法。
【請求項１９】
前記特定の状態は、
ａ）特定の疾患若しくは状態である、
ｂ）特定の疾患若しくは状態でない、又は、
ｃ）他の疾患又は状態である、
から選択される、請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
前記疾患又は状態が、ヒト結核、ＨＩＶ同時感染を伴うヒト結核、ＨＩＶ同時感染を伴わないヒト結核、がん、から選択される、請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
前記がんは、前立腺がん又は乳がん、敗血症、カンジダ血症、ウシ結核、ウシ乳房炎から選択される、請求項２０に記載の方法。
【請求項２２】
前記疾患が、結核である、請求項１９に記載の方法。
【請求項２３】
前記差次的遺伝子調節シグネチャが、前記対象の白血球から特定される、請求項１７～２２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２４】
ＧＢＰ６、ＡＲＧ１、及びＴＭＣＣ１の差次的調節の程度が、いくつかの「他の疾患」を有するのと比較して、結核を有する全体的な確率に寄与する、請求項２２に記載の方法。
【請求項２５】
前記遺伝子発現シグネチャが、結核を有しない患者におけるこれらの遺伝子のレベルと比較して、ＧＢＰ６の上方調節、並びにＡＲＧ１及びＴＭＣＣ１の下方調節である、請求項２４に記載の方法。
【請求項２６】
請求項１～２５のいずれか一項に記載の方法を実施するためのキットであって、前記キットが、少なくとも２つの調整された競合ポリヌクレオチド、又は少なくとも３，４，５，６，７，８，９，又は少なくとも１０の異なる調整された競合ポリヌクレオチドを含み、
前記少なくとも２つの調整された競合ポリヌクレオチド、または前記少なくとも３、４、５、６、７、８、９、または少なくとも１０の異なる調整された競合ポリヌクレオチドのうちの少なくとも２つの調整された競合ポリヌクレオチドは、対応する第１の標的ポリヌクレオチドおよび第２の標的ポリヌクレオチドの増幅動態と同じではない、または前記第１の標的ポリヌクレオチドまたは前記第２の標的ポリヌクレオチドの増幅動態と実質的に類似していない増幅動態を有するように設計され、
前記設計は、
ａ）前記第１の調整された競合ポリヌクレオチドの長さを前記第１の標的ポリヌクレオチドの長さに対して増加または減少させること、および／または、
ｂ）前記第１の調整された競合ポリヌクレオチドのＧＣ含有量を前記第１の標的ポリヌクレオチドのＧＣ含有量に対して増加または減少させること、を含む、
キット。
【請求項２７】

試料中の少なくとも２つの標的ポリヌクレオチドの同時競合増幅の方法であって、
ａ）ポリヌクレオチドを含む試料、
ｂ）第１及び第２の調整された競合ポリヌクレオチド、
ｃ）第１のプライマーセットであって、前記プライマーセットが、第１の標的ポリヌクレオチド及び前記第１の競合ポリヌクレオチドの反対側の鎖上でハイブリダイズすることができて、第１の標的増幅生成物及び第１の競合増幅生成物の生成を可能にする２つのプライマーを含む、第１のプライマーセット、
ｄ）第２のプライマーセットであって、前記プライマーセットが、第２の標的ポリヌクレオチド及び前記第２の競合ポリヌクレオチドの反対側の鎖上でハイブリダイズすることができて、第２の標的生成物及び第２の競合生成物の生成を可能にする２つのプライマーを含む、第２のプライマーセット、
ｅ）第１のプローブ群であって、前記第１のプローブ群が、前記第１の標的増幅生成物にハイブリダイズすることができる第１の標識標的プローブ及び前記第１の競合増幅生成物にハイブリダイズすることができる第１の標識競合プローブを含む、第１のプローブ群、
ｆ）第２のプローブ群であって、前記第２のプローブ群が、前記第２の標的増幅生成物にハイブリダイズすることができる第２の標識標的プローブ及び前記第２の競合増幅生成物にハイブリダイズすることができる第２の標識競合プローブを含む、第２のプローブ群、を提供することであって、
ｉ）前記第１の標識標的プローブ及び前記第２の標的標識プローブが、同じ第１の標識で標識され、かつ前記第１の標識競合プローブ及び前記第２の標識競合プローブが、同じ第２の標識で標識されるか、又は
ｉｉ）前記第１の標識標的プローブ及び前記第２の標識競合プローブが、同じ第１の標識で標識され、かつ前記第１の標識競合プローブ及び前記第２の標識標的プローブが、同じ第２の標識で標識される、提供することと、
前記第１及び第２のプライマーセットが標的及び競合ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることを可能にすることと、を含み、
前記第１の標的ポリヌクレオチドの増幅動態が、前記第１の調整された競合ポリヌクレオチドの増幅動態と同じではないか、又は前記第１の調整された競合ポリヌクレオチドの増幅動態と実質的に類似していないように設計され、当該設計は、
ａ）前記第１の標的ポリヌクレオチドの長さと比較して、前記第１の調整された競合ポリヌクレオチドの長さを増加または減少させること； および/または
ｂ）前記第１の標的ポリヌクレオチドのＧＣ含量と比較して、前記第１の調整された競合ポリヌクレオチドのＧＣ含量を増加または減少させることを含む。
【請求項２８】
多重増幅後、前記第１の標識及び前記第２の標識の量を同時に検出することを更に含む、請求項２７に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【背景技術】
【０００１】
生物学的システムは信じられないほど複雑であり、主に多数の遺伝子の発現レベルの変動によって支配されている。そのような差次的発現（ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｌ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ）は、これらの細胞が他の細胞と相互作用し、私たちの世界に反応する方法を反映している。特定の時点又は特定の環境状況における全ての遺伝子の発現レベルは、特定の「状態」を表すことができる。遺伝子発現レベルは非常に急速に変化する場合があり、したがって、特定の生物学的システム（例えば、細胞又は組織又は器官）の「状態」も変化する場合がある。特定の生物学的システムが予想される／所望されるように挙動しているかどうかを知ることが重要であるため、特定の点における「状態」（すなわち、いくつかの遺伝子の相対発現）を決定することは、診断、予後、及び例えば産業バイオテクノロジーにおいて明確な有用性を有する。
【０００２】

遺伝子は、単独ではなく、複雑なネットワークの一部として機能する。非常に多くの相互作用する遺伝子及び別々の遺伝子ネットワークがあるため、細胞などの生物学的システムの状態を完全に決定することは、それ自体非常に複雑である。現在では、生物学的システム内の全ての遺伝子の発現レベルを、例えば、ＲＮＡ－ｓｅｑを介して、比較的日常的に分析することが可能であるが、これは、特に、遺伝子のサブセットのみが、生物学的システムが特定の状態にあるか、又は異なる特定の状態にあるか、又は特定の活性（例えば、高タンパク質産生状態）を示すかを予測又は分類するのに関連している可能性が高いため、配列決定及びその後のバイオインフォマティクスの両方の観点から、費用的にも時間的にも効果的ではない。そのような複雑な関係を決定するには、単純な代数的閾値ではなく、パターン認識が必要である。

【０００３】

特定の遺伝子ネットワークを比較的個別の単位に近似することができるという前提は、現代の診断の多くの基礎をなし、全トランスクリプトームの小さな（又は比較的小さな）サブセットからの情報を利用する予測的関係又は差次的遺伝子調節シグネチャが特定されると、各試験試料のトランスクリプトーム全体の評価は、試料を特定の状態にあるかどうかとして診断するために必要ではない。例えば、遺伝子発現データ（例えば、トランスクリプトームデータ）が、２つ以上の異なるタイプの試料から得られ、かつ機械学習を含むバイオインフォマティクスを使用して、２つの試料タイプ間で過少発現又は過剰発現されている遺伝子／ｍＲＮＡの特定のサブセットを特定するために分析された多数の事例が存在する。そのような診断的又は予測的な発現パターンの特定は、例えば、がん診断、がん予後、結核及び敗血症の診断、並びにウシ結核及び乳房炎の診断などの獣医学的使用、及び療法に対する応答の予測において使用されてきた。

【０００４】

所与の遺伝子セットの相対的な遺伝子発現に基づく、同じタイプの診断及び予測的関係、決定面、又は差次的遺伝子調節シグネチャを、細胞工学及び組織工学において使用することができる。例えば、多くの場合、「再生医療」の目的は、幹細胞を特定の最終細胞型に分化させるように誘導すること、又は分化細胞の活性をあるタスク又は別のタスクにシフトさせることである。遺伝子発現プロファイリング、具体的には「分子時間」の考え方により、「細胞がどれくらい分化しているのか？」「細胞がどれくらい極性化しているのか？」を決定することが可能である。加えて、合成生物学の分野は、特有の課題を提示している。高度に操作された遺伝子経路を有する細胞集団、又はそのような集団が所与のタスクに協力している場合、バイオプロセス工学は、システムが設計されたとおりに挙動しているかどうかを決定する手段を必要とする。

【０００５】

最も単純な例では、そのような予測的関係、決定面、又は差次的遺伝子調節シグネチャは、単一の遺伝子からの発現の存在又は不在の評価を含むことができる。例えば、試料中の遺伝子Ａ由来のｍＲＮＡの存在は、試料が状態Ａにある（例えば、「疾患Ａを有する」）ことを予測し、遺伝子Ａ由来のｍＲＮＡの不在は、試料が状態Ｂにある（例えば、「疾患Ａを有しない」、すなわち、異なる疾患を有する又は疾患を有しない）ことを予測する。

【０００６】

しかしながら、ほとんどの疾患状態又は様々な化合物の生体産生に関連し得る特定の調節状態（例えば、品質管理のためにエンジニアによって定義された許容範囲（ｔｏｌｅｒａｎｃｅ　ｗｉｎｄｏｗ）内で遺伝子調節が生じる状態）などの他の状態は、より多くの遺伝子からの発現データを使用してのみ正確に予測又は診断することができる。より多くの数の遺伝子からの発現データの評価のための要件は、予測的関係又は差次的遺伝子調節シグネチャが決定された後でさえ（例えば、特定の状態を予測するために使用することができるそれらの「マーカー」を特定するためのより大きなセットの発現データの分析から）、診断／予測発現データを分析し、予測／診断を形成するために、専用の機器及び熟練した生物情報学者が必要であることを意味する。例えば、いくつかの遺伝子の発現レベルを決定するために、マイクロアレイ、ＲＮＡ－ｓｅｑ、Ｎａｎｏｓｔｒｉｎｇなどの技術

を使用するには、例えば、一連の標識を有する一連のプローブを使用する必要があり、それぞれが別個の決定を必要とする。したがって、特定の状態の診断／予測を決定する現在の方法は、試料調製後及び実際の発現データの取得後の広範なデータ処理及び統計を必要とし、例えば、ポイントオブケア診断状況には好適ではない。

【０００７】

エンドユーザが、典型的には、２つ以上の特定の状態（例えば、「疾患を有する」又は「疾患を有しない」）のうちの１つを直接的に予測する、かつ統計学者又は複雑な機器からの入力を必要としない、１つ又は少数の出力を与える単純なアッセイを行うことができるように、予測的関係又は差次的遺伝子調節シグネチャの使用及び出力を単純化することが有益であろう。

【０００８】

本発明は、生物学的データから生成された予測的関係又は差次的遺伝子調節シグネチャを使用する先行技術の方法で、少なくとも上述の問題を解決する。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００９】

本発明の発明者らは、所定の予測的関係、決定面、又は差次的標的オリゴヌクレオチドパターン（遺伝子発現パターンと特定の状態との間の遺伝子調節シグネチャなど）を有用な診断又は予測結果に変換する複雑さを大幅に低減するために使用することができる方法及び構成要素を開発した。

【課題を解決するための手段】

【００１０】

本明細書に記載の方法は、アッセイ自体の分子を使用して、例えば、医療診断において日常的に得られる標準的な標的オリゴヌクレオチドパターン（例えば、発現データ）を分析するために現在使用されている複雑な数学及び人工知能を反映する。

【００１１】

開示された方法は、特に専門的な計装を必要とせず、使用が容易であり、試料調製が標準的である。必要な構成要素が日常的な手順によって最適化されると、実際には、例えば、診断／予後における方法を実践することは非常に単純であり、いくつかの実施形態では、単純な多重ＰＣＲ増幅反応及び２つのフルオロフォアの読み取りを必要とする。これは、例えば、複数のフルオロフォアを使用していくつかのＲＮＡ種を増幅し、各フルオロフォアの量を決定し、その後、それらのデータを、各ＲＮＡ種の相対レベルを比較してその「状態」を決定する複雑なバイオインフォマティクスシステムに供給することを必要とする本方法とは対照的である。例えば、予測的関係、決定面、又は差次的標的オリゴヌクレオチドパターン（差次的遺伝子調節シグネチャなど）が１０個の遺伝子の相対発現に基づいている場合、現在は、同じフルオロフォアを使用することができるように各遺伝子の発現レベルを別々に決定する必要があるか、又は増幅方法を多重化することができるように１０個の異なるフルオロフォアを使用する必要がある。したがって、いずれの場合も、少なくとも１０個の異なる読み取り値が必要である。本発明の重要な利点は、場合によっては、単一のチューブで２つの異なるフルオロフォア（又は使用される全てのフルオロフォア）の単一の読み取りまで、読み取りの数を減少させることである。

【００１２】

本発明の方法によって生成された結果は、得るのが容易であり、明確であり、研究室の研究者、発酵の専門家、及びベッドサイドの臨床医によって解釈することができる。

【００１３】

本方法は、典型的には、核酸増幅を中心としており、当業者は、これが非常に日常的であり、最小限の機器で実施することができることを理解するであろう。

【００１４】

加えて、先行技術の方法の多くは、複雑なネットワーク及び予測的関係、決定面、又は標的オリゴヌクレオチドパターン（差次的遺伝子調節シグネチャなど）を、単純な線形関

係（すなわち、例えば、ある遺伝子からのより多い発現が特定の状態を予測し、異なる遺伝子のより多い発現が異なる状態を予測する単純な線形関係）に還元する。このような還元主義的アプローチは、生物学的システムを正確に反映するものではなく、例えば、ＡＩを使用することによって特定及び生成され得る予測的関係又は差次的遺伝子調節シグネチャを適切に捕捉及び反映するものではない。

【００１５】

例えば、ＡＩシステムは、遺伝子Ａの発現が１０の任意の発現閾値を上回り、遺伝子Ｂの発現が５の閾値を下回り、遺伝子Ｃの発現が７の閾値を上回る場合、試料が特定の状態（例えば、状態Ａ）にあると決定し、一方、遺伝子Ａの発現が１０の閾値を上回り、遺伝子Ｂの発現が１０の閾値を上回り、Ｃの発現が７の閾値を下回る場合、試料が異なる特定の状態（状態Ｂ）にあると決定することができる。

【００１６】

より多くの異なる「状態」が、単に３つの遺伝子の発現レベルに基づいて決定及び予測されることは明らかであろう。これらの異なる状態が臨床的に有用であるか、バイオテクノロジー的に有用であるかは、ＡＩシステムが訓練されている試料によって決定される。いずれにせよ、１０の閾値を上回る遺伝子Ａの発現（すなわち、遺伝子Ａの「より多い」発現）は、単一の状態を反映するだけではないことがわかる。重要なのは、特定のネットワークにおける、又は予測ネットワークの一部であると特定された各遺伝子の相対的な発現レベルである。

【００１７】

本発明の方法は、この複雑な相互依存関係を捕捉し、それを単一の出力に凝縮して、試料が状態Ａ又は状態Ｂにあるか若しくはそうである可能性があるか、又は例えば、状態Ｂ若しくは状態Ｃではなく、状態Ａであるかをユーザに伝えることができる。

【００１８】

本発明の方法は、競合増幅ネットワーク（Ｃｏｍｐｅｔｉｔｉｖｅ Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｎｅｔｗｏｒｋ）（ＣＡＮ）と呼ぶことができる。本方法は、ＰＣＲなどのＲＮＡ／ＤＮＡ増幅技術を、複雑な遺伝子発現パターンの認識に適合させる。名前が意味するように、反応は、所与の遺伝子転写産物又は転写産物のセットによって提供される情報を状態Ａ対状態Ｂの相対確率に変換する競合的相互作用によって設計される。フルオロフォア標識プローブを利用するいくつかの実施形態では、これらの確率が組み合わされて、２つの色によって表される全体的な診断を提供する。解釈は、どの色がより明るいかを確認するのと同じくらい簡単である。ネットワークは、コストや操作の複雑さを大幅に増加させることなく、多数の遺伝子を包含するように拡張可能である。最後に、これらのネットワークは、複数の標的に対して同時に複雑な非線形演算を実行するように設計することができる。この技術は、疾患診断、治療モニタリング、再生医療研究、及びバイオプロセス製造の品質管理のためのアプリケーション固有のキットを設計するためのプラットフォームを提供する。

【発明を実施するための形態】

【００１９】

したがって、本発明は、少なくとも２つのオリゴヌクレオチドの相対存在量（又は存在若しくは不在）、例えば、少なくとも２つの遺伝子の相対発現、又は少なくとも２つの変異の存在若しくは不在を、特定の状態の相対確率、例えば、状態Ａ対状態Ｂの相対確率に変換する方法を提供する。

【００２０】

本発明はまた、少なくとも２つのオリゴヌクレオチドの相対存在量、例えば、少なくとも２つの遺伝子の相対発現、又は少なくとも２つの変異の存在若しくは不在を、単一の値に組み合わせる方法も提供する。

【００２１】

本発明はまた、

試料中の少なくとも２つのオリゴヌクレオチドの相対存在量、例えば、少なくとも２つ

の遺伝子の相対発現、又は少なくとも２つの変異の存在若しくは不在を、特定の状態の相対確率に変換する方法。

２つのフルオロフォア標識プローブのみを使用して、試料中の少なくとも３つのオリゴヌクレオチドの相対存在量、例えば、少なくとも３つの遺伝子の相対発現、又は少なくとも３つの変異の存在若しくは不在を検出する方法。

試料中の少なくとも２つのオリゴヌクレオチドの相対存在量、例えば、少なくとも２つの遺伝子の相対発現、又は少なくとも２つの変異の存在若しくは不在を、単一の値に組み合わせる方法。

試料中の少なくとも２つのオリゴヌクレオチドの相対存在量又は少なくとも２つの変異の存在若しくは不在によって提供される予測的関係、決定面、又は差次的標的オリゴヌクレオチドパターン（例えば、差次的遺伝子調節シグネチャ）を、単一の値に変換する方法。

競合増幅ネットワークを用いて、統計情報を模倣する方法、を提供する。

【００２２】

「特定の状態の確率」及び「予測的関係」、「決定面」、又は「差次的標的オリゴヌクレオチドパターン」若しくは「差次的遺伝子調節シグネチャ」、及び「統計情報」に到達することは、当業者の手段の範囲内である。そのような情報は、典型的には、例えば、マイクロアレイデータ又はＲＮＡｓｅｑデータ、続いて、例えば、状態Ａ対状態Ｂの確率を予測するために使用することができる２つ以上のマーカー間の関係を生成するバイオインフォマティクスから得られる。そのような予測パネルの多くの例が存在する。例えば、（１）Ｗａｒｓｉｎｓｋｅ，Ｈ．；Ｖａｓｈｉｓｈｔ，Ｒ．；Ｋｈａｔｒｉ，Ｐ．Ｈｏｓｔ－Ｒｅｓｐｏｎｓｅ－Ｂａｓｅｄ Ｇｅｎｅ Ｓｉｇｎａｔｕｒｅｓ ｆｏｒ Ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ Ｄｉａｇｎｏｓｉｓ：Ａ Ｓｙｓｔｅｍａｔｉｃ Ｃｏｍｐａｒｉｓｏｎ ｏｆ １６ Ｓｉｇｎａｔｕｒｅｓ．ＰＬＯＳ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ ２０１９，１６（４），ｅ１００２７８６．ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１３７１／ｊｏｕｒｎａｌ．ｐｍｅｄ．１００２７８６。

【００２３】

（２）Ｓｗｅｅｎｅｙ，Ｔ．Ｅ．；Ｗｏｎｇ，Ｈ．Ｒ．；Ｋｈａｔｒｉ，Ｐ．Ｒｏｂｕｓｔ Ｃｌａｓｓｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ Ｂａｃｔｅｒｉａｌ ａｎｄ Ｖｉｒａｌ Ｉｎｆｅｃｔｉｏｎｓ ｖｉａ Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ Ｈｏｓｔ Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ．Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎａｌ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ ２０１６，８（３４６），３４６ｒａ９１－３４６ｒａ９１．ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１１２６／ｓｃｉｔｒａｎｓｌｍｅｄ．ａａｆ７１６５、（３）Ｃａｒｄｏｓｏ，Ｆ．；ｖａｎ’ｔ Ｖｅｅｒ，Ｌ．Ｊ．；Ｂｏｇａｅｒｔｓ，Ｊ．；Ｓｌａｅｔｓ，Ｌ．；Ｖｉａｌｅ，Ｇ．；Ｄｅｌａｌｏｇｅ，Ｓ．；Ｐｉｅｒｇａ，Ｊ．－Ｙ．；Ｂｒａｉｎ，Ｅ．；Ｃａｕｓｅｒｅｔ，Ｓ．；ＤｅＬｏｒｅｎｚｉ，Ｍ．；Ｇｌａｓ，Ａ．Ｍ．；Ｇｏｌｆｉｎｏｐｏｕｌｏｓ，Ｖ．；Ｇｏｕｌｉｏｔｉ，Ｔ．；Ｋｎｏｘ，Ｓ．；Ｍａｔｏｓ，Ｅ．；Ｍｅｕｌｅｍａｎｓ，Ｂ．；Ｎｅｉｊｅｎｈｕｉｓ，Ｐ．Ａ．；Ｎｉｔｚ，Ｕ．；Ｐａｓｓａｌａｃｑｕａ，Ｒ．；Ｒａｖｄｉｎ，Ｐ．；Ｒｕｂｉｏ，Ｉ．Ｔ．；Ｓａｇｈａｔｃｈｉａｎ，Ｍ．；Ｓｍｉｌｄｅ，Ｔ．Ｊ．；Ｓｏｔｉｒｉｏｕ，Ｃ．；Ｓｔｏｒｋ，Ｌ．；Ｓｔｒａｅｈｌｅ，Ｃ．；Ｔｈｏｍａｓ，Ｇ．；Ｔｈｏｍｐｓｏｎ，Ａ．Ｍ．；ｖａｎ ｄｅｒ Ｈｏｅｖｅｎ，Ｊ．Ｍ．；Ｖｕｙｌｓｔｅｋｅ，Ｐ．；Ｂｅｒｎａｒｄｓ，Ｒ．；Ｔｒｙｆｏｎｉｄｉｓ，Ｋ．；Ｒｕｔｇｅｒｓ，Ｅ．；Ｐｉｃｃａｒｔ，Ｍ．７０－Ｇｅｎｅ Ｓｉｇｎａｔｕｒｅ ａｓ ａｎ Ａｉｄ ｔｏ Ｔｒｅａｔｍｅｎｔ Ｄｅｃｉｓｉｏｎｓ ｉｎ Ｅａｒｌｙ－Ｓｔａｇｅ Ｂｒｅａｓｔ Ｃａｎｃｅｒ．Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ ２０１６，３７５（８），７１７－７２９．ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０５６／ＮＥＪＭｏａ１６０２２５３、（４）Ｚａａｓ，Ａ．Ｋ．；Ａｚｉｚ，Ｈ．；Ｌｕｃａｓ，Ｊ．；Ｐｅｒｆｅｃｔ，Ｊ．Ｒ．；Ｇｉｎｓｂｕｒｇ，Ｇ．Ｓ．Ｂｌｏｏｄ Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｓｉｇｎａｔｕｒｅｓ Ｐｒｅｄｉｃｔ Ｉｎｖａｓｉｖｅ Ｃａｎｄｉｄｉａｓｉｓ．Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎａｌ Ｍｅｄｉｃｉｎ

ｅ ２０１０，２（２１），２１ｒａ１７－２１ｒａ１７．ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１１２６／ｓｃｉｔｒａｎｓｌｍｅｄ．３０００７１５を参照されたい。

【００２４】

予測的関係によって、各入力次元が特定の標的配列の濃度を表し、各出力次元が異なるクラスを表す「決定面」として視覚化することができる任意の統計分類技術の意味を含む。例えば、入力ドメインは２つの遺伝子で構成され、出力ドメインは健康及び病気の２つのクラスで構成され得る。次いで、「決定面」は、二次元の表面であり、患者の２つの遺伝子がそれらのそれぞれのレベルで発現している場合、所与の点が、２つの遺伝子転写産物の濃度を表し、その点における表面の高さが、病気である確率に対応する。別の例では、入力ドメインは、手術後の前立腺がん患者の循環腫瘍ＤＮＡ（ｃｔＤＮＡ）で観察される１０の異なる変異からなり得、出力ドメインは、再発なし、軽度の再発、及び侵襲性の再発の３つのカテゴリで構成され得、その各々は、医師に異なる行動方針を推奨する。この場合の決定面は（多かれ少なかれ）十次元立方体であり、各点は、変異濃度の特定の組み合わせを３つのカテゴリの相対確率に変換し、おそらく画像の赤色、緑色、及び青色の成分の相対強度として色で視覚化する。

【００２５】

十次元の三色立方体を視覚化することは困難であるが、そのような表現に到達することは、生物統計学者、生物情報学者、数学者、統計学者、又はデータ科学者にとって日常的であろう。専門家は、多くの個体（各個体は異なるカテゴリ（例えば、健康／病気、又は再発なし／軽度の再発／侵襲性の再発）に属することが知られている）からの様々な遺伝子の発現又は手術後のｃｔＤＮＡの変異プロファイルなど、多くの潜在的な標的の測定された濃度を含むデータセットから始めるであろう。次いで、専門家は、ロジスティック回帰、ガウス過程分類、人工ニューラルネットワーク分類、決定木、ランダムフォレスト、ナイーブベイズ、サポートベクトルマシン、又は最近傍を含むがこれらに限定されない、いくつかの分類アルゴリズムのうちのいずれかを適用して決定面に到達するであろう。

【００２６】

代替的に、決定面は、より手動的で原則的な方法で構築され得る。例えば、バイオプロダクションエンジニアは、その操作された生物又は生物の集団によって発現されるいくつかの遺伝子の各々について、最適な発現レベル及びそれぞれの耐性を知ることができる。品質管理及びプロセスモニタリングの目的のために、エンジニアは、これらの遺伝子のうちのいずれかがその許容範囲外にあるかどうかを知りたいかもしれない。この例では、決定面は、出力ドメインで－１から＋１まで延在する多次元ガウス分布として表すことができる。上記のように、各次元は、特定の遺伝子転写産物の濃度を表し、その次元に沿った周辺ガウス分布は、その遺伝子の理想濃度での平均（ピーク）を有し、その標準偏差（幅）は、それぞれの許容範囲に対応する。そのような決定面の競合増幅ネットワークの実装は、全ての転写産物がその理想であるか又はその理想に近い場合、１つの蛍光色を示し、任意の転写産物がその許容範囲をはるかに超えている場合、別の蛍光色を示す。

【００２７】

別のそのような原則的な決定面は、術後の前立腺がん患者の再発の早期徴候を監視する目的で循環腫瘍ＤＮＡの個別化された監視から生じ得る（Ｃｏｏｍｂｅｓ ｅｔ ａｌ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ２０１９ ２５：ＤＯＩ：１０．１１５８／１０７８－０４３２．ＣＣＲ－１８－３６６３）。標的の目的の変異は、腫瘍のゲノムを患者の健康な組織のゲノムと比較することによって、手術時に特定される。次いで、専門家は閾値濃度を選択することで、この閾値を超えるｃｔＤＮＡにおける変異のいずれかが観察された場合、専門家はがんが再発したと結論付けるであろう。この場合の所与の変異の周辺決定面は、０（変異がない場合）から＋１（その閾値濃度での）への移行からなるであろう。

【００２８】

決定面、又は目的の標的と分類との間の確率的関係を得た後、専門家は、この関係を近似する競合増幅ネットワークを設計する。所与のシグナル（ＦＡＭなどのフルオロフォア

色、又はラテラルフローストリップ上のバンド強度）は、出力の正の方向に対応するように任意に指定され、第２のシグナル（ＨＥＸなど）は負の方向として指定される。したがって、これら２つの色の強度の差は、決定面の「高さ」に対応する。代替的に、出力ドメインが２つ以上のカテゴリで構成される場合、それらの間の特定の対の差が異なる出力カテゴリの確率に対応するように、適切な数のシグナルを選択することができる。

【００２９】

決定面の出力ドメインを様々なシグナルの相対強度に変換した後、専門家はネットワークのアーキテクチャを選択するであろう。このアーキテクチャは、いくつの合成競合を含めるべきか、いくつのプライマーを含めるべきか、どのオリゴヌクレオチド鎖がどのプライマーを共有するか、及びどの鎖がどのプローブによって標的化されるかを決定することからなる。次いで、各アーキテクチャについて、システム中の各オリゴに対して増幅パラメータの多数の組み合わせが存在する。アーキテクチャとパラメータ値との間の選択は、多数の異なるパラメータ値（「競合増幅のシミュレーション」のセクションを参照）で、それぞれ多数の異なるアーキテクチャによって生成された表面をシミュレートして、所定の決定面に似たパラメータ値のアーキテクチャ及び組み合わせを特定することによって行われる。この最適化タスクを実行する技術分野には、アーキテクチャ間の選択のための進化的アルゴリズム法及びシミュレーテッド・アニーリング法、並びに理想的なパラメータの組み合わせを特定するための勾配降下法、確率的勾配降下法、又は準ニュートン法を含む多くの方法が知られている。最後に、専門家は、ここで特定されたパラメータを示し、選択されたアーキテクチャに従ってプライマーを共有する標的及び合成競合オリゴヌクレオチドを設計する（「競合増幅挙動の試験及び予測」のセクションを参照）。更なる説明が、以下の実施例に提供される。

【００３０】

これらの方法の各々は、第１の状態を示す各生成物の量を累積的に定量化することができ、第２の状態を示す各生成物を累積的に定量化することができるように、１つ以上の標的ポリヌクレオチドの増幅を伴う。これらの２つの読み取りを組み合わせると、試料が第１の状態にある可能性が高いか又は第２の状態にある可能性が高いかを示す単一の全体的な読み取り（すなわち、調査中の遺伝子の数にかかわらず、例えば、緑色の総強度とオレンジ色の総強度との差）は、システム全体からの情報を統合する。例えば、一実施形態では、第１の状態に関連する全ての生成物は、第１のフルオロフォアで標識され、第２の状態で標識された全ての生成物は、第２のフルオロフォアで標識される。全体的な予測的関係又は差次的遺伝子調節シグネチャへの各生成物の相対的な寄与が考慮される場合、各状態の累積定量化を合計すると、正確かつ予測的な値が生成される。本発明の競合ポリヌクレオチド及び本明細書に記載の方法で使用されるポリヌクレオチドは、この予測的関係又は差次的遺伝子調節シグネチャを反映するように設計、設計、又は調整される。

【００３１】

したがって、本発明は、

試料中の少なくとも２つのオリゴヌクレオチドの相対存在量（例えば、少なくとも２つの遺伝子の相対発現）又は少なくとも２つの変異の存在若しくは不在を、特定の状態の相対確率に変換する方法、

２つのフルオロフォア標識プローブのみを使用して、試料中の少なくとも３つのオリゴヌクレオチドの相対存在量（例えば、少なくとも３つの遺伝子の相対発現）又は少なくとも３つの変異の存在若しくは不在を検出する方法、

試料中の少なくとも２つのオリゴヌクレオチドの相対存在量（例えば、少なくとも２つの遺伝子の相対発現）又は少なくとも２つの変異の存在若しくは不在を、単一の値に組み合わせる方法、

試料中の少なくとも２つのオリゴヌクレオチドの相対存在量又は少なくとも２つの変異の存在若しくは不在によって提供される予測的関係、決定面、又は差次的標的オリゴヌクレオチドパターン（例えば、差次的遺伝子調節シグネチャ）を、単一の値に変換する方法、

競合増幅ネットワークを用いて、統計情報を模倣する方法、

及び
　試料中の複雑な遺伝子発現パターンを、単一の値に低減する方法、を提供し、
本方法は、試料中の１つ以上の標的ポリヌクレオチドを増幅するステップを含む。
【００３２】
　本明細書に記載されるように、試料中の１つ以上の標的ポリヌクレオチドを増幅する方法は、本発明によってそれ自体が提供される。
【００３３】
　理論的には、溶液中の全ての標的分子は、これらのプライマーが使い果たされるまで、サイクルごとに複製されるべきであるが、重要なことに、ＣＡＮ設計原理（すなわち、本明細書に開示される方法）は、完全な倍加を実際に達成することが困難である。それは、単一の出力が発現レベルの複雑なネットワークを反映することを可能にする適切な特徴を含む調整された競合ポリヌクレオチドである。
【００３４】
　ＧＣ含有量などの標的配列の特徴は、各サイクルで複製される分子の割合に影響を及ぼし、これらの特徴が、本明細書で使用される競合ポリヌクレオチドに意図的に組み込まれることで、標的ポリヌクレオチドが、適切な効率で増幅され、全体的な予測的関係又は差次的遺伝子調節シグネチャにおけるその特定の標的の寄与を模倣するように効率が調整される。
【００３５】
　例えば、２つの遺伝子の発現の増加が疾患を予測する仮説的シナリオにおいて、
　特定の遺伝子（Ｇ１）は、１２を超える任意のレベルで発現している場合、「疾患」に関連し、１２未満の発現レベルでは、「非疾患」に関連し、Ｇ１は、弱い予測（ｗｅａｋｌｙ　ｐｒｅｄｉｃｔｉｖｅ）であり、
　第２の遺伝子（Ｇ２）は、発現レベルが６を超える場合、疾患に関連し、発現レベルが６未満の場合、非疾患に関連し、Ｇ２は、強い予測（ｓｔｒｏｎｇｌｙ　ｐｒｅｄｉｃｔｉｖｅ）である。
【００３６】
　Ｇ１及びＧ２の発現を単純に得て、個々の予測力を考慮せずに一緒に加算する場合、Ｇ１の発現レベルが１０（「非疾患」を予測する）及びＧ２の発現レベルが７（「疾患」を予測する）の試料は、「疾患予測遺伝子」の全体的な発現レベルが１７であり、一方、Ｇ１の発現レベルが１（「非疾患」を予測する）及びＧ２の発現レベルが１０の試料は、「疾患予測遺伝子」の全体的な発現レベルが１１しかない。一見すると、個々の予測力を考慮せずに、第１の試料は第２の試料よりも病気になる可能性が高いように見える。しかしながら、Ｇ１が弱い予測に過ぎないが、Ｇ２が強い予測であることを考慮に入れると、疾患の実際の予測は、第２の試料についてははるかに可能性が高い場合がある。
【００３７】
　したがって、全ての「疾患関連遺伝子」を単純に増幅し、生成物の量を加算するだけでは十分ではない。しかしながら、生成物の量を加算することは、いくつかの発現レベル入力に基づいて累積的かつ正確な予測を得るための簡単な手段である。本発明者らは、個々の予測力を競合ポリヌクレオチドに組み込むことに成功しており、その結果、標的対対応する競合ポリヌクレオチドの相対量は、予測力を示す。
【００３８】
　例えば、上記の仮説的な例を挙げると、一例では、
　Ｇ１は、天然のＧ１標的と強く競合する対応する競合ポリヌクレオチドとともに増幅される。すなわち、競合は、天然の標的Ｇ１よりも高い増幅効率を有する。このように、第１の試料中のＧ１の高い発現（１０個の標的分子の均等物を有する）は、より低い実際のＧ１標的生成物（例えば、３）に変換される。これは、Ｇ１のより低い予測力を反映する。次いで、Ｇ１標的生成物は、緑色標識プローブでプローブされ得、Ｇ１競合は、オレンジ色標識プローブでプローブされ得る。増幅及び検出後、緑色標識の量は、オレンジ色標識よりも少ない場合がある（例えば、緑色の読み取り値が３で、オレンジ色の読み取り値

が７）。一方、Ｇ２は、高い予測力のために、増幅することが非常に困難な対応する競合ポリヌクレオチドの存在下で増幅され得るため、Ｇ２天然標的がＧ２競合ポリヌクレオチドよりも多く増幅される。７つのＧ２標的に相当する第１の試料の場合、生成されたＧ２標的の量は６であってもよく、生成されたＧ２競合の量は１であってもよい。Ｇ２標的は、緑色標識プローブ（すなわち、６の緑色）でプローブされてもよく、Ｇ２競合は、オレンジ色標識プローブ（すなわち、１のオレンジ色）でプローブされてもよい。この例では、Ｇ１とＧ２の結果を合わせると、９の緑色の読み取り値（すなわち、病気）と８のオレンジ色の読み取り値が得られる。

【００３９】

実質的に１のＧ１標的分子及び１０のＧ２標的分子を有していた試料２の場合、Ｇ１は、０．５の緑色の読み取り値及び１のオレンジ色の読み取り値を生成してもよく、Ｇ２は、９の緑色の読み取り値及び２のオレンジ色の読み取り値を生成してもよく、累積読み取り値は、９．５の緑色対３のオレンジ色であってもよい。

【００４０】

当業者は、いくつかの状況において、ある遺伝子の発現の増加及び異なる遺伝子の発現の抑制が、特定の状態（例えば、疾患状態）を示すことができることを理解するであろう。

【００４１】

元のデータセット（例えば、マイクロアレイデータ、ＲＮＡｓｅｑデータ）に由来する予測的関係又は差次的遺伝子調節シグネチャは、全体的な累積蛍光が「状態Ａ」（すなわち、「疾患」）の診断をもたらすためにどの程度「緑色」である必要があるかの閾値を提供する。

【００４２】

標的が１：１の様式で増幅された場合、試料１は、１７の全体的な緑色の読み取り値を有し、試料２は、１１の読み取り値を有するであろう。それは、試料がその特定の状態（例えば、疾患状態）にある可能性を正確に反映しない。

【００４３】

上記は相対遺伝子発現の文脈で論じられるが、当業者は、様々な変異の存在又は不在が、がんなどの特定の疾患状態又は非コードＲＮＡの相対存在量を示す状況（したがって、タンパク質コード遺伝子の文脈では厳密には「遺伝子発現」ではなく、一般に、転写）においても同じ前提が真実であることを理解及び認識するであろう。したがって、上述のように、相対遺伝子発現に言及する場合、これは、変異の組み合わせ、又は例えば非コードＲＮＡの相対転写及び産生にも適用されると解釈されるべきである。

【００４４】

増幅の進行は、プライマー結合部位間の標的生成物又は競合生成物の領域に特異的な蛍光標識プローブオリゴヌクレオチドを含めることによってリアルタイムで監視することができる（実施例については、図１Ｂを参照）。あるタイプのプローブの場合、適切なプライマーが伸長されると、ポリメラーゼは、プローブを（多かれ少なかれ）個々のヌクレオチドに分解し、クエンチャー（ｑｕｅｎｃｈｅｒ）からフルオロフォアを遊離し、蛍光シグナルを生成する。得られた曲線は、密度制限指数関数的増殖過程としてモデル化することができる：

【数１】

$$\frac{dF}{dt} = rF\left(1-\frac{F}{K}\right), \qquad \frac{dK}{dt} = m, \tag{1}$$

［式（１）］

式中、Ｆは蛍光強度であり、ｒは指数関数的増殖率（塩基ｅ）であり、Ｋはシグナルプラトー（ｓｉｇｎａｌ　ｐｌａｔｅａｕ）であり、ｍはこのプラトーのドリフトである。ここでの重要な成分はｒであり、塩基２で表される場合、各サイクルを複製する（プローブ

結合した）標的鎖の割合を表す。ｒは、図２に示すように、プライマー領域間の標的の配列を変更することによって変化し得る。

【００４５】

なお、ほとんどの場合、所与の標的との全ての反応は、標的の開始量にかかわらず、末端に同じ蛍光強度を有することに留意されたい。反応のエンドポイントは、試料に関する最小限の情報を提供し、この欠点は、本発明に従って、ＰＣＲへの競合を設計することによって改善される。

【００４６】

増幅は、本明細書に記載される特定の特徴を有するように「調整」された競合ポリヌクレオチドの使用を伴う「競合」増幅である。当業者は、競合ＰＣＲの先行技術の方法が、典型的には、標的核酸の定量化に使用され、使用される競合ポリヌクレオチドが、増幅効率のいかなる矛盾も回避するために、可能な限り配列が標的に近いように設計されることを理解するであろう。標的生成物の量を、典型的には、ゲル電気泳動を使用して競合生成物の量と比較し、これにより、出発標的物質の量を定量化することができる。

【００４７】

対照的に、本発明は、競合ポリヌクレオチドが、標的の増幅と競合の増幅との間の増幅効率の特定の差を意図的にもたらす配列を有するように設計されることを特に必要とする。

【００４８】

次いで、一実施形態では、本発明は、試料中の１つ以上の標的ポリヌクレオチドを増幅する方法を提供し、本方法は、

ａ）ポリヌクレオチドを含む試料、

ｂ）第１の調整された競合ポリヌクレオチド、

ｃ）少なくとも第１のプライマーであって、

第１の標的ポリヌクレオチド、及び

第１の調整された競合ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができる、少なくとも第１のプライマー、を提供することと、

標的ポリヌクレオチド（試料中に存在する場合）及び第１の調整された競合ポリヌクレオチドが増幅されるように、プライマー伸長反応を開始することと、を含み、

増幅が、第１の標的生成物及び第１の調整された競合生成物をもたらす。

【００４９】

誤解を避けるために、本発明の方法は、「トーホールド（ｔｏｅ－ｈｏｌｄ）」プライマーが最初により短い「プロテクター（ｐｒｏｔｅｃｔｏｒ）」鎖に結合する「トーホールド」方法とは異なり、したがって、このプロテクター及び標的は、標的への結合に対して競合する。この場合、「プロテクター」は増幅されない（これはプライマーよりも短い）。

【００５０】

また、明確にするために、第１の調整された競合ポリヌクレオチドは、特定の特性を有するように特に設計された又は「調整された」ポリヌクレオチドであり、意図的に増幅反応に導入されている。本明細書に記載される競合ポリヌクレオチドは、例えば、試料中にもたまたま存在する他のポリヌクレオチドと異なるとみなされる。例えば、本発明による競合ポリヌクレオチドは、単に、プライマーへのハイブリダイゼーションに対して競合し、望ましくないバックグラウンド増幅をもたらし得るゲノムＤＮＡの別の断片ではない。次いで、一実施形態では、本明細書に記載の競合ポリヌクレオチドが意図的に増幅される。一実施形態では、本明細書に記載の競合ポリヌクレオチドは、試料中に天然に存在しない。

【００５１】

また、本方法は、競合オリゴヌクレオチドが意図的に標的ポリヌクレオチドと同様の増幅動態特性を有するように設計されている競合増幅の先行技術の方法と異なることに留意することが重要である。かかる方法は、標的ポリヌクレオチドの濃度を推定するために当該技術を使用しており、例えば、既知の量の競合ポリヌクレオチドが増幅反応に含まれる

。かかる方法では、競合の増幅率が標的の増幅率を反映することが不可欠である。当業者には、これが本発明に当てはまらないことが明らかとなるであろう。本発明は、調整された競合オリゴヌクレオチドが、それぞれの標的ポリヌクレオチドに対して異なる増幅動態を有することを必要とし、それにより、標的及び競合の相対増幅率は、少なくとも２つの状態のうちの１つを示す予測的関係、決定面、又は差次的標的オリゴヌクレオチドパターン（例えば、差次的遺伝子調節シグネチャ）に一致する生成物をもたらす。

【００５２】

したがって、一実施形態では、競合ポリヌクレオチドは、それぞれの標的ポリヌクレオチドと同一の増幅率又は実質的に類似した増幅率を有しない。

【００５３】

本方法はまた、種特異的サブ領域を増幅又は配列決定する前に、ほとんどの細菌に共通する遺伝子配列（リボソームサブユニット）を最初に増幅する１６ｓネステッドＰＣＲなどの方法と異なる（Ｙｕ ｅｔ ａｌ ＰＬｏＳ Ｏｎｅ ２０１５ １０：ｅ０１３２２５３）。ヒトＢ細胞におけるＶＤＪ組換えをプローブするために同様のアプローチが使用される（Ｋｏｎｉｎｇ ｅｔ ａｌ Ｂｒｉｔｉｓｈ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｈａｅｍａｔｏｌｏｇｙ ２０１６ １７８：９８３－９６８）。どちらの場合も、競合は起こるが、それは天然の配列の間だけである。したがって、一実施形態では、本方法は、１６ｓ型ＰＣＲ法でもなく、かつ／又はヒトＢ細胞におけるＶＤＪ組換えをプローブするために使用される方法でもない。

【００５４】

当業者は、所与の標的配列及び／又は調整された競合配列を、例えば、非対称増幅又は指数関数的増幅反応ＥＸＰＡＲ（Ｒｅｉｄ ｅｔ ａｌ Ａｎｇｅｗａｎｄｔｅ Ｃｈｅｍｉｅ ２０１８ ５７：１１８５６－１１８６６を参照）などの１つのプライマーのみを使用して、又は例えば、標準的なＰＣＲのように２つのプライマーを使用して増幅することが可能であることを理解するであろう。所与の標的配列又は所与の競合配列を増幅するために２つのプライマーを使用する必要はないと考えられるが、典型的には、２つのプライマーが使用され、第１及び第２のプライマーが二本鎖の標的配列又は競合配列の反対側の鎖上でハイブリダイズするように配置されて、標的生成物又は競合生成物をもたらす。２つのプライマーを使用して標的配列を増幅してもよく、かつ／又は調整された競合ポリヌクレオチドの一部又は全てを増幅してもよい。当業者は、適切なプライマー（例えば、標的／競合配列の一部を識別する長さ、配列）に必要なものを理解するであろう。

【００５５】

したがって、いくつかの実施形態では、本方法は、第２のプライマーを提供することを含む。

【００５６】

いくつかの実施形態では、第２のプライマーは、第１の標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができ、第１及び第２のプライマーは、標的の反対側の鎖上でハイブリダイズして、第１の標的生成物、任意選択的に、第１の標的ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）生成物の生成をもたらす。

【００５７】

当業者はまた、第１のプライマーが第１の標的ポリヌクレオチド及び第１の調整された競合ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができるように、第１の標的ポリヌクレオチドの一部及び第１の調整された競合の一部は、単一のプライマーが２つの異なるポリヌクレオチドにハイブリダイズすることを可能にするように、同じ配列又は実質的に同じ配列を有するであろうことを理解するであろう。標的及び競合の残りの配列はまったく異なる場合がある。

【００５８】

いくつかの事例では、本方法は、第１の標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができる第２のプライマーの使用を含み、同じ第２のプライマーは、第１の調整された競合ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることもでき、第１及び第２のプライマーは、

第１の調整された競合ポリヌクレオチドの反対側の鎖上でハイブリダイズすることで、第１の調整された競合生成物、任意選択的に、第１の調整された競合ＰＣＲ生成物の生成をもたらす。この場合、第１の標的ポリヌクレオチド及び第１の調整された競合ポリヌクレオチドは、同一であるか又は実質的に同一である２つの領域を共有することで、第１及び第２のプライマーの各ポリヌクレオチドへのハイブリダイゼーションを可能にする。当業者は、同じプライマーのハイブリダイゼーションを可能にするために、２つの配列がどの程度類似する必要があるかを理解するであろう。

【００５９】

この配置が図３に示されており、第１の標的及び第１の競合ポリヌクレオチドが、同じ第１及び第２のプライマーを使用して増幅される。それは、「直接」法又は直接ＣＡＮと呼ぶことができる。最初のものは、２つの標識プローブを使用するある特定の実施形態も示す。しかしながら、本明細書に記載されるように、異なるプローブシステム及び異なる検出方法を使用することができる。典型的には、本方法は、標的ポリヌクレオチド生成物にハイブリダイズすることができる標識プローブと、第１の競合ポリヌクレオチド生成物に結合することができる異なる標識で標識されたプローブと、を必要とするであろう。

【００６０】

標的及び競合が同じ増幅反応で増幅されると、それらはプライマーに対して競合する。プライマーは、標的鎖の各複製によって消費されるため、プライマープールが枯渇するとすぐに、両方の配列の増幅が停止する。反応終了時の各増幅生成物の量は、２つの標的の相対的な開始量に依存する。これは、得られた蛍光シグナルに反映される（例えば、図４を参照）。同じ濃度で開始する同じ増幅率を有する２つの標的（例えば、図３のＷＴ及びＩＳＯ）について、それぞれに由来する蛍光シグナルは、反応の終了時に同じであろう。反応の開始時に競合よりも多くの「標的」が存在する場合、標的生成物に関連する蛍光は、最後により強くなり、逆もまた同様であろう。純粋な標的シグナルから純粋な競合シグナルへの遷移の鋭さ又は勾配は、競合の増幅率を調整することによって調整することができる。増幅率を調節するための競合ポリヌクレオチドの配列及び長さの設計方法を本明細書に記載する。

【００６１】

競合の増幅挙動の試験及び予測

増幅挙動を支配するパラメータを推定するために、各競合を、適切なプライマー、関連するフルオロフォア標識プローブ、及び標準ｑＰＣＲマスターミックス（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ ＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃのＴａｑＭａｎ Ｆａｓｔ Ａｄｖａｎｃｅｄマスターミックス）を含む反応において増幅することができる。得られた蛍光データは、当業者が、例えば、以下の標準的な非線形最小二乗推定を使用して選択することができるであろういくつかのアルゴリズム（本明細書では、実施例で使用される機構モデルと称される）のうちの１つに適合させる必要がある。

【数２】

$$F = \mathrm{f} \cdot \left(1 + \frac{\mathrm{f}}{K} \cdot m \cdot \left(t + \frac{\log F_0}{r}\right)\right) \qquad (2)$$

式中、ｆは、次のように定義される。

【数３】

$$f = \frac{\mathrm{K}}{1 + \frac{\mathrm{K} - \mathrm{F}_0}{\mathrm{F}_0} 2^{-\mathrm{rt}}} \qquad (3)$$

式中、ｒは、増幅率であり、F_0は、反応開始時の初期蛍光であり、ｍは、定常状態で

の蛍光のドリフトの程度を示し、Ｋは、ドリフトの不在下の定常状態での蛍光を与える。上記の式は単なる例示であり、増幅挙動を説明する他のモデルも使用することができる。以下に説明するように、この機構モデルのパラメータを推定する１つの方法は、以下のように指定された一般化線形モデルを介する。効率的な推定を可能にするために、以下の変数置換を、F_0及びｒに対して最初に適用する：

【数４】

$$\tau = -\frac{\log F_0}{r} \tag{4}$$

$$\rho = -\frac{\log r}{\log \tau} \tag{5}$$

【００６２】

モデルへの入力パラメータは、塩基対単位のプライマー間の配列の領域の長さ（ＢＰ）、その領域のＧＣ含有率（ＧＣ）、及びコピー数単位の配列の濃度（Ｑ）である。入力及び出力（ρ、τ、Ｋ、及びｍ）パラメータは、最初に次のように「標準化された」形式（ａ＾で示される）に置かれる：

【数５】

$$\log \mathrm{BP} = \widehat{\mathrm{BP}} \cdot \sigma_{\mathrm{BP}} + \mu_{\mathrm{BP}} \tag{6}$$

$$\mathrm{logit}\,\mathrm{GC} = \widehat{\mathrm{GC}} \cdot \sigma_{\mathrm{GC}} + \mu_{\mathrm{GC}} \tag{7}$$

$$\log_{10}\mathrm{Q} = \widehat{\mathrm{Q}} \cdot \sigma_{\mathrm{Q}} + \mu_{\mathrm{Q}} \tag{8}$$

$$\mathrm{logit}\,\rho = \hat{\rho} \cdot \sigma_{\rho} + \mu_{\rho} \tag{9}$$

$$\tau = \hat{\tau} \cdot \sigma_{\tau} + \mu_{\tau} - \left(\mathrm{Q} - \mu_{\mathrm{Q}}\right) \cdot \log_2 10 \tag{10}$$

$$\mathrm{logit}\,\mathrm{K} = \widehat{\mathrm{K}} \cdot \sigma_{\mathrm{K}} + \mu_{\mathrm{K}} \tag{11}$$

$$\log \mathrm{m} = \widehat{\mathrm{m}} \cdot \sigma_{\mathrm{m}} + \mu_{\mathrm{m}} \tag{12}$$

$$\mathrm{logit}\,\rho = \hat{\rho} \cdot \sigma_{\rho} + \mu_{\rho} \tag{13}$$

【００６３】

次いで、回帰モデルが以下のように与えられる：

【数６】

$$\hat{\rho} = \alpha_{\rho} + \beta_{\rho,BP} \cdot \widehat{BP} + \beta_{\rho,GC} \cdot \widehat{GC} + \epsilon_{\rho} + \left(\gamma_{\rho} + \zeta_{\rho,BP} \cdot \widehat{BP} + \zeta_{\rho,GC} \cdot \widehat{GC} + \epsilon_{\rho,Q}\right) \cdot \widehat{Q} \quad (14)$$

$$\hat{\tau} = \alpha_{\tau} + \beta_{\tau,BP} \cdot \widehat{BP} + \beta_{\tau,GC} \cdot \widehat{GC} + \epsilon_{\tau} + \left(\gamma_{\tau} + \zeta_{\tau,BP} \cdot \widehat{BP} + \zeta_{\tau,GC} \cdot \widehat{GC} + \epsilon_{\tau,Q}\right) \cdot \widehat{Q} \quad (15)$$

$$\widehat{K} = \alpha_{K} + \beta_{K,BP} \cdot \widehat{BP} + \beta_{K,GC} \cdot \widehat{GC} + \epsilon_{K} + \left(\gamma_{K} + \zeta_{K,BP} \cdot \widehat{BP} + \zeta_{K,GC} \cdot \widehat{GC} + \epsilon_{K,Q}\right) \cdot \widehat{Q} \quad (16)$$

$$\widehat{m} = \alpha_{m} + \beta_{m,BP} \cdot \widehat{BP} + \beta_{m,GC} \cdot \widehat{GC} + \epsilon_{m} + \left(\gamma_{m} + \zeta_{m,BP} \cdot \widehat{BP} + \zeta_{m,GC} \cdot \widehat{GC} + \epsilon_{m,Q}\right) \cdot \widehat{Q} \quad (17)$$

式中、αは、全ての配列及び濃度にわたる所与のパラメータの「典型的な」値を表し、βは、所与の配列の長さ又はＧＣ含有量への依存性をそれぞれ表し、γは、全ての配列にわたる濃度への「典型的な」依存性を表し、及びζは、長さ及びＧＣ含有量によって濃度への依存性がどのように変化するかを定義する。観測されたデータからパラメータ値を推定しようとする回帰モデルでは、εは、残りのパラメータによって示されるグローバルトレンドからの所与の配列の挙動の偏差を表す。新しい未試験配列のパラメータ値を提供する予測モデルは、回帰モデルと同じであるが、ε成分は含まれていない。

【００６４】

実施例に示されるように、一実施形態１６では、３０～２４０塩基対長及び１５％～８５％のＧＣ含有量の範囲の異なる競合を増幅する。７つの異なる濃度の各競合（すなわち、反応が、10^2、10^3、10^4、10^5、10^6、10^7、又は10^8コピーの競合を含有した）を、二重に。当業者は、特定の状況に応じて、適切な数の競合、適切な長さ、適切なＧＣ含有量及び濃度を選択することができる。上記のモデルのパラメータ値は、ベイズアプローチを使用して推定することができる。しかしながら、他の線形回帰技術（最尤推定、最小二乗推定、リッジ回帰、及びラッソ回帰を含むが、これらに限定されない）を使用することができる。

【００６５】

実施例に記載の１６の競合の回帰の結果を図１６に示し、推定パラメータ値を以下の表に示す。図中、「切片」はα成分とβ成分との合計を指し、「傾き」はγ成分とζ成分との合計を指す。ドットは特定の配列の推定値を表し、線と影付きの領域はそれぞれ全体の傾向と付随する不確実性を表す。

【表１】

	ρ	τ	K	m	BP	GC	Q
μ	-1.32	27.5	0.74	-5.25	4.48	-0.282	5
σ	0.31	3.6	0.38	0.70	0.75	1.0	2
α	-0.705	-0.240	-0.119	0.306			
β_{BP}	1.180	0.128	-0.546	-0.383			
β_{GC}	0.715	0.366	-0.277	0.669			
γ	0.409	-0.118	0.036	-0.154			
ζ_{BP}	0.105	-0.018	-0.006	-0.061			
ζ_{GC}	0.076	-0.104	0.010	0.011			

【００６６】

一般化線形モデルの他の、非線形回帰及びノンパラメトリック回帰（例えば、多項式回帰、ガウス過程、人工ニューラルネットワーク、サポートベクトルマシン、最近傍、決定木、ランダムフォレスト、及びナイーブベイズ）を含むが、これらに限定されない他の回帰手法を使用することができる。

【００６７】

競合増幅のシミュレーション

上記の式は、単独での所与の配列の増幅を説明する。複数のオリゴが互いに競合するときの増幅挙動をシミュレートするために、より細粒度モデル（ｆｉｎｅ－ｇｒａｉｎｅｄ ｍｏｄｅｌ）が使用される。競合増幅は、モノー増殖の一例としてモデル化されている（Ｍｏｎｏｄ，Ｊａｃｑｕｅｓ（１９４９）．“Ｔｈｅ ｇｒｏｗｔｈ ｏｆ ｂａｃｔｅｒｉａｌ ｃｕｌｔｕｒｅｓ”．Ａｎｎｕａｌ Ｒｅｖｉｅｗ ｏｆ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ．３：３７１－３９４．ｄｏｉ：１０．１１４６／ａｎｎｕｒｅｖ．ｍｉ．０３．１００１４９．００２１０３）。微生物の増殖をモデル化するために一般的に使用されているこのアプローチは、限られた基質が消費されるにつれて減衰する最大速度での複製を記述する。所与のオリゴヌクレオチドの２本の鎖の各々は、配列の増幅率として上記の最大速度でその相補体を生成する別個の「有機体」とみなされる。そうすることで、対応するプライマーを消費し、このプライマーの濃度が低下すると、新しい鎖の生成速度が低下する。この減衰の大きさは、所与のプライマー濃度と、そのプライマー濃度及びプライマーに結合する全ての鎖の濃度の和の比によって与えられる。単純な非競合ＰＣＲ（１つの標的、２つのプライマー）の場合、モデルは、常微分方程式の次のシステムで構成される：

【数７】

$$\frac{dA_+}{dt} = rA_-\mu_{p1}, \quad \frac{dA_-}{dt} = rA_+\mu_{p2} \qquad (18.1, 18.2)$$

$$\frac{dp1}{dt} = -\frac{dA_+}{dt}, \quad \frac{dp2}{dt} = -\frac{dA_-}{dt} \qquad (19.1, 19.2)$$

$$\mu_{p1} = \frac{p1}{A_- + p1}, \quad \mu_{p2} = \frac{p2}{A_+ + p2} \qquad (20.1, 20.2)$$

式中、A_+及びA_-は、配列Ａのプラス鎖及びマイナス鎖の濃度であり、ｐ１及びｐ２は、２つのプライマーの濃度であり、ｒは、配列の増幅率である（ここで、μは、前の方程式におけるμとは無関係であることに留意されたい）。

【００６８】

直接競合ＰＣＲ（２つの標的ＷＴ及びＲＥＦ、２つのプライマー）のモデルは、以下のとおりである：

【数８】

$$\frac{dWT_+}{dt} = rWT_-\mu_{p1}, \quad \frac{dWT_-}{dt} = rWT_+\mu_{p2} \qquad (21.1, 21.2)$$

$$\frac{dREF_+}{dt} = rREF_-\mu_{p1}, \quad \frac{dREF_-}{dt} = rREF_+\mu_{p2} \qquad (22.1, 22.2)$$

$$\frac{dp1}{dt} = -\frac{dREF_+}{dt} - \frac{dWT_+}{dt}, \quad \frac{dp2}{dt} = -\frac{dREF_-}{dt} - \frac{dWT_-}{dt} \qquad (23.1, 23.2)$$

$$\mu_{p1} = \frac{p1}{WT_- + REF_- + p1}, \quad \mu_{p2} = \frac{p2}{WT_+ + REF_+ + p2} \qquad (24.1, 24.2)$$

【００６９】

したがって、当業者は、本明細書に含まれる全ての競合増幅システムを同様の方法で説明することができる。これらの微分方程式の系は、当該技術分野で既知の多くの分析技術

又は数値技術のいずれかを使用して解くことができ、経時的な反応における各種の濃度を説明する曲線を得ることができる。所与のプローブ又はプローブのセットから経時的にシグナルの曲線を得るために、開業医は、それらのプローブに同族の鎖の濃度を組み合わせるであろう。例えば、直接競合ＰＣＲの上記の例では、ＦＡＭ標識プローブがＷＴ－鎖に結合するように設計され（すなわち、ＷＴ＋鎖と配列同一性を共有する）、ＨＥＸ標識プローブがＲＥＦ－鎖に結合するように設計された場合を考えてみる。したがって、ＦＡＭシグナルは、ＷＴ＋鎖の濃度によって与えられ、ＨＥＸシグナルは、ＲＥＦ＋鎖の濃度によって与えられる。追加のＦＡＭ標識プローブがＲＥＦ＋鎖に結合するように設計されている場合、ＦＡＭシグナルは、ＷＴ＋鎖及びＲＥＦ－鎖の濃度の合計によって与えられるであろう。

【００７０】

これまでに説明したシナリオ、すなわち、１つの標的ポリヌクレオチド及び１つの対応する競合ポリヌクレオチドは、本発明の１つの最も単純な応用を表す。しかしながら、１つの遺伝子の発現レベルを評価することは、実際には遺伝子ネットワークを表すものではない。遺伝子ネットワーク内の複数の遺伝子の発現レベルは、２つ以上の標的ポリヌクレオチドを増幅すること、及び／又は２つ以上の競合ポリヌクレオチドを提供することの組み合わせを使用して評価することができる。本発明は、異なる組み合わせを提供し、そのうちのいくつかは、より詳細に説明されるであろうが、当業者は、異なる標的ポリペプチド、異なる競合、及びプライマーの異なる配置（例えば、標的と競合との間で共有されるプライマー、競合と競合との間で共有されるプライマー、及び／又は標的と標的との間で共有されるプライマー）の多数の組み合わせを理解するであろう。

【００７１】

これらの方法のうちのいくつかは、「間接」法、又は間接ＣＡＮと呼ばれる。

【００７２】

本明細書に記載の間接ＣＡＮ法は、より大きな遺伝子シグネチャを分析する場合、より安価であると考えられる。なぜなら、「直接」法では、標的とされる各転写産物に対して少なくとも１つのプローブ（２つではない場合）を設計する必要があるからである。２０～５０の標的を有する遺伝子シグネチャ（例えば、遺伝子発現レベル、特定の変異の存在又は不在、非コードＲＮＡの存在量）の場合、配列設計を反復することは非常に高価になる。この問題に対処するために、間接ＣＡＮは、調査中の遺伝子の数にかかわらず、多かれ少なかれ固定コストで同様の機能を提供する。間接競合はまた、複数の標的を同時に複雑かつ非線形の解析ができる高次ネットワークの可能性を開く。最後に、冗長な標的化により、全てのＣＡＮアーキテクチャに更なる柔軟性を可能にする。

【００７３】

本明細書に記載の直接競合法は、プローブした標的ポリヌクレオチド生成物とプローブした競合ポリヌクレオチド生成物との間の競合を使用する。間接法は、単純に競合ポリヌクレオチド間の競合を仲介するために、プローブされない標的ポリヌクレオチドを使用する。両方のプライマーは、所与の標的の指数関数的増幅に必要であるため、複製は、１つのプライマーのみを枯渇させることによって阻止され得る。本発明のこの実施形態では、図５においてＲＥＦＨとして示されている競合ポリヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチド、ＷＴと１つのプライマーを共有し、その第２のプライマーは、第２の競合ポリヌクレオチド、ＲＥＦＦを共有するように設計される（図５）。全ての成分が等しい増幅率を有し、２つの競合（ＲＥＦ）が等しい濃度で開始する場合、なんらＷＴが存在しなくても、ＨＥＸ及びＦＡＭシグナル（核酸プローブ上の標識）が等しく増幅される。しかしながら、ＷＴの増加はＲＥＦＨを打ち負かし、ＨＥＸシグナルを減衰させる。これは次に、ＲＥＦＦが増殖する余地を作り出し、反応の最後により大きなＦＡＭシグナルをもたらす。その結果、直接競合から観察されたものと同様に、様々なＷＴ濃度に対するＳ字型の応答曲線が得られる（図５Ａ）。この応答曲線は、標的のいずれかの増幅率、競合ポリヌクレオチドの開始濃度、プライマーのいずれかの濃度、又はネットワーク自体のトポロジーを調整することによって調整することができる（図５Ｂ、図５Ｃ）。このシステムの主な利点

は、競合ポリヌクレオチドの配列が制限されていないため（プライマーにハイブリダイズする領域のみが任意の配列制約を有する）、同じ２つのプローブ配列を再利用して複数の競合ポリヌクレオチド生成物をプローブすることができ、どれだけ多くの天然の標的が利用されているか、又はネットワークがどれほど複雑であるかにかかわらず、開発コストを最小限に抑えることができることである。

【００７４】

したがって、いくつかの実施形態では、本方法は、第２の調整された競合ポリヌクレオチドを提供することを含む。

【００７５】

いくつかの実施形態では、第２のプライマーは、

ａ）第１の調整された競合ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができ、第１及び第２のプライマーが、第１の調整された競合ポリヌクレオチドの反対側の鎖上でハイブリダイズして、第１の調整された競合生成物、任意選択的に、第１の調整された競合ＰＣＲ生成物の生成をもたらし、かつ

ｂ）第２の調整された競合ポリヌクレオチドにハイブリダイズし、プライマー伸長反応を開始することができ、それにより、第２の調整された競合ポリヌクレオチドが増幅されて、第２の調整された競合生成物の生成をもたらし、任意選択的に、更なるプライマーと組み合わせて、第２のプライマー及び更なるプライマーが、第２の調整された競合ポリヌクレオチドの反対側の鎖上でハイブリダイズして、第２の調整された競合生成物、任意選択的に、第１の標的ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）生成物の生成をもたらし、

任意選択的に、第２のプライマーが、第１の標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができない。

【００７６】

間接法の他のあまり好ましくない実施形態では、第２のプライマーは、

ａ）第１の標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができ、第１及び第２のプライマーが、標的の反対側の鎖上でハイブリダイズして、第１の標的生成物、任意選択的に、第１の標的ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）生成物の生成をもたらし、

ｂ）第２の調整された競合ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができ、

かつ任意選択的に、第１の競合ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができない。

【００７７】

いくつかの実施形態では、第２のプライマーは、第２の標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができ、任意選択的に、第１の標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができない。

【００７８】

上記のように、本方法は、２つ以上の標的ポリヌクレオチドの文脈で使用され得ることが理解されるであろう。いくつかの事例では、本方法は、２つ以上の遺伝子の発現、２つ以上の特定の変異の存在若しくは不在、及び／又は２つ以上の非コードＲＮＡの存在量を決定するために使用される。他の実施形態では、当業者は、関連するプライマーが、２つ以上の標的ポリヌクレオチドが同じ実際のＲＮＡ分子の一部であるように設計され得ることを理解するであろう。例えば、いくつかのプライマー対は、単一のｍＲＮＡからいくつかの異なる領域を増幅するように設計することができる。適切な競合ポリヌクレオチドと併せて、本発明の方法のこの実施形態は、「冗長」方法と呼ばれる。

【００７９】

したがって、一実施形態では、第２の標的ポリヌクレオチドは、第１の標的ポリヌクレオチドと同じポリヌクレオチド分子の一部である。

【００８０】

他の実施形態では、第２の標的ポリヌクレオチドは、第１の標的ポリヌクレオチドと異なるポリヌクレオチド分子上にある。

【００８１】

典型的には、各標的を増幅するために２つのプライマーが使用されることが理解される

であろう。したがって、本発明の方法は、２つ以上のプライマー（例えば、少なくとも３、４、５、６、又はそれ以上のプライマー）を含んでもよい。

【００８２】

例えば、一実施形態では、第２のプライマーは、

ａ）第１の標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができ、第１及び第２のプライマーが、標的の反対側の鎖上でハイブリダイズして、第１の標的生成物、任意選択的に、第１の標的ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）生成物の生成をもたらし、

ｂ）第１又は第２の調整された競合ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができず、

本方法は、第１及び第２の調整された競合ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができる第３のプライマーを含む。

【００８３】

他の実施形態では、本方法は、第４のプライマーを提供することを含み、第４のプライマーは、第１の標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができ、第１及び第４のプライマーは、標的の反対側の鎖上でハイブリダイズして、第１の標的生成物、任意選択的に、第１の標的ＰＣＲ生成物の形成を可能にする。

【００８４】

わかるように、本発明の方法によってプライマーの任意の好適な配置が提供され、それにより、各関連する標的又は競合が増幅され、各標的及び競合が関連するプライマーに対して適切に競合する。

【００８５】

本発明によって提供される標的、競合、及びプライマー配置の異なる組み合わせを更に例示するために、いくつかの実施形態では、本方法は、

ａ）第２のプライマーであって、

ｉ）第１の標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができ、第１及び第２のプライマーが、標的の反対側の鎖上でハイブリダイズして、第１の標的生成物、任意選択的に、第１の標的ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）生成物の生成をもたらし、

ｉｉ）第１の調整された競合ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができる、第２のプライマーと、

ｂ）第３のプライマーであって、

ｉ）第１の調整された競合ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができ、第３及び第２のプライマーが、第１の調整された競合ポリヌクレオチドの反対側の鎖上でハイブリダイズして、第１の調整された競合ポリヌクレオチド生成物、任意選択的に、第１の調整された競合ポリヌクレオチドポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）生成物の生成をもたらし、

ｉｉ）第２の調整された競合ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができる、第３のプライマーと、ｃ）第４のプライマーであって、第２の調整された競合ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができ、第３及び第４のプライマーが、第２の調整された競合ポリヌクレオチドの反対側の鎖上でハイブリダイズして、第２の調整された競合ポリヌクレオチド生成物、任意選択的に、第２の調整された競合ポリヌクレオチドポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）生成物の生成をもたらす、第４のプライマーと、を提供することを含む。

【００８６】

第４及び第５のプライマーが、他の標的ポリヌクレオチド及び／又は他の競合ポリヌクレオチドに結合し、評価されるネットワークの複雑さを拡大することができることは明らかであろう。

【００８７】

上記のように、本発明の重要な特徴は、１つ以上の調整された競合ポリヌクレオチドの使用であり、それは、対応する標的ポリヌクレオチドに対して又はネットワーク内の他の標的若しくは競合ポリヌクレオチドの増幅率に対して特に調整された増幅率を有する。この調整は、増幅における差異を提供し、それは、例えば、標識核酸プローブを使用するこ

とによって、予測的関係、決定面、又は差次的標的オリゴヌクレオチドパターン（例えば、差次的遺伝子調節シグネチャ又は特定の変異の存在若しくは不在）を、簡単に調べることができる各増幅生成物の相対存在量に変換する。

【００８８】

したがって、一実施形態では、第１の標的ポリヌクレオチドの増幅率は、第１の調整された競合ポリヌクレオチドの増幅率と異なる。他の実施形態では、標的ポリヌクレオチドの増幅率は、対応する調整された競合ポリヌクレオチドの増幅率と異なる。

【００８９】

典型的には、先行技術の増幅方法では、生成物を増幅しようとすると、増幅率が最適化され、増幅が可能な限り効率的になる。当業者は、増幅の効率を向上させる技術、例えば、生成物の長さを変化させること、Ｇ／Ｃ含有量を変化させること、及びプライマーの濃度を変化させることを認識している。当業者は増幅を改善する方法を知っているので、当業者は増幅を非効率的する（すなわち、増幅率を低下させる）方法を知っている。

【００９０】

当業者は、１つの標的と１つの競合との間の相対増幅率（又は場合によっては、１つの標的と複数の競合との間の相対増幅率、又は複数の標的と１つの競合との間の相対増幅率、又は複数の標的と複数の競合との間の相対増幅率）が重要であり、必ずしも絶対増幅率ではないことを理解するであろう。したがって、標的と競合との間の相対増幅率が適切であるように、標的の最も適切な領域（例えば、特定の標的ｍＲＮＡの最も適切な２００ｂｐ領域）が増幅のために選択されることが重要である。

【００９１】

したがって、一実施形態では、標的ポリヌクレオチド又は競合ポリヌクレオチドのいずれかの増幅率は、

ａ）長さ及び／若しくはパーセントＧＣ含有量に基づいて、標的核酸配列を選択すること、

ｂ）長さ及び／若しくはパーセントＧＣ含有量を変化させるように、競合核酸配列を設計すること、

ｃ）競合核酸配列の開始濃度を増加若しくは減少させること、並びに／又は

ｄ）核酸プライマーのいずれかの開始濃度を増加若しくは減少させること、のうちの１つ以上によって変化させることができる。

【００９２】

したがって、一実施形態では、競合ポリヌクレオチドの増幅率は、競合ポリヌクレオチド生成物の塩基対の数を増加又は減少させることによって変化させることができる。

【００９３】

いくつかの実施形態では、競合ポリヌクレオチドの増幅率は、

塩基対の数を減らすことによって増加し、

塩基対の数を増やすことによって減少し、

競合ポリヌクレオチドのＧＣ含有率を増やすこと若しくは減らすことによって変化し、

パーセントＧＣ含有量を増やすことによって減少し、かつ／又は

パーセントＧＣ含有量を増やすことによって低減される。

【００９４】

例として、様々な相対増幅率を提供するように調整され、実施例で例示される、標的生成物及び対応する競合生成物の対の配列を以下に提供する。

【００９５】

増幅率は、任意の他のポリヌクレオチドの不在下で、ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができるプライマーのみを用いて、ポリヌクレオチドに対して実行された標準的な定量ＰＣＲの蛍光トレースに次の式を適合することから推定された「ｒ」として定義することができる：

【数９】

$$F(t) = \frac{K}{1 + \frac{K - F_0}{F_0} 2^{-rt}} \tag{25}$$

【００９６】

この及び他の好適な式は、当該技術分野で既知である。例えば、Ｓｐｉｅｓｓ ｅｔ ａｌ ＢＭＣ Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ ９ ａｒｔｉｃｌｅ ｎｕｍｂｅｒ ２２１（２００８）、Ｒｕｔｌｅｄｇｅ ＮＡＲ ２００４ ３２：ｅ１７８、及びＬｉｕ ｅｔ ａｌ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ ａｎｄ Ｔｉｓｓｕｅ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ２００１ ２７：１４０７－１４１４を参照されたい。

【００９７】

式中、ｔは、各蛍光値が測定されたサイクルである。典型的な反応には、市販のｑＰＣＲマスターミックス、各々１２５ｎＭの２つのプライマー、それぞれ２５０ｎＭのプローブが含まれ、６０℃で６０サイクル実行されるであろう。曲線適合は、通常、非線形最小二乗（ＮＬＬＳ）アルゴリズムを使用して実行されるであろう。プローブを蛍光色素（例えば、Ｓｙｂｒ Ｇｒｅｅｎ、ＥｖａＧｒｅｅｎ）で置き換えること、関与する持続時間、温度、又は濃度を変更すること、又はベイズ推定などの代替的な統計的アプローチは、評価される全てのポリヌクレオチドに対して同じアプローチが使用される限り許容される。同様に、異なる式を使用して、以下を含むがこれらに限定されない「ｒ」を推定することができる：

【数１０】

$$F(t) = \frac{K}{1 + \frac{K - F_0}{F_0} e^{-rt}} \tag{26}$$

$$F(t) = \frac{K}{\left(1 + \frac{K - F_0}{F_0} 2^{-rt}\right)^g} \tag{27}$$

$$\frac{dF}{dt} = rF\left(1 - \frac{F}{K}\right) \tag{28}$$

$$F(t) = f \cdot \left(1 + \frac{f}{K} m \cdot (\mathrm{t} - \tau)\right) \tag{29}$$

式中、ｆは、上記の式のいずれかからのＦとして定義される。

【００９８】

競合ポリヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチドと異なる増幅率を有するように調整されるため、増幅反応が同じ又は実質的に同じ数の初期標的及び競合テンプレート分子を含む状況では、生成される標的生成物ポリヌクレオチドの数は、生成される調整された競合生成物ポリヌクレオチドの数と異なる。したがって、本方法の一実施形態では、生成され

る標的生成物ポリヌクレオチドの数は、プライマー伸長前の標的ポリヌクレオチドの初期数及び調整された競合ポリヌクレオチドの数が同じであるか、又は実質的に同じである場合、生成される調整された競合生成物ポリヌクレオチドの数と異なる。

【００９９】

標的及び競合が特定の相対増幅率を有するように競合ポリヌクレオチドを調整する前提は、最終的に、例えば、診断、予後において、又は単にシステム若しくは遺伝子ネットワークの現在の状態のスナップショットを取得することにおいて、本方法の目的の基礎となる予測的関係、決定面、又は差次的遺伝子調節シグネチャ若しくは特定の変異の存在／不在を模倣することである。したがって、一実施形態では、増幅される第１の標的ポリヌクレオチドの配列及び少なくとも第１の調整された競合ポリヌクレオチドの配列は、標的の予測的関係又は差次的遺伝子調節シグネチャを１つ以上の状態に近似、再現、又は一致させるような様式で、第１の標的ポリヌクレオチドの初期濃度とともに変化する最終的な検出可能なシグナルをもたらすように選択される。

【０１００】

このようにして、特定の試料が遺伝子の低レベルの発現を有するが、その低発現が、例えば、疾患状態をより高度に予測する（又は特定の変異を有するが、その変異が第２の変異よりも疾患状態を高度に予測する）場合、標的生成物の最終的な検出可能なレベルは高くてもよく（対応する競合ポリヌクレオチドが、不十分な競合である配列を有するように設計される）、一方、高レベルの発現を有するが疾患を不十分に予測する遺伝子は、標的生成物の最終的な検出可能なレベルが低くてもよい（すなわち、対応する競合ポリヌクレオチドが、高い遺伝子発現を低い量の標的生成物に変換する、非常に競合的な配列を有するように設計されている）。これは、競合配列が、各標的の増幅に正しい重み付けを適用するように選択されるためである。

【０１０１】

この同じ前提が、直接法にも適用され、各標的ポリヌクレオチドが、２つのプライマーによって増幅され、それはまた、対応する調整された競合ポリヌクレオチドも増幅する（以下に記載されるように、各反応において、いくつかの異なる標的及び異なる対応する競合ポリヌクレオチドが増幅される可能性があることに留意されたい）。また、間接的法にも適用され、例えば、標的が、２つのプライマーによって増幅され、そのうちの１つは、第２の競合プライマーとともに第１の競合を増幅するためにも使用され、それ自体が、第２の競合ポリヌクレオチドを増幅するために使用される（例えば、－標的－競合１－競合２－。ここで、各「－」はプライマーである）。当業者は、出力（すなわち、標的及び競合の生成物の量）が診断的、予後的、又はそうでなければ状態Ａ対状態Ｂの確率を予測するように、予測的関係又は差次的遺伝子調節シグネチャを効果的にコードするかかる増幅ネットワークを生成することができる。

したがって、一実施形態では、第１の標的ポリヌクレオチドの増幅率及び第２の標的ポリヌクレオチドの増幅率は、所定の重み付けを近似、再現、又は一致させる。当業者は、重み付けが、アッセイシグナルが予測シグナルを近似、再現、又は一致させるために必要なものから導出されることを理解するであろう。それは、典型的には、シミュレーションを介して特定される。

【０１０２】

競合増幅を伴う先行技術の方法は、配列において競合が標的配列に可能な限り近いことを必要とする。本方法は、出発標的鋳型の量を定量するのに使用されるため、増幅率におけるいかなる違いも、結果を歪めるであろう。本明細書の開示から、本発明の競合ポリヌクレオチドが、標的と異なる増幅率を有するように意図的に設計されることが明らかである。これは、標的と異なる配列を有することによって達成され得る。一実施形態では、増幅される第１の調整された競合ポリヌクレオチドの配列は、増幅される第１の標的ポリヌクレオチドの配列と、９５％、９０％、８８％、８５％、８０％、７５％、７０％、６５％、６０％、５５％、５０％、４５％、４０％、３５％、３０％未満の配列同一性を共有する。増幅される標的配列が、典型的には、より大きなポリヌクレオチド（例えば、５０

０ヌクレオチドのポリヌクレオチドの２００ヌクレオチド領域）内のサブ配列であることは、当業者には明らかであろう。当業者であれば、特定の配列同一性又は増幅率の要件は、増幅されるポリヌクレオチドのこの部分にのみ適用され、隣接領域の配列は、ほぼ無関係であることを理解するであろう。

【０１０３】

上記のように、異なる増幅率は、増幅される配列のＧＣ含有量を変更することによって達成され得る。したがって、一実施形態では、増幅される第１の調整された競合ポリヌクレオチドの配列（すなわち、第１の調整された競合生成物の配列）は、少なくとも１５％ＧＣ、又は少なくとも２５％であり、少なくとも３５％であり、少なくとも５５％であり、少なくとも６５％であり、少なくとも７５％であり、少なくとも８５％であり、又は少なくとも８５％ＧＣである。

【０１０４】

同じ又は異なる実施形態において、増幅される第１の標的ポリヌクレオチド部分及び増幅される第１の競合ポリヌクレオチドのＧＣ含有量の差は、少なくとも１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、又は少なくとも９０％若しくは９５％である。例えば、増幅される第１の標的ポリヌクレオチド部分は、２０％ＧＣである配列を含んでもよく、増幅される第１の競合ポリヌクレオチドは、２５％ＧＣである配列を含んでもよく、５％のＧＣ含有量の差をもたらす。

【０１０５】

生成される生成物の長さ（すなわち、任意の所与の増幅において使用される２つのプライマーのハイブリダイゼーション部位間の距離）を変更することはまた、増幅率を調整するためにも使用することもできる（単独で又は本明細書に記載の他の方法と組み合わせて、例えば、ＧＣ含有量を変更すること）。したがって、同じ又は異なる実施形態では、第１の調整された競合生成物は、第１の標的生成物よりも少なくとも５ヌクレオチド長く、任意選択的に、第１の標的生成物よりも少なくとも１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、又は少なくとも３３０ヌクレオチド長い。

【０１０６】

いくつかの実施形態では、第１の調整された競合生成物は、第１の標的生成物よりも少なくとも５ヌクレオチド短く、任意選択的に、第１の標的生成物よりも少なくとも１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、又は少なくとも３３０ヌクレオチド短い。

【０１０７】

いくつかの実施形態では、第１の調整された競合生成物は、第１の標的生成物よりも少なくとも５ヌクレオチド長く、任意選択的に、第１の標的生成物よりも少なくとも１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、又は少なくとも３３０ヌクレオチド長い。

【０１０８】

当業者は、適切に調整された競合ポリヌクレオチドを生成するために、上記のパラメータ（すなわち、ＧＣ含有量、配列同一性、及びアンプリコンの長さ）のうちの１つ又は全ての任意の組み合わせを使用することができることを理解するであろう。

【０１０９】

増幅後、増幅生成物が検出されることは、当業者には明らかであろう。いくつかの事例では、特定の生成物の存在又は不在を検出するだけで十分である。他の例では、生成物の実際の存在量又は相対存在量の決定が必要である。ゲルベースの電気泳動アッセイ（例えば、ラテラルフローストリップ）上での増幅生成物の親和性ベースの捕捉、及び蛍光標識プローブベースのアッセイを含む、増幅生成物の存在又は量を決定するために、当業者に利用可能な様々な手段がある。

【０１１０】

本発明は、少なくとも２つの標的ポリヌクレオチドの相対存在量を決定するために使用される場合、特に強力である。したがって、いくつかの実施形態では、１つ以上の標的生成物、任意選択的に、１つ以上の標的ＰＣＲ生成物、及び１つ以上の調整された競合生成物、任意選択的に、１つ以上の競合ポリヌクレオチドＰＣＲ生成物が検出される。

【０１１１】

好ましい実施形態では、各標的生成物及び各対応する競合生成物が検出される。特に好ましい実施形態では、検出は、蛍光標識プローブの使用を伴い、どれだけ多くの標的及び競合が検出されても、検出は、２つの異なるフルオロフォアのみを使用する。各プローブからの蛍光（すなわち、両方のフルオロフォアからの蛍光を１回読み取るだけ）を合計すると、単一の全体値が生成される（すなわち、蛍光標識のうちのどれがより高いか）。これは次に、診断又は予後に対応している。

【０１１２】

したがって、いくつかの実施形態では、本方法は、１つ以上のプローブ群を提供することを含み、各プローブ群は、第１の標識で標識された少なくとも１つのプローブポリヌクレオチド及び第２の標識で標識された少なくとも１つのプローブポリヌクレオチドを含み、第１の標識と第２の標識とが異なる。

【０１１３】

いくつかの事例では、第１の標識で標識された少なくとも１つのプローブは、第１の標的生成物にハイブリダイズすることができ、第２の標識で標識された少なくとも１つのプローブは、第１の調整された競合生成物にハイブリダイズすることができる。いくつかの実施形態では、いずれのプローブも、第１の標的生成物にハイブリダイズすることができない。

【０１１４】

他の例では、第１の標識で標識された少なくとも１つのプローブは、第１の調整された競合生成物にハイブリダイズすることができ、第２の標識で標識された少なくとも１つのプローブは、第２の調整された競合生成物にハイブリダイズすることができる。いくつかの実施形態では、いずれのプローブも、第１の標的生成物にハイブリダイズすることができない。

【０１１５】

上記は、いくつかの遺伝子は、発現レベルが対照（例えば、非疾患）試料と比較して増加している場合、予測的又は診断的であり得、いくつかの遺伝子は、発現レベルが対照試料と比較して減少している場合、予測的又は診断的であり得るという事実を反映している。当業者は、全蛍光の組み合わせが遺伝子発現の方向を考慮に入れるように、正しい標識が正しいプローブに割り当てられることを確実にすることができるであろう。本発明の重要な特徴は、それが、情報を提供する標識間の差であり、どの標識が「正」のシグナルを提供し、どの標識が「負」のシグナルを提供するかは、当業者によって決定されることである。

【０１１６】

特定のプローブ群は、２つの異なる標識のうちの１つで各々標識された一連のプローブを表す。上記のように、本方法を使用して、いくつかの異なる標的生成物及び競合生成物が検出され得ることは明らかであろう。したがって、いくつかの実施形態では、単一のプローブ群内に、第１の標識で各々標識された少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、

３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、又は少なくとも１００個の異なるプローブが存在する。同じ又は他の実施形態では、単一のプローブ群内に、第２の標識で各々標識された少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、又は少なくとも１００個の異なるプローブが存在する。上記の直接法は、典型的には、標的生成物にハイブリダイズすることができる１つの標識を有する１つのプローブと、対応する競合生成物にハイブリダイズすることができる第２の標識で標識された対応するプローブと、を必要とする（すなわち、１：１の比率のプローブ（ただし、標識は、予測的関係又は差次的遺伝子調節シグネチャに応じて、上記のように交換され得る）。間接法は、必ずしもこの１：１の比率を必要としない（例えば、単一の標的生成物が２つ以上の競合生成物に関連し得るため）。

【０１１７】

したがって、いくつかの実施形態では、単一のプローブ群内に、
第１の標識で各々標識された少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、又は少なくとも１００個の異なるプローブ、及び
第２の標識で各々標識された少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、又は少なくとも１００個の異なるプローブが存在する。

【０１１８】

いくつかの実施形態では、適切なプローブは、以下のとおりである。

【表２】

/56-FAM/AGCTGTGAG/Zen/ACGAAGGCTTCATGC/3IABkFQ/	配列番号 77
/5HEX/TAGAGAGGT/ZEN/TACCAGAGCGTTGCC/3IABkFQ/	配列番号 78
/56-FAM/AGTTTCTCA/Zen/AGCAGACCAGCCTTTCTC/3IABkFQ/	配列番号 79
/56-HEX/CCAGAGTTC/Zen/CCAGACGATTCCCA/3IABkFQ/	配列番号 80

【０１１９】

上記のように、本方法の威力は、少なくとも、いくつかの異なる標的及び競合の検出を２つの単一の読み取りに組み合わせることに由来し（すなわち、第１の標識の読み取り及び第２の標識の読み取りであって、両方とも単一の読み取りで行うことができる）、それら自体は、単一の読み取り（第１の標識の量対第２の標識の量）に組み合わされる。

【０１２０】

しかしながら、より多くの遺伝子の発現の分析が必要な場合、又はより複雑なネットワークの分析が必要な場合、例えば、第３及び第４のプライマーで標識された更なるプローブ群（又は、第５及び第６の標識で標識された第３のプローブ群など）を使用することが可能である。このようにして、第１のプローブ群（第１及び第２の標識の読み取り、続いて、第１の標識の量対第２の標識の量）及び第２のプローブ群（第３及び第４の標識の読み取り、続いて、第３の標識の量対第４の標識の量）を使用して、１セットの遺伝子を分析することができる。必要に応じて、第１：第２：第３：第４の標識の全体的な読み取りを行うことができる。これは全て、用いられている予測的関係又は差次的遺伝子調節シグネチャに依存するであろう。

【０１２１】

したがって、いくつかの実施形態では、本方法は、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、

９５、又は少なくとも１００個の異なるプローブ群を提供することを含み、特定の標識が１つ以上のプローブ群で使用されることはない。

【０１２２】

いくつかの実施形態では、本方法は、各標的生成物が対応する標識された標的プローブポリヌクレオチドを有し、各調整された競合生成物が対応する標識された競合プローブを有するように、いくつかの標識されたプローブポリヌクレオチドを提供することを含み、標的生成物及び調整された競合生成物に対応する標識プローブは、異なる標識で標識される。

【０１２３】

いくつかの実施形態では、プローブ上に存在する標識は、第１の標識及び第２の標識のみである。

【０１２４】

いくつかの実施形態では、各プローブは、単一のタイプの標識で標識される。例えば、各プローブにはＨＥＸのみで標識されているか、ＦＡＭのみで標識されており、ＨＥＸ及びＦＡＭの両方は標識されていない。しかしながら、各プローブは、同じ標識の２つ以上の分子で標識されてもよく、例えば、１、２、３、４、５、又はそれ以上のＨＥＸで標識されてもよいことは、当業者には明らかであろう。

【０１２５】

プローブは、任意のタイプの検出可能な標識、例えば、色の変化をもたらす酵素ベースの標識で標識され得る。好ましくは、標識は、フルオロフォアである。したがって、いくつかの実施形態では、第１及び第２の標識は、フルオロフォアである。フルオロフォア標識プローブの例は、「ＴａｑＭａｎ」プローブ（クエンチャーの近くからフルオロフォアを遊離するのに分解を必要とする）、Ｈｙｂｅａｃｏｎ（標的に結合したときにのみ光る）及び分子ビーコンＭｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｅａｃｏｎ（フルオロフォアはプローブを介してつながれたままであるが、アンプリコンに結合した場合、２つのフルオロフォアを物理的に遠ざける）、並びにＳｃｏｒｐｉｏｎ　ｐｒｏｂｅである。

【０１２６】

したがって、上記から、フルオロフォアへの言及は、クエンチャーも存在しない可能性があることを意味するわけではないことは明らかであろう。例えば、いくつかの実施形態では、プローブは、第１及び第２のフルオロフォアで標識される。しかしながら、各プローブはまた、当業者によって理解されるように、適切なクエンチャーで標識され得る。

【０１２７】

代替的に、プローブは、親和性ベースの分離を意図した様式で標識され得る（例えば、核酸ラテラルフローイムノアッセイのためのＡｂｉｎｇｄｏｎプローブ（ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ａｂｉｎｇｄｏｎｈｅａｌｔｈ．ｃｏｍ／ｏｔｈｅｒ－ｐｒｏｄｕｃｔｓ／ｎｕｃｌｅｉｃ－ａｃｉｄ－ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ－ｐｃｒｄ／）及びＴｗｉｓｔｄｘによって提供されるプローブ（ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｔｗｉｓｔｄｘ．ｃｏ．ｕｋ／ｄｏｃｓ／ｄｅｆａｕｌｔ－ｓｏｕｒｃｅ／Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ－ｎｏｔｅｓ／ａｐｐ－ｎｏｔｅ－００１－－－ｐｃｒｄ－ｒｐａ－ｕｓｅ－ｖ１－７．ｐｄｆ？ｓｆｖｒｓｎ＝６１５４０３ｆｃ＿４６）を参照されたい）。かかる実施形態の一例として、一方のプローブは、ＦＡＭで標識され、他方は、ハプテンジゴキシゲニン（ＤＩＧ）で標識される。標的及び競合の各プライマーは、ビオチンで標識され、したがって、増幅は、一端がビオチンで標識され、かつ他端がＦＡＭで標識されたあるアンプリコン、並びに一端がビオチンで標識され、かつ他端がＤＩＧで標識された他のアンプリコンを生成する。アンプリコンを、ストレプトアビジンでコーティングされた金ナノ粒子の溶液と混合する。ナノ粒子は、ビオチンに結合してナノ粒子－アンプリコン複合体を形成し、次いで、ラテラルフローストリップを流れ上がるようにする。このストリップアクト上の別々の線に印刷された抗ＦＡＭ抗体及び抗ＤＩＧ抗体は、それぞれのアンプリコンに結合する親和性精製剤として作用する。これにより、金ナノ粒子が、印刷された線で捕捉され、肉眼で見える濃い赤いバンドが生成される。これら２つのバンドの相対強度は、上記の２つのフルオロフォアの

相対強度と同じ様式で「シグナル」を提供する。

【０１２８】

当業者は、核酸標的へのハイブリダイゼーションを介して機能するプローブに何が必要かを理解している。例えば、プローブは、標的の関連領域と１００％同一の配列を有し得る。しかしながら、当業者はまた、配列が１００％同一である必要はないことも理解している。かかるハイブリダイゼーションプローブを設計することは、当業者にとって完全に日常的である。

【０１２９】

当業者は、フルオロフォアが何を意味するのかを理解し、適切なフルオロフォア又はフルオロフォア対を特定することができる。好ましくは、第１及び第２のフルオロフォアは、それらが異なる発光スペクトルを有するように選択される。例示的なフルオロフォアは、ＴＡＭ、ＳＵＮ、ＶＩＣ、ＴＥＴ、ＪＯＥ、シアニン色素（Ｃｙ３、Ｃｙ３．５、Ｃｙ５、Ｃｙ５．５）、Ａｔｔｏ色素、及びＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（例えば、ｈｔｔｐｓ：／／ｅｕ．ｉｄｔｄｎａ．ｃｏｍ／ｓｉｔｅ／Ｃａｔａｌｏｇ／ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎｓ／ｄｙｅｓ及びｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｔｒｉｌｉｎｋｂｉｏｔｅｃｈ．ｃｏｍ／ｏｍｉ－Ｆｉｇｕｒｅ　７を参照）である。

【０１３０】

特に有用な組み合わせは、ＦＡＭとＨＥＸ、ＣＹ３とＣＹ５、及びＦＡＭ、ＨＥＸ、ＴＥＴとＣｙ５の任意の組み合わせであると考えられる。

【０１３１】

特に有用な一対のフルオロフォアは、ＦＡＭとＨＥＸである。

【０１３２】

したがって、一実施形態では、第１の標識は、ＦＡＭであり、第２の標識は、ＨＥＸである。別の実施形態では、第１の標識はＨＥＸであり、第２の標識はＦＡＭである。

【０１３３】

標的生成物に結合するプローブ及び対応する競合生成物に結合するプローブは、異なる標識で標識されることが重要である。そのため、各生成物の相対量が決定されるか、又は異なる標的生成物及び異なる競合生成物の量の全体的な決定に組み込まれ得る。

【０１３４】

したがって、一実施形態では、第１の標的生成物にハイブリダイズすることができる少なくとも１つのプローブ及び第１の調整された競合生成物にハイブリダイズすることができる少なくとも１つのプローブは、異なる標識で標識される。

【０１３５】

同じ又は異なる実施形態では、第１の調整された競合生成物にハイブリダイズすることができる少なくとも１つのプローブと、第２の調整された競合生成物にハイブリダイズすることができる少なくとも１つのプローブとは、異なる標識で標識される。

【０１３６】

遺伝子の発現が対照試料又は対照レベルと比較して増加したときに、遺伝子群が特定の状態（例えば、疾患、予後）の全てを予測するいくつかの実施形態では、標的生成物にハイブリダイズすることができる各プローブが、同じ第１の標識で標識され、調整された競合生成物にハイブリダイズすることができる各プローブは、同じ第２の標識で標識されることが適切である。

【０１３７】

しかしながら、上記のいくつか実施形態では、いくつかの遺伝子は、遺伝子発現が抑制された場合の特定の状態を予測する。多くの予測的関係又は差次的遺伝子調節シグネチャ及びネットワークは、いくつかの遺伝子の発現の増加及び他の遺伝子の同時抑制を伴うため、これが、本方法からの単純な出力に反映され得ることが重要である。したがって、いくつかの実施形態では、標的生成物にハイブリダイズすることができるプローブのうちの少なくとも１つは、第１の標識で標識され、調整された競合生成物にハイブリダイズすることができるプローブのうちの少なくとも１つは、同じ第１の標識で標識される。

【０１３８】
いくつかの事例では、所与の増幅反応内で、第１の標識で標識された標的生成物にハイブリダイズすることができるプローブ、第２の標識で標識された標的生成物にハイブリダイズすることができるプローブ、第１の標識で標識された競合生成物にハイブリダイズすることができるプローブ、及び第２の標識で標識された競合生成物にハイブリダイズすることができるプローブが存在する。
【０１３９】
いくつかの実施形態では、特定の状態の正の予測的関係若しくは差次的遺伝子調節シグネチャに関連する標的ポリヌクレオチド生成物にハイブリダイズすることができる各プローブは、第１の標識で標識され、調整された競合ポリヌクレオチド生成物にハイブリダイズすることができる対応するプローブは、第２の標識で標識され、かつ／又は
特定の状態の負の予測的関係若しくは差次的遺伝子調節シグネチャに関連する標的ポリヌクレオチド生成物にハイブリダイズすることができる各プローブは、第２の標識で標識され、調整された競合ポリヌクレオチド生成物にハイブリダイズすることができる対応するプローブは、第１の標識で標識される。
【０１４０】
いくつかの事例では、増幅後に、第１のプローブによって検出される各生成物の実際の量及び第２のプローブによって検出される生成物の量が決定される。
【０１４１】
他の実施形態では、決定されるものは、各プローブの相対量である。例えば、いくつかの実施形態では、各プローブの相対量を標準曲線と比較して、１つ以上の状態の相対確率を決定する。
【０１４２】
適切な標準曲線を生成することは、当業者にとって日常的であり、生のシグナル（又は、この場合、シグナル間の差）を予測／診断に関連付けるために、個々のユーザ又は製造業者のいずれかによる較正を必要とするであろう。
【０１４３】
本発明の利点は、例えば、多重ＰＣＲを介して、多数の異なる発現パターンの調査を同時に可能にすることであり、２つのみ又はおそらく少数（例えば、３、４、５、６つ）の異なるフルオロフォアを使用するため、いくつかの異なる発現パターンを同時に調査することが可能になることであり、存在量若しくは相対存在量又は各生成物を単一の読み取り（例えば、複数の波長（チャネル）にわたる単一の読み取り）に凝縮して、各プローブ標識からの蛍光の量、又は同じ試料上で迅速に連続して実行される複数の読み取りを検出することが可能になることである。
【０１４４】
次いで、本発明の方法は、所与の遺伝子転写産物又は転写産物のセットによって提供される情報を、特定の状態の相対確率に変換することが明らかであろう。
【０１４５】
本明細書に記載の方法は、遺伝子発現ネットワークの一部の状態を、任意選択的に、単一の値として捕捉する。
【０１４６】
当業者には、標的ポリヌクレオチドが、増幅することができる限り、任意の供給源由来の任意の核酸であり得ることが明らかであろう。一実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、ＲＮＡであり、任意選択的に、ＲＮＡ転写産物であり、任意選択的に、ｍＲＮＡである。いくつかの実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、ｍｉＲＮＡ、ｌｎｃＲＮＡ、又はｓｉＲＮＡである。
【０１４７】
標的ポリヌクレオチドはまた、ＤＮＡであり得る。ＤＮＡは、ＤＮＡの修飾形態であり得る。
【０１４８】

試料は、核酸を含むか、又は核酸を含むと予想される任意の試料であり得る。

【０１４９】

本発明の方法は、医学的使用並びにバイオテクノロジー／バイオプロダクト使用の両方を有する。試料は、組織、生検、血液、血漿、血清、病原体、微生物細胞、細胞培養物、及び細胞溶解物を含むか又はそれらからなる群から選択され得る。

【０１５０】

試料は、任意の供給源の核酸を含むことができる。いくつかの実施例では、試料は、細胞、任意選択的に、白血球及び／若しくは赤血球、エクソソーム、循環腫瘍ＤＮＡ（ｃｔＤＮＡ）、無細胞ＤＮＡ（ｃｆＤＮＡ）、ＲＮＡ、又は病原体核酸のうちのいずれか１つ以上を含む。

【０１５１】

細胞は、任意の細胞型であり得る。例えば、細胞は、哺乳類細胞、細菌細胞、酵母細胞、又は植物細胞であり得る。哺乳類細胞は、ヒト細胞であってもよく、又はヒト細胞に由来してもよい。

【０１５２】

細胞は、培養細胞、任意選択的に、患者由来初代細胞、又は不死化細胞株であり得る。

【０１５３】

細胞は、哺乳類幹細胞であり得る。

【０１５４】

いくつかの実施形態では、細胞は、操作された細胞、任意選択的に、代謝物及び化合物のバイオプロダクションに使用される操作された細胞である。

【０１５５】

細胞は、酵母細胞であってもよく、任意選択的に、酵母細胞は醸造に使用される。

【０１５６】

上記から明らかなように、本発明の方法は、いくつかの好ましい実施形態では、少なくとも第１及び第２の標的ポリヌクレオチドの増幅のための方法である。

【０１５７】

いくつかの実施形態では、本方法は、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、又は少なくとも１００個の標的ポリヌクレオチドの増幅のための方法である。

【０１５８】

上記のように、本方法はまた、「冗長」モデルと呼ばれるものも含み、同じ物理的標的ポリヌクレオチド分子の少なくとも２つ以上の部分が増幅される。

【０１５９】

したがって、いくつかの実施形態では、第１及び第２の標的ポリヌクレオチドは、同じ単一のポリヌクレオチド内の標的配列である。

【０１６０】

いくつかの特定の実施形態では、本方法は、第１及び第２の標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズし、第１の標的生成物及び第２の標的生成物を生成することができる少なくとも１つのプライマーによる調整された競合ポリヌクレオチドの増幅を含む。

【０１６１】

いくつかの実施形態では、本方法は、２つの調整された競合ポリヌクレオチドの増幅を含み、本方法は、

第１の標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができる少なくとも１つのプライマーによる第１の調整された競合ポリヌクレオチドの増幅と、

第２の標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができる少なくとも１つのプライマーによる第２の調整された競合ポリヌクレオチドの増幅と、を含む。

【０１６２】

増幅に続いて、生成物の検出（例えば、フルオロフォア標識プローブによって生成され

たシグナルの検出）が、１つ以上の標的ポリヌクレオチドの
ｉ）存在若しくは不在、
ｉｉ）特定の所定の開始濃度、
ｉｉｉ）所定のレベルを上回る若しくは下回る開始濃度、及び／又は
ｉｖ）所定の範囲内にある開始濃度、
のうちのいずれか１つ以上を示すことは明らかであろう。

【０１６３】

いくつかの実施形態では、上記の（ｉ）、（ｉｉ）、（ｉｉｉ）、及び／又は（ｉｖ）は、
ａ）特定の遺伝子の相対発現、
ｂ）２つ以上の特定の遺伝子の相対発現、
ｃ）１つ以上のハウスキーピング遺伝子の発現、
ｄ）特定の遺伝子の発現シグネチャの発現、
ｅ）１つ又は複数の遺伝子の特定のアレルバリアントの発現、
ｆ）遺伝子の変異バージョンの発現、
ｇ）無細胞腫瘍ＤＮＡの発現、のうちの１つ以上を示し、
標的ポリヌクレオチドが、（ａ）～（ｇ）の既知の配列の１つ以上の部分から選択される。

【０１６４】

本明細書で言及されるように、本発明の方法は、特定の試料が特定の状態Ｂよりもむしろ特定の状態Ａにある可能性が高いかどうかを決定するために使用され得る。状態は、予測的関係又は差次的遺伝子調節シグネチャが基づく状態である。いくつかの事例では、状態は、「特定の疾患」対「疾患なし」、又は「特定の疾患」対「他の疾患」、又は「特定の疾患」対「特定の疾患なし」であり得る。

【０１６５】

本発明によって提供される方法のいずれも、対象における疾患若しくは状態の診断及び／又は予後のためのものであり得る。

【０１６６】

したがって、本発明はまた、対象における疾患若しくは状態の診断及び／又は予後のための方法を提供する。

【０１６７】

いくつかの事例では、疾患又は状態を診断するには、少なくとも２つの遺伝子の相対発現レベルの評価が必要であり、任意選択的に、少なくとも３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、又は少なくとも１００個の遺伝子の相対発現レベルの評価が必要である。

【０１６８】

いくつかの実施形態では、疾患又は状態は、ヒト結核、ＨＩＶ同時感染を伴うヒト結核、ＨＩＶ同時感染を伴わないヒト結核、がん、任意選択的に、前立腺がん、敗血症、カンジダ血症（ｂｌｏｏｄｓｔｒｅａｍ ｃａｎｄｉｄｉａｓｉｓ）、ウシ結核、ウシ乳房炎から選択される。特定の実施形態では、疾患は、結核である。

【０１６９】

非常に特定の実施形態では、疾患は、結核であり、差次的遺伝子調節シグネチャ及び／又は予測的関係又は差次的遺伝子調節シグネチャは、対象の白血球から特定される。

【０１７０】

いくつかの実施形態では、疾患が結核である場合、ＧＢＰ６、ＡＲＧ１、及びＴＭＣＣ１の差次的調節の程度は、いくつかの「他の疾患」を有することと比較して、結核を有する全体的な確率に寄与する。遺伝子発現シグネチャは、結核を有しない患者におけるこれらの遺伝子のレベルと比較した、ＧＢＰ６の上方調節、並びにＡＲＧ１及びＴＭＣＣ１の下方調節である。

【０１７１】

疾患が結核であり、ＧＢＰ６、ＡＲＧ１、及びＴＭＣＣ１の差次的調節の程度が、いくつかの「他の疾患」を有するものと比較して、結核を有する全体的な確率に寄与する実施形態では、図１７に、使用され得るプライマー及び競合配列の例を示す。
図１７では、ＷＴ配列は、いずれの場合も標的配列である。Ｆプライマー及びＲプライマー配列は、標的配列及び対応する競合配列を増幅するために使用される配列である。「コア」配列は、２つのプライマーアニーリング部位間の競合配列であり、「全配列」は、２つのプライマーによって増幅される全標的又は競合オリゴヌクレオチドの配列である。
【０１７２】
一実施形態では、標的がＴＭＣＣ１であり、標的配列が配列番号４である場合、最適な競合を決定するために使用される適切な競合配列は、配列番号６、８、１０、１２、１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、及び３６であるとみなされる。標的及び競合の増幅のための適切なプライマーを、配列番号１及び３に示す。この標的の寄与を検出するための適切なプローブを、配列番号７７及び７８に示す。
【０１７３】
一実施形態では、標的がＡＲＧ１であり、標的配列が配列番号４０である場合、最適な競合を決定するために使用される適切な競合配列は、配列番号４２、４４、４６、及び４８であるとみなされる。標的及び競合の増幅のための適切なプライマーを、配列番号３７及び３９に示す。この標的の寄与を検出するための適切なプローブを、配列番号７９及び７８に示す。
【０１７４】
一実施形態では、標的がＧＢＰ６であり、標的配列が配列番号５２である場合、最適な競合を決定するために使用される適切な競合配列は、配列番号５４、５６、及び５８であるとみなされる。標的及び競合の増幅のための適切なプライマーを、配列番号４９及び５１に示す。この標的の寄与を検出するための適切なプローブを、配列番号８０及び７７に示す。
【０１７５】
他の実施形態では、疾患は、がんであり、例えば、前立腺がん又は乳がん、任意選択的に、前立腺がんである。
【０１７６】
疾患が前立腺がんである場合、使用可能なプライマー及びプローブは、以下のとおりである：
【０１７７】
いくつかの実施形態では、疾患は、がんであり、遺伝子の変異バージョン、特定のアレルバリアント、及び／又は無細胞腫瘍ＤＮＡの相対発現が検出される。
【０１７８】
本明細書に記載の方法及び実施形態のいずれかにおいて、標的ポリヌクレオチドは、疾患状態に関連する（任意選択的に、腫瘍及び／又はがんの存在に関連する）、ＳＮＰ、ＳＮＶ（単一ヌクレオチドバリアント）、インデル、又はコピー数バリアント（ＣＮＶ）を含み得、例えば、無細胞腫瘍ＤＮＡにおけるｓｎｐ、ｓｎｖ、又はインデルを含み得る。
【０１７９】
いくつかの実施形態では、標的は、ＥＧＦＲ（特に、ＥＧＦＲにおけるＳＮＰ）である。いくつかの実施形態では、標的配列は、配列番号６２であり、適切な競合配列は、配列番号６４、６７、及び７１である。適切なプライマー配列は、配列番号６８及び７０である。
【０１８０】
いくつかの方法では、ブロッカーオリゴヌクレオチドが使用され、ブロッカーオリゴヌクレオチドは、その３’末端の伸長を受けることができず、ブロッカーオリゴヌクレオチドは、一塩基多型を含む少なくとも１つの標的ポリヌクレオチドにおける配列の部分に相補的ではなく、任意選択的に、ｓｎｐは、ｓｎｖであるが、ブロッカーオリゴヌクレオチドは、対応する野生型配列に相補的であり、ブロッカーオリゴヌクレオチドに相補的である

配列を含む標的ポリヌクレオチドにおける配列は、プライマーのうちの１つに相補的な配列の少なくとも一部と重複する。

【０１８１】

いくつかの事例では、適切なブロッカー配列は、配列番号７５及び７６である。

【０１８２】

いくつかの事例では、試料は、特定の疾患又は状態を有することが既に疑われている対象から得られる。他の事例では、本方法は、日常的なスクリーニングプログラムの一部として使用することができ、この場合、標的ポリヌクレオチドは、特定の疾患又は状態を有すると疑われない対象から得られた試料に由来してもよい。対象は、例えば、年齢又はライフスタイルに起因して、特定の疾患又は状態のリスクがあるとみなされ得る。

【０１８３】

ここで述べたように、本発明は、医学的使用に加えて、バイオエンジニアリング及び産業バイオテクノロジーの分野において有用である。いくつかの実施形態では、特定の１つ又は複数の遺伝子の相対発現の検出は、培養物中の細胞の特定の天然の遺伝子及び／又は操作された遺伝子の発現を示すものであり、例えば、細胞若しくはシステムが好ましく挙動しているかどうか、又は培養パラメータを最適化する必要があるかどうかを、当業者が決定することを可能にすることができる。

【０１８４】

上記のように、任意の増幅手段が、本発明での使用に好適である。しかしながら、好ましい増幅方法としては、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）又はリコンビナーゼポリメラーゼ反応（ＲＰＡ）が挙げられる。

【０１８５】

上記からわかるように、本発明は、１つ以上の標的ポリヌクレオチドの増幅のための多数の方法を提供する。最初に示したように、本発明は、

試料中の少なくとも２つのオリゴヌクレオチドの相対存在量（例えば、少なくとも２つの遺伝子の相対発現）又は少なくとも２つの変異の存在若しくは不在を、特定の状態の相対確率に変換する方法、

２つのフルオロフォア標識プローブのみを使用して、試料中の少なくとも３つのオリゴヌクレオチドの相対存在量（例えば、少なくとも３つの遺伝子の相対発現）又は少なくとも３つの変異の存在若しくは不在を検出する方法、

試料中の少なくとも２つのオリゴヌクレオチドの相対存在量（例えば、少なくとも２つの遺伝子の相対発現）又は少なくとも２つの変異の存在若しくは不在を、単一の値に組み合わせる方法、

試料中の少なくとも２つのオリゴヌクレオチドの相対存在量又は少なくとも２つの変異の存在若しくは不在によって提供される予測的関係、決定面、又は差次的標的オリゴヌクレオチドパターン（例えば、差次的遺伝子調節シグネチャ）を、単一の値に変換する方法、

競合増幅ネットワークを用いて、統計情報を模倣する方法、

及び

複雑な遺伝子発現パターンを、単一の値に低減する方法、を提供し、

本方法は、試料中の１つ以上の標的ポリヌクレオチドを増幅するステップを含む。１つ以上の標的ポリヌクレオチドを増幅するステップは、本明細書に記載の増幅方法のいずれかに従って行うことができる。

【０１８６】

本発明は、対象における疾患若しくは状態の診断又は予後の方法を更に提供し、本方法は、本発明の増幅方法のいずれかを含む。いくつかの実施形態では、対象は、第１の標識及び第２の標識の相対量が疾患若しくは状態の予後を示す場合、疾患若しくは状態又は疾患若しくは状態の予後を有すると診断される。

【０１８７】

上記のように、疾患又は状態は、ヒト結核、ＨＩＶ同時感染を伴うヒト結核、ＨＩＶ同時感染を伴わないヒト結核、がん、任意選択的に、前立腺がん又は乳がん、敗血症、カン

ジダ血症、ウシ結核、ウシ乳房炎から選択され得る。疾患又は状態の選好は、本明細書の他箇所に記載のとおりである。

【０１８８】

本発明はまた、本発明の方法を実施するために使用することができる様々な組成物及びキットも提供する。例えば、本発明は、以下のうちの１つ以上を含む組成物を提供する：

ａ）本明細書に記載される少なくとも１つの標的ポリヌクレオチド、

ｂ）本明細書に記載される少なくとも１つの調整された競合ポリヌクレオチド、

ｃ）本明細書に定義される少なくとも１つのプライマー、好ましくは少なくとも２つのプライマー、

ｄ）本明細書に定義される少なくとも１つ以上のプローブ群であって、各プローブ群が、第１の標識で標識された少なくとも１つのプローブポリヌクレオチド及び第２の標識で標識された少なくとも１つのプローブポリヌクレオチドを含む、プローブ群。

【０１８９】

当業者は、核酸増幅のための組成物が、１つ以上の標準的な増幅成分（例えば、ポリメラーゼ酵素、適切な量の４つのヌクレオチドＡ、Ｃ、Ｔ、及びＧの各々、リコンビナーゼ酵素、一本鎖結合タンパク質、並びに／又は適切な量のヌクレオチドＡ、Ｃ、Ｔ、Ｇ、及びＵの各々）を含み得ることを理解するであろう。

【０１９０】

本発明はまた、本明細書に定義される調整された競合ポリヌクレオチドも提供する。調整された競合ポリヌクレオチドの特徴の選好は、本明細書の他箇所に記載されている。

【０１９１】

本発明はまた、本発明の方法のいずれかを実施するためのキットを提供し、例えば、キットは、以下のうちの１つ以上を含む：

ａ）本明細書に記載される１つ以上の調整された競合ポリヌクレオチド、

ｂ）本明細書に記載される１つ以上のプライマー、

ｃ）本明細書に記載される第１の標識で標識された第１のプローブポリヌクレオチド及び本明細書に記載される第２の標識で標識された第２のプローブポリヌクレオチド、

ｄ）好適な緩衝液、

ｅ）使用説明書。

【０１９２】

特定の実施形態では、キットは、以下を含む：

ａ）本明細書に記載される１つ以上の調整された競合ポリヌクレオチド、

ｂ）本明細書に記載される１つ以上のプライマー、

ｃ）本明細書に記載される第１の標識で標識された第１のプローブポリヌクレオチド及び本明細書に記載される第２の標識で標識された第２のプローブポリヌクレオチド。

【０１９３】

本発明はまた、以下のうちのいずれか１つ以上を含む組成物も提供する：

ａ）本明細書に記載される１つ以上の調整された競合ポリヌクレオチド、

ｂ）本明細書に記載される１つ以上のプライマー、

ｃ）本明細書に記載される第１の標識で標識された第１のプローブポリヌクレオチド及び本明細書に記載される第２の標識で標識された第２のプローブポリヌクレオチド。

【０１９４】

一実施形態では、組成物は、以下を含む：

ａ）本明細書に記載される１つ以上の調整された競合ポリヌクレオチド、及び

ｂ）本明細書に記載される１つ以上のプライマー。

【０１９５】

一実施形態では、組成物は、以下を含む：

ａ）本明細書に記載される１つ以上の調整された競合ポリヌクレオチド、及び

ｃ）本明細書に記載される第１の標識で標識された第１のプローブポリヌクレオチド及び本明細書に記載される第２の標識で標識された第２のプローブポリヌクレオチド。

【０１９６】
一実施形態では、組成物は、以下を含む：
ｂ）本明細書に記載される１つ以上のプライマー、
ｃ）本明細書に記載される第１の標識で標識された第１のプローブポリヌクレオチド及び本明細書に記載される第２の標識で標識された第２のプローブポリヌクレオチド。
【０１９７】
一実施形態では、組成物は、以下を含む：
ａ）本明細書に記載される１つ以上の調整された競合ポリヌクレオチド、
ｂ）本明細書に記載される１つ以上のプライマー、
ｃ）本明細書に記載される第１の標識で標識された第１のプローブポリヌクレオチド及び本明細書に記載される第２の標識で標識された第２のプローブポリヌクレオチド。
【０１９８】
一実施形態では、キット又は組成物は、図１７に示される配列のうちのいずれか１つ以上を含む。
【０１９９】
一実施形態では、キット又は組成物は、ＴＭＣＣ１　ｍＲＮＡの一部を増幅するためのものであり、配列番号６、８、１０、１２、１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、及び３６の競合配列のうちのいずれか１つを含む。いくつかの実施形態では、キット又は組成物はまた、標的及び競合を増幅するための適切なプライマー（例えば、配列番号１及び３のもの）も含む。
【０２００】
同じ又は異なる実施形態では、キット又は組成物は、ＡＲＧ１　ｍＲＮＡの一部を増幅するためのものであるか、又はそれを増幅するためのものでもあり、配列番号４２、４４、４６、及び４８の競合配列のうちのいずれか１つ以上を含む。いくつかの実施形態では、キット又は組成物はまた、標的及び競合を増幅するための適切なプライマー（例えば、配列番号３９及び３９のもの）も含む。
【０２０１】
同じ又は異なる実施形態では、キット又は組成物は、ＧＢＰ６　ｍＲＮＡの一部を増幅するためのものであるか、又はそれを増幅するためのものでもあり、配列番号５４、５６、及び５８の競合配列のうちのいずれか１つ以上を含む。いくつかの実施形態では、キット又は組成物はまた、標的及び競合を増幅するための適切なプライマー（例えば、配列番号４９及び５１のもの）も含む。
【０２０２】
他の実施形態では、キット又は組成物は、野生型アレルとＬ８５８Ｒ　ＳＮＰなどの特定の変異とを区別するために、ＥＧＦＲゲノムＤＮＡの一部（例えば、ｃｔＤＮＡの試料中にあるゲノムＤＮＡ）を増幅するためのものであり、配列番号６４、６７、及び７１の競合配列のうちのいずれか１つ以上を含む。いくつかの実施形態では、キット又は組成物はまた、標的及び競合を増幅するための適切なプライマー（例えば、配列番号６８及び７０のもの）も含む。
【０２０３】
本発明はまた、本明細書に記載される少なくとも２つの調整された競合ポリヌクレオチドを含むコレクション又はキットを提供し、コレクションが、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２２、２４、２５、２６、２８、３０、３２、３４、３５、３６、３８、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、又は少なくとも２００個の調整された競合ポリヌクレオチドを含む。
【０２０４】
本発明はまた、少なくとも２つの調整された競合ポリヌクレオチド及び少なくとも２つの対応する標識プローブを含むコレクション又はキットを提供する。

【０２０５】
本発明はまた、以下を含むコレクション又はキットも提供する：
少なくとも２つの調整された競合ポリヌクレオチド、
最後に、２つの対応する標識プローブ、及び
少なくとも２つのプライマー。
【０２０６】
更に、本発明は、以下を含むコレクション又はキットを提供する：
先行請求項のいずれかによって定義される少なくとも２つの調整された競合ポリヌクレオチド、
最後に、先行請求項のいずれかによって定義される２つの対応する標識プローブ、
先行請求項のいずれかによって定義される少なくとも２つのプライマー。
【０２０７】
本発明はまた、第１の標的ポリヌクレオチドとの少なくとも第１のプライマーとのハイブリダイゼーションに対して競合し、第１の標的生成物及び第１の調整された競合生成物の増幅をもたらす、第１の競合ポリヌクレオチドを調整する方法も提供し、
ａ）増幅される調整された競合ポリヌクレオチドの割合と比較して、異なる割合の標的ポリヌクレオチドが増幅され、
ｂ）第１の標的ポリヌクレオチドの増幅が、標的ポリヌクレオチドの予測的関係若しくは差次的遺伝子調節シグネチャを特定の状態に近似、再現、若しくは一致させ、かつ／又は
ｃ）第１の標的ポリヌクレオチドの増幅率、及び任意選択的に、第２の標的ポリヌクレオチドの増幅率が、所定の重み付けに近似、再現、若しくは一致し、
本方法が、
第１の標的生成物の配列及び／又は第１の標的生成物の長さに関して、調整された競合ポリヌクレオチドの配列及び／又は調整された競合増幅生成物の長さを最適化することを含む。当業者が特定の状況に応じて競合ポリヌクレオチドをどのように調整するかについての詳細な議論が上に与えられており、また、例えば、以下の「ロジスティック回帰の模倣」セクションも参照されたい。
【０２０８】
本発明の競合ポリヌクレオチドを調整する方法はまた、
当該増幅に使用される第２のプライマーであって、第１の標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができ、それにより、第１の標的生成物が、２つのプライマーからのプライマー伸長によって生成される（任意選択的に、ＰＣＲによって生成される）、第２のプライマー、
当該増幅に使用される第３のプライマーであって、第１の調整された競合ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができ、それにより、第１の調整された競合生成物が、２つのプライマーからのプライマー伸長によって生成される（任意選択的に、ＰＣＲによって生成される）、第３のプライマー、も含み得、
任意選択的に、第２及び第３のプライマーが、同じ配列を有する。
【０２０９】
いくつかの事例では、当該最適化は、２つ以上の試験調整された競合ポリヌクレオチドを生成することを含み、増幅後、
ａ）増幅される調整された競合ポリヌクレオチドの割合と比較して、異なる割合の標的ポリヌクレオチドが増幅され、
ｂ）第１の標的ポリヌクレオチドの増幅が、標的の予測的関係若しくは差次的遺伝子調節シグネチャを特定の状態に近似、再現、若しくは一致させ、かつ／又は
ｃ）第１の標的ポリヌクレオチドの増幅率、及び任意選択的に、第２の標的ポリヌクレオチドの増幅率が、所定の重み付けに近似、再現、若しくは一致し、
第１の標的ポリヌクレオチドの最も好ましい増幅をもたらす調整された競合を選択することをもたらす。
【０２１０】

いくつかの事例では、当該最適化は、少なくとも３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０個の異なる試験調整された競合ポリヌクレオチドを産生することを含む。

【０２１１】

いくつかの実施形態では、当該最適化は、各試験調整された競合ポリヌクレオチドを用いて、少なくとも３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０回の試験増幅反応を行うことを含み、

任意選択的に、少なくとも３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０回の増幅反応が、少なくとも３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０の異なる標的ポリヌクレオチドの濃度及び／又は標的ポリヌクレオチド分子の数を使用して行われる。

【０２１２】

好ましい実施形態では、５回の増幅反応の少なくとも２回の反復が行われ、５回の増幅反応の各々は、異なる調整された競合ポリヌクレオチドを用いる。

【０２１３】

いくつかの事例では、特定の試験調整された競合ポリヌクレオチドを使用した各試験増幅は、異なる濃度及び／又は数の標的ポリヌクレオチド鋳型を使用して行われる。

【０２１４】

いくつかの実施形態では、試験増幅反応は、１００コピー／μＬ～10^8コピー／μＬにわたる範囲の濃度及び／又は数の標的ポリヌクレオチド鋳型を用いて行われる。

【０２１５】

本明細書に記載されるように、いくつかの事例では、試験調整された競合ポリヌクレオチドは、異なるＧＣ含有量を有するように設計される。

【０２１６】

また、本発明によって先行請求項のいずれか一項に記載の競合増幅反応を最適化する方法が提供され、当該最適化が、

ａ）合成核酸配列の開始濃度を増加又は減少させること、及び／又は

ｂ）核酸プライマーのいずれかの開始濃度を増加又は減少させること、を含む。

【０２１７】

本発明はまた、少なくとも２つの標的ポリヌクレオチドの多重競合増幅の方法を提供し、本方法は、少なくとも１つの競合ポリヌクレオチドを含み、標的増幅生成物が、同じ標識で標識された（任意選択的に、同じフルオロフォアで標識された）プローブを使用して検出され、任意選択的に、競合ポリヌクレオチドが、先行請求項のいずれかによる調整された競合ポリヌクレオチドである。

【０２１８】

本発明はまた、システムの転写状態を決定する方法を提供し、本方法は、本発明のいずれかの方法による競合増幅を含む。

【０２１９】

本発明はまた、システムが状態Ａ又は状態Ｂにあるかを決定する方法を提供し、本方法は、本発明のいずれかの方法による競合増幅を含む。

【０２２０】

本方法はまた、試料中の少なくとも２つの標的ポリヌクレオチドの同時競合増幅の方法を提供し、本方法は、

ａ）ポリヌクレオチドを含む試料、

ｂ）第１及び第２の調整された競合ポリヌクレオチド、

ｃ）第１のプライマーセットであって、プライマーセットが、第１の標的ポリヌクレオチド及び第１の競合ポリヌクレオチドの反対側の鎖上でハイブリダイズすることができて、第１の標的増幅生成物及び第１の競合増幅生成物の生成を可能にする２つのプライマーを含む、第１のプライマーセット、

ｄ）第２のプライマーセットであって、プライマーセットが、第２の標的ポリヌクレオチド及び第２の競合ポリヌクレオチドの反対側の鎖上でハイブリダイズすることができて、第２の標的生成物及び第２の競合生成物の生成を可能にする２つのプライマーを含む、第２のプライマーセット、
ｅ）第１のプローブ群であって、第１のプローブ群が、第１の標的増幅生成物にハイブリダイズすることができる第１の標識標的プローブ及び第１の競合増幅生成物にハイブリダイズすることができる第１の標識競合プローブを含む、第１のプローブ群、
ｄ）第２のプローブ群であって、第２のプローブ群が、第２の標的増幅生成物にハイブリダイズすることができる第２の標識標的プローブ及び第２の競合増幅生成物にハイブリダイズすることができる第２の標識競合プローブを含む、第２のプローブ群、を提供することを含み、
　ｉ）第１の標識標的プローブ及び第２の標的標識プローブが、同じ第１の標識で標識され、かつ第１の標識競合プローブ及び第２の標識競合プローブが、同じ第２の標識で標識されるか、又は
　ｉｉ）第１の標識標的プローブ及び第２の標識競合プローブが、同じ第１の標識で標識され、かつ第１の標識競合プローブ及び第２の標識標的プローブが、同じ第２の標識で標識され、
第１及び第２のプライマーセットが標的及び競合ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることを可能にする。

【０２２１】
　少なくとも２つの標的ポリヌクレオチドの同時競合増幅の方法のいくつかの実施形態では、本方法は、
ｅ）更なる１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０個のプライマーセット及び対応するプローブ群を提供することを含む。

【０２２２】
　少なくとも２つの標的ポリヌクレオチドの同時競合増幅の方法のいくつかの実施形態では、標識標的プローブのうちの１つは、第２の標識で標識され、対応する標識競合プローブは、第１の標識で標識される。

【０２２３】
　少なくとも２つの標的ポリヌクレオチドの同時競合増幅の方法のいくつかの実施形態では、本方法は、多重増幅後、第１の標識及び第２の標識の量を同時に検出することを更に含む。

【０２２４】
　本明細書における明らかに以前に公開された文書のリスト又は議論は、必ずしも、その文書が最新技術の一部であるか又は通常の一般的な知識であることを認めているとみなされるべきではない。

【０２２５】
　本発明の所与の態様、特徴、又はパラメータの選好及び選択肢は、文脈が別段の指示をしない限り、全ての他の態様のあらゆる選好及び選択肢と組み合わせて開示されているとみなされるべきである。例えば、本発明によって提供される特徴の例示的な組み合わせとしては、以下が挙げられる：

【０２２６】
　１）試料中の少なくとも２つの遺伝子の相対発現を単一の値に組み合わせる方法であって、本方法は、６つの標的ポリヌクレオチド及び６つの調整された競合ポリヌクレオチドを増幅するステップを含み、６つの標的増幅生成物が、各々、ＨＥＸで標識された異なるハイブリダイゼーションプローブでプローブされ、６つの調整された競合増幅生成物の各々が、ＦＡＭで標識された異なるハイブリダイゼーションプローブでプローブされる、方法、

【０２２７】
　２）がんを診断する方法であって、本方法が、試料中の１つ以上の標的ポリヌクレオチ

ドを増幅するステップを含み、本方法が、
　ａ）ポリヌクレオチドを含む試料、
　ｂ）第１の調整された競合ポリヌクレオチド、
　ｃ）少なくとも第１のプライマーであって、
　　試料中の第１の標的ポリヌクレオチド、及び
　　第１の調整された競合ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができる、少なくとも第１のプライマー、を提供することと、
標的ポリヌクレオチド（試料中に存在する場合）及び第１の調整された競合ポリヌクレオチドが増幅されるように、プライマー伸長反応を開始することと、を含み、
増幅が、第１の標的生成物及び第１の調整された競合生成物をもたらす、方法。

【０２２８】
　特定の出願のために本発明を実施するために当業者がとることができる全体的なアプローチの概要は、以下のとおりである：
ａ）開業医は、患者データに対して回帰（例えば、ロジスティック回帰）を行って、どの遺伝子転写産物を標的にするか、並びに各転写産物の発現レベルと診断確率との間の適切な関係の両方を決定することによって開始する。当業者は、ロジスティック回帰が行われ得る既存のデータを得ることができる。
ｂ）次に、開業医は、各標的転写産物について、ＣＡＮアーキテクチャ（すなわち、競合配列の数及び共有プライマーの配置）を選択する。ＣＡＮアーキテクチャを選択する例示的な方法は、本明細書の他箇所に記載されている。
ｃ）次いで、開業医は、患者データの回帰結果（例えば、各オリゴヌクレオチドの濃度及び所望の増幅挙動）を最適に要約する各ＣＡＮモジュールの理想的な成分を計算的に決定する。以前に取得したデータを使用して、開業医は、各競合オリゴヌクレオチドの設計パラメータ（長さ及びＧＣ含有量）を提案し、所望の増幅挙動をもたらす可能性が最も高いものを選択する。次いで、これらのパラメトリック設計を使用して配列設計を生成し、それらを取得し、標準的なＰＣＲ増幅を介して実験的に試験し、分析して、それらの挙動を説明することができる。これらの新しい観測は、マルチタスク回帰フレームワークにおける以前の観測と組み合わされ、統計モデルは、設計パラメータと各増幅パラメータとの間の経験的関係を一緒に学習する。
ｄ）更なる最適化が必要な場合、この統計モデルを使用して、新たに取得したデータに照らして、望ましい増幅挙動を生成する可能性が最も高い新しい配列設計を提案することができる。このプロセスは、ＣＡＮ反応を介したロジスティック回帰結果の再現を可能にする好適な競合配列が見つかるまで続く。

【０２２９】
　競合ポリヌクレオチドを調整する例示的な方法の概要は、以下のとおりである：

【０２３０】
　シミュレーションを実施して、最適な挙動を記述する理想的なパラメータ値を特定した。１つ以上のこれらのパラメータ値によって反映される挙動を示す競合配列を設計することが、調整の目標である。最初に、多数のアンプリコン配列が、プライマー間の同一のプライマー配列及び可変「コア」配列を用いて設計及び取得される。これらの配列は実験的に試験され、それらの挙動を分析して記述的パラメータの値を導出する。これらの配列のいずれも理想的な増幅挙動を示さないと仮定して、データは、標的挙動に一致する可能性が最も高い新しい配列を合理的に設計するために使用される。この目的のために、様々な配列設計パラメータが増幅挙動を記述する目的のパラメータをどのように予測したかを決定するために行われる回帰が行われる。具体的には、ガウス過程回帰子（ｒｅｇｒｅｓｓｏｒ）は、「コア」配列の長さ及びＧＣ含有量を「増幅率」パラメータに関連付けるように訓練することができる。この回帰子又は任意の他のかかる回帰子を使用して、所与の設計されたアンプリコンの挙動を予測し、所望の目的を達成する可能性が最も高い配列記述子（ｄｅｓｃｒｉｐｔｏｒ）（長さ及びＧＣ含有量）を提供することができる。このシミュレーション、設計、実験、分析、及び回帰のプロセスは、好適な配列が見つかるまで、

競合増幅ネットワーク内のあらゆる配列に対して反復される。本アプローチの改変は、回帰内にプライマー配列自体に関する情報を組み込むことを含む。これにより、設計パラメータと増幅パラメータとの間のグローバルな関係、及び所与のプライマー対に特異的なその関係の特質の両方を決定することができる。

【０２３１】

本発明は、以下の番号付けされた実施形態の段落で更に説明される。

【０２３２】

１．試料中の少なくとも２つの標的オリゴヌクレオチドの相対存在量を、特定の状態の相対確率に変換する方法。

【０２３３】

２．２つのフルオロフォア標識プローブのみを使用して、試料中の少なくとも３つの標的オリゴヌクレオチドの相対存在量を検出する方法。

【０２３４】

３．試料中の少なくとも２つの標的オリゴヌクレオチドの相対存在量を、単一の値に組み合わせる方法。

【０２３５】

４．試料中の少なくとも２つのオリゴヌクレオチドの相対存在量によって提供される予測的関係又は決定面を、単一の値に変換する方法。

【０２３６】

５．競合増幅ネットワークを用いて、統計情報を模倣する方法。

【０２３７】

６．方法が、試料中のより多くの標的ポリヌクレオチドのうちの１つを増幅するステップを含み、任意選択的に、増幅するステップが、実施形態７～８２のいずれか１つに記載の増幅するステップである、実施形態１～５のいずれか１つに記載の方法。

【０２３８】

７．試料中の１つ以上の標的ポリヌクレオチドを増幅する方法であって、本方法が、

ａ）１つ以上の標的ポリヌクレオチドを潜在的に含む試料、

ｂ）第１の調整された競合ポリヌクレオチド、

ｃ）少なくとも第１のプライマーであって、

試料中の第１の標的ポリヌクレオチド、及び

第１の調整された競合ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができる、少なくとも第１のプライマー、を提供することと、

標的ポリヌクレオチド（試料中に存在する場合）及び第１の調整された競合ポリヌクレオチドが増幅されるように、プライマー伸長反応を開始することと、を含み、

増幅が、第１の標的生成物及び第１の調整された競合生成物をもたらす、方法。

【０２３９】

８．方法が、

第２のプライマー、

第２の競合ポリヌクレオチド、及び／又は

第２の標的ポリヌクレオチド、を提供することを含む、実施形態７に記載の方法。

【０２４０】

９．第２のプライマーが、第１の標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができ、第１及び第２のプライマーが、標的の反対側の鎖上でハイブリダイズして、第１の標的生成物、任意選択的に、第１の標的ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）生成物の生成をもたらす、実施形態８に記載の方法。

【０２４１】

１０．第２のプライマーが、第１の調整された競合ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることもでき、第１及び第２のプライマーが、第１の調整された競合ポリヌクレオチドの反対側の鎖上でハイブリダイズして、第１の調整された競合生成物、任意選択的に、第１の調整された競合ＰＣＲ生成物の生成をもたらす、実施形態７又は８に記載の方法。

【０２４２】
１１．方法が、第２の調整された競合ポリヌクレオチドを提供することを含む、実施形態７～１０のいずれか１つに記載の方法。
【０２４３】
１２．第２のプライマーが、
ａ）第１の調整された競合ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができ、第１及び第２のプライマーが、第１の調整された競合ポリヌクレオチドの反対側の鎖上でハイブリダイズして、第１の調整された競合生成物、任意選択的に、第１の調整された競合ＰＣＲ生成物の生成をもたらし、かつ
ｂ）第２の調整された競合ポリヌクレオチドにハイブリダイズし、プライマー伸長反応を開始することができ、それにより、第２の調整された競合ポリヌクレオチドが増幅されて、第２の調整された競合生成物の生成をもたらし、任意選択的に、更なるプライマーと組み合わせて、第２のプライマー及び更なるプライマーが、第２の調整された競合ポリヌクレオチドの反対側の鎖上でハイブリダイズして、第２の調整された競合生成物、任意選択的に、第１の標的ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）生成物の生成をもたらし、
任意選択的に、第２のプライマーが、第１の標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができない、実施形態８又は１１に記載の方法。
【０２４４】
１３．第２の標的ポリヌクレオチドが、第１の標的ポリヌクレオチドと同じポリヌクレオチド分子の一部である、実施形態７～１２のいずれか１つに記載の方法。
【０２４５】
１４．第２の標的ポリヌクレオチドが、第１の標的ポリヌクレオチドと異なるポリヌクレオチド分子上にある、７～１２に記載の方法。
【０２４６】
１６．第２のプライマーが、
ａ）第１の標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができ、第１及び第２のプライマーが、標的の反対側の鎖上でハイブリダイズして、第１の標的生成物、任意選択的に、第１の標的ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）生成物の生成をもたらし、
ｂ）第１又は第２の調整された競合ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができず、
方法が、第１及び第２の調整された競合ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができる第３のプライマーを含む、実施形態７～１４のいずれか１つに記載の方法。
【０２４７】
１７．方法が、第４のプライマーを提供することを含み、第４のプライマーが、第１の標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができ、第１及び第４のプライマーが、標的の反対側の鎖上でハイブリダイズして、第１の標的生成物、任意選択的に、第１の標的ＰＣＲ生成物の形成を可能にする、実施形態７～１６のいずれか１つに記載の方法。
【０２４８】
１８．方法が、
ａ）第２のプライマーであって、
ｉ）第１の標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができ、第１及び第２のプライマーが、標的の反対側の鎖上でハイブリダイズして、第１の標的生成物、任意選択的に、第１の標的ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）生成物の生成をもたらし、
ｉｉ）第１の調整された競合ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができる、第２のプライマーと、
ｂ）第３のプライマーであって、
ｉ）第１の調整された競合ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができ、第３及び第２のプライマーが、第１の調整された競合ポリヌクレオチドの反対側の鎖上でハイブリダイズして、第１の調整された競合ポリヌクレオチド生成物、任意選択的に、第１の調整された競合ポリヌクレオチドポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）生成物の生成をもたら

し、

ｉｉ）第２の調整された競合ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができる、第３のプライマーと、

ｃ）第４のプライマーであって、第２の調整された競合ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができ、第３及び第４のプライマーが、第２の調整された競合ポリヌクレオチドの反対側の鎖上でハイブリダイズして、第２の調整された競合ポリヌクレオチド生成物、任意選択的に、第２の調整された競合ポリヌクレオチドポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）生成物の生成をもたらす、第４のプライマーと、を提供することを含む、実施形態７～１７５のいずれか１つに記載の方法。

【０２４９】

１９．第１の標的ポリヌクレオチドの増幅率が、第１の調整された競合ポリヌクレオチドの増幅率と異なる、実施形態７～１８のいずれか１つに記載の方法。

【０２５０】

２０．プライマー伸長前の標的ポリヌクレオチドの初期の数及び調整された競合ポリヌクレオチドの数が同じであるか又は実質的に同じである場合、生成された標的生成物ポリヌクレオチドの数が、生成された調整された競合ポリヌクレオチドの数と異なる、実施形態７又は１９に記載の方法。

【０２５１】

２１．増幅される第１の標的ポリヌクレオチドの配列及び少なくとも第１の調整された競合ポリヌクレオチドの配列が、１つ以上の状態に対する標的の予測的関係に近似又は再現又は一致するような様式で、第１の標的ポリヌクレオチドの初期濃度とともに変化する最終的な検出可能なシグナルをもたらすように選択される、実施形態７～２０のいずれか１つに記載の方法。

【０２５２】

２２．第１の標的ポリヌクレオチドの増幅率及び第２の標的ポリヌクレオチドの増幅率が、所定の重み付けに一致する、実施形態７～２１のいずれか１つに記載の方法。

【０２５３】

２３．増幅される第１の調整された競合ポリヌクレオチドの配列が、増幅される第１の標的ポリヌクレオチドの配列と、９５％、９０％、８８％、８５％、８０％、７５％、７０％、６５％、６０％、５５％、５０％、４５％、４０％、３５％、３０％未満の配列同一性を共有する、実施形態７～２２のいずれか１つに記載の方法。

【０２５４】

２４．増幅される第１の調整された競合ポリヌクレオチドの配列が、少なくとも１５％のＧＣ、又は少なくとも２５％、少なくとも３５％である、少なくとも５５％である、少なくとも６５％である、少なくとも７５％である、少なくとも８５％である、又は少なくとも８５％のＧＣを含む、実施形態７～２３のいずれか１つに記載の方法。

【０２５５】

２５．第１の調整された競合生成物が、第１の標的生成物よりも少なくとも５ヌクレオチド長く、任意選択的に、第１の標的生成物よりも少なくとも１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、又は少なくとも３３０ヌクレオチド長い、実施形態７～２４のいずれか１つに記載の方法。

【０２５６】

２６．第１の調整された競合生成物が、

第１の標的生成物よりも少なくとも５ヌクレオチド短く、任意選択的に、第１の標的生成物よりも少なくとも１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２１０、２２０、２３０、

２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、若しくは少なくとも３３０ヌクレオチド短いか、又は
第１の標的生成物よりも少なくとも５ヌクレオチド長く、任意選択的に、第１の標的生成物よりも少なくとも１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、若しくは少なくとも３３０ヌクレオチド長い、実施形態７～２５のいずれか１つに記載の方法。

【０２５７】

２７．１つ以上の標的生成物、任意選択的に、１つ以上の標的ＰＣＲ生成物、及び１つ以上の調整された競合生成物、任意選択的に、１つ以上の競合ポリヌクレオチドＰＣＲ生成物が検出される、実施形態７～２６のいずれか１つに記載の方法。

【０２５８】

２８．方法が、１つ以上のプローブ群を提供することを含み、各プローブ群が、第１の標識で標識された少なくとも１つのプローブポリヌクレオチド及び第２の標識で標識された少なくとも１つのプローブポリヌクレオチドを含み、
第１の標識と第２の標識とが異なる、実施形態７～２７のいずれか１つに記載の方法。

【０２５９】

２９．第１の標識で標識された少なくとも１つのプローブが、第１の標的生成物にハイブリダイズすることができ、第２の標識で標識された少なくとも１つのプローブが、第１の調整された競合生成物にハイブリダイズすることができる、実施形態２８に記載の方法。

【０２６０】

３０．第１の標識で標識された少なくとも１つのプローブが、第１の調整された競合生成物にハイブリダイズすることができ、
第２の標識で標識された少なくとも１つのプローブが、第２の調整された競合生成物にハイブリダイズすることができ、
任意選択的に、いずれのプローブも、第１の標的生成物にハイブリダイズすることができない、実施形態２８又は２９に記載の方法。

【０２６１】

３１．単一のプローブ群内に、第１の標識で各々標識された少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、又は少なくとも１００個の異なるプローブが存在する、実施形態２８～３０のいずれか１つに記載の方法。

【０２６２】

３２．単一のプローブ群内に、第２の標識で各々標識された少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、又は少なくとも１００個の異なるプローブが存在する、実施形態２８～３１のいずれか１つに記載の方法。

【０２６３】

３３．単一のプローブ群内に、
第１の標識で各々標識された少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、又は少なくとも１００個の異なるプローブ、及び
第２の標識で各々標識された少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、又は少なくとも１００個の異なるプローブが存在する、実施形態２８～３２のいずれか１つに記載の方法。

【０２６４】
　３４．方法が、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、又は少なくとも１００個の異なるプローブ群を提供することを含み、
任意選択的に、特定の標識（任意選択的に、フルオロフォア）が、２つ以上のプローブ群で使用されない、実施形態２８～３３のいずれか１つに記載の方法。
【０２６５】
　３５．プローブ上に存在する標識が、第１の標識及び第２の標識のみである、実施形態２８～３４のいずれか１つに記載の方法。
【０２６６】
　３６．各プローブが、単一タイプの標識で標識される、実施形態２８～３５のいずれか１つに記載の方法。
【０２６７】
　３７．第１及び第２の標識が、フルオロフォアであり、任意選択的に、各プローブが、クエンチャーを含む、実施形態２８～３６のいずれか１つに記載の方法。
【０２６８】
　３８．第１の標識がＦＡＭであり、第２の標識がＨＥＸであるか、又は第１の標識がＨＥＸであり、第２の標識がＦＡＭである、実施形態２８～３７のいずれか１つに記載の方法。
【０２６９】
　３９．
　ｉ）第１の標的生成物にハイブリダイズすることができる少なくとも１つのプローブ及び第１の調整された競合生成物にハイブリダイズすることができる少なくとも１つのプローブが、異なる標識で標識され、かつ／又は
　ｉｉ）第１の調整された競合生成物にハイブリダイズすることができる少なくとも１つのプローブ及び第２の調整された競合生成物にハイブリダイズすることができる少なくとも１つのプローブが、異なる標識で標識される、実施形態２８～３８のいずれか１つに記載の方法。
【０２７０】
　４０．標的生成物にハイブリダイズすることができる各プローブが、同じ第１の標識で標識され、調整された競合生成物にハイブリダイズすることができる各プローブが、同じ第２の標識で標識される、実施形態２８～３９のいずれか１つに記載の方法。
【０２７１】
　４１．
　標的生成物にハイブリダイズすることができるプローブのうちの少なくとも１つが、第１の標識で標識され、調整された競合生成物にハイブリダイズすることができるプローブのうちの少なくとも１つが、同じ第１の標識で標識されるか、又は
　標的生成物にハイブリダイズすることができる少なくとも１つのプローブが、第１の標識で標識され、第２の標識で標識される標的生成物にハイブリダイズすることができる少なくとも１つのプローブが、第１の標識で標識され、競合生成物にハイブリダイズすることができる少なくとも１つのプローブが、第２の標識で標識される、実施形態２８～４０のいずれか１つに記載の方法。
【０２７２】
　４２．特定の状態の正の予測的関係に関連する標的ポリヌクレオチド生成物にハイブリダイズすることができる各プローブが、第１の標識で標識され、調整された競合ポリヌクレオチド生成物にハイブリダイズすることができる対応するプローブが、第２の標識で標識され、
かつ／又は
特定の状態の負の予測的関係に関連する標的ポリヌクレオチド生成物にハイブリダイズす

ることができる各プローブが、第２の標識で標識され、調整された競合ポリヌクレオチド生成物にハイブリダイズすることができる対応するプローブが、第１の標識で標識される、実施形態２８～４１のいずれか１つに記載の方法。

【０２７３】

４３．増幅後に、第１のプローブによって検出される生成物の量及び第２のプローブによって検出される生成物の量が決定される、実施形態２８～４２のいずれか１つに記載の方法。

【０２７４】

４４．各プローブの相対量を標準曲線と比較して、１つ以上の状態の相対確率を決定する、実施形態４３に記載の方法。

【０２７５】

４５．方法が、使用される全てのフルオロフォアの単一読み取りを含む、実施形態７～４４のいずれか１つに記載の方法。

【０２７６】

４６．方法が、遺伝子発現ネットワークの一部の状態を、任意選択的に、単一の値として、捕捉する、実施形態７～４５のいずれか１つに記載の方法。

【０２７７】

４７．標的ポリヌクレオチドが、ＲＮＡであり、任意選択的に、ＲＮＡ転写産物であり、任意選択的に、ｍＲＮＡである、実施形態７～４６のいずれか１つに記載の方法。

【０２７８】

４８．標的ポリヌクレオチドが、非コードＲＮＡであり、任意選択的に、ｍｉＲＮＡ、ｌｎｃＲＮＡ、又はｓｉＲＮＡである、実施形態７～４７のいずれか１つに記載の方法。

【０２７９】

４９．標的ポリヌクレオチドが、ＤＮＡである、実施形態７～４６のいずれか１つに記載の方法。

【０２８０】

５０．試料が、組織、生検、血液、血漿、血清、病原体、微生物細胞、細胞培養物、及び細胞溶解物を含むか又はそれらからなる群から選択される、実施形態７～４９のいずれか１つに記載の方法。

【０２８１】

５１．試料が、

細胞、任意選択的に、白血球及び／若しくは赤血球、エクソソーム、循環腫瘍ＤＮＡ（ｃｔＤＮＡ）、無細胞ＤＮＡ（ｃｆＤＮＡ）、ＲＮＡ、又は病原体核酸のうちのいずれか１つ以上を含む、実施形態７～５０のいずれか１つに記載の方法。

【０２８２】

５２．細胞が、

哺乳類細胞、細菌細胞、酵母細胞、若しくは植物細胞；

培養細胞、任意選択的に、初代患者由来細胞、若しくは不死化細胞株；

哺乳類幹細胞；

操作された細胞、任意選択的に、代謝物及び化合物のバイオプロダクションに使用される操作された細胞、並びに／又は

酵母細胞、任意選択的に、醸造に使用される酵母細胞である、５０又は５１に記載の方法。

【０２８３】

５３．方法が、少なくとも第１及び第２の標的ポリヌクレオチドの増幅のためのものであり、任意選択的に、方法が、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、又は少なくとも１００個の標的ポリヌクレオチドの増幅のためのものである、実施形態７～５２のいずれか１つに記載の方法。

【０２８４】
５４．少なくとも第１及び第２の標的ポリヌクレオチドが、同じ単一のポリヌクレオチド内の標的配列である、実施形態５３に記載の方法。
【０２８５】
５５．方法が、第１及び第２の標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズし、第１の標的生成物及び第２の標的生成物を産生することができる少なくとも１つのプライマーによる調整された競合ポリヌクレオチドの増幅を含む、実施形態７～５４のいずれか１つに記載の方法。
【０２８６】
５６．方法が、２つの調整された競合ポリヌクレオチドの増幅を含み、方法が、
第１の標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができる少なくとも１つのプライマーによる第１の調整された競合ポリヌクレオチドの増幅と、
第２の標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができる少なくとも１つのプライマーによる第２の調整された競合ポリヌクレオチドの増幅と、を含む、実施形態７～５５のいずれか１つに記載の方法。
【０２８７】
５７．増幅生成物の検出が、１つ以上の標的ポリヌクレオチドの
ｉ）存在若しくは不在、
ｉｉ）特定の所定の開始濃度、
ｉｉｉ）所定のレベルを上回る若しくは下回る開始濃度、及び／又は
ｉｖ）所定の範囲内にある開始濃度、
を示す、実施形態７～５６のいずれか１つに記載の方法。
【０２８８】
５８．（ｉ）、（ｉｉ）、（ｉｉｉ）、及び／又は（ｉｖ）が、
ａ）特定の遺伝子の相対発現、
ｂ）２つ以上の特定の遺伝子の相対発現、
ｃ）１つ以上のハウスキーピング遺伝子の相対発現、
ｄ）特定の遺伝子の発現シグネチャの相対発現、
ｅ）１つ又は複数の遺伝子の特定のアレルバリアントの相対発現、
ｆ）遺伝子の変異バージョンの相対発現、
ｇ）無細胞腫瘍ＤＮＡの相対発現、のうちの１つ以上を示し、
標的ポリヌクレオチドが、（ａ）～（ｇ）の既知の配列の１つ以上の部分から選択される、実施形態５７に記載の方法。
【０２８９】
５９．差次的遺伝子調節の程度が、いくつかの他の特定の状態２にあるものと比較して、特定の状態１にある試料の全体的な確率に寄与する、実施形態７～５８のいずれか１つに記載の方法。
【０２９０】
６０．特定の状態１が、「特定の疾患」であり、特定の状態２が、「疾患なし」又は「他の疾患」又は「特定の疾患なし」である、実施形態１～のいずれか１つに記載の方法。
【０２９１】
６１．方法が、対象における疾患若しくは状態の診断及び／又は予後のためのものである、実施形態１～６０のいずれか１つに記載の方法。
【０２９２】
６２．疾患又は状態の診断が、少なくとも２つの遺伝子の相対発現レベルの評価を必要とし、任意選択的に、少なくとも３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、又は少なくとも１００個の遺伝子の相対発現レベルの評価を必要とする、実施形態６１に記載の方法。
【０２９３】

６３．疾患又は状態が、ヒト結核、ＨＩＶ同時感染を伴うヒト結核、ＨＩＶ同時感染を伴わないヒト結核、がん、任意選択的に、前立腺がん、敗血症、カンジダ血症（ｂｌｏｏｄｓｔｒｅａｍ ｃａｎｄｉｄｉａｓｉｓ）、ウシ結核、ウシ乳房炎から選択される、実施形態６１又は６２に記載の方法。

【０２９４】

６４．疾患が、結核である、実施形態６１～６３のいずれか１つに記載の方法。

【０２９５】

６５．疾患が、結核であり、差次的遺伝子調節シグネチャ又は予測的関係が、対象の白血球から特定される、実施形態６４に記載の方法。

【０２９６】

６６．ＧＢＰ６、ＡＲＧ１、及びＴＭＣＣ１の差次的調節の程度が、いくつかの「他の疾患」を有するのと比較して、結核を有する全体的な確率に寄与し、遺伝子発現シグネチャが、結核を有しない患者におけるこれらの遺伝子のレベルと比較して、ＧＢＰ６の上方調節、並びにＡＲＧ１及びＴＭＣＣ１の下方調節である、実施形態６３～６５のいずれか１つに記載の方法。

【０２９７】

６７．疾患が、がん、任意選択的に、前立腺がん又は乳がん、任意選択的に、前立腺がんである、実施形態６１～６３のいずれか１つに記載の方法。

【０２９８】

６８．遺伝子の変異バージョン、特定のアレルバリアント、及び／又は無細胞腫瘍ＤＮＡの相対発現が検出される、実施形態６１～６７のいずれか１つに記載の方法。

【０２９９】

６９．疾患が、がんである、実施形態６１～６８のいずれか１つに記載の方法。

【０３００】

７０．標的ポリヌクレオチドが、疾患状態に関連する（任意選択的に、腫瘍及び／又はがんの存在に関連する）、ｓｎｐ、ｓｎｖ（単一ヌクレオチドバリアント）、インデル、又はコピー数バリアント（ＣＮＶ）を含む、実施形態７～６９のいずれか１つに記載の方法。

【０３０１】

７１．標的ポリヌクレオチドが、無細胞腫瘍ＤＮＡにおけるｓｎｐ、ｓｎｖ、又はインデルを含む、実施形態７０に記載の方法。

【０３０２】

７２．方法が、ブロッカーオリゴヌクレオチドを添加することを更に含み、ブロッカーオリゴヌクレオチドが、その３’末端の伸長を受けることができず、ブロッカーオリゴヌクレオチドが、一塩基多型を含む少なくとも１つの標的ポリヌクレオチドにおける配列の部分に相補的ではなく、任意選択的に、ｓｎｐは、ｓｎｖであるが、ブロッカーオリゴヌクレオチドは、対応する野生型配列に相補的であり、ブロッカーオリゴヌクレオチドに相補的である配列を含む標的ポリヌクレオチドにおける配列は、プライマーのうちの１つに相補的な配列の少なくとも一部と重複する、実施形態７～７１のいずれか１つに記載の方法。

【０３０３】

７３．標的ポリヌクレオチドが、特定の疾患又は状態を有すると疑われる対象から得られた試料に由来する、実施形態７～７２のいずれか１つに記載の方法。

【０３０４】

７４．標的ポリヌクレオチドが、特定の疾患又は状態を有すると疑われない対象から得られた試料に由来する、実施形態７～７２のいずれか１つに記載の方法。

【０３０５】

７５．特定の遺伝子又は遺伝子の発現の検出が、培養中の細胞における特定の天然の遺伝子及び／又は操作された遺伝子の発現を示す、実施形態７～７４のいずれか１つに記載の方法。

【０３０６】

７６．細胞が、遺伝子操作された細菌、植物、又は酵母細胞である、実施形態７～７５のいずれか１つに記載の方法。

【０３０７】

７７．核酸が、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）又はリコンビナーゼポリメラーゼ反応（ＲＰＡ）を使用して増幅される、実施形態７～７６のいずれか１つに記載の方法。

【０３０８】

７８．対象における疾患若しくは状態の診断又は予後の方法であって、方法が、実施形態１～７７のいずれか１つに記載の方法を含む、方法。

【０３０９】

７９．対象が、第１の標識及び第２の標識の相対量が疾患若しくは状態の予後を示す場合、疾患若しくは状態又は疾患若しくは状態の予後を有すると診断される、実施形態７８に記載の方法。

【０３１０】

８０．疾患又は状態が、ヒト結核、ＨＩＶ同時感染を伴うヒト結核、ＨＩＶ同時感染を伴わないヒト結核、がん、任意選択的に、前立腺がん又は乳がん、敗血症、カンジダ血症、ウシ結核、ウシ乳房炎から選択される、実施形態７８又は７９に記載の方法。

【０３１１】

８１．疾患が、結核であり、任意選択的に、

差次的遺伝子調節シグネチャ及び／若しくは予測的関係が、対象の白血球から特定され、かつ／又は

ＧＢＰ６、ＡＲＧ１、及びＴＭＣＣ１の差次的調節の程度が、いくつかの「他の疾患」を有することと比較して、結核を有する全体的な確率に寄与する、実施形態７８～８０ｘのいずれか１つに記載の方法。

【０３１２】

８２．疾患が、がん、任意選択的に、前立腺がん又は乳がん、任意選択的に、前立腺がんである、実施形態７８～８０のいずれか１つに記載の方法。

【０３１３】

８３．以下のうちの１つ以上を含む組成物：

ａ）実施形態７～８２のいずれか１つに定義される少なくとも１つの標的核酸配列、

ｂ）実施形態７～８２のいずれか１つに定義される少なくとも１つの調整された競合ポリヌクレオチド、

ｃ）実施形態７～８２のいずれか１つに定義される少なくとも１つのプライマー、任意選択的に、実施形態７～８２のいずれか１つに定義される少なくとも２つのプライマー、

ｄ）少なくとも１つ以上のプローブ群であって、各プローブ群が、任意選択的に、実施形態２８～８２のいずれか１つに定義される、第１の標識で標識された少なくとも１つのプローブポリヌクレオチド及び第２の標識で標識された少なくとも１つのプローブポリヌクレオチドを含む、少なくとも１つ以上のプローブ群。

【０３１４】

８４．実施形態８３に記載の組成物であって、

ｄ）ポリメラーゼ酵素、

ｅ）適切な量の各々の４つのヌクレオチドＡ、Ｃ、Ｔ、及びＧ、を更に含む、組成物。

【０３１５】

８５．実施形態８３又は８４に記載の組成物であって、

ｆ）リコンビナーゼ酵素、

ｇ）一本鎖結合タンパク質、

ｈ）ポリメラーゼ酵素、

ｉ）適切な量の各々のヌクレオチドＡ、Ｃ、Ｔ、Ｇ、及びＵ、を更に含む、組成物。

【０３１６】

８６．実施形態７～８５のいずれか１つに定義される、調整された競合ポリヌクレオチド。

【０３１７】
８７．実施形態１～８２のいずれか１つに記載の方法を実施するためのキットであって、キットが、
ａ）実施形態７～８２によって定義される１つ以上の調整された競合ポリヌクレオチド、
ｂ）１つ以上のプライマー、
ｃ）実施形態２８～８２のいずれか１つに定義される第１のプローブ群、
ｄ）好適な緩衝液、
ｅ）使用説明書、のうちの１つ以上を含み、
任意選択的に、キットが、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、若しくは少なくとも１０個の異なる調整された競合ポリヌクレオチド、及び／又は少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、若しくは少なくとも１０個の異なるプローブ群を含む、キット。
【０３１８】
８８．実質的に本明細書に記載される方法、核酸配列、又はキット。
【０３１９】
８９．少なくとも２つの調整された競合ポリヌクレオチドのコレクション又はキットであって、コレクションが、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２２、２４、２５、２６、２８、３０、３２、３４、３５、３６、３８、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、又は少なくとも２００個の調整された競合ポリヌクレオチドを含み、任意選択的に、調整された競合ポリヌクレオチドが、実施形態７～８８のいずれかによって定義される、コレクション又はキット。
【０３２０】
９０．少なくとも２つの調整された競合ポリヌクレオチド及び少なくとも２つの対応する標識プローブを含む、コレクション／キット。
【０３２１】
９１．
少なくとも２つの調整された競合ポリヌクレオチド、
最後に、２つの対応する標識プローブ、及び
少なくとも２つのプライマー、を含む、コレクション／キット。
【０３２２】
９２．
先行実施形態のいずれかによって定義される少なくとも２つの調整された競合ポリヌクレオチド、
先行実施形態のいずれかによって定義される最後に２つの対応する標識プローブ、及び
先行実施形態のいずれかによって定義される少なくとも２つのプライマー、を含む、コレクション／キット。
【０３２３】
９３．少なくとも第１のプライマーの第１の標的ポリヌクレオチドとのハイブリダイゼーションに対して競合し、第１の標的生成物及び第１の調整された競合生成物の増幅をもたらす、第１の競合ポリヌクレオチドを調整する方法であって、
ａ）増幅される調整された競合ポリヌクレオチドの割合と比較して、異なる割合の標的ポリヌクレオチドが増幅され、
ｂ）第１の標的ポリヌクレオチドの増幅が、特定の状態に対する標的ポリヌクレオチドの予測的関係に一致し、かつ／又は
ｃ）第１の標的ポリヌクレオチドの増幅率、及び任意選択的に、第２の標的ポリヌクレオチドの増幅率が、所定の重み付けに一致し、
本方法が、
第１の標的生成物の配列及び／又は第１の標的生成物の長さに関して、調整された競合ポリヌクレオチドの配列及び／又は調整された競合増幅生成物の長さを最適化することを含

む、方法。

【０３２４】

９４．

第１の標的生成物が２つのプライマーからのプライマー伸長によって生成される（任意選択的に、ＰＣＲによって生成される）ように第１の標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができる、第２のプライマーが当該増幅に使用され、

第１の調整された競合生成物が２つのプライマーからのプライマー伸長によって生成される（任意選択的に、ＰＣＲによって生成される）ように第１の調整された競合ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができる、第３のプライマーが当該増幅に使用され、

任意選択的に、第２及び第３のプライマーが、同じ配列を有する、実施形態９３に記載の方法。

【０３２５】

９５．当該最適化が、増幅後、

ａ）増幅される調整された競合ポリヌクレオチドの割合と比較して、異なる割合の標的ポリヌクレオチドが増幅され、

ｂ）第１の標的ポリヌクレオチドの増幅が、特定の状態に対する標的の予測的関係に一致し、かつ／又は

ｃ）第１の標的ポリヌクレオチドの増幅率、及び任意選択的に、第２の標的ポリヌクレオチドの増幅率が、所定の重み付けに一致し、

第１の標的ポリヌクレオチドの最も好ましい増幅をもたらす調整された競合を選択することをもたらす、２つ以上の試験調整された競合ポリヌクレオチドを生成することを含む、実施形態９３又は９４に記載の方法。

【０３２６】

９６．当該最適化が、少なくとも３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０個の異なる試験調整された競合ポリヌクレオチドを産生することを含む、実施形態９３～９５のいずれか１つに記載の方法。

【０３２７】

９７．当該最適化が、各試験調整された競合ポリヌクレオチドを用いて、少なくとも３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０回の試験増幅反応を行うことを含み、任意選択的に、少なくとも３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０回の増幅反応が、少なくとも３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０の異なる標的ポリヌクレオチドの濃度及び／又は標的ポリヌクレオチド分子の数を使用して行われる、実施形態９３～９６のいずれか１つに記載の方法。

【０３２８】

９８．特定の試験調整された競合ポリヌクレオチドを使用した各試験増幅が、異なる濃度及び／又は数の標的ポリヌクレオチド鋳型を使用して行われる、実施形態９７に記載の方法。

【０３２９】

９９．試験増幅反応が、１００コピー／μＬ～10^{8}コピー／μＬにわたる範囲の濃度及び／又は数の標的ポリヌクレオチド鋳型を用いて行われる、実施形態９７又は９８に記載の方法。

【０３３０】

１００．試験調整された競合ポリヌクレオチドが、異なるＧＣ含有量を有するように設計される、実施形態９３～９９のいずれか１つに記載の方法。

【０３３１】

１００．先行実施形態のいずれか１つに記載の競合増幅反応を最適化する方法であって、当該最適化が、

ａ）合成核酸配列の開始濃度を増加又は減少させること、及び／又は

ｂ）核酸プライマーのいずれかの開始濃度を増加又は減少させること、を含む、方法。

【０３３２】

１０１．少なくとも２つの標的ポリヌクレオチドの多重競合増幅の方法であって、方法が、少なくとも１つの競合ポリヌクレオチドを含み、標的増幅生成物が、同じ標識で標識された（任意選択的に、同じフルオロフォアで標識された）プローブを使用して検出され、任意選択的に、競合ポリヌクレオチドが、先行請求項のいずれかによる調整された競合ポリヌクレオチドである、方法。

【０３３３】

１０２．方法が、先行実施形態のいずれかによる競合増幅を含む、システムの転写状態を決定する方法。

【０３３４】

１０３．システムが状態Ａ又は状態Ｂにあるかを決定する方法であって、本方法が、先行実施形態のいずれかによる競合増幅を含む、方法。

【０３３５】

１０４．試料中の少なくとも２つの標的ポリヌクレオチドの同時競合増幅の方法であって、

ａ）ポリヌクレオチドを含む試料、

ｂ）第１及び第２の調整された競合ポリヌクレオチド、

ｃ）第１のプライマーセットであって、プライマーセットが、第１の標的ポリヌクレオチド及び第１の競合ポリヌクレオチドの反対側の鎖上でハイブリダイズすることができて、第１の標的増幅生成物及び第１の競合増幅生成物の生成を可能にする２つのプライマーを含む、第１のプライマーセット、

ｄ）第２のプライマーセットであって、プライマーセットが、第２の標的ポリヌクレオチド及び第２の競合ポリヌクレオチドの反対側の鎖上でハイブリダイズすることができて、第２の標的生成物及び第２の競合生成物の生成を可能にする２つのプライマーを含む、第２のプライマーセット、

ｅ）第１のプローブ群であって、第１のプローブ群が、第１の標的増幅生成物にハイブリダイズすることができる第１の標識標的プローブ及び第１の競合増幅生成物にハイブリダイズすることができる第１の標識競合プローブを含む、第１のプローブ群、

ｄ）第２のプローブ群であって、第２のプローブ群が、第２の標的増幅生成物にハイブリダイズすることができる第２の標識標的プローブ及び第２の競合増幅生成物にハイブリダイズすることができる第２の標識競合プローブを含む、第２のプローブ群、を提供することであって、

ｉ）第１の標識標的プローブ及び第２の標的標識プローブが、同じ第１の標識で標識され、かつ第１の標識競合プローブ及び第２の標識競合プローブが、同じ第２の標識で標識されるか、又は

ｉｉ）第１の標識標的プローブ及び第２の標識競合プローブが、同じ第１の標識で標識され、かつ第１の標識競合プローブ及び第２の標識標的プローブが、同じ第２の標識で標識される、提供することと、

第１及び第２のプライマーセットが標的及び競合ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることを可能にすることと、を含む、方法。

【０３３６】

１０５．ｅ）更なる１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０個のプライマーセット及び対応するプローブ群を提供することを含む、１０４に記載の方法。

【０３３７】

１０６．方法が、多重増幅後、第１の標識及び第２の標識の量を同時に検出することを更に含む、実施形態１０５に記載の方法。

【０３３８】

１０７．

標的がＴＭＣＣ１であり、標的配列が配列番号４である場合、最適な競合を決定するた

めに使用される競合配列が、配列番号６、８、１０、１２、１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、及び３６であり、任意選択的に、標的及び競合の増幅のためのプライマーが、配列番号１及び３に示される、かつ／又は

標的がＡＲＧ１であり、標的配列が配列番号４０である場合、最適な競合を決定するために使用される競合配列が、配列番号４２、４４、４６、及び４８であり、任意選択的に、標的及び競合の増幅のためのプライマーが、配列番号３７及び３９に示され、かつ／又は

標的がＧＢＰ６であり、標的配列が配列番号５２である場合、最適な競合を決定するために使用される競合配列が、配列番号５４、５６、及び５８であり、任意選択的に、標的及び競合の増幅のためのプライマーが、配列番号４９及び５１に示され、かつ／又は

標的がＥＧＦＲであり、標的配列が配列番号６２である場合、競合配列が、配列番号６４、６７、及び７１であり、任意選択的に、プライマー配列が、配列番号６８及び７０である、先行実施形態のいずれか。

【０３３９】

本発明はまた、以下の番号付けされた実施形態によって更に定義される。

【０３４０】

１．試料中の１つ以上の標的ポリヌクレオチドを増幅する方法であって、本方法が、

ａ）１つ以上の標的ポリヌクレオチドを潜在的に含む試料、

ｂ）第１の調整された競合ポリヌクレオチド、

ｃ）少なくとも第１のプライマーであって、

試料中の第１の標的ポリヌクレオチド、及び

第１の調整された競合ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができる、少なくとも第１のプライマー、を提供することと、

標的ポリヌクレオチド（試料中に存在する場合）及び第１の調整された競合ポリヌクレオチドが増幅されるように、プライマー伸長反応を開始することと、を含み、

増幅が、第１の標的生成物及び第１の調整された競合生成物をもたらす、方法。

【０３４１】

２．方法が、

第２のプライマー、

第２の競合ポリヌクレオチド、及び／又は

第２の標的ポリヌクレオチド、を提供することを含む、実施形態１に記載の方法。

【０３４２】

３．第２のプライマーが、第１の標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができ、第１及び第２のプライマーが、標的の反対側の鎖上でハイブリダイズして、第１の標的生成物、任意選択的に、第１の標的ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）生成物の生成をもたらす、実施形態２に記載の方法。

【０３４３】

４．第２のプライマーが、第１の調整された競合ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることもでき、第１及び第２のプライマーが、第１の調整された競合ポリヌクレオチドの反対側の鎖上でハイブリダイズして、第１の調整された競合生成物、任意選択的に、第１の調整された競合ＰＣＲ生成物の生成をもたらす、実施形態２又は３に記載の方法。

【０３４４】

５．方法が、第２の調整された競合ポリヌクレオチドを提供することを含む、実施形態１～４のいずれか１つに記載の方法。

【０３４５】

６．第２のプライマーが、

ａ）第１の調整された競合ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができ、第１及び第２のプライマーが、第１の調整された競合ポリヌクレオチドの反対側の鎖上でハイブリダイズして、第１の調整された競合生成物、任意選択的に、第１の調整された競合ＰＣＲ生成物の生成をもたらし、かつ

ｂ）第２の調整された競合ポリヌクレオチドにハイブリダイズし、プライマー伸長反応

を開始することができ、それにより、第２の調整された競合ポリヌクレオチドが増幅されて、第２の調整された競合生成物の生成をもたらし、任意選択的に、更なるプライマーと組み合わせて、第２のプライマー及び更なるプライマーが、第２の調整された競合ポリヌクレオチドの反対側の鎖上でハイブリダイズして、第２の調整された競合生成物、任意選択的に、第１の標的ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）生成物の生成をもたらし、
任意選択的に、第２のプライマーが、第１の標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができない、実施形態２又は５に記載の方法。

【０３４６】

７．第２の標的ポリヌクレオチドが、第１の標的ポリヌクレオチドと同じポリヌクレオチド分子の一部である、実施形態１～６のいずれか１つに記載の方法。

【０３４７】

８．第２の標的ポリヌクレオチドが、第１の標的ポリヌクレオチドと異なるポリヌクレオチド分子上にある、１～７のいずれか１つに方法。

【０３４８】

９．第２のプライマーが、

ａ）第１の標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができ、第１及び第２のプライマーが、標的の反対側の鎖上でハイブリダイズして、第１の標的生成物、任意選択的に、第１の標的ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）生成物の生成をもたらし、

ｂ）第１又は第２の調整された競合ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができず、

方法が、第１及び第２の調整された競合ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができる第３のプライマーを含む、実施形態１～８のいずれか１つに記載の方法。

【０３４９】

１０．第１の標的ポリヌクレオチドの増幅率が、第１の調整された競合ポリヌクレオチドの増幅率と異なる、実施形態１～９のいずれか１つに記載の方法。

【０３５０】

１１．プライマー伸長前の標的ポリヌクレオチドの初期の数及び調整された競合ポリヌクレオチドの数が同じであるか又は実質的に同じである場合、生成された標的生成物ポリヌクレオチドの数が、生成された調整された競合ポリヌクレオチドの数と異なる、実施形態１又は１０に記載の方法。

【０３５１】

１２．増幅される第１の標的ポリヌクレオチドの配列及び少なくとも第１の調整された競合ポリヌクレオチドの配列が、１つ以上の状態に対する標的の予測的関係に近似又は再現又は一致するような様式で、第１の標的ポリヌクレオチドの初期濃度とともに変化する最終的な検出可能なシグナルをもたらすように選択される、実施形態１～１１のいずれか１つに記載の方法。

【０３５２】

１２．第１の標的ポリヌクレオチドの増幅率及び第２の標的ポリヌクレオチドの増幅率が、所定の重み付けに一致する、実施形態１～１１のいずれか１つに記載の方法。

【０３５３】

１３．増幅される第１の調整された競合ポリヌクレオチドの配列が、増幅される第１の標的ポリヌクレオチドの配列と、９５％、９０％、８８％、８５％、８０％、７５％、７０％、６５％、６０％、５５％、５０％、４５％、４０％、３５％、３０％未満の配列同一性を共有する、実施形態１～１２のいずれか１つに記載の方法。

【０３５４】

１４．第１の調整された競合生成物が、

第１の標的生成物よりも少なくとも５ヌクレオチド短く、任意選択的に、第１の標的生成物よりも少なくとも１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２１０、２２０、２３０、

２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、若しくは少なくとも３３０ヌクレオチド短いか、又は
　第１の標的生成物よりも少なくとも５ヌクレオチド長く、任意選択的に、第１の標的生成物よりも少なくとも１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、若しくは少なくとも３３０ヌクレオチド長い、実施形態１～１３のいずれか１つに記載の方法。

【０３５５】

　１５．１つ以上の標的生成物、任意選択的に、１つ以上の標的ＰＣＲ生成物、及び１つ以上の調整された競合生成物、任意選択的に、１つ以上の競合ポリヌクレオチドＰＣＲ生成物が検出される、実施形態１～１４のいずれか１つに記載の方法。

【０３５６】

　１６．方法が、１つ以上のプローブ群を提供することを含み、各プローブ群が、第１の標識で標識された少なくとも１つのプローブポリヌクレオチド及び第２の標識で標識された少なくとも１つのプローブポリヌクレオチドを含み、
第１の標識と第２の標識とが異なる、実施形態１～１５のいずれか１つに記載の方法。

【０３５７】

　１７．第１の標識で標識された少なくとも１つのプローブが、第１の標的生成物にハイブリダイズすることができ、第２の標識で標識された少なくとも１つのプローブが、第１の調整された競合生成物にハイブリダイズすることができる、実施形態１６に記載の方法。

【０３５８】

　１８．第１の標識で標識された少なくとも１つのプローブが、第１の調整された競合生成物にハイブリダイズすることができ、
第２の標識で標識された少なくとも１つのプローブが、第２の調整された競合生成物にハイブリダイズすることができ、
任意選択的に、いずれのプローブも、第１の標的生成物にハイブリダイズすることができない、実施形態１６又は１７に記載の方法。

【０３５９】

　１９．単一のプローブ群内に、
　第１の標識で各々標識された少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、若しくは少なくとも１００個の異なるプローブ、及び／又は
　第２の標識で各々標識された少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、若しくは少なくとも１００個の異なるプローブが存在する、実施形態１６～１８のいずれか１つに記載の方法。

【０３６０】

　２０．方法が、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、又は少なくとも１００個の異なるプローブ群を提供することを含み、
任意選択的に、特定の標識（任意選択的に、フルオロフォア）が、２つ以上のプローブ群で使用されない、実施形態１６～１９のいずれか１つに記載の方法。

【０３６１】

　２０．プローブ上に存在する標識が、第１の標識及び第２の標識のみである、実施形態１６～１９のいずれか１つに記載の方法。

【０３６２】

２１．第１及び第２の標識が、フルオロフォアであり、任意選択的に、
各プローブが、クエンチャーを含み、かつ／又は
第１の標識がＦＡＭであり、第２の標識がＨＥＸであるか、若しくは第１の標識がＨＥＸであり、第２の標識がＦＡＭである、実施形態１６～２０のいずれか１つに記載の方法。
【０３６３】
２２．
ｉ）第１の標的生成物にハイブリダイズすることができる少なくとも１つのプローブ及び第１の調整された競合生成物にハイブリダイズすることができる少なくとも１つのプローブが、異なる標識で標識され、かつ／又は
ｉｉ）第１の調整された競合生成物にハイブリダイズすることができる少なくとも１つのプローブ及び第２の調整された競合生成物にハイブリダイズすることができる少なくとも１つのプローブが、異なる標識で標識される、実施形態１６～２１のいずれか１つに記載の方法。
【０３６４】
２３．特定の状態の正の予測的関係に関連する標的ポリヌクレオチド生成物にハイブリダイズすることができる各プローブが、第１の標識で標識され、調整された競合ポリヌクレオチド生成物にハイブリダイズすることができる対応するプローブが、第２の標識で標識され、
かつ／又は
特定の状態の負の予測的関係に関連する標的ポリヌクレオチド生成物にハイブリダイズすることができる各プローブが、第２の標識で標識され、調整された競合ポリヌクレオチド生成物にハイブリダイズすることができる対応するプローブが、第１の標識で標識される、実施形態１６～２２のいずれか１つに記載の方法。
【０３６５】
２４．増幅後に、第１のプローブによって検出される生成物の量及び第２のプローブによって検出される生成物の量が決定される、実施形態１６～２３のいずれか１つに記載の方法。
【０３６６】
２５．各プローブの相対量を標準曲線と比較して、１つ以上の状態の相対確率を決定する、実施形態２４に記載の方法。
【０３６７】
２６．方法が、使用される全てのフルオロフォアの単一読み取りを含む、実施形態１～２５のいずれか１つに記載の方法。
【０３６８】
２７．方法が、少なくとも第１及び第２の標的ポリヌクレオチドの増幅のためのものであり、任意選択的に、方法が、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、又は少なくとも１００個の標的ポリヌクレオチドの増幅のためのものである、実施形態１～２６のいずれか１つに記載の方法。
【０３６９】
２８．方法が、２つの調整された競合ポリヌクレオチドの増幅を含み、方法が、
第１の標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができる少なくとも１つのプライマーによる第１の調整された競合ポリヌクレオチドの増幅と、
第２の標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができる少なくとも１つのプライマーによる第２の調整された競合ポリヌクレオチドの増幅と、を含む、実施形態１～２７のいずれか１つに記載の方法。
【０３７０】
２９．方法が、対象における疾患若しくは状態の診断及び／又は予後のためのものである、実施形態１～２８のいずれか１つに記載の方法。

【０３７１】
３０．核酸が、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）又はリコンビナーゼポリメラーゼ反応（ＲＰＡ）を使用して増幅される、実施形態１～２９のいずれか１つに記載の方法。
【０３７２】
３１．対象における疾患若しくは状態の診断又は予後の方法であって、当該方法が、実施形態１～３０のいずれか１つに記載の方法を含む、方法。
【０３７３】
３２．対象が、第１の標識及び第２の標識の相対量が疾患若しくは状態の予後を示す場合、疾患若しくは状態又は疾患若しくは状態の予後を有すると診断される、実施形態３１に記載の方法。
【０３７４】
３３．疾患又は状態が、ヒト結核、ＨＩＶ同時感染を伴うヒト結核、ＨＩＶ同時感染を伴わないヒト結核、がん、任意選択的に、前立腺がん又は乳がん、敗血症、カンジダ血症、ウシ結核、ウシ乳房炎から選択される、実施形態３１又は３２に記載の方法。
【０３７５】
３４．疾患が、結核であり、任意選択的に、
差次的遺伝子調節シグネチャ及び／若しくは予測的関係が、対象の白血球から特定され、かつ／又は
ＧＢＰ６、ＡＲＧ１、及びＴＭＣＣ１の差次的調節の程度が、いくつかの「他の疾患」を有するのと比較して、結核を有する全体的な確率に寄与し、任意選択的に、遺伝子発現シグネチャが、結核を有しない患者におけるこれらの遺伝子のレベルと比較して、ＧＢＰ６の上方調節、並びにＡＲＧ１及びＴＭＣＣ１の下方調節である、実施形態３１～３３のいずれか１つに記載の方法。
【０３７６】
３５．疾患が、がん、任意選択的に、前立腺がん又は乳がん、任意選択的に、前立腺がんである、実施形態３１～３４のいずれか１つに記載の方法。
【０３７７】
３６．疾患又は状態の診断が、少なくとも２つの遺伝子の相対発現レベルの評価を必要とし、任意選択的に、少なくとも３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、又は少なくとも１００個の遺伝子の相対発現レベルの評価を必要とする、実施形態３１～３５のいずれか１つに記載の方法。
【０３７８】
３７．以下のうちの１つ以上を含む組成物：
ａ）実施形態１～３０のいずれか１つに定義される少なくとも１つの標的核酸配列、
ｂ）実施形態１～３０のいずれか１つに定義される少なくとも１つの調整された競合ポリヌクレオチド、
ｃ）実施形態１～３０のいずれか１つに定義される少なくとも１つのプライマー、任意選択的に、実施形態１～３０のいずれか１つに定義される少なくとも２つのプライマー、
ｄ）少なくとも１つ以上のプローブ群であって、各プローブ群が、任意選択的に、実施形態１６～３０のいずれか１つに定義される、第１の標識で標識された少なくとも１つのプローブポリヌクレオチド及び第２の標識で標識された少なくとも１つのプローブポリヌクレオチドを含む、少なくとも１つ以上のプローブ群。
【０３７９】
３８．実施形態１～３０のいずれか１つに定義される、調整された競合ポリヌクレオチド。
【０３８０】
３９．実施形態１～３６のいずれか１つに記載の方法を実施するためのキットであって、キットが、

ａ）実施形態１～３０によって定義される１つ以上の調整された競合ポリヌクレオチド、
ｂ）任意選択的に、実施形態１～３０のいずれか１つに定義される１つ以上のプライマー、
ｃ）実施形態１６～３０のいずれか１つに定義される第１のプローブ群、
ｄ）好適な緩衝液、
ｅ）使用説明書、のうちの１つ以上を含み、
任意選択的に、キットが、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、若しくは少なくとも１０個の異なる調整された競合ポリヌクレオチド、及び／又は少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、若しくは少なくとも１０個の異なるプローブ群を含む、キット。

【０３８１】

４０．少なくとも第１のプライマーの第１の標的ポリヌクレオチドとのハイブリダイゼーションに対して競合し、第１の標的生成物及び第１の調整された競合生成物の増幅をもたらす、第１の競合ポリヌクレオチドを調整する方法であって、
ａ）増幅される調整された競合ポリヌクレオチドの割合と比較して、異なる割合の標的ポリヌクレオチドが増幅され、
ｂ）第１の標的ポリヌクレオチドの増幅が、特定の状態に対する標的ポリヌクレオチドの予測的関係に一致し、かつ／又は
ｃ）第１の標的ポリヌクレオチドの増幅率、及び任意選択的に、第２の標的ポリヌクレオチドの増幅率が、所定の重み付けに一致し、
本方法が、
第１の標的生成物の配列及び／又は第１の標的生成物の長さに関して、調整された競合ポリヌクレオチドの配列及び／又は調整された競合増幅生成物の長さを最適化することを含む、方法。

【０３８２】

４１．
第１の標的生成物が２つのプライマーからのプライマー伸長によって生成される（任意選択的に、ＰＣＲによって生成される）ように第１の標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができる、第２のプライマーが当該増幅に使用され、
第１の調整された競合生成物が２つのプライマーからのプライマー伸長によって生成される（任意選択的に、ＰＣＲによって生成される）ように第１の調整された競合ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができる、第３のプライマーが当該増幅に使用され、
任意選択的に、第２及び第３のプライマーが、同じ配列を有する、実施形態４０に記載の方法。

【０３８３】

４２．当該最適化が、増幅後、
ａ）増幅される調整された競合ポリヌクレオチドの割合と比較して、異なる割合の標的ポリヌクレオチドが増幅され、
ｂ）第１の標的ポリヌクレオチドの増幅が、特定の状態に対する標的の予測的関係に一致し、かつ／又は
ｃ）第１の標的ポリヌクレオチドの増幅率、及び任意選択的に、第２の標的ポリヌクレオチドの増幅率が、所定の重み付けに一致し、
第１の標的ポリヌクレオチドの最も好ましい増幅をもたらす調整された競合を選択することをもたらす、２つ以上の試験調整された競合ポリヌクレオチドを生成することを含む、実施形態４０又は４１に記載の方法。

【０３８４】

４３．方法が、先行実施形態のいずれかによる競合増幅を含む、システムの転写状態を決定する方法。

【０３８５】

４４．システムが状態Ａ又は状態Ｂにあるかを決定する方法であって、本方法が、先行実施形態のいずれかによる競合増幅を含む、方法。

【０３８６】

４５．試料中の少なくとも２つの標的ポリヌクレオチドの同時競合増幅の方法であって、
ａ）ポリヌクレオチドを含む試料、
ｂ）第１及び第２の調整された競合ポリヌクレオチド、
ｃ）第１のプライマーセットであって、プライマーセットが、第１の標的ポリヌクレオチド及び第１の競合ポリヌクレオチドの反対側の鎖上でハイブリダイズすることができて、第１の標的増幅生成物及び第１の競合増幅生成物の生成を可能にする２つのプライマーを含む、第１のプライマーセット、
ｄ）第２のプライマーセットであって、プライマーセットが、第２の標的ポリヌクレオチド及び第２の競合ポリヌクレオチドの反対側の鎖上でハイブリダイズすることができて、第２の標的生成物及び第２の競合生成物の生成を可能にする２つのプライマーを含む、第２のプライマーセット、
ｅ）第１のプローブ群であって、第１のプローブ群が、第１の標的増幅生成物にハイブリダイズすることができる第１の標識標的プローブ及び第１の競合増幅生成物にハイブリダイズすることができる第１の標識競合プローブを含む、第１のプローブ群、
ｄ）第２のプローブ群であって、第２のプローブ群が、第２の標的増幅生成物にハイブリダイズすることができる第２の標識標的プローブ及び第２の競合増幅生成物にハイブリダイズすることができる第２の標識競合プローブを含む、第２のプローブ群、を提供することであって、
ｉ）第１の標識標的プローブ及び第２の標的標識プローブが、同じ第１の標識で標識され、かつ第１の標識競合プローブ及び第２の標識競合プローブが、同じ第２の標識で標識されるか、又は
ｉｉ）第１の標識標的プローブ及び第２の標識競合プローブが、同じ第１の標識で標識され、かつ第１の標識競合プローブ及び第２の標識標的プローブが、同じ第２の標識で標識される、提供することと、
第１及び第２のプライマーセットが標的及び競合ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることを可能にすることと、を含む、方法。
【０３８７】
４６．方法が、
ｅ）更なる１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０個のプライマーセット及び対応するプローブ群を提供することを含む、４５に記載の方法。
【０３８８】
４７．方法が、多重増幅後、第１の標識及び第２の標識の量を同時に検出することを更に含む、実施形態４６に記載の方法。
【図面の簡単な説明】
【０３８９】
【図１－１】従来のＰＣＲのメカニズム。Ａ）ＰＣＲでは、異なる温度段階を循環することにより、標的配列を何度も複製又は「増幅」する。この倍化は、目的の標的に特異的な短い合成「プライマー」オリゴヌクレオチドによって促進される。プライマーが使い果たされると、反応は停止する。
【図１－２】従来のＰＣＲのメカニズム。Ｂ）定量ＰＣＲでは、合成「プローブ」配列も同様に含まれ、標的の各複製で蛍光シグナルを生成する。プローブは、一端にフルオロフォア、もう一方にクエンチャーを用いて設計される。プローブが無傷のままである間、クエンチャーは、フルオロフォアによって放出された光を吸収し、それが検出されないようにする。しかしながら、反応が進むにつれて、ポリメラーゼは、プローブを分解し、それを細かい断片に噛み砕く。これは、フルオロフォアをクエンチャーから分離し、検出可能な蛍光シグナルをもたらす。
【図２－１】標的配列の組成を変化させると、増幅挙動が変化する。天然ＰＣＲ標的配列（ＷＴ）のバリエーションは、同じプライマー配列を利用するように設計されたが、塩基対の数（ＢＰ）及びプライマー領域間でグアニン又はシトシンであるヌクレオチドの割合（ＧＣ）が異なる。ＩＳＯ標的は、ＷＴと同じ長さ（８８ｂｐ）及びＧＣ含有量（４３％

）を有するが、配列が異なる。Ａ）これらの標的のＰＣＲ反応は、式（１）に適合し、灰色の線は、参照のためのＩＳＯ適合を示す。
【図２－２】標的配列の組成を変化させると、増幅挙動が変化する。
【図２－３】標的配列の組成を変化させると、増幅挙動が変化する。
【図２－４】Ｂ）これらの標的は、広範囲の指数関数的増殖率を示す（＊はＩＳＯ標的を示す）。この増幅挙動の多様性は、特定の用途に合わせてＣＡＮの特性を調整するために使用される。
【図３】直接競合ＰＣＲのための標的設計。合成ＲＥＦ配列は、同じプライマーに対してＷＴ配列と競合するが、２つは、異なる標識を有する異なるプローブによって標的化される。
【図４－１】直接競合増幅のエンドポイント。図３からのＷＴ配列を、示されたＲＥＦ配列と同じ反応で増幅した。４５回のＰＣＲサイクル後のＷＴ（ＦＡＭ）蛍光とＲＥＦ（ＨＥＸ）蛍光との間の差は、ＷＴ開始量の関数として示される。それぞれのＲＥＦ配列の初期濃度は、各プロットで縦の灰色の線で示されている。用量反応関係は、シグモイド曲線に適合される（黒色の曲線、灰色の曲線はＩＳＯ適合を反映する）。挿入された数字はシグモイド指数を示し、数字が大きいほど曲線がより険しいことを示す。速い競合配列（配列が短いほど、配列のＧＣ含有量が低い）との反応は、急激な遷移を示したが、遅い競合配列は緩やかな曲線をもたらした。
【図４－２】直接競合増幅のエンドポイント。
【図４－３】直接競合増幅のエンドポイント。
【図５】間接ＣＡＮの原理。Ａ）間接競合では、天然の標的は蛍光プローブと直接相互作用しない。代わりに、複数の合成標的が使用され、それらの各々は、別の配列を有する１つのプライマーのみを共有し得る。Ｂ）抽象的なネットワーク図。天然の標的は正方形、合成標的は丸、プライマーは点として示されている。複数の標的（ここでは、ｐ０及びｐ３）によって共有されない「非競合」プライマーは、概して図から省略される。
【図６－１】様々な間接ＣＡＮアーキテクチャのシミュレートされた出力。間接ＣＡＮは、個々の成分のパラメータ（増幅率、濃度）を調整することによって、又は成分間の接続性を変更することによって調整することができる。ここに示されるように、間接ＣＡＮは、１０％～９０％の最大シグナル差の間のＷＴ濃度範囲として定義される幅広いダイナミックレンジ（ＤＲ）を達成することができる。
【図６－２】様々な間接ＣＡＮアーキテクチャのシミュレートされた出力。
【図７－１】色素の一例である。
【図７－２】色素の一例である。
【図８－１】結核の診断のための３組の直接ＣＡＮ。Ａ）ＣＡＮは、遺伝子発現シグネチャの転写産物ごとに１つずつ、３つの直接的な競合対からなる。各対は、ロジスティック回帰からのそれぞれの対数オッズをシミュレートする様々な濃度の天然の標的に対するシグナル応答を示すように設計される（図６）。ここには、シミュレートされた反応結果が示されている。Ｂ）３対全てが同じ反応で増幅される場合、得られた蛍光は、それらの個々の寄与を集約する。青緑色（ｔｅａｌ）のシグナルとオレンジ色のシグナルとの間の全体的な蛍光差は、ロジスティック回帰によって提供される対数オッズとはほとんど異ならない（ｄｉｆｆｅｒｓ　ｉｎｓｕｂｓｔａｎｔｉａｌｌｙ）最終診断を提供する。
【図８－２】結核の診断のための３組の直接ＣＡＮ。
【図９】間接ＣＡＮの原理。Ａ）間接競合では、天然の標的は蛍光プローブと直接相互作用しない。代わりに、複数の合成標的が使用され、それらの各々は、別の配列を有する１つのプライマーのみを共有し得る。Ｂ）抽象的なネットワーク図。天然の標的は正方形、合成標的は丸、プライマーは点として示されている。複数の標的（ここでは、ｐ０及びｐ３）によって共有されない「非競合」プライマーは、概して図から省略される。
【図１０－１】高次ＣＡＮは、ブール論理に近似するように設計することができる。間接競合は、複数の標的のパターンで構成される組み合わせを認識することができる。ここでは、ＣＡＮモチーフは、ブールゲートとして機能し、指定された条件が真（ｔｒｕｅ）の

場合は青緑色／高、偽（ｆａｌｓｅ）の場合はオレンジ色／低をシグナルする。「半分」のＸＯＲは例外であり、偽の場合にシグナルパリティを生成する。ここに示されている完全なＸＯＲは不完全であり、更に調整する必要があるが、高次ＣＡＮから可能な豊富な挙動を示している。ネットワークパラメータを調整することは、移行レジームの急峻性（ａｂｒｕｐｔｎｅｓｓ）及び位置を決定することができる。逆ゲート、ＮＡＮＤ、ＮＯＲ、及びＸＮＯＲは全て、プローブ標識を交換するだけで取得できることに留意されたい。シミュレートした結果、全ての標的は、０．９の増幅率を有すると仮定される。

【図１０－２】高次ＣＡＮは、ブール論理に近似するように設計することができる。

【図１１－１】デジタルＰＣＲデータのロジスティック回帰。Ａ）灰色の点は、結核（ＴＢ）又は他の疾患（ＯＤ）のいずれかを有する個々の患者に見られる遺伝子濃度を示し、破線は、ロジスティック回帰の結果である。対数オッズ（左）及び確率（右）は、単純な非線形変換によって交換可能である。これらの結果から、第４の遺伝子であるＰＲＤＭ１は、診断に有意義に貢献していないことがわかる。

【図１１－２】デジタルＰＣＲデータのロジスティック回帰。Ｂ）全体的な診断に対する各遺伝子の個々の寄与は、対応する色によって示され、全体的な対数オッズは、破線によって示される。矢印は、統計的診断がゴールドスタンダードの診断、微生物培養と一致しない患者を指す。

【図１２】様々な間接ＣＡＮアーキテクチャのシミュレートした出力。間接ＣＡＮは、個々の成分のパラメータ（増幅率、濃度）を調整することによって、又は成分間の接続性を変更することによって調整することができる。ここに示されるように、間接ＣＡＮは、１０％～９０％の最大シグナル差の間のＷＴ濃度範囲として定義される幅広いダイナミックレンジ（ＤＲ）を達成することができる。

【図１３－１】ｃｔＤＮＡ中の微量がん性ＳＮＰの検出のためのＣＡＮシステム。Ａ）追加の競合メカニズムは、ＷＴの増幅を抑制して、ＳＮＰ濃度のみを反映するシグナルを生成する。ポリメラーゼによって伸長することができないブロッカーオリゴ（濃い紫色）は、ＳＮＰバリアントよりもＷＴアレルに対する親和性が大きいため、対応するＷＴ鎖の複製を阻害する。最終的な色の強度の比は、高いＷＴ濃度であっても、ＳＮＰの量に対応する。

【図１３－２】ｃｔＤＮＡ中の微量がん性ＳＮＰの検出のためのＣＡＮシステム。Ｂ）個々のシミュレートされたＨＥＸ及びＦＡＭの蛍光トレース。

【図１３－３】ｃｔＤＮＡ中の微量がん性ＳＮＰの検出のためのＣＡＮシステム。Ｃ）１０５コピーのＷＴの存在下での様々な濃度のＳＮＰについての反応のエンドポイントにおける蛍光強度（ＦＡＭ－ＨＥＸ）の差。かかるシステムと同時に複数の異なる変異を標的にすることができ、したがって、ｃｆＤＮＡ中の総ＳＮＰ負荷は、エンドポイントのシグナル差から推定することができる。

【図１４－１】高次ＣＡＮは、ブール論理に近似するように設計することができる。間接競合は、複数の標的のパターンで構成される組み合わせを認識することができる。ここでは、ＣＡＮモチーフは、ブールゲートとして機能し、指定された条件が真（ｔｒｕｅ）の場合は青緑色／高、偽（ｆａｌｓｅ）の場合はオレンジ色／低をシグナルする。「半分」のＸＯＲは例外であり、偽の場合にシグナルパリティを生成する。ここに示されている完全なＸＯＲは不完全であり、更に調整する必要があるが、高次ＣＡＮから可能な豊富な挙動を示している。ネットワークパラメータを調整することは、移行レジームの急峻性（ａｂｒｕｐｔｎｅｓｓ）及び位置を決定することができる。逆ゲート、ＮＡＮＤ、ＮＯＲ、及びＸＮＯＲは全て、プローブ標識を交換するだけで取得できることに留意されたい。シミュレートした結果、全ての標的は、０．９の増幅率を有すると仮定される。

【図１４－２】高次ＣＡＮは、ブール論理に近似するように設計することができる。

【図１５－１】冗長な標的化は、ＣＡＮの設計を可能にし、２つの標的の相対濃度を、それらの絶対濃度とは無関係に報告する。Ａ）遺伝子転写産物は、典型的には数千ヌクレオチド長であり、ＰＣＲ標的は、１００ヌクレオチド程度であり、複数のＰＣＲ標的が単一の転写産物に由来し得ることを意味する。これにより、目的の遺伝子（ＴＭＣＣ１）の濃

度を古典的な「ハウスキーピング」遺伝子（ＧＡＰＤＨ）と比較するなど、各々が同じ配列の異なる領域を標的とする独立したＣＡＮモチーフの設計が可能になる。Ｂ）ここに示されるＣＡＮモチーフは、大まかに比較器として機能し、一方の標的が他方の標的よりも大きいかどうかを報告するが、狭い濃度レジーム内でのみ報告する。Ｃ）Ｂからのモチーフを単一の反応で組み合わせると、それらの蛍光出力が積み重ねられ、試料がどの程度希釈されているかにかかわらず、２つの転写産物の（ｌｏｇ）相対濃度に比例するシグナルが生成される。Ｄ）シグナルパリティレジームは、競合の濃度を調整することによってシフトすることができ、それにより、反応は、アルファの濃度がベータの濃度よりも１００倍超又は１００倍未満であるかを決定する。

【図１５－２】冗長な標的化は、ＣＡＮの設計を可能にし、２つの標的の相対濃度を、それらの絶対濃度とは無関係に報告する。

【図１６－１】Ａ）プライマー対によるプローブ標的化反応について、長さ及びＧＣ含有量にわたる増幅率及び推定傾向を測定した。上の行のタイトルは、使用されたフォワードプライマーとリバースプライマーを示し、丸は、１０＾８コピー／反応での特定の標的の測定値を示す。

【図１６－２】Ａ）プライマー対によるプローブ標的化反応について、長さ及びＧＣ含有量にわたる増幅率及び推定傾向を測定した。

【図１６－３】Ａ）プライマー対によるプローブ標的化反応について、長さ及びＧＣ含有量にわたる増幅率及び推定傾向を測定した。

【図１６－４】Ａ）プライマー対によるプローブ標的化反応について、長さ及びＧＣ含有量にわたる増幅率及び推定傾向を測定した。

【図１６－５】Ｂ）プライマー対による色素標的化反応について、長さ及びＧＣ含有量にわたる測定増幅率及び推定傾向。上の行のタイトルは、使用されたフォワードプライマーとリバースプライマーを示し、丸は、１０＾８コピー／反応での特定の標的の測定値を示す。

【図１６－６】Ｂ）プライマー対による色素標的化反応について、長さ及びＧＣ含有量にわたる測定増幅率及び推定傾向。

【図１６－７】Ｂ）プライマー対による色素標的化反応について、長さ及びＧＣ含有量にわたる測定増幅率及び推定傾向。

【図１６－８】Ｂ）プライマー対による色素標的化反応について、長さ及びＧＣ含有量にわたる測定増幅率及び推定傾向。

【図１７－１】配列情報。

【図１７－２】配列情報。

【図１７－３】配列情報。

【図１７－４】配列情報。

【図１７－５】配列情報。

【図１７－６】配列情報。

【図１７－７】配列情報。

【図１７－８】配列情報。

【図１８】ＣＡＮの組み合わせは付加的な挙動につながる。ここでは、１０＾３コピーのＳ０５６．２．２及び１０＾３コピーの合成競合Ｓ０５６．４．２を各反応に含め、２つの標的Ｓ０５６．２．１０及びＳ０５６．４．１０を示された濃度で含めた。Ｓ０５６．２．１０は、Ｓ０５６．２．２とプライマーを共有し、Ｓ０５６．４．１０は、Ｓ０５６．４．２とプライマーを共有する。Ｓ０５６．２．１０及びＳ０５６．４．１０は、ＦＡＭプローブによって標的化され、Ｓ０５６．２．２及びＳ０５６．４．２は、ＨＥＸプローブによって標的化される。したがって、このシステムは、異なる標的濃度に対する独立したエンドポイント応答を有する２つのＣＡＮからなる。両方のＣＡＮがプローブフルオロフォアを共有することを考慮すると、それらのそれぞれの蛍光挙動は、相加的に組み合わされる。いずれかの標的の濃度が高いほど、より強いＦＡＭシグナル及びより弱いＨＥＸシグナルにつながる。全ての反応の最後のＦＡＭとＨＥＸとの間の強度の差は、右下の

プロットに要約されている。このシグナル差は、両方の標的が最高濃度である場合に最大に達する。

【図１９】ＣＡＮのエンドポイント応答プロファイルは、様々な成分を調整することによって調整可能である。単一競合ＣＡＮの応答プロファイルが、ここに示されている。応答の鋭さは、競合配列及び野生型配列の選択によって異なり得る。競合の濃度を調整すると、応答プロファイルの中心点がシフトする。最後に、シグナル応答の最小及び最大範囲は、プライマーの濃度を減少させることによって制約され得る。

【図２０】特定の用途のためのＣＡＮを設計するプロセス。開業医は、患者データに対して回帰（例えば、ロジスティック回帰）を行って、どの遺伝子転写産物を標的にするか、並びに各転写産物の発現レベルと診断確率との間の適切な関係の両方を決定することによって開始する。次に、開業医は、各標的転写産物について、ＣＡＮアーキテクチャ（すなわち、競合配列の数）及び共有プライマーの配置を選択する。次に、開業医は、患者データの回帰結果（具体的には、各オリゴヌクレオチドの濃度及び所望の増幅挙動）を最適に再現する各ＣＡＮモジュールの理想的な成分を計算的に決定する。以前に取得したデータを使用して、開業医は、各競合オリゴヌクレオチドの設計パラメータ（長さ及びＧＣ含有量）を提案し、所望の増幅挙動をもたらす可能性が最も高いものを選択する。次いで、これらのパラメトリック設計を使用して配列設計を生成し、それらを取得し、標準的なＰＣＲ増幅を介して実験的に試験し、分析して、それらの挙動を説明することができる。これらの新しい観測は、マルチタスク回帰フレームワークにおける以前の観測と組み合わされ、統計モデルは、設計パラメータと各増幅パラメータとの間の経験的関係を一緒に学習する。更なる最適化が必要な場合、この統計モデルを使用して、新たに取得したデータに照らして、望ましい増幅挙動を生成する可能性が最も高い新しい配列設計を提案することができる。このプロセスは、ＣＡＮ反応を介したロジスティック回帰結果の再現を可能にする好適な競合配列が見つかるまで続く。

【図２１－１】所与の標的増幅率ｒを達成するために、どのように回帰が競合の調整を可能にするのかの図示。Ａ）回帰曲面（左端）は、例えば、ガウス過程回帰を介して生成され、その関係の不確実性とともに、長さ（ＢＰ、ヌクレオチド単位）及びＧＣ含有量（パーセント単位）の２つの競合設計パラメータを、観測された増幅率に関連付ける。ここでは、観測された点（すなわち、設計され、実験的に試験された競合配列）は、増幅率によって網掛けされた丸で示されている。塗りつぶされた輪郭は、回帰アルゴリズムによって決定された各点での予想される増幅率を表し、破線は、これまでに観測された全てのｒ値の標準偏差の倍数として示される等不確実性輪郭（ｉｓｏ－ｕｎｃｅｒｔａｉｎｔｙ ｃｏｎｔｏｕｒ）（回帰子によって返される分散の平方根）を表す。この回帰曲面から、期待改善量（Ｅｘｐｅｃｔｅｄ Ｉｍｐｒｏｖｅｍｅｎｔ）などのメトリックを計算することができ、それは、所望の標的増幅率を示す可能性が高い新しい設計を示す。ここには、目標を達成する可能性がより高いことを示す明るい色合いの異なる標的の期待改善量曲面（Ｅｘｐｅｃｔｅｄ Ｉｍｐｒｏｖｅｍｅｎｔ ｓｕｒｆａｃｅ）が示されている。

【図２１－２】所与の標的増幅率ｒを達成するために、どのように回帰が競合の調整を可能にするのかの図示。Ｂ）１．０の標的増幅率についてここに示されている回帰曲面及び期待改善量曲面は、新しい配列が試験され、モデルに追加されるにつれて変化する。このようにして、開業医は、所望の増幅率を達成するために競合配列を反復的に調整することができる：ｉ）これまでに得られたデータに対して回帰が実行される、ｉｉ）所望の比率を達成する可能性が高い新しい設計が提案される、ｉｉｉ）この設計に基づく新しい配列が得られ、実験的に試験される、ｉｖ）観察された挙動が最適でない場合、回帰曲面を更新して、このデータを組み込むことが可能であり、ｖ）更に別の設計が提案され得る。

【図２１－３】所与の標的増幅率ｒを達成するために、どのように回帰が競合の調整を可能にするのかの図示。

【図２２－１】ここには、図２に示されている各合成アンプリコンとその図に示されている「ＷＴ」との間の競合増幅反応のリアルタイム蛍光トレースが示されている。各反応について、競合を固定濃度で維持し、ＷＴを、１反応当たり１０＾２～１０＾８コピーの濃

度範囲で試験する。ＷＴは、ＦＡＭフルオロフォアを有するプローブによって標的化され、このシグナルの強度は、各パネルの上半分に示されている。競合アンプリコンは、ＨＥＸフルオロフォアを有するプローブによって標的化される。このシグナルの強度は、各パネルの下半分に反転させて示されている。反応は、競合とＷＴの相対濃度の対数によって色分けされている。「ｌｏｇ１０比」が３とは、反応中にそれぞれの競合よりも１０００倍多くのＷＴが存在することを示し、「ｌｏｇ１０比」が－５とは、反応中にＷＴよりも１００００００倍多くの競合が存在することを意味する。ＢＰ１５競合は、プローブ領域を許容するには短すぎたため、ＨＥＸシグナルは観察されないが、エンドポイント蛍光シグナルの用量依存的変化は依然として観察されることに留意されたい。ここに示される各反応のＦＡＭ及びＨＥＸシグナル強度の違いを図４に要約する。

【図２２－２】ここには、図２に示されている各合成アンプリコンとその図に示されている「ＷＴ」との間の競合増幅反応のリアルタイム蛍光トレースが示されている。

【図２２－３】ここには、図２に示されている各合成アンプリコンとその図に示されている「ＷＴ」との間の競合増幅反応のリアルタイム蛍光トレースが示されている。

【図２３－１】本研究で使用される検査された配列、設計特性、及び観測された増幅パラメータのリストであり、それらのいずれも任意のＣＡＮの成分として使用することができる。本明細書に列挙される各配列を、従来のＰＣＲ技術を使用して増幅し、得られた蛍光曲線を本研究に記載されるように分析した。測定パラメータＦ０＿ｌｇ、Ｋ、ｒ、及びｍは、式２及び３に現れるパラメータであり、ｔａｕ及びｒｈｏは、式４及び５に現れる。図１６は、ガウス過程回帰によって決定されるｒパラメータについてのこの表の知見を要約し、各配列の長さ（ＢＰ）及びＧＣ含有量（ＧＣ）を、各プライマー対（その図では「ＦＰｎａｍｅ－ＲＰｎａｍｅ」と表記）及びレポーター（色素又はプローブ）について観測された比率ｒに関連付ける。（ＦＰ＝フォワードプライマー、ＲＰ＝リバースプライマー、ＣＯ＝競合オリゴヌクレオチド）。

【図２３－２】本研究で使用される検査された配列、設計特性、及び観測された増幅パラメータのリストであり、それらのいずれも任意のＣＡＮの成分として使用することができる。

【図２３－３】本研究で使用される検査された配列、設計特性、及び観測された増幅パラメータのリストであり、それらのいずれも任意のＣＡＮの成分として使用することができる。

【図２３－４】本研究で使用される検査された配列、設計特性、及び観測された増幅パラメータのリストであり、それらのいずれも任意のＣＡＮの成分として使用することができる。

【図２３－５】本研究で使用される検査された配列、設計特性、及び観測された増幅パラメータのリストであり、それらのいずれも任意のＣＡＮの成分として使用することができる。

【図２３－６】本研究で使用される検査された配列、設計特性、及び観測された増幅パラメータのリストであり、それらのいずれも任意のＣＡＮの成分として使用することができる。

【図２３－７】本研究で使用される検査された配列、設計特性、及び観測された増幅パラメータのリストであり、それらのいずれも任意のＣＡＮの成分として使用することができる。

【図２３－８】本研究で使用される検査された配列、設計特性、及び観測された増幅パラメータのリストであり、それらのいずれも任意のＣＡＮの成分として使用することができる。

【図２３－９】本研究で使用される検査された配列、設計特性、及び観測された増幅パラメータのリストであり、それらのいずれも任意のＣＡＮの成分として使用することができる。

【０３９０】

配列情報：

配列番号１～８０は、図１７に記載のとおりである。配列番号８１～２８７は、以下の表１に記載されており、図２３に記載されているオリゴヌクレオチドに関する。

【表３－１】

表１

配列番号	配列
81	GCTATTGCTGGGATTTTGAGG
82	CGCCAAGTCCAGAACCATAG
83	GGAGAAAAGCCACATGAATGC
84	TGCAGAAACACTACCTGGTAC
85	GCAAGAACCAAGACCCTCAG
86	TCTCTGATCGGTCCCTTTACTC
87	AGTCAGTGTCAATATCCAAGCG
88	CATTTGCTTCAACAGTGACTACG
89	TCCCCATAATCCTTCACATCAC
90	CTGGAGAGAAACCATACCAATG
91	CCAAGTTCACCCAGTTTGTG
92	CAGTGCCTTGTCTGGAGAAT
93	TAATGTATGTCGGCGGTGTATC
94	TAGAGAGGTTACCAGAGCGTTGCC
95	AGCTGTGAGACGAAGGCTTCATGC
96	AGTTTCTCAAGCAGACCAGCCTTTCTC
97	CCAGAGTTCCCAGACGATTCCCA
98	AGTCAGTGTCAATATCCAAGCGCAAATAAAACACAAAACCCCAACTCAAACAAACCACACACCACCAACCCACCCTCCCTCTACTCCTCTTTCTCTTCTTTTCTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAACTCTGATACACCGCCGACATACATTA
99	AGTCAGTGTCAATATCCAAGCGCAAATAACCAACAAACAACCCAACCACCCCACCTCCCACTCTCCCTCCTTCTACTTCTCTTCTTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAATCACGATACACCGCCGACATACATTA
100	AGTCAGTGTCAATATCCAAGCGCGAAAAGAGTGAAGATAGTACGTGATTATGGGTCGGGTCCTGGGCTTTCTTACTTCTGCTATGATTTGTACTTTTACGCATGAAGCCTTCGTCTCACAGCTAGTTCGATACACCGCCGACATACATTA
101	AGTCAGTGTCAATATCCAAGCGTAAGGCCCACCAACATAACCACCCAAAAGATCAAGATTAGTGTGACGTACCTACCCTGAAATGACAGCCGCCTAGCATGAAGCCTTCGTCTCACAGCTGATGAGATACACCGCCGACATACATTA
102	AGTCAGTGTCAATATCCAAGCGTAATCAATCTCTCCTACCATCTCCCCTCCTCCCACCTCACCCTCAACCCACAACACACAAACCCCAACCTAACATAA

【表３－２】

配列番号	配列
	ACTCACTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAAAACTGATACACCGCCGACATACATTA
103	CGCCAAGTCCAGAACCATAGAAATACAGAAAGAAGAGCCCCGGAATAAGACAAGCCAGATGAACACCAATACGACACACTAAAACATCAAACACGGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTATACTTGATACACCGCCGACATACATTA
104	CGCCAAGTCCAGAACCATAGAACAACACCAACAAACCACACACCCCACCACTCATCTCCCTTCTTCCTCTTTCTCTCCTATTTCCTTTACTTTTGCATGAAGCCTTCGTCTCACAGCTCTAAAGATACACCGCCGACATACATTA
105	CGCCAAGTCCAGAACCATAGAGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAATTGATAGAAGTCCCCATAATCCTTCACATCAC
106	CGCCAAGTCCAGAACCATAGAGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAATTGATAGAAGTCCCCATAATCCTTCACATCAC
107	CGCCAAGTCCAGAACCATAGAGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAATTGATAGAAGTCCCCATAATCCTTCACATCAC
108	CGCCAAGTCCAGAACCATAGAGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAATTGATAGAAGTCCCCATAATCCTTCACATCAC
109	CGCCAAGTCCAGAACCATAGATCTGTATCCCAAGTGTTCAGACCTTCATATTGCATGAAGCCTTCGTCTCACAGCTATTGATAGTTCCGATTGCAACTTGACGTCTAGTCCCCATAATCCTTCACATCAC
110	CGCCAAGTCCAGAACCATAGCAACAGAAAAGAACACGAACAACCAAAACCCACAATAAACACACCTACAACACCCAACCCCACCTCACCCCGCATGAAGCCTTCGTCTCACAGCTAACAAGATACACCGCCGACATACATTA
111	CGCCAAGTCCAGAACCATAGCCAAAACCAAACACCAACCACAACCTACCCCATCTCTCCCTCTCTTTTCTCCTTTTATTTCCTGCATGAAGCCTTCGTCTCACAGCTAAACAGATACACCGCCGACATACATTA
112	CGCCAAGTCCAGAACCATAGCCCGCCCCGCCCTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAGCCCGCCCCGCCTCCCCATAATCCTTCACATCAC
113	CGCCAAGTCCAGAACCATAGCCCGCCCCGCCCTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAGCCCGCCCCGCCTCCCCATAATCCTTCACATCAC
114	CGCCAAGTCCAGAACCATAGCCCGCCCCGCCCTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAGCCCGCCCCGCCTCCCCATAATCCTTCACATCAC
115	CGCCAAGTCCAGAACCATAGCCCGCCCCGCCCTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAGCCCGCCCCGCCTCCCCATAATCCTTCACATCAC

【表３－３】

配列番号	配列
116	CGCCAAGTCCAGAACCATAGCGGGCGCGCCGCGCGCGACGCGCGTCCCG TCCGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAACCCGCACGCCGGCGACCGCGC GCCCGGTCCCCATAATCCTTCACATCAC
117	CGCCAAGTCCAGAACCATAGCGGGCGCGCCGCGCGCGACGCGCGTCCCG TCCGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAACCCGCACGCCGGCGACCGCGC GCCCGGTCCCCATAATCCTTCACATCAC
118	CGCCAAGTCCAGAACCATAGCGGGCGCGCCGCGCGCGACGCGCGTCCCG TCCGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAACCCGCACGCCGGCGACCGCGC GCCCGGTCCCCATAATCCTTCACATCAC
119	CGCCAAGTCCAGAACCATAGCGGGCGCGCCGCGCGCGACGCGCGTCCCG TCCGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAACCCGCACGCCGGCGACCGCGC GCCCGGTCCCCATAATCCTTCACATCAC
120	CGCCAAGTCCAGAACCATAGCGGTAATTACTGTTAGACTGGTGGGTATA AACTTCGTTATTTGGATTGGAATTGTTGAGCCCTACCTGACTCTGTATCC CAAGTGTTCTCTGCTTCATATTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAAATT GATAGTTCCGATTGCAACTTGACGTCTAGCCCGTATAAATAGCCGGTCTA AACAGCGATGAAATTTCTGTAGAATCAACTAAATTTTCCGTTCAACGGAT CCTTCCCCATAATCCTTCACATCAC
121	CGCCAAGTCCAGAACCATAGCGGTAATTACTGTTAGACTGGTGGGTATA AACTTCGTTATTTGGATTGGAATTGTTGAGCCCTACCTGACTCTGTATCC CAAGTGTTCTCTGCTTCATATTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAAATT GATAGTTCCGATTGCAACTTGACGTCTAGCCCGTATAAATAGCCGGTCTA AACAGCGATGAAATTTCTGTAGAATCAACTAAATTTTCCGTTCAACGGAT CCTTCCCCATAATCCTTCACATCAC
122	CGCCAAGTCCAGAACCATAGCGGTAATTACTGTTAGACTGGTGGGTATA AACTTCGTTATTTGGATTGGAATTGTTGAGCCCTACCTGACTCTGTATCC CAAGTGTTCTCTGCTTCATATTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAAATT GATAGTTCCGATTGCAACTTGACGTCTAGCCCGTATAAATAGCCGGTCTA AACAGCGATGAAATTTCTGTAGAATCAACTAAATTTTCCGTTCAACGGAT CCTTCCCCATAATCCTTCACATCAC
123	CGCCAAGTCCAGAACCATAGCGGTAATTACTGTTAGACTGGTGGGTATA AACTTCGTTATTTGGATTGGAATTGTTGAGCCCTACCTGACTCTGTATCC CAAGTGTTCTCTGCTTCATATTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAAATT GATAGTTCCGATTGCAACTTGACGTCTAGCCCGTATAAATAGCCGGTCTA

【表３－４】

配列番号	配列
	AACAGCGATGAAATTTCTGTAGAATCAACTAAATTTTCCGTTCAACGGATCCTTCCCCATAATCCTTCACATCAC
124	CGCCAAGTCCAGAACCATAGGCATGTCGGCTCGGTCTGTCTCTTTCCCCTCATCTCTCGGTACACTCCTTACCTCGCCCACCCCGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTATCTGGCCTGTCACGAATCACTGTCCATCTAACCTCGGAGCCCTGTCACGCGGCGGACTTGGAGATCCCCATAATCCTTCACATCAC
125	CGCCAAGTCCAGAACCATAGGCATGTCGGCTCGGTCTGTCTCTTTCCCCTCATCTCTCGGTACACTCCTTACCTCGCCCACCCCGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTATCTGGCCTGTCACGAATCACTGTCCATCTAACCTCGGAGCCCTGTCACGCGGCGGACTTGGAGATCCCCATAATCCTTCACATCAC
126	CGCCAAGTCCAGAACCATAGGCATGTCGGCTCGGTCTGTCTCTTTCCCCTCATCTCTCGGTACACTCCTTACCTCGCCCACCCCGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTATCTGGCCTGTCACGAATCACTGTCCATCTAACCTCGGAGCCCTGTCACGCGGCGGACTTGGAGATCCCCATAATCCTTCACATCAC
127	CGCCAAGTCCAGAACCATAGGCATGTCGGCTCGGTCTGTCTCTTTCCCCTCATCTCTCGGTACACTCCTTACCTCGCCCACCCCGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTATCTGGCCTGTCACGAATCACTGTCCATCTAACCTCGGAGCCCTGTCACGCGGCGGACTTGGAGATCCCCATAATCCTTCACATCAC
128	CGCCAAGTCCAGAACCATAGGGATTATTGGAGCTCCTTTCTCAAAGGGACAGCCACGAGGAGGGGTGGAAGAAGGCCCTACAGTATTGAGAAAGGCTGGTCTGCTTGAGAAACTTAAAGAACAAGAGTGTGATGTGAAGGATTATGGGGA
129	CGCCAAGTCCAGAACCATAGGGATTATTGGAGCTCCTTTCTCAAAGGGACAGCCACGAGGAGGGGTGGAAGAAGGCCCTACAGTATTGAGAAAGGCTGGTCTGCTTGAGAAACTTAAAGAACAAGAGTGTGATGTGAAGGATTATGGGGA
130	CGCCAAGTCCAGAACCATAGGGATTATTGGAGCTCCTTTCTCAAAGGGACAGCCACGAGGAGGGGTGGAAGAAGGCCCTACAGTATTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAAATTAAAGAACAAGAGTGTGATGTGAAGGATTATGGGGA
131	CGCCAAGTCCAGAACCATAGGGATTATTGGAGCTCCTTTCTCAAAGGGACAGCCACGAGGAGGGGTGGAAGAAGGCCCTACAGTATTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAAATTAAAGAACAAGAGTGTGATGTGAAGGATTATGGGGA

【表３－５】

配列番号	配列
132	CGCCAAGTCCAGAACCATAGGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAAATTAAGTGATGTGAAGGATTATGGGGA
133	CGCCAAGTCCAGAACCATAGGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAAATTAAGTGATGTGAAGGATTATGGGGA
134	CGCCAAGTCCAGAACCATAGTAATTATTATAGCTAATTTCTCAAATTTACAGAAACGAATAGAAGTTTAAGAATTAAATACAGTATTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAAATTAAATAACAATAATGTGATGTGAAGGATTATGGGGA
135	CGCCAAGTCCAGAACCATAGTAATTATTATAGCTAATTTCTCAAATTTACAGAAACGAATAGAAGTTTAAGAATTAAATACAGTATTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAAATTAAATAACAATAATGTGATGTGAAGGATTATGGGGA
136	CGCCAAGTCCAGAACCATAGTACAAAGCACGATCGAGAACAGGGCAGGTAGATTGAACGAGATGGGGAATGATGGACGGATAAATGGGACTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAACATTGATACACCGCCGACATACATTA
137	CGCCAAGTCCAGAACCATAGTAGCAATATTGAATTCTAGATTATACGAGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTATTATTTAAGCTATCATACTCTAGTGTTTTCCCCATAATCCTTCACATCAC
138	CGCCAAGTCCAGAACCATAGTAGCAATATTGAATTCTAGATTATACGAGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTATTATTTAAGCTATCATACTCTAGTGTTTTCCCCATAATCCTTCACATCAC
139	CGCCAAGTCCAGAACCATAGTAGCAATATTGAATTCTAGATTATACGAGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTATTATTTAAGCTATCATACTCTAGTGTTTTCCCCATAATCCTTCACATCAC
140	CGCCAAGTCCAGAACCATAGTATCCCAAGTGTTCTCTGCTTCATATTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAAATTGATAGTTCCGATTGCAACTTGACGTTCCCCATAATCCTTCACATCAC
141	CGCCAAGTCCAGAACCATAGTATCCCAAGTGTTCTCTGCTTCATATTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAAATTGATAGTTCCGATTGCAACTTGACGTTCCCCATAATCCTTCACATCAC
142	CGCCAAGTCCAGAACCATAGTCATAGTTCTATATACATTGTCATGACACGAATTGGCTGAAAACGGTTGATAGAAGATATTGACTATATTCTCTTCCGCTGTATCCCGTTTCTTTTGGAAATTGACCGTATTATGGTCACCATCAGCCTAAGTGATCTCTGGACCGTCGAGAGACCCCATTGACTTGGTTCTTCGGTTTGATGCACTCATGTAAAATGTAGTCTCAATCAATACCATCCATTTCTAGCAT

【表３－６】

配列番号	配列
	ACGGGTGAGCATGAAGCCTTCGTCTCACAGCTCCGGTACAGGTAATCGA GAGAACACTAAAACAGTCCGACATGAGATTCATTAAAACCTATTTTCAC CAATCGGTAGAACGGTTATGCGCAAAATATTTTCGGGGTCCACAGTGCA CCTATGTAATCTGTAACATGAAGTTGTACGAAAATAGAGAACCCACCCA GCTTATCTAGGAAATTGATCTCTTCGATTTAAGGATGTGTCGACACGTAT CATGCCAAGTGATCAGAGGCGTAATCCCCATAATCCTTCACATCAC
143	CGCCAAGTCCAGAACCATAGTCTGTATCCCAAGTGTTCAGAGCTTCATAT TGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAAATTGATAGTTCCGATTGCAACTTG ACGTCTAGGTGATGTGAAGGATTATGGGGA
144	CGCCAAGTCCAGAACCATAGTCTGTATCCCAAGTGTTCAGAGCTTCATAT TGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAAATTGATAGTTCCGATTGCAACTTG ACGTCTAGGTGATGTGAAGGATTATGGGGA
145	CGCCAAGTCCAGAACCATAGTGAATATTTTATTCCCTAATTTTATTATTA TGTTCTAAAAGGTATTTAAATACTTTTCATTAATGGCAACGCTCTGGTAA CCTCTCTATCATAAATATTTTAAATACTAGAATCTTATTTTATTCTTTAGA ATAGTAGAAATTTAATTAAATTCCCCATAATCCTTCACATCAC
146	CGCCAAGTCCAGAACCATAGTGAATATTTTATTCCCTAATTTTATTATTA TGTTCTAAAAGGTATTTAAATACTTTTCATTAATGGCAACGCTCTGGTAA CCTCTCTATCATAAATATTTTAAATACTAGAATCTTATTTTATTCTTTAGA ATAGTAGAAATTTAATTAAATTCCCCATAATCCTTCACATCAC
147	CGCCAAGTCCAGAACCATAGTGAATATTTTATTCCCTAATTTTATTATTA TGTTCTAAAAGGTATTTAAATACTTTTCATTAATGGCAACGCTCTGGTAA CCTCTCTATCATAAATATTTTAAATACTAGAATCTTATTTTATTCTTTAGA ATAGTAGAAATTTAATTAAATTCCCCATAATCCTTCACATCAC
148	CGCCAAGTCCAGAACCATAGTGAATATTTTATTCCCTAATTTTATTATTA TGTTCTAAAAGGTATTTAAATACTTTTCATTAATGGCAACGCTCTGGTAA CCTCTCTATCATAAATATTTTAAATACTAGAATCTTATTTTATTCTTTAGA ATAGTAGAAATTTAATTAAATTCCCCATAATCCTTCACATCAC
149	CGCCAAGTCCAGAACCATAGTGCCGAGGGTCCAGGTCGAGACTCCATCC CGAGGCGTGTGTCCCCATGGCCGTCCTCCAGGCTAGTACTGTGCCCCGTC GCCGTCGCACAAGGCCGGTCGATCGTGGTGGCTGTCAGGCGGGGTGGCA ACGCTCTGGTAACCTCTCTACGGCGTAGTAGTTCGTGCCCCTCCCCTTGC GACCTCCCGCTACCACCCGTCACTCCCCGGTAAGAGGCTCTCACGGACG GCAGAGTCGGTCGCGCGCTCCGGATGTGGTCCCCTCCCAGTCCTCTCCCC ATAATCCTTCACATCAC

【表３－７】

配列番号	配列
150	CGCCAAGTCCAGAACCATAGTGCCGAGGGTCCAGGTCGAGACTCCATCC CGAGGCGTGTGTCCCCATGGCCGTCCTCCAGGCTAGTACTGTGCCCCGTC GCCGTCGCACAAGGCCGGTCGATCGTGGTGGCTGTCAGGCGGGGTGGCA ACGCTCTGGTAACCTCTCTACGGCGTAGTAGTTCGTGCCCCTCCCCTTGC GACCTCCCGCTACCACCCGTCACTCCCCGGTAAGAGGCTCTCACGGACG GCAGAGTCGGTCGCGCGCTCCGGATGTGGTCCCCTCCCAGTCCTCTCCCC ATAATCCTTCACATCAC
151	CGCCAAGTCCAGAACCATAGTGCCGAGGGTCCAGGTCGAGACTCCATCC CGAGGCGTGTGTCCCCATGGCCGTCCTCCAGGCTAGTACTGTGCCCCGTC GCCGTCGCACAAGGCCGGTCGATCGTGGTGGCTGTCAGGCGGGGTGGCA ACGCTCTGGTAACCTCTCTACGGCGTAGTAGTTCGTGCCCCTCCCCTTGC GACCTCCCGCTACCACCCGTCACTCCCCGGTAAGAGGCTCTCACGGACG GCAGAGTCGGTCGCGCGCTCCGGATGTGGTCCCCTCCCAGTCCTCTCCCC ATAATCCTTCACATCAC
152	CGCCAAGTCCAGAACCATAGTGCCGAGGGTCCAGGTCGAGACTCCATCC CGAGGCGTGTGTCCCCATGGCCGTCCTCCAGGCTAGTACTGTGCCCCGTC GCCGTCGCACAAGGCCGGTCGATCGTGGTGGCTGTCAGGCGGGGTGGCA ACGCTCTGGTAACCTCTCTACGGCGTAGTAGTTCGTGCCCCTCCCCTTGC GACCTCCCGCTACCACCCGTCACTCCCCGGTAAGAGGCTCTCACGGACG GCAGAGTCGGTCGCGCGCTCCGGATGTGGTCCCCTCCCAGTCCTCTCCCC ATAATCCTTCACATCAC
153	CGCCAAGTCCAGAACCATAGTGTAATATTAACAAGTAATAAAGAAATAT ATAGCATGAAGCCTTCGTCTCACAGCTTTTATTCAATTTAATGATTACCTT TATTATCTTCCCCATAATCCTTCACATCAC
154	GCAAGAACCAAGACCCTCAGAAACACCAACCCAACAACACAAACCCGC AACCTAAAACCACCACAACTCCCTCCTCGCATGAAGCCTTCGTCTCACAG CTCCCCACCCCTTAATTTCCGCACCTATT
155	GCAAGAACCAAGACCCTCAGACACGACTCCCCGCCACAACCACACAATC CACTACCTGCCCACATCCTAACCCTACCCTTCCTGCATGAAGCCTTCGTC TCACAGCTCTAGTCCCCTTAATTTCCGCACCTATT
156	GCAAGAACCAAGACCCTCAGACCAAACGCAACAACACAGACACCACAA CTACCACTCACCCCAACTCCAACCGCATGAAGCCTTCGTCTCACAGCTCT CCGCCCCTTAATTTCCGCACCTATT
157	GCAAGAACCAAGACCCTCAGACCAACAACCGCCAACTACAACGACACC AGAGCACACCCATATACATCACCCCTTCCCCTATTTCTCTTCCGCTCCTTT

【表３－８】

配列番号	配列
	CTTTCCGTCTGTTTCCCGCTGCTTTTCTGTCTCGCCCTAATCCACCAAACC CGCCCACTCCAATATCCTACCTTCTTCACCTTGCCTGTACCGATGACTTTG CCCGAATAATCTACTCTCCTAACCTGCACCCGACTCAACTCCTCATCTAT CCCAACGCCGTCACTTCCTCCATACCTCTACCATCCAACCCCACGACCCA CCTACACAGATACCCAAATCCGCATGAAGCCTTCGTCTCACAGCTTATGT CAGTGCCTTGTCTGGAGAAT
158	GCAAGAACCAAGACCCTCAGACCGCCGCCCACCCCTCCCCGCATGAAGC CTTCGTCTCACAGCTCGCGTCAGTGCCTTGTCTGGAGAAT
159	GCAAGAACCAAGACCCTCAGAGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAATTG ATAGAAGATTCTCCAGACAAGGCACTG
160	GCAAGAACCAAGACCCTCAGATCCATTACCCAGATTGAGCTATTTACGA CGACAACACATCCACATTCTACCTGACCCACTACCGCGCATGAAGCCTTC GTCTCACAGCTTCGATCCCCTTAATTTCCGCACCTATT
161	GCAAGAACCAAGACCCTCAGATCTGTATCCCAAGTGTTCAGACCTTCAT ATTGCATGAAGCCTTCGTCTCACAGCTATTGATAGTTCCGATTGCAACTT GACGTCTAGCAGTGCCTTGTCTGGAGAAT
162	GCAAGAACCAAGACCCTCAGATCTGTATCCCAAGTGTTCAGACCTTCAT ATTGCATGAAGCCTTCGTCTCACAGCTATTGATAGTTCCGATTGCAACTT GACGTCTAGCAGTGCCTTGTCTGGAGAAT
163	GCAAGAACCAAGACCCTCAGATCTGTATCCCAAGTGTTCAGACCTTCAT ATTGCATGAAGCCTTCGTCTCACAGCTATTGATAGTTCCGATTGCAACTT GACGTCTAGCAGTGCCTTGTCTGGAGAAT
164	GCAAGAACCAAGACCCTCAGCACCACCATCCCCACCTCCCACTCTACTCC ACGCCTCAATTCCGACTACCACTACGCCATTTCCCCTCTTCCATTCACTGT CCTTTCTCTCCTTATCCTGCTCCTCTGTCTCTTTTATTCTTTCCTTCCCTTT ATCTCCCGTTACTTGCACTTTACCTATCCGAACCCACACATACCCCTGCC AAAACCCCAACCTAAAACGAACACCCAAACAAAGCCACAATACAACAC ACCAACATAACAACCCGCACTCCCTAATATCACCTTGCCCTCCTACTAAC CTCATCATCTACCCGTCCGCTCTAACACTAATCACACTTACATCTGCCCG CCCCTTACCCTAGAAAACTCGCATGAAGCCTTCGTCTCACAGCTATTTTC AGTGCCTTGTCTGGAGAAT
165	GCAAGAACCAAGACCCTCAGCCACCCTAAATCTCCGCACAGGCATTCAC GACGATATACGGAAACAGCACAAGTGGCACGCGGGAAGGTCATCAGTT ACAGTCATGGTCAGGGTTAGTAGGTTGGGTAGGAGGGAAATTGGACAGA TTAACGAGGGCAGATCAGAGAAACGTGCATACTCTACTCCACACAACTT

【表３－９】

配列番号	配列
	CCGACGCTTAGATAACCACGCAACCCCGAATTTACTACAATAACTCTCCTTTCACCTAGCCATTCCTCCCCTATTCAGTCCTAGTCGCTAAAGTTCCCATCCCCGCATAGTTGAGTGTTGTTGCATGAAGCCTTCGTCTCACAGCTCGCGTCAGTGCCTTGTCTGGAGAAT
166	GCAAGAACCAAGACCCTCAGCCCAAACACAACACCACCAACCACACCCGCCCTCCCACTTCCCTTCTCCTTTCCCCTATCTTACCCTACGCATGAAGCCTTCGTCTCACAGCTCCCCACCCCTTAATTTCCGCACCTATT
167	GCAAGAACCAAGACCCTCAGCCCATACCCCACCCCTCCACTCCTCCTTCCTTTATTTTCGTTTCTCTGTTTTGTATTTGTTGCATGAAGCCTTCGTCTCACAGCTCTTTTCCCCTTAATTTCCGCACCTATT
168	GCAAGAACCAAGACCCTCAGCCCATCCCAGAAACAAGTTACGCGACAGTGAGGAGAGAGCCAAGTATAAGTAAGCAGATCCGTCCATTCAAGCGTCAGAGTCCCGTGCCATTGTTCCCTTCCTATACCCTTGCCACTACTTTCTCGCTCCCATATTTCTACAGGTGCATCGTACTTCTTTATGCCGCGTTACTGTTCACTCTTTTCCTTAGGCTAGATCGGAACTCGCAACAAAACTAATCACAAACGGGCAAAGGGGATACGGACACTGGAATAAGACTACACGCCGACTTGATGAAAGCTACTCCACACGACACAACCTCCTAAACCGACCACCGCCACCAACACACCATCACCCAACCACTCAAAATCCCTACCCGTACCTGAGAGTAAAACCAGCGCCAAATCGACCTCAACCCACCTAACACCCCTATCCATACCGTAAAGCCCTCCGCATGAAGCCTTCGTCTCACAGCTCGGGTCAGTGCCTTGTCTGGAGAAT
169	GCAAGAACCAAGACCCTCAGCCCCGACACAAAATAAAACCACACCAAACACCCAACAACCCCACATCCCACCACCTCCCTACCCACTACCACTCCTCTCTAAACCCGCATGAAGCCTTCGTCTCACAGCTCTTTTCCCCTTAATTTCCGCACCTATT
170	GCAAGAACCAAGACCCTCAGCCCCGCCCGTAACACTCAGACCTAACTAAACCGAGCACCACACAACCCGCATGAAGCCTTCGTCTCACAGCTCCCATCCCCTTAATTTCCGCACCTATT
171	GCAAGAACCAAGACCCTCAGCCCGCCCCGCCCTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAGCCCGCCCCGCCATTCTCCAGACAAGGCACTG
172	GCAAGAACCAAGACCCTCAGCGGGCGCGCCGCGCGCGACGCGCGTCCCGTCCGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAACCCGCACGCCGGCGACCGCGCGCCCGGATTCTCCAGACAAGGCACTG
173	GCAAGAACCAAGACCCTCAGCGGTAATTACTGTTAGACTGGTGGGTATAAACTTCGTTATTTGGATTGGAATTGTTGAGCCCTACCTGACTCTGTATCC

【表３－１０】

配列番号	配列
	CAAGTGTTCTCTGCTTCATATTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAAATTGATAGTTCCGATTGCAACTTGACGTCTAGCCCGTATAAATAGCCGGTCTAAACAGCGATGAAATTTCTGTAGAATCAACTAAATTTTCCGTTCAACGGATCCTATTCTCCAGACAAGGCACTG
174	GCAAGAACCAAGACCCTCAGGCATGAAGCCTTCGTCTCACAGCTCGTGATCAGTGCCTTGTCTGGAGAAT
175	GCAAGAACCAAGACCCTCAGGCATGAAGCCTTCGTCTCACAGCTCGTGATCAGTGCCTTGTCTGGAGAAT
176	GCAAGAACCAAGACCCTCAGGCATGTCGGCTCGGTCTGTCTCTTTCCCCTCATCTCTCGGTACACTCCTTACCTCGCCCACCCCGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTATCTGGCCTGTCACGAATCACTGTCCATCTAACCTCGGAGCCCTGTCACGCGGCGGACTTGGAGAATTCTCCAGACAAGGCACTG
177	GCAAGAACCAAGACCCTCAGGGAGGGAATCACAGTCACGCATGAAGCCTTCGTCTCACAGCTCGTGACTTATGTAGAGGCCATCAACAGTGGAGCAGTGCCTTGTCTGGAGAAT
178	GCAAGAACCAAGACCCTCAGGGAGGGAATCACAGTCACGCATGAAGCCTTCGTCTCACAGCTCGTGACTTATGTAGAGGCCATCAACAGTGGAGCAGTGCCTTGTCTGGAGAAT
179	GCAAGAACCAAGACCCTCAGGGAGGGAATCACAGTCACTGGGAATCGTCTGGGAACTCTGGCAGTGACTTATGTAGAGGCCATCAACAGTGGAGCAGTGCCTTGTCTGGAGAAT
180	GCAAGAACCAAGACCCTCAGGGAGGGAATCACAGTCACTGGGAATCGTCTGGGAACTCTGGCAGTGACTTATGTAGAGGCCATCAACAGTGGAGCAGTGCCTTGTCTGGAGAAT
181	GCAAGAACCAAGACCCTCAGGGAGGGAATCACAGTCACTGGGAATCGTCTGGGAACTCTGGCAGTGACTTATGTAGAGGCCATCAACAGTGGAGCAGTGCCTTGTCTGGAGAAT
182	GCAAGAACCAAGACCCTCAGTACCGTTCGCATCGCCACCTTCACCTCCACTCCCTCCTTCCACACCCGTCTGCACCCCTCGAAGTCTCTGCGCTACTCTATCCCGGTCTGTGCGTTTTACCTCGTCCTCCCCTATGTGTTCCTGATCCCCGCGCATGAAGCCTTCGTCTCACAGCTCATTACAGTGCCTTGTCTGGAGAAT
183	GCAAGAACCAAGACCCTCAGTAGCAATATTGAATTCTAGATTATACGAGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTATTATTTAAGCTATCATACTCTAGTGTTTATTCTCCAGACAAGGCACTG

【表３－１１】

配列番号	配列
184	GCAAGAACCAAGACCCTCAGTATCCCAAGTGTTCTCTGCTTCATATTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAAATTGATAGTTCCGATTGCAACTTGACGTATTCTCCAGACAAGGCACTG
185	GCAAGAACCAAGACCCTCAGTGAATATTTTATTCCCTAATTTTATTATTATGTTCTAAAAGGTATTTAAATACTTTTCATTAATGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTATCATAAATATTTTAAATACTAGAATCTTATTTTATTCTTTAGAATAGTAGAAATTTAATTAAATATTCTCCAGACAAGGCACTG
186	GCAAGAACCAAGACCCTCAGTGCCGAGGGTCCAGGTCGAGACTCCATCCCGAGGCGTGTGTCCCCATGGCCGTCCTCCAGGCTAGTACTGTGCCCCGTCGCCGTCGCACAAGGCCGGTCGATCGTGGTGGCTGTCAGGCGGGGTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTACGGCGTAGTAGTTCGTGCCCCTCCCCTTGCGACCTCCCGCTACCACCCGTCACTCCCCGGTAAGAGGCTCTCACGGACGGCAGAGTCGGTCGCGCGCTCCGGATGTGGTCCCCTCCCAGTCCTCATTCTCCAGACAAGGCACTG
187	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGAACGTAGCAATATTGAATTCTAGATTATACGAGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTATTATTTAAGCTATCATACTCTAGTGTTTCGTTCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
188	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGAACGTAGCAATATTGAATTCTAGATTATACGAGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTATTATTTAAGCTATCATACTCTAGTGTTTCGTTCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
189	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGAAGATCTGTTCATGCGTTCGTTATTTGGATTGGAATTGTTGAGCCCTACCTGACTCTGTATCCCAAGTGTTCTCTGCTTCATATTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAAATTGATAGTTCCGATTGCAACTTGACGTCTAGCCCGTATAAATAGCCGGTCTAAACAGCGATGAAATTTCGTCCGAACAAGTTTCAACTTCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
190	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGAAGATCTGTTCATGCGTTCGTTATTTGGATTGGAATTGTTGAGCCCTACCTGACTCTGTATCCCAAGTGTTCTCTGCTTCATATTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAAATTGATAGTTCCGATTGCAACTTGACGTCTAGCCCGTATAAATAGCCGGTCTAAACAGCGATGAAATTTCGTCCGAACAAGTTTCAACTTCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
191	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGACCACGGTAATTACTGTTAGACTGGTGGGTATAAACTTCGTTATTTGGATTGGAATTGTTGAGCCCTACCTGACTCTGTATCCCAAGTGTTCTCTGCTTCATATTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAAATTGATAGTTCCGATTGCAACTTGACGTCTAGCCCGTATAAATAGCCGG

【表３－１２】

配列番号	配列
	TCTAAACAGCGATGAAATTTCTGTAGAATCAACTAAATTTTCCGTTCAAC GGATCCTCTGCCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
192	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGACCACGGTAATTACTGTTAGACTGGTGGG TATAAACTTCGTTATTTGGATTGGAATTGTTGAGCCCTACCTGACTCTGT ATCCCAAGTGTTCTCTGCTTCATATTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTA AATTGATAGTTCCGATTGCAACTTGACGTCTAGCCCGTATAAATAGCCGG TCTAAACAGCGATGAAATTTCTGTAGAATCAACTAAATTTTCCGTTCAAC GGATCCTCTGCCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
193	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGAGCTTTTCCTAAAAGGATTGTACACCTTA GAAGTGCTTAAGGAAGAGTGATGAAGATAGGCATGAAGCCTTCGTCTCA CAGCTGCATGCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
194	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGAGCTTTTCCTAAAAGGATTGTACACCTTA GAAGTGCTTAAGGAAGAGTGATGAAGATAGGCATGAAGCCTTCGTCTCA CAGCTGCATGCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
195	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGAGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAATAT GCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
196	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGAGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAATAT GCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
197	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGAGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAATTG ATAGAAGCATTTGCTTCAACAGTGACTACG
198	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGAGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAATTG ATAGAAGCATTTGCTTCAACAGTGACTACG
199	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGAGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAATTG ATAGATTCCAGCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
200	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGAGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAATTG ATAGATTCCAGCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
201	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGAGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAATTG ATAGTTCCGATACGTGCAACTTGTCTCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
202	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGAGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAATTG ATAGTTCCGATACGTGCAACTTGTCTCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
203	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGATATGTTCCAGTAGACGCGCAACAGGGC TTCTACGGTTCGCCGGTTATTGACTTACTGCACGTTGGGGAGCGGCTTGA ATTGAGTCCCAGGCCCGAGTCCGTACCGATGCTCTTAGGCGAGCCACGTT TCTGGACCCACCCCGTGCTACCTATGGCCGTTCTTCGTATCTGTCTCTTAG CGCGCCTCAACTATGGTGTCCTCGCCTAGTAGAGCTCCGTAGACGTCCAC

【表３－１３】

配列番号	配列
	CCCTTCGCAGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTACCCGGGAAGGGATTAC AGGCTCGATTCCAGTCGCAGATGACACCGCTGTTCTACTCGGCACCTGAC TACCTACCAGATGGGCCCGCAACACGTCGTGCACCCGCGGAACCGGTTA AAGAACGTTAGTTCCCTGGCCTTGGAGCCTAAACAAACTTACTGAGCCG CACCTTCCGAGTCTCGCTGTACTGTGATCCCCGCTTCCCTGGTACTAGAG GGCAAATCCGACTGGCTATACCGACGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
204	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGATATGTTCCAGTAGACGCGCAACAGGGC TTCTACGGTTCGCCGGTTATTGACTTACTGCACGTTGGGGAGCGGCTTGA ATTGAGTCCCAGGCCCGAGTCCGTACCGATGCTCTTAGGCGAGCCACGTT TCTGGACCCACCCCGTGCTACCTATGGCCGTTCTTCGTATCTGTCTCTTAG CGCGCCTCAACTATGGTGTCCTCGCCTAGTAGAGCTCCGTAGACGTCCAC CCCTTCGCAGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTACCCGGGAAGGGATTAC AGGCTCGATTCCAGTCGCAGATGACACCGCTGTTCTACTCGGCACCTGAC TACCTACCAGATGGGCCCGCAACACGTCGTGCACCCGCGGAACCGGTTA AAGAACGTTAGTTCCCTGGCCTTGGAGCCTAAACAAACTTACTGAGCCG CACCTTCCGAGTCTCGCTGTACTGTGATCCCCGCTTCCCTGGTACTAGAG GGCAAATCCGACTGGCTATACCGACGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
205	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGATCTGTATCCCAAGTGTTCAGACCTTCAT ATTGCATGAAGCCTTCGTCTCACAGCTATTGATAGTTCCGATTGCAACTT GACGTCTAGCATTTGCTTCAACAGTGACTACG
206	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGCCCGCCCCGCCCTGGCAACGCTCTGGTAA CCTCTCTAGCCCGCCCCGCCCATTTGCTTCAACAGTGACTACG
207	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGCCCGCCCCGCCCTGGCAACGCTCTGGTAA CCTCTCTAGCCCGCCCCGCCCATTTGCTTCAACAGTGACTACG
208	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGCCCGCCCCGCCCTGGCAACGCTCTGGTAA CCTCTCTAGCCCGCCCCGTCCCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
209	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGCCCGCCCCGCCCTGGCAACGCTCTGGTAA CCTCTCTAGCCCGCCCCGTCCCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
210	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGCGGGCGCGCCGCGCGCGACGCGCGTCCC GTCCGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAACCCGCACGCCGGCGACCGCG CGCCCGGCATTTGCTTCAACAGTGACTACG
211	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGCGGGCGCGCCGCGCGCGACGCGCGTCCC GTCCGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAACCCGCACGCCGGCGACCGCG CGCCCGGCATTTGCTTCAACAGTGACTACG

【表３－１４】

配列番号	配列
212	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGCGGGCGCGCCGCGCGCGACGCGCGTCCCGTCCGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAACCCGCACGCCGGCGCCGCGCGCCCGAGCGCACGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
213	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGCGGGCGCGCCGCGCGCGACGCGCGTCCCGTCCGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAACCCGCACGCCGGCGCCGCGCGCCCGAGCGCACGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
214	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGCGGTAATTACTGTTAGACTGGTGGGTATAAACTTCGTTATTTGGATTGGAATTGTTGAGCCCTACCTGACTCTGTATCCCAAGTGTTCTCTGCTTCATATTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAAATTGATAGTTCCGATTGCAACTTGACGTCTAGCCCGTATAAATAGCCGGTCTAAACAGCGATGAAATTTCTGTAGAATCAACTAAATTTTCCGTTCAACGGATCCTCATTTGCTTCAACAGTGACTACG
215	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGCGGTAATTACTGTTAGACTGGTGGGTATAAACTTCGTTATTTGGATTGGAATTGTTGAGCCCTACCTGACTCTGTATCCCAAGTGTTCTCTGCTTCATATTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAAATTGATAGTTCCGATTGCAACTTGACGTCTAGCCCGTATAAATAGCCGGTCTAAACAGCGATGAAATTTCTGTAGAATCAACTAAATTTTCCGTTCAACGGATCCTCATTTGCTTCAACAGTGACTACG
216	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGCGTGTTGTTTCGATTTAACTTGTCCATGTGTCTCTGCTGCTTTCTTCCTTTCCACTTCACTACTCTTATTCGGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAATTCTCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
217	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGCGTTATTTGGATTGGAATTGTTGAGCCCTACCTGACTCTGTATCCCAAGTGTTCTCTGCTTCATATTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAAATTGATAGTTCCGATTGCAACTTGACGTCTAGCCGATAAATAGCCGGTCTAAACAGCGATGAAATTTCCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
218	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGCGTTATTTGGATTGGAATTGTTGAGCCCTACCTGACTCTGTATCCCAAGTGTTCTCTGCTTCATATTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAAATTGATAGTTCCGATTGCAACTTGACGTCTAGCCGATAAATAGCCGGTCTAAACAGCGATGAAATTTCCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
219	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGCTGGAATTTGTGCTCTTAGGTCGTGGGGCTGCTGTTAAGTCGCTCGCTATCTAAAGTTCAGTCAAGGATGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAGAAATCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG

【表３－１５】

配列番号	配列
220	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGGACCTCGACCGCTGGCAACGCTCTGGTAA CCTCTCTATCCTCCCCTCTCCCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
221	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGGACCTCGACCGCTGGCAACGCTCTGGTAA CCTCTCTATCCTCCCCTCTCCCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
222	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGGCATGTCGGCTCGGTCTGTCTCTTTCCCCT CATCTCTCGGTACACTCCTTACCTCGCCCACCCCGGCAACGCTCTGGTAA CCTCTCTATCTGGCCTGTCACGAATCACTGTCCATCTAACCTCGGAGCCC TGTCACGCGGCGGACTTGGAGACATTTGCTTCAACAGTGACTACG
223	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGGCATGTCGGCTCGGTCTGTCTCTTTCCCCT CATCTCTCGGTACACTCCTTACCTCGCCCACCCCGGCAACGCTCTGGTAA CCTCTCTATCTGGCCTGTCACGAATCACTGTCCATCTAACCTCGGAGCCC TGTCACGCGGCGGACTTGGAGACATTTGCTTCAACAGTGACTACG
224	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGGCCCGCGCGCCGGCGGCGGCGCGGTGGC CGGCGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAGGCGGCGGCGCCACCGCGCGG GCGGGCGGGCCCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
225	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGGCCCGCGCGCCGGCGGCGGCGCGGTGGC CGGCGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAGGCGGCGGCGCCACCGCGCGG GCGGGCGGGCCCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
226	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGGCCGTGCCGAGGGTCCAGGTCGAGACTC CATCCCGAGGCGTGTGTCCCCATGGCCGTCCTCCAGGCTAGTACTGTGCC CCGTCGCCGTCGCACAAGGCCGGTCGATCGTGGTGGCTGTCAGGCGGGG TGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTACGGCGTAGTAGTTCGTGCCCCTCCC CTTGCGACCTCCCGCTACCACCCGTCACTCCCCGGTAAGAGGCTCTCACG GACGGCAGAGTCGGTCGCGCGCTCCGGATGTGGTCCCCTCCCAGTCCTCC CCGCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
227	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGGCCGTGCCGAGGGTCCAGGTCGAGACTC CATCCCGAGGCGTGTGTCCCCATGGCCGTCCTCCAGGCTAGTACTGTGCC CCGTCGCCGTCGCACAAGGCCGGTCGATCGTGGTGGCTGTCAGGCGGGG TGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTACGGCGTAGTAGTTCGTGCCCCTCCC CTTGCGACCTCCCGCTACCACCCGTCACTCCCCGGTAAGAGGCTCTCACG GACGGCAGAGTCGGTCGCGCGCTCCGGATGTGGTCCCCTCCCAGTCCTCC CCGCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
228	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGGCGCGGCGGTGGAGCGCTCGCGGTGGTG CGCTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTATGGCGCGTGGCCACGCTCCCGC GCGACGGCCGCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG

【表３－１６】

配列番号	配列
229	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGGCGCGGCGGTGGAGCGCTCGCGGTGGTGCGCTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTATGGCGCGTGGCCACGCTCCCGCGCGACGGCCGCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
230	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGGTAAACAGAGCGGAATCACAAATATTTATGCCTACCAAACCGATTTCTCAAAAGTAAAACAAAGTACGTCTCATTAATACTGTGGTGTAAGTATTATCAAAATAAAATAGTGTAACTGTATGTATGTTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAATAAATTGATAAATTACACTGAGTTTGCATAGGAATCGTTATATATCAAAGTATGTTTTCTGACTACTATCAAACGCGCAAGTTACTTACTCTAAAAGTATTTGAGTTTAAGCCATTAGTCACCGATACGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
231	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGTAGCAATATTGAATTCTAGATTATACGAGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTATTATTTAAGCTATCATACTCTAGTGTTTCATTTGCTTCAACAGTGACTACG
232	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGTAGCAATATTGAATTCTAGATTATACGAGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTATTATTTAAGCTATCATACTCTAGTGTTTCATTTGCTTCAACAGTGACTACG
233	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGTATATAAATAAATGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAAATAAATAAAATACGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
234	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGTATATAAATAAATGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAAATAAATAAAATACGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
235	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGTATCCCAAGTGTTCTCTGCTTCATATTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAAATTGATAGTTCCGATTGCAACTTGACGTCATTTGCTTCAACAGTGACTACG
236	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGTATTATTATTTTAAATTAATATTATAATTTTAACTTTTATTGATTATATATTAGTCATTATATATAAAGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTATCTTAGTTTTATTAATATAAAATTTATATAATAATATTTATTAAATAAATTCTATTATATTATTGATTCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
237	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGTATTATTATTTTAAATTAATATTATAATTTTAACTTTTATTGATTATATATTAGTCATTATATATAAAGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTATCTTAGTTTTATTAATATAAAATTTATATAATAATATTTATTAAATAAATTCTATTATATTATTGATTCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
238	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGTCATAGTTCTATATACATTGTCATGACACGAATTGGCTGAAAACGGTTGATAGAAGATATTGACTATATTCTCTTCCGC

【表３－１７】

配列番号	配列
	TGTATCCCGTTTCTTTTGGAAATTGACCGTATTATGGTCACCATCAGCCT AAGTGATCTCTGGACCGTCGAGAGACCCCATTGACTTGGTTCTTCGGTTT GATGCACTCATGTAAAATGTAGTCTCAATCAATACCATCCATTTCTAGCA TACGGGTGAGCATGAAGCCTTCGTCTCACAGCTCCGGTACAGGTAATCG AGAGAACACTAAAACAGTCCGACATGAGATTCATTAAAACCTATTTTCA CCAATCGGTAGAACGGTTATGCGCAAAATATTTTCGGGGTCCACAGTGC ACCTATGTAATCTGTAACATGAAGTTGTACGAAAATAGAGAACCCACCC AGCTTATCTAGGAAATTGATCTCTTCGATTTAAGGATGTGTCGACACGTA TCATGCCAAGTGATCAGAGGCGTAACATTTGCTTCAACAGTGACTACG
239	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGTCATAGTTCTATATACATTGTCATGACAC GAATTGGCTGAAAACGGTTGATAGAAGATATTGACTATATTCTCTTCCGC TGTATCCCGTTTCTTTTGGAAATTGACCGTATTATGGTCACCATCAGCCT AAGTGATCTCTGGACCGTCGAGAGACCCCATTGACTTGGTTCTTCGGTTT GATGCACTCATGTAAAATGTAGTCTCAATCAATACCATCCATTTCTAGCA TACGGGTGAGCATGAAGCCTTCGTCTCACAGCTCCGGTACAGGTAATCG AGAGAACACTAAAACAGTCCGACATGAGATTCATTAAAACCTATTTTCA CCAATCGGTAGAACGGTTATGCGCAAAATATTTTCGGGGTCCACAGTGC ACCTATGTAATCTGTAACATGAAGTTGTACGAAAATAGAGAACCCACCC AGCTTATCTAGGAAATTGATCTCTTCGATTTAAGGATGTGTCGACACGTA TCATGCCAAGTGATCAGAGGCGTAACGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
240	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGTCATAGTTCTATATACATTGTCATGACAC GAATTGGCTGAAAACGGTTGATAGAAGATATTGACTATATTCTCTTCCGC TGTATCCCGTTTCTTTTGGAAATTGACCGTATTATGGTCACCATCAGCCT AAGTGATCTCTGGACCGTCGAGAGACCCCATTGACTTGGTTCTTCGGTTT GATGCACTCATGTAAAATGTAGTCTCAATCAATACCATCCATTTCTAGCA TACGGGTGAGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTACCGGTACAGGTAATCG AGAGAACACTAAAACAGTCCGACATGAGATTCATTAAAACCTATTTTCA CCAATCGGTAGAACGGTTATGCGCAAAATATTTTCGGGGTCCACAGTGC ACCTATGTAATCTGTAACATGAAGTTGTACGAAAATAGAGAACCCACCC AGCTTATCTAGGAAATTGATCTCTTCGATTTAAGGATGTGTCGACACGTA TCATGCCAAGTGATCAGAGGCGTAACGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
241	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGTCATAGTTCTATATACATTGTCATGACAC GAATTGGCTGAAAACGGTTGATAGAAGATATTGACTATATTCTCTTCCGC TGTATCCCGTTTCTTTTGGAAATTGACCGTATTATGGTCACCATCAGCCT AAGTGATCTCTGGACCGTCGAGAGACCCCATTGACTTGGTTCTTCGGTTT

【表３－１８】

配列番号	配列
	GATGCACTCATGTAAAATGTAGTCTCAATCAATACCATCCATTTCTAGCA TACGGGTGAGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTACCGGTACAGGTAATCG AGAGAACACTAAAACAGTCCGACATGAGATTCATTAAAACCTATTTTCA CCAATCGGTAGAACGGTTATGCGCAAAATATTTTCGGGGTCCACAGTGC ACCTATGTAATCTGTAACATGAAGTTGTACGAAAATAGAGAACCCACCC AGCTTATCTAGGAAATTGATCTCTTCGATTTAAGGATGTGTCGACACGTA TCATGCCAAGTGATCAGAGGCGTAACGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
242	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGTCGCTCGCCCCTACTTACACCACCCCTCC CCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
243	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGTCTGGCATGTCGGCTCGGTCTGTCTCTTTC CCCTCATCTCTCGGTACACTCCTTACCTCGCCCACCCCGGCAACGCTCTG GTAACCTCTCTATCTGGCCTGTCACGAATCACTGTCCATCTAACCTCGGA GCCCTGTCACGCGGCGGACTTGGAGACTGTCGTAGTCACTGTTGAAGCA AATG
244	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGTCTGGCATGTCGGCTCGGTCTGTCTCTTTC CCCTCATCTCTCGGTACACTCCTTACCTCGCCCACCCCGGCAACGCTCTG GTAACCTCTCTATCTGGCCTGTCACGAATCACTGTCCATCTAACCTCGGA GCCCTGTCACGCGGCGGACTTGGAGACTGTCGTAGTCACTGTTGAAGCA AATG
245	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGTCTGTATCCCAAGTGTTCTCTGCTTCATAT TGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAAATTGATAGTTCCGATTGCAACTTG ACGTCTAGCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
246	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGTCTGTATCCCAAGTGTTCTCTGCTTCATAT TGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAAATTGATAGTTCCGATTGCAACTTG ACGTCTAGCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
247	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGTGAATATTTTATTCCCTAATTTTATTATTA TGTTCTAAAAGGTATTTAAATACTTTTCATTAATGGCAACGCTCTGGTAA CCTCTCTATCATAAATATTTTAAATACTAGAATCTTATTTTATTCTTTAGA ATAGTAGAAATTTAATTAAATCATTTGCTTCAACAGTGACTACG
248	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGTGAATATTTTATTCCCTAATTTTATTATTA TGTTCTAAAAGGTATTTAAATACTTTTCATTAATGGCAACGCTCTGGTAA CCTCTCTATCATAAATATTTTAAATACTAGAATCTTATTTTATTCTTTAGA ATAGTAGAAATTTAATTAAATCATTTGCTTCAACAGTGACTACG
249	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGTGCCGAGGGTCCAGGTCGAGACTCCATCC CGAGGCGTGTGTCCCCATGGCCGTCCTCCAGGCTAGTACTGTGCCCCGTC

【表３－１９】

配列番号	配列
	GCCGTCGCACAAGGCCGGTCGATCGTGGTGGCTGTCAGGCGGGGTGGCA ACGCTCTGGTAACCTCTCTACGGCGTAGTAGTTCGTGCCCCTCCCCTTGC GACCTCCCGCTACCACCCGTCACTCCCCGGTAAGAGGCTCTCACGGACG GCAGAGTCGGTCGCGCGCTCCGGATGTGGTCCCCTCCCAGTCCTCCATTT GCTTCAACAGTGACTACG
250	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGTGCCGAGGGTCCAGGTCGAGACTCCATCC CGAGGCGTGTGTCCCCATGGCCGTCCTCCAGGCTAGTACTGTGCCCCGTC GCCGTCGCACAAGGCCGGTCGATCGTGGTGGCTGTCAGGCGGGGTGGCA ACGCTCTGGTAACCTCTCTACGGCGTAGTAGTTCGTGCCCCTCCCCTTGC GACCTCCCGCTACCACCCGTCACTCCCCGGTAAGAGGCTCTCACGGACG GCAGAGTCGGTCGCGCGCTCCGGATGTGGTCCCCTCCCAGTCCTCCATTT GCTTCAACAGTGACTACG
251	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGTGCGTCGATGCTGTGTGAGGTGAAGACCT AGAGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTACACGCTTAGCAACGCTGCATGTC GAGTCTCCACGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
252	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGTGCGTCGATGCTGTGTGAGGTGAAGACCT AGAGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTACACGCTTAGCAACGCTGCATGTC GAGTCTCCACGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
253	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGTGCGTCGCGGCTGTGGGAGGTGCGGACC TAGAGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTACACGCTTAGCGCCGCTGCCTGT CGACCGTCCACGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
254	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGTGCGTCGCGGCTGTGGGAGGTGCGGACC TAGAGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTACACGCTTAGCGCCGCTGCCTGT CGACCGTCCACGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
255	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGTGGGGCTGGCAGGGGCGGGTGGGGAGGA GGGCGGGGTGGGGTCGGGGCCAAGGGGAGCGGGGAGCGGCGGCAACGC TCTGGTAACCTCTCTAGCCCGTCCGTGCCGTCCGCCGCCTGGGAGCCTCG CTCGGGGACAGCCGGGACTGGGGACGCGGGCCGCCGTAGTCACTGTTGA AGCAAATG
256	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGTGGGGCTGGCAGGGGCGGGTGGGGAGGA GGGCGGGGTGGGGTCGGGGCCAAGGGGAGCGGGGAGCGGCGGCAACGC TCTGGTAACCTCTCTAGCCCGTCCGTGCCGTCCGCCGCCTGGGAGCCTCG CTCGGGGACAGCCGGGACTGGGGACGCGGGCCGCCGTAGTCACTGTTGA AGCAAATG

【表３－２０】

配列番号	配列
257	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGTGGTAGATGGCGTTTTGTTTCAGGAGTTTATCATTACCGACTTAAAGCTAACAACGAAACTTATGAAATGGATCTTAGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAATCGCCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
258	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGTGTAATATTAACAAGTAATAAAGAAATATATAGCATGAAGCCTTCGTCTCACAGCTTTTATTCAATTTAATGATTACCTTTATTATCTCATTTGCTTCAACAGTGACTACG
259	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGTGTAATATTAACAAGTAATAAAGAAATATATAGCATGAAGCCTTCGTCTCACAGCTTTTATTCAATTTAATGATTACCTTTATTATCTCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
260	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGTGTAATATTAACAAGTAATAAAGAAATATATAGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTATTTATTCAATTTAATGATTACCTTTATTATCTCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
261	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGTGTAATATTAACAAGTAATAAAGAAATATATAGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTATTTATTCAATTTAATGATTACCTTTATTATCTCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
262	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGTTGCAACTTGACGTCTCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
263	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGTTTAATAAATAAATTAAATATTATATAAATTAGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTATATTATATTAAATTATTAAATTAATAATTATACGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
264	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGTTTAATAAATAAATTAAATATTATATAAATTAGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTATATTATATTAAATTATTAAATTAATAATTATACGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
265	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGTTTCTGAATATTTTATTCCCTAATTTTATTATTATGTTCTAAAAGGTATTTAAATACTTTTCATTAATGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTATCATAAATATTTTAAATACTAGAATCTTATTTTATTCTTTAGAATAGTAGAAATTTAATTAAATGCACCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
266	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGTTTCTGAATATTTTATTCCCTAATTTTATTATTATGTTCTAAAAGGTATTTAAATACTTTTCATTAATGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTATCATAAATATTTTAAATACTAGAATCTTATTTTATTCTTTAGAATAGTAGAAATTTAATTAAATGCACCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG

【表３－２１】

配列番号	配列
267	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGTTTGTTTTCGTTTCTTTCTCTCTTTCTTATCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
268	GGAGAAAAGCCACATGAATGCAAAACACCAGCAATCTCAAGACCCACCTATAAACATTGGTATGGTTTCTCTCCAG
269	GGAGAAAAGCCACATGAATGCAAAACACCAGCAATCTCAAGACCCACCTATAAACTGGAGAGAAACCATACCAATG
270	GGAGAAAAGCCACATGAATGCAAAAGAAGAAATAAGATAAAATACAACAATAATCAAAGACACAAAACAAACATAAACACCAGCAATCTCAAGACCCACCTAAGAACATTGGTATGGTTTCTCTCCAG
271	GGAGAAAAGCCACATGAATGCAAAAGAAGAAATAAGATAAAATACAACAATAATCAAAGACACAAAACAAACATAAACACCAGCAATCTCAAGACCCACCTAAGAACTGGAGAGAAACCATACCAATG
272	GGAGAAAAGCCACATGAATGCAAAATAAATACTAAACAAAACTAACAACACAAACACCAGCAATCTCAAGACCCACCTATAAACATTGGTATGGTTTCTCTCCAG
273	GGAGAAAAGCCACATGAATGCAAAATAAATACTAAACAAAACTAACAACACAAACACCAGCAATCTCAAGACCCACCTATAAACTGGAGAGAAACCATACCAATG
274	GGAGAAAAGCCACATGAATGCATATAATATACTACAATTATTAAAATATGCATGAAGCCTTCGTCTCACAGCTAAGTTCTGGAGAGAAACCATACCAATG
275	TCTCTGATCGGTCCCTTTACTCGCCTCCCTACTCTTCATTCTATTCTCCTTCTCGTTCTTGTTTCTTCTTTTGTCTCTTTGCTTCCCTCGTATCTGTTCCTTTCCCGTCTCCCCATTCCCCGCCCCACTACCCAACACCCACCAATCAACCAAAACCTACAACCCATCCACACACCACCTCACTAACTCCTACCTCGCTCCTCTACACTTCACTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTATCTCACCCCTTAATTTCCGCACCTATT
276	TCTCTGATCGGTCCCTTTACTCTCCCAACCCCTCCCTCGCCCATCCCCACTCCGCTCGCTTCCCCTGGCCCTGTCCGCCTCCACCCGTCGTCCTCATCCAGCCGCAAGTTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTACGCCGCCCCTTAATTTCCGCACCTATT
277	TCTCTGATCGGTCCCTTTACTCTCCCTCGCCTCCTTCCCACCCTCTTCCTCACTCACCCCACTTTTCTATCTACTTCACTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTACCCCTCCCCTTAATTTCCGCACCTATT

【表３－２２】

配列番号	配列
278	TCTCTGATCGGTCCCTTTACTCTGCCTTTTCTCCTTTCTTTCCTTCCTCATCCACTTCCACCCACCTCACTCACCCTAACCCCGCCCTCCCAACCATCACCAACACCCCTCAAACCTACCTCCTCCGCTCCCCACACTCTCCCTACTCAACTCTACACATGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTATCTCGCCCCTTAATTTCCGCACCTATT
279	TCTCTGATCGGTCCCTTTACTCTTCTGTCCTTCCTCCTGTATTCGCTTATCTTCCACTTTCCAATTTAACGATATGACGAGTTTATTCCTGCTTGAGTCTAGTTCCGTTTCAAATACCCCTGCGCCCTTCTTTGTCTTACTTGTTCGGTTCACTTGCTCCTCTACTTCACGGTCTCTTTAACTCAGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTATCACTCCCCTTAATTTCCGCACCTATT
280	TGCAGAAACACTACCTGGTACAAAACACCAGCAATCTCAAGACCCACCTATAAACACAAACTGGGTGAACTTGG
281	TGCAGAAACACTACCTGGTACAAAAGAAGAAATAAGATAAAATACAACAATAATCAAAGACACAAAACAAACATAAACACCAGCAATCTCAAGACCCACCTAAGAACACAAACTGGGTGAACTTGG
282	TGCAGAAACACTACCTGGTACAAAATAAATACTAAACAAAACTAACAACACAAACACCAGCAATCTCAAGACCCACCTATAAACACAAACTGGGTGAACTTGG
283	CGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG
284	GTGATGTGAAGGATTATGGGGA
285	CATTGGTATGGTTTCTCTCCAG
286	ATTCTCCAGACAAGGCACTG
287	AATAGGTGCGGAAATTAAGGGG

【０３９１】

ここで、本発明は、以下の非限定的な実施例によって更に説明されるであろう。

【実施例】

【０３９２】

コア技術は、１つ以上の目的の配列の特定の組み合わせの評価のための核酸増幅反応で使用される、少なくとも３つの天然の標的又は競合ポリヌクレオチドのシステムである。配列が複製されるにつれて、それらはこれらの共有プライマーに対して競合し、得られる読み出しに固有の特性を付与する。例えば、各々が操作された合成競合と対になった一連の天然の遺伝子転写産物を取り上げる（図８）。増幅反応は、固定量の各競合及び様々な量の各天然の標的を用いて実行される。各競合対の自然な配列が複製されるにつれて、それは緑色の蛍光シグナルを生成し、対応する各合成配列は、オレンジ色のシグナルを生成する。全ての緑色シグナルと全てのオレンジ色シグナルが互いに積み重なっているため、反応の最後にオレンジ色及び緑色の相対強度を見ると、全ての転写産物の濃度がそれぞれの競合の濃度にどれほど近いかがわかる。各競合配列は、個々の天然の標的に対する目的の濃度範囲を反映するように設計することができる。おそらく、いくつかの転写産物は狭いウインドウ内で興味深い効果を有するが、他の転写産物は、それらの濃度が変化するにつれてより緩やかな影響を有する。この原理には、人間の診断からバイオプロセス製造及び生物医学研究まで、多くの用途がある。

【０３９３】
上記の「直接」競合増幅ネットワークは、各々が両方のプライマーに対して競合する複数の天然及び合成標的対を含み、本発明の最も単純な実施形態を構成する。しかしながら、同じ競合原理が、より複雑なネットワークにも適用される。例えば、天然標的は、そのプライマーのうちの１つを１つの合成標的と共有することができ、この合成標的は、次いで、その他のプライマーを第２の合成標的と共有し、「間接」ＣＡＮを作り出す（図９）。プライマーは、複数の合成標的間で共有することができ、完全に接続されたネットワークは、複数の自然標的を含むように設計することができ、非線形演算を実行する可能性を生み出す（図１０）。単一の天然配列を、同じオリゴ上の複数の位置に独立して標的化することができ、強力な特性を有する「冗長」システムを作成する（図１１）。

【０３９４】
直接競合ＰＣＲ
競合ＰＣＲでは、競合ポリヌクレオチド（ＲＥＦ）が、標的（図中ではＷＴとして表される）と並んで参照として含まれる（図３）。この競合配列は、ＷＴと同じプライマー配列を共有するように設計されているが、異なるプローブ配列を含む。１つのフルオロフォア（例えば、緑色を生成するフルオロセイン又はＦＡＭ）を有するプローブは、ＷＴを標的化するように設計することができ、一方、異なるフルオロフォア（例えば、オレンジ色を生成するヘキサクロロフルオレセイン又はＨＥＸ）を有する別個のプローブは、ＲＥＦ（競合）を標的とすることができる。

【０３９５】
標的及び競合が同じＰＣＲ反応で増幅される場合、それらはプライマーに対して競合する。プライマーは、標的又は競合鎖の各複製によって消費されるため、プライマープールが枯渇するとすぐに、両方の配列の増幅が停止する。反応終了時の各増幅生成物の量は、２つの標的の相対的な開始量に依存する。これは、得られた蛍光シグナルに反映される（図４）。同じ濃度で開始する同じ増幅率（例えば、図２のＷＴ及びＩＳＯ）を有する標的及び競合については、各々から導き出される蛍光シグナルは、反応の終了時に同じであろう。反応の開始時にＲＥＦよりも多くのＷＴが存在する場合、ＷＴフルオロフォアは最後により強くなり、またその逆も同様である。純粋なＷＴシグナルから純粋なＲＥＦシグナルへのこの遷移の鋭さは、競合の増幅率を調整することによって調整することができる。

【０３９６】
図４は、様々な競合（ＲＥＦ）とのＷＴ配列の競合増幅を示し、非常に広い遷移（ＢＰ２４０、ＧＣ８５）から非常に鋭い遷移（ＢＰ３０）までのアクセス可能な行動の幅を実証する。応答曲線の中点は、ＲＥＦの初期濃度を調整することによって、より高い又はより低いＷＴ濃度にシフトすることができる。ゲル電気泳動を使用して、各反応におけるアンプリコンの最終濃度を直接測定することができ、蛍光シグナルで観測されるダイナミクスを確認することができる。本質的には、このシステムは、目的の遺伝子の発現が所定の濃度にどれほど近いかを報告している。ＲＥＦの適切な設計及び初期濃度を選択することによって、この濃度並びに関心のある範囲を定義することができる。

【０３９７】
直接競合増幅ネットワーク
ここで、競合する一対の標的は、あまり「ネットワーク」ではなく、単一の遺伝子標的も、遺伝子発現シグネチャの複雑さを反映していない。しかしながら、同じ反応で複数の競合対を組み合わせることができ、各々が異なるＲＮＡ転写産物を反映するＨＥＸ及びＦＡＭシグナルを生成する。各競合対は、与えられた遺伝子が個々の設定点にどれほど近いかを報告し、これらのシグナルは全て、単に互いに積み重なるであろう。その結果は、全ての遺伝子の全体的な類似性の集約的な尺度である。調査中の遺伝子の数にかかわらず、総ＨＥＸ強度と総ＦＡＭ強度との間の差は、システム全体からの情報を統合する。なぜこれが有用なのかを例示するために、ロジスティック回帰の統計的手法を模倣することによって、結核を診断するのにかかるネットワークをどのように使用することができるのかを見てみよう。

【０３９８】
事例研究：直接ＣＡＮによる結核の診断
　毎年、他のどの感染症よりも多くのヒトが結核で亡くなっている。２０１８年には、１０００万人の新規症例及び１５０万人の死亡が発生した。結核は、現在の結核（ＴＢ）検査では特に診断が困難な集団であるＨＩＶにも感染している人々の間で特に蔓延している（そして致命的である）。結核の診断に使用することができる遺伝子発現シグネチャがヒト白血球で見出された。（（１）Ｋａｆｏｒｏｕ，Ｍ．；Ｗｒｉｇｈｔ，Ｖ．Ｊ．；Ｏｎｉ，Ｔ．；Ｆｒｅｎｃｈ，Ｎ．；Ａｎｄｅｒｓｏｎ，Ｓ．Ｔ．；Ｂａｎｇａｎｉ，Ｎ．；Ｂａｎｗｅｌｌ，Ｃ．Ｍ．；Ｂｒｅｎｔ，Ａ．Ｊ．；Ｃｒａｍｐｉｎ，Ａ．Ｃ．；Ｄｏｃｋｒｅｌｌ，Ｈ．Ｍ．；Ｅｌｅｙ，Ｂ．；Ｈｅｙｄｅｒｍａｎ，Ｒ．Ｓ．；Ｈｉｂｂｅｒｄ，Ｍ．Ｌ．；Ｋｅｒｎ，Ｆ．；Ｌａｎｇｆｏｒｄ，Ｐ．Ｒ．；Ｌｉｎｇ，Ｌ．；Ｍｅｎｄｅｌｓｏｎ，Ｍ．；Ｏｔｔｅｎｈｏｆｆ，Ｔ．Ｈ．；Ｚｇａｍｂｏ，Ｆ．；Ｗｉｌｋｉｎｓｏｎ，Ｒ．Ｊ．；Ｃｏｉｎ，Ｌ．Ｊ．；Ｌｅｖｉｎ，Ｍ．Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ ｉｎ ＨＩＶ－Ｉｎｆｅｃｔｅｄ ａｎｄ －Ｕｎｉｎｆｅｃｔｅｄ Ａｆｒｉｃａｎ Ａｄｕｌｔｓ Ｕｓｉｎｇ Ｗｈｏｌｅ Ｂｌｏｏｄ ＲＮＡ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｓｉｇｎａｔｕｒｅｓ：Ａ Ｃａｓｅ－Ｃｏｎｔｒｏｌ Ｓｔｕｄｙ．ＰＬＯＳ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ ２０１３，１０（１０），ｅ１００１５３８．ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１３７１／ｊｏｕｒｎａｌ．ｐｍｅｄ．１００１５３８．（２）Ｇｌｉｄｄｏｎ，Ｈ．Ｄ．；Ｋａｆｏｒｏｕ，Ｍ．；Ａｌｉｋｉａｎ，Ｍ．；Ｈａｂｇｏｏｄ－Ｃｏｏｔｅ，Ｄ．；Ｚｈｏｕ，Ｃ．；Ｏｎｉ，Ｔ．；Ａｎｄｅｒｓｏｎ，Ｓ．Ｔ．；Ｂｒｅｎｔ，Ａ．Ｊ．；Ｃｒａｍｐｉｎ，Ａ．Ｃ．；Ｅｌｅｙ，Ｂ．；Ｋｅｒｎ，Ｆ．；Ｌａｎｇｆｏｒｄ，Ｐ．Ｒ．；Ｏｔｔｅｎｈｏｆｆ，Ｔ．Ｈ．Ｍ．；Ｈｉｂｂｅｒｄ，Ｍ．Ｌ．；Ｆｒｅｎｃｈ，Ｎ．；Ｗｒｉｇｈｔ，Ｖ．Ｊ．；Ｄｏｃｋｒｅｌｌ，Ｈ．Ｍ．；Ｃｏｉｎ，Ｌ．Ｊ．；Ｗｉｌｋｉｎｓｏｎ，Ｒ．Ｊ．；Ｌｅｖｉｎ，Ｍ．；Ｃｏｎｓｏｒｔｉｕｍ，ｏｎ ｂｅｈａｌｆ ｏｆ ｔｈｅ Ｉ．Ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ Ｒｅｄｕｃｅｄ Ｈｏｓｔ Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｏｍｉｃ Ｓｉｇｎａｔｕｒｅｓ ｆｏｒ Ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ ａｎｄ Ｄｉｇｉｔａｌ ＰＣＲ－Ｂａｓｅｄ Ｖａｌｉｄａｔｉｏｎ ａｎｄ Ｑｕａｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ．ｂｉｏＲｘｉｖ ２０１９，５８３６７４．ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１１０１／５８３６７４．）

【０３９９】
　重要なことに、この検査はＨＩＶの有無にかかわらず、患者でも同様に良好に機能する。しかしながら、このシグネチャを特定するために使用される技術－マイクロアレイ－は、そのような試験が最も必要とされる世界の農村部の貧困地域で使用するには煩雑で高価である。直接競合増幅ネットワークは、遺伝子発現シグネチャを評価し、試験を迅速、安価、かつ使いやすい形式に変換することができる。

【０４００】
統計による診断：ロジスティック回帰
　結核の診断にＣＡＮを使用する方法を理解するには、まず、模倣しようとしている統計的手法（ロジスティック回帰）を理解する必要がある。ロジスティック回帰は、様々な決定因子（様々な遺伝子の発現レベル）の個々の寄与を調べることによって、別の群（他のいくつかの疾患、ＯＤを有する）と比較して、ある群（結核に感染している）にある確率をモデル化する。これは、対数オッズ又は相対確率が、これらの因子の（線形）加重和によって与えられると仮定する。

【数１１】

$$\frac{TB}{1-TB} = \beta 1 \cdot [GBP6] + \beta 2 \cdot [TMCC1] + \beta 3 \cdot [ARG1] + \beta 4 \cdot [PRDM1]$$

【０４０１】

それぞれの周辺対数オッズ（ｍａｒｇｉｎａｌ　ｌｏｇ－ｏｄｄｓ）を調べることによって、分類器（ｃｌａｓｓｉｆｉｅｒ）への個々の遺伝子の全体的な寄与を見ることができる（図１１Ａ）。すなわち、他の３つの遺伝子が全て平均値（情報を提供しない）である場合、どれほどの情報が様々な量のこの遺伝子によって提供されるだろうか？対数オッズは相対確率を表すため、負のスコアは「ＯＤである可能性が高い」こと（－１としてコード化）を意味し、正のスコアは「ＴＢである可能性が高い」こと（＋１としてコード化）を意味する。２つの尺度が示されている：左側に周辺対数オッズ、右側に周辺確率。灰色の点は、個々の患者の遺伝子コピー数であり、破線は、所与の遺伝子のコピー数によって示される結核の回帰対数オッズ（又は確率）である。

【０４０２】

ロジスティック回帰に基づいて患者を診断するには、個々の各遺伝子の寄与を加算するだけである。例えば、患者は、１０３コピーのＧＢＰ６を有し得、＋０．２５の周辺対数オッズを寄与する。同じ患者は、それぞれ１０４及び１０４コピーのＡＲＧ１及びＴＭＣＣ１を有し得、－０．５及び－０．２を寄与する。この結核を有する患者の全体的な対数オッズは、０．２５－０．５－０．２＝－０．４５であるため、この患者が結核を有する可能性は低いと結論付けることができる。これを全ての患者に対して繰り返すと（図１１Ｂ）、高精度の回帰結果が達成され、４０人の患者のうち３６人を正しく分類することがわかる。

【０４０３】

直接ＣＡＮによる統計量の模倣

直接ＣＡＮを使用して、３つの遺伝子転写産物の各々の競合を設計することによって、分子レベルでこの統計的推論を要約することができる（図８Ａ）。ＧＢＰ６は結核と正の相関があるため、転写産物にはＨＥＸ標識プローブ、競合にはＦＡＭ標識プローブを使用する。ＡＲＧ１及びＴＭＣＣ１はＴＢと負の相関があるため、プローブ標識を入れ替える。次いで、転写産物から適切な領域を天然標的として選択し、適切な配列を合成標的（以下に更に説明）として選択して、ロジスティック回帰からの周辺対数オッズに一致する応答曲線を生成する増幅挙動を表示する。全ての成分を同じ増幅反応に含めることにより、総ＨＥＸ及びＦＡＭ蛍光強度は、個々の対の独立した寄与を集約する。これら２色の強度間の差は、ロジスティック回帰から導き出された対数オッズの代替物として機能し（図８Ｂ）、統計結果によって予測される確率的診断マッチングを提供する。

【０４０４】

適切な標的領域を選択し、合成標的配列を設計するために、ロジスティック回帰の結果を「目的関数」として使用する。本発明者らの目標は、一緒に増幅した場合、この目的に近い入出力応答曲線を与える一対の配列を見出すことである。したがって、各標的について、上記の式（それぞれのβ項）から導き出された傾きで、データセットで観測されたその標的の平均濃度で０と交わる線を近似しようとする。シミュレーションを使用して、一緒に増幅された任意の２つの配列の挙動を予測することができ、それにより、当該技術分野で既知の標準曲線適合アルゴリズムを使用して、最適なパラメータを見出すことができる。この場合、これらのパラメータは、データセットで観測された標的濃度の範囲内で，上で指定された線にできるだけ近く一致し、その範囲外でできるだけ早く平坦になる応答曲線を生成するパラメータである（図７を参照）。

【０４０５】

好適なパラメータが見つかったら、それらを示す配列を選択する必要がある。「競合の増幅挙動の試験及び予測」のセクションにおける上記の式を使用して、これらのパラメータを提供する長さとＧＣ含有量の組み合わせを予測することができる。シミュレーションには、回帰方程式に見られるドリフト項（ｍ）又はプラトー項（Ｋ）が含まれていないことに留意されたい。これは、シミュレーションが理想的な振る舞いを表し、これらの２つのパラメータがその理想からの逸脱を記述するためである。したがって、最適な長さ及びＧＣ含有量を選択する際、できるだけ理想に近い配列を選択するように、ドリフトを最小化し、プラトーを最大化しようとする。

【０４０６】
複数のセットのパラメータがほぼ最適な曲線を与え得る可能性が高い。好適な標的配列が（外部制約のために）先験的に特定され、その増幅パラメータが測定され、次いで曲線適合アルゴリズムを使用して、測定されたパラメータとともにシミュレートされたときにほぼ最適な応答を生成する競合増幅パラメータのみを選択することが好ましい場合がある。増幅挙動のシミュレーションは上に記載されており、シミュレーションのための好適な方程式が提供され、当業者は、とりわけ、勾配降下、確率的勾配降下、及び準ニュートン最適化を含むいくつかの最適化手法及びアルゴリズムのいずれかを実行することが可能となる。

【０４０７】
直接ＣＡＮの限界
上記の直接ネットワークには２つの大きな欠点がある。第一に、標的化される各転写産物に対して２つではないにしても少なくとも１つのプローブを設計する必要があるため、より大きな遺伝子シグネチャについてはすぐに高価になる。ＤＮＡ配列のスケールの経済性は、スケールアップに非常に好ましいが、開発スケールでは、各蛍光標識プローブのコストは約２００ポンドである（文脈上、各プライマーのコストは約２ポンドであり、各合成標的は約２０ポンドである）。２０～５０個の標的を有する遺伝子シグネチャの場合、配列設計の反復は非常に高価になる。第二に、直接ＣＡＮは、達成可能な応答曲線が幾分制限される。これらの問題に対処するために、間接ＣＡＮは、調査中の遺伝子の数に関係なく、多かれ少なかれ固定費で同様の機能を提供する。間接競合はまた、複数の標的を同時に複雑かつ非線形の解析ができる高次ネットワークの可能性を開く。最後に、冗長な標的化により、全てのＣＡＮアーキテクチャに更なる柔軟性を可能にする。

【０４０８】
間接競合ＰＣＲ
プローブされた標的とプローブされた競合との間の直接競合の代わりに、プローブされていない標的は、単に競合ポリヌクレオチド間の競合を仲介することができる。両方のプライマーは、所与の標的の指数関数的増幅に必要であるため、複製は、１つのプライマーのみを枯渇させることによって阻止され得る。したがって、合成標的であるＲＥＦＨを設計することができ、これは、天然配列であるＷＴと１つのプライマーを共有し、その第２のプライマーを第２の合成標的であるＲＥＦＦと共有する（図１２）。全ての成分が等しい増幅率を有し、２つのＲＥＦが等しい濃度で開始する場合、いかなるＷＴも存在せずに、ＨＥＸシグナル及びＦＡＭシグナルが均等に増幅される。しかしながら、ＷＴの増加はＲＥＦＨを打ち負かし、ＨＥＸシグナルを減衰させる。これは次に、ＲＥＦＦが増殖する余地を作り出し、反応の最後により大きなＦＡＭシグナルをもたらす。その結果、直接競合から観察されたものと同様に、様々なＷＴ濃度に対するＳ字型の応答曲線が得られる（図９Ａ）。この応答曲線は、標的のいずれかの増幅率、合成標的の開始濃度、プライマーのいずれかの濃度、又はネットワーク自体のトポロジーを調整することによって調整することができる（図９Ｂ、図９Ｃ）。このシステムの主な利点は、合成標的の「内部」配列に対して完全な自由度を有するため、同じ２つのプローブ配列を複数のＲＥＦで再利用できることで、どれだけ多くの天然の標的が利用されているか、又はネットワークがどれほど複雑であるかにかかわらず、開発コストを最小限に抑えることができることである。

【０４０９】
事例研究：間接ＣＡＮによるがんの診断
早期がん診断又はがん治療のモニタリングの有望な手段は、血流中の腫瘍由来ＤＮＡ（循環腫瘍ＤＮＡ、ｃｔＤＮＡ）、細胞が死ぬときに細胞から放出される染色体断片の検出によるものである。これは、一塩基多型（ＳＮＰ）又は挿入欠失（インデル）などの特定の変異によって、無細胞ＤＮＡ（ｃｆＤＮＡ）の通常の環境と区別可能である。既知の病原性変異を検出することによって、スキャンで腫瘍が現れる前に誰かを診断することができる可能性がある。治療後又は治療中にｃｔＤＮＡを調べて、患者が反応しているかどうか、又はがんが再発したかどうかを確かめることもできる。困難なことは、これらのバリ

アントが、対応する天然配列よりも濃度がはるかに低いことである。更に、単一の塩基の変化は、通常のＰＣＲを使用して区別することが困難である（インデルはより簡単なので、ＳＮＰで機能するものはインデルでよりよく機能するであろうことを理解して、ＳＮＰに焦点を当てよう）。場合によっては、特定の変異が治療決定（すなわち、標的治療感受性／耐性）に情報を与えることができるが、一般に、多数の変異のいずれかがその合計の代わりとして機能し得るにもかかわらず、総ｃｔＤＮＡ負荷が必要とされる全てであり、これがＣＡＮの優れた用途となる。

【０４１０】

ｃｔＤＮＡの検出にＣＡＮを使用するために、対応する野生型よりもバリアントアレルを優先的に増幅するための公開されたアプローチであるブロッカー変位増幅（Ｗｕ　ｅｔ　ａｌ．，２０１７）を適応させよう（図１３）。ＢＤＡでは、短いオリゴはＳＮＰ部位と重複するように設計されているが、ＷＴ配列により強く結合する。この「ブロッカー」は、ポリメラーゼによる伸長を防ぐように化学的に修飾される。ＳＮＰに隣接し、ブロッカー領域と重複するプライマー部位を選択することによって、ブロッカー及びプライマーは、ＷＴ標的及びＳＮＰ標的への結合に対して競合する。これは、ブロッカーがプライマーよりも強く結合するため、ＷＴの増幅率を抑制するが、プライマーがブロッカーを打ち負かすため、最小限の摂動でＳＮＰを増幅することができる。このシステムは、可変アレル頻度（ＶＡＦ）が高い場合でも、ＳＮＰ濃度が増加するにつれて１つのシグナルが急速に優位になるように調整された間接ＣＡＮと共役され得る。いくつかの異なる標的について、そのようなあるＣＡＮを設計することで、総シグナルがｃｔＤＮＡにおける総全変異負荷を反映する多重サーベイランスが可能になる。

【０４１１】

高次競合ネットワーク

間接ＣＡＮの柔軟性により、単一の閉じたネットワークに複数の天然標的を組み込むことができ、標的の組み合わせの非線形解析が可能になる。例えば、図１４は、ブール論理からＡＮＤ、ＯＲ、及びＸＯＲ論理を近似するＣＡＮモチーフを示す。冗長競合ネットワーク

上記のＣＡＮは、所与の標的に対する応答が限定されており、出力は、標的濃度に関して常に単調又は少なくとも単峰である。しかしながら、単一の配列を冗長的に標的化することによって、蛍光シグナルの相加的性質を更に活用することができる。遺伝子転写産物は、典型的には数千ヌクレオチド長であるが、ＰＣＲ標的に必要なのは５０～３００ヌクレオチドのみである。したがって、各々同じ配列の異なる領域を標的とする独立したＣＡＮを設計することができる。それらの出力は積み重なり、強力な創発的挙動を生み出す。数学的観点から、個々のネットワークは、理論的には任意の応答関係を構築することができ、所与の配列内で利用可能な標的領域の数によってのみ制限される、「基底関数」のライブラリになる。

【０４１２】

事例研究：冗長ＣＡＮを備えた希釈非依存（ｄｉｌｕｔｉｏｎ－ａｇｎｏｓｔｉｃ）比較器

バイオセンシングは少しパラドックスに直面している：生体分子の濃度の変動は疾患状態を推測するために使用されているが、試料の標的の濃度が変動し得るという多くの非生物学的な理由がある。患者は、予想されるものよりも多かれ少なかれ水和している可能性があり、試料の量が不正確である可能性があり、又は単純な統計が得られた細胞の数の変動につながる可能性がある。これらの不確実性に対応するための古典的なアプローチは、内部標準を使用することであり、疾患状態によって変わるべきではない試料に固有のものである。ＲＮＡの分析の場合、この内部標準は、典型的には、「ハウスキーピング」遺伝子であり、その濃度が、それらの状態ではなく、分析された細胞の数のみを反映する、細胞の増殖（例えば、細胞骨格又は細胞膜の代謝を制御する）に非常に基本的な転写産物である。本当に興味深い遺伝子転写産物の濃度は、ハウスキーピング遺伝子と比較して、正規性からの偏差のより信頼できる測定値を生成することができる。典型的には、これらは並行して行われる別個のＰＣＲ反応であるか、又は単一の反応内の複数のプローブで行わ

れるかのいずれかである。いずれの場合も、これは、例えば、１６個の目的の遺伝子及び５個のハウスキーピング遺伝子が必要であり、広範な後処理が必要である場合、非常に時間、資源、及び試料集約的になる。間接ＣＡＮの冗長な標的化は、分子レベルでこの計算を明示的に行う方法を提供するため、報告されたシグナルは、それらの絶対濃度に関係なく、２つの遺伝子の相対濃度を反映する（図１５）。

【０４１３】

更なる用途

２５年にわたる遺伝子発現解析により、数十又は更に数百の潜在的な診断用発現シグネチャが特定された。ＲＴ－ＰＣＲ、Ｎａｎｏｓｔｒｉｎｇ、及びＲＮＡ－ｓｅｑ分析は、同様に有用な洞察を生み出した。上記のシグネチャに加えて、以下の報告は、ＣＡＮプラットフォームの適応のための有望な候補を提示している。

●敗血症抗生物質の決定モデル、１１遺伝子
●乳がん化学療法の決定、７０遺伝子
●乳がん診断、２１遺伝子
●カンジダ血症、４０遺伝子
●ウシ結核、１５遺伝子
●ウシ乳房炎、１５遺伝子

【０４１４】

ＣＡＮプラットフォームはまた、バイオプロセスの問題、合成細胞の工業用途を解決して、薬剤などの製品を生産したり、石油化学物質若しくは温室効果ガスなどの物質を分解したりすることもできる。これには、いくつかの合成及び天然の遺伝子システムの協調を伴い、同時に増殖した２つ以上の操作された細胞集団が関与する可能性がある。現在、システムの性能は、高価で時間がかかるＲＮＡ－ｓｅｑ又はマイクロアレイによって検証されている。代替的に、エンジニアは、所望の生成物と併せて「レポーター」を産生する遺伝子を含む。しかしながら、そうすることで、そうでなければ所望の化合物の生成に使用され得る原料を消費し、一方で、操作された細胞により大きなストレスと不確実性を与える。ＣＡＮアーキテクチャは、関連する全ての遺伝子の転写活性のスナップショットを同時に取得する様式を提供する。全ての遺伝子が事前に指定されたウインドウ内で機能している場合、ＣＡＮは、１色を生成するが、遺伝子がそのウインドウの上又は下にある場合、異なる色を生成するように設計され得る。

【０４１５】

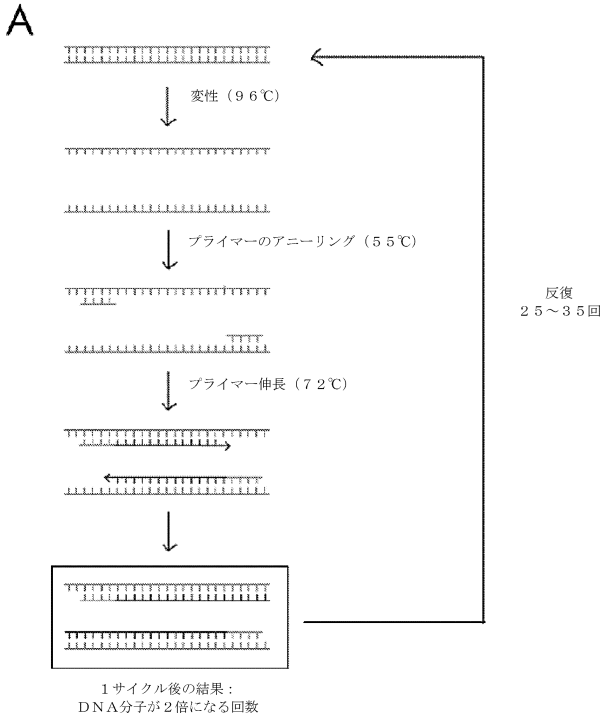
結論

競合増幅ネットワークは、分子レベルで強力な計算を実行し、バイオセンサアーキテクチャ内で分析物のパターン認識を明示的に実行する可能性を提供する。ユビキタスなＤＮＡ増幅技術であるＰＣＲを活用することで、ＣＡＮプラットフォームは、高速で安価で、とりわけ使いやすい。この技術のデータ主導的な性質は、その強みと弱みの両方である。ＣＡＮの設計及び試験に必要なのは適切なデータセットだけであるが、十分に堅牢なデータセットを取得することは長期的な課題になる可能性がある。幸いなことに、このトピックに関する広範な文献が存在し、多くはオープンアクセスデータが含まれている。ここにおける結果は、技術の可能性を記述し始めるだけであり、ネットワーク設計、標的配列の選択、及び実験的検証のためのルール及びアルゴリズムを確立するためには、より多くの作業が必要である。まだ初期段階であるため、ＣＡＮの作成は非常に手動のプロセスであるが、モデリング及び自動計装の統合によってプロセス全体が簡素化され、ｉ）アプリケーション用のネットワークを設計し、ｉｉ）競合及びプライマー配列を選択し、ｉｉｉ）ビルディングブロックオリゴから競合をロボットで組み立て、ｉｖ）適切な数の反応を実行し、ｖ）結果を予測された応答と比較し、ｖｉ）ネットワーク又は配列設計を調整する。このようなクローズループ開発システムは、幅広いバイオセンシング用途のためのＣＡＮプラットフォームの迅速な展開を可能にするであろう。

【図面】

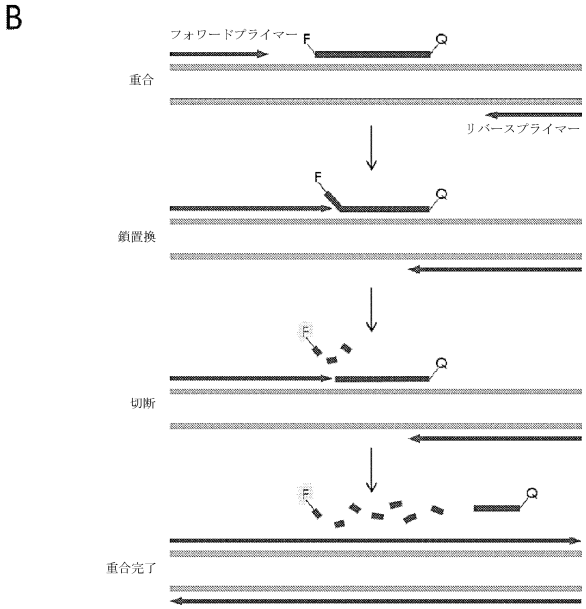
【図１－１】

図１（１／２）



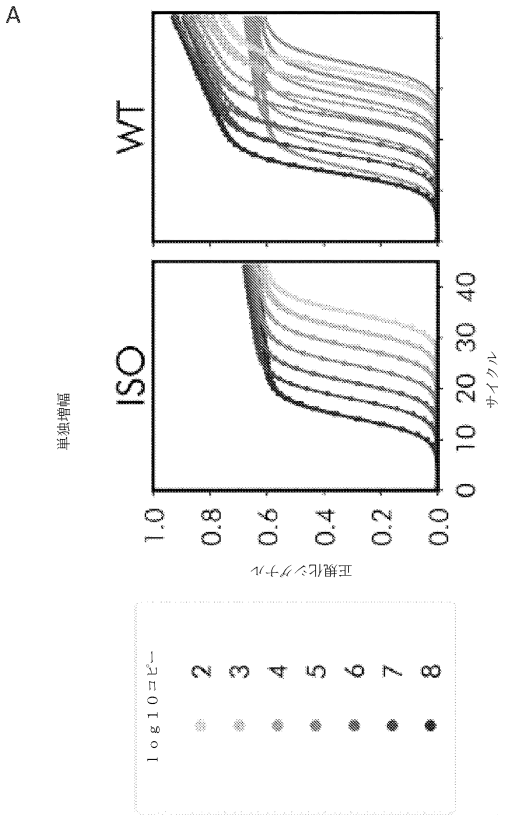
【図１－２】

図１（２／２）



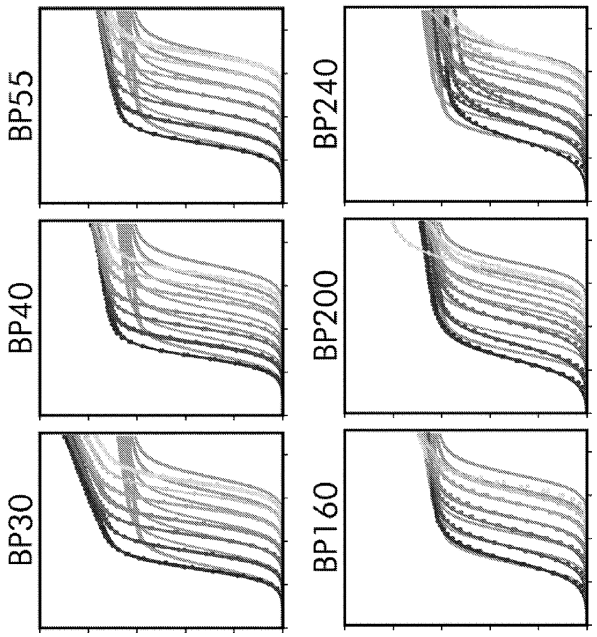
【図２－１】

図２（１／４）



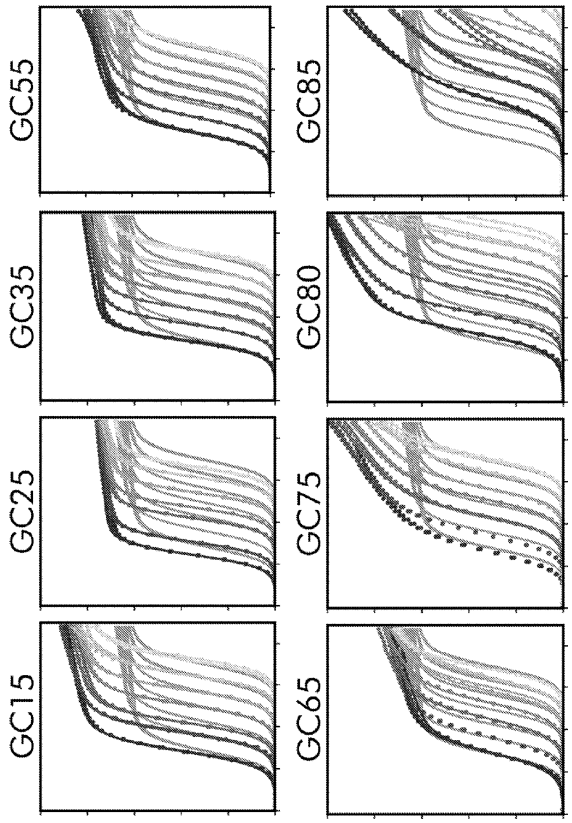
【図２－２】

図２（２／４）



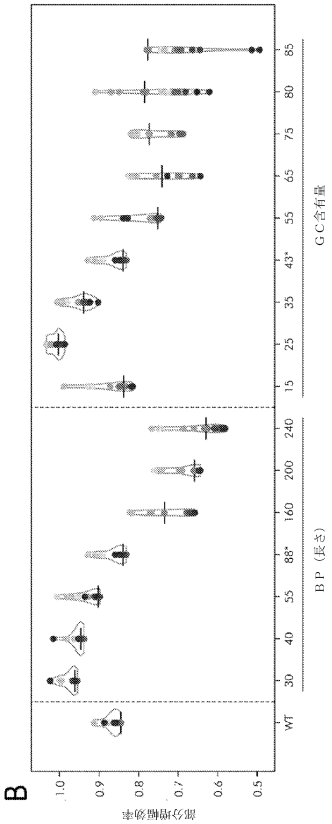
【図２－３】

図２（３／４）



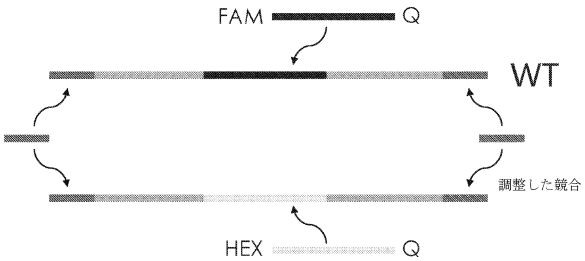
【図２－４】

図２（４／４）



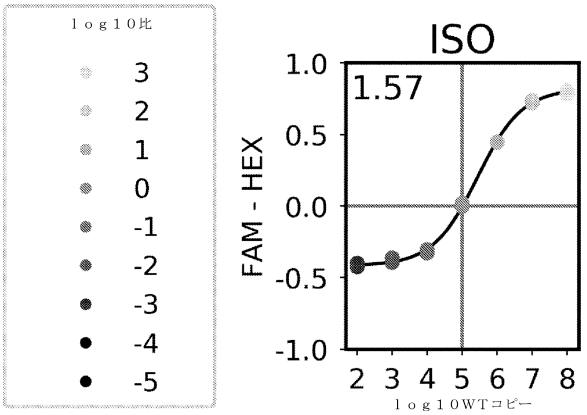
【図３】

図３



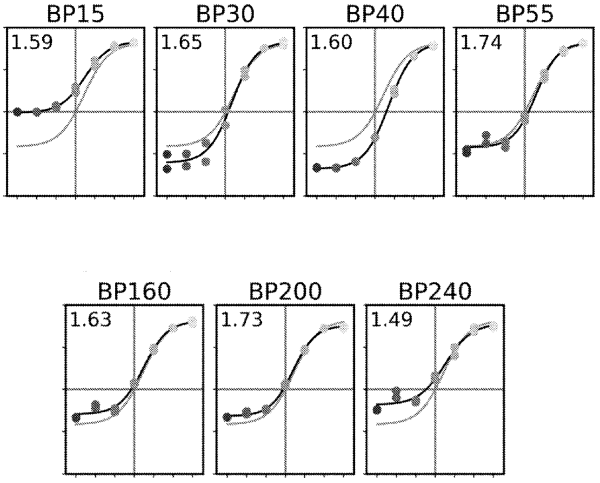
【図４－１】

図４（１／３）



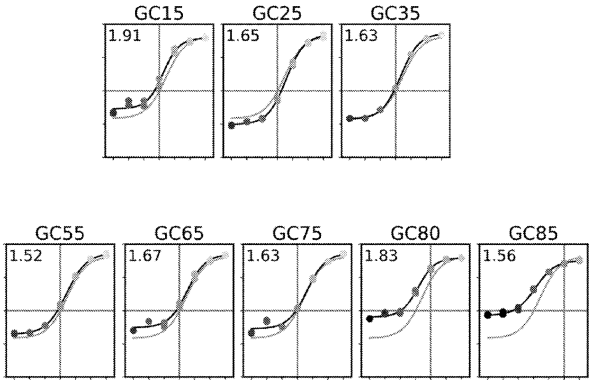
【図４－２】

図４（２／３）



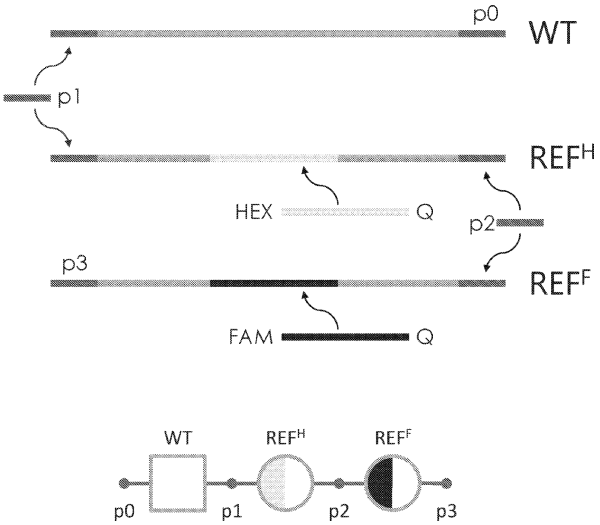
【図４－３】

図４（３／３）



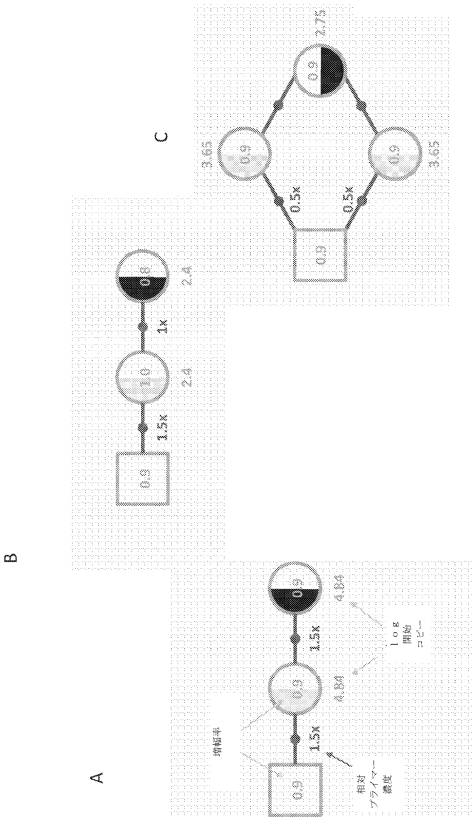
【図５】

図５



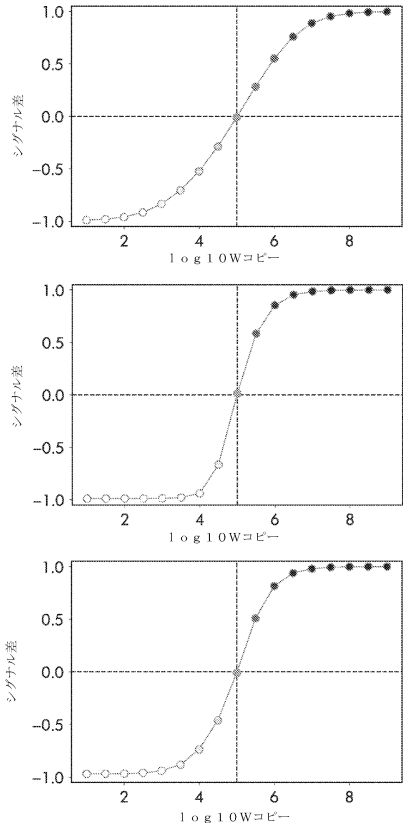
【図６－１】

図６（１／２）



【図６－２】

図６（２／２）



【図７－１】

図７（１／２）

色素	励起	発光代替例
６－ＦＡＭ（ＮＨＳエステル）	496	516N/A
６－ＦＡＭ（フルオレセイン）	495	520N/A
フルオレセインｄＴ	495	520N/A
Cy3TM	550	５６４ＴＹＥ（商標）５６３
TAMRATM	559	583N/A
ＪＯＥ（ＮＨＳエステル）	529	５５５ＭＡＸ（ＮＨＳエステル）
Cy5TM	648	６６８ＴＹＥ（商標）６６５
ＴＡＭＲＡ（ＮＨＳエステル）	559	583N/A
ＭＡＸ（ＮＨＳエステル）	531	５５６ＪＯＥ（ＮＨＳエステル）
TETTM	522	539N/A
Cy5.5TM	685	706TYE 705
ＲＯＸ（ＮＨＳエステル）	588	６０８ＡＴＴＯＴＭ Ｒｈｏ１０１（ＮＨＳエステル）
ＴＹＥ（商標）５６３	549	563Cy3TM
Ｙａｋｉｍａ Ｙｅｌｌｏｗ（登録商標）	524	551N/A
HEX	538	555N/A
TEX 615	596	６１３Ｔｅｘａｓ Ｒｅｄ（登録商標）－Ｘ（ＮＨＳエステル）
ＴＹＥ（商標）６６５	645	665Cy5TM
TYE 705	686	704Cy5.5TM
ＡＴＴＯＴＭ４８８（ＮＨＳエステル）	502	５２２Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８（ＮＨＳエステル）
ＡＴＴＯＴＭ５３２（ＮＨＳエステル）	534	554N/A
ＡＴＴＯＴＭ５５０（ＮＨＳエステル）	560	575N/A
ＡＴＴＯＴＭ５６５（ＮＨＳエステル）	570	591N/A
ＡＴＴＯＴＭ Ｒｈｏ１０１（ＮＨＳエステル）	592	６０９ＲＯＸ（ＮＨＳエステル）

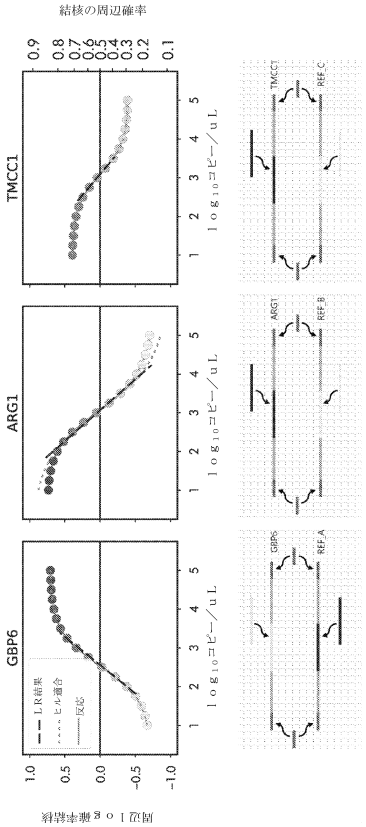
【図７－２】

図７（２／２）

色素	励起	発光代替例
ＡＴＴＯＴＭ５９０（ＮＨＳエステル）	593	６２２Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（登録商標）５９４（ＮＨＳエステル）
ＡＴＴＯＴＭ６３３（ＮＨＳエステル）	635	653N/A
ＡＴＴＯＴＭ６４７Ｎ（ＮＨＳエステル）	649	６２２Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６４７（ＮＨＳエステル）
Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８（ＮＨＳエステル）	492	５１７ＡＴＴＯＴＭ４８８（ＮＨＳエステル）
Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（登録商標）５３２（ＮＨＳエステル）	527	553N/A
Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（登録商標）５４６（ＮＨＳエステル）	556	571N/A
Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（登録商標）５９４（ＮＨＳエステル）	584	６１６ＡＴＴＯＴＭ５９０（ＮＨＳエステル）
Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６４７（ＮＨＳエステル）	650	６７０ＡＴＴＯＴＭ６４７Ｎ（ＮＨＳエステル）
Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６６０（ＮＨＳエステル）	661	691N/A
Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（登録商標）７５０（ＮＨＳエステル）	753	782N/A
５’ＩＲＤｙｅ（登録商標）７００	684	702N/A
５’ＩＲＤｙｅ（登録商標）８００	791	809N/A
５’ＩＲＤｙｅ（登録商標）８００ＣＷ（ＮＨＳエステル）	767	791N/A
ローダミングリーンＴＭ－Ｘ（ＮＨＳエステル）	504	531N/A
ローダミンレッドＴＭ－Ｘ（ＮＨＳエステル）	574	594N/A
５－ＴＡＭＲＡ ＴＭ（アジド）	546	579N/A
６－ＦＡＭ（アジド）	496	516N/A
Ｔｅｘａｓ Ｒｅｄ（登録商標）－Ｘ（ＮＨＳエステル）	598	617TEX 615
Ｌｉｇｈｔｃｙｃｌｅｒ（登録商標）６４０（ＮＨＳエステル）	620	635N/A
Ｄｙ７５０（ＮＨＳエステル）	747	776N/A

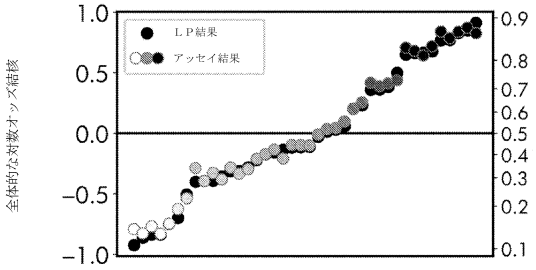
【図８－１】

図８（１／２）



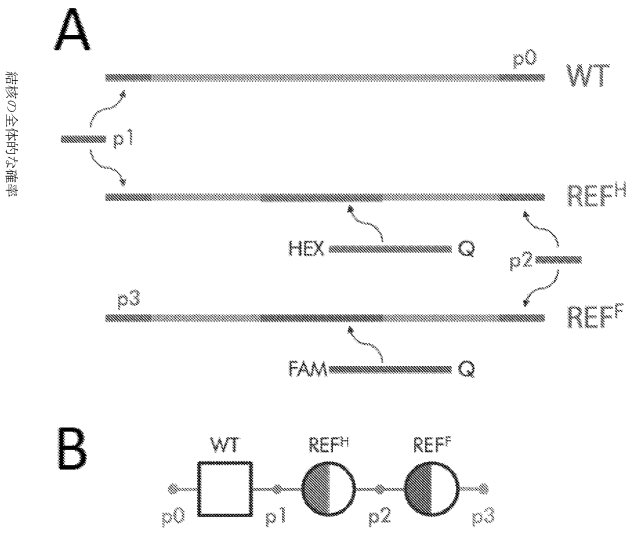
【図８－２】

図８（２／２）



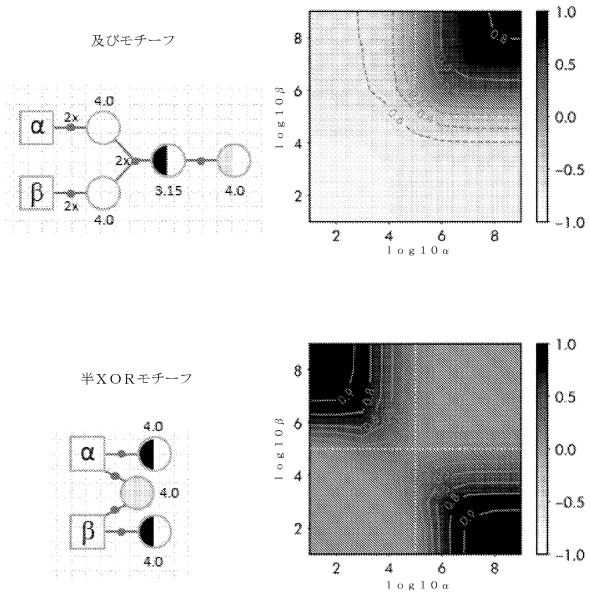
【図９】

図９



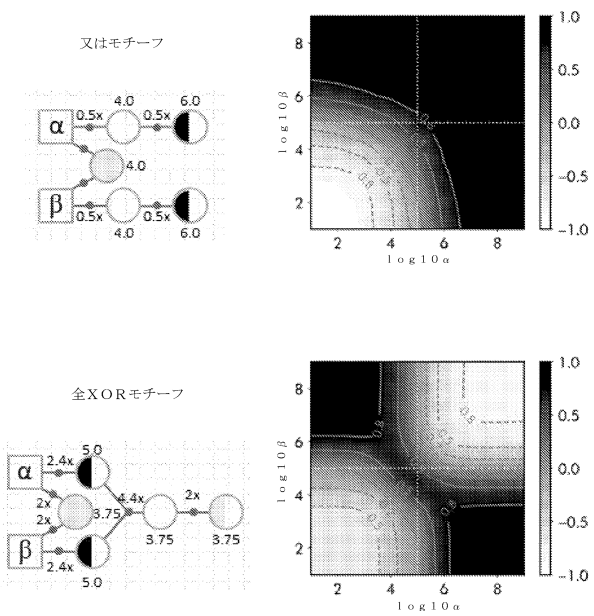
【図１０－１】

図１０（１／２）



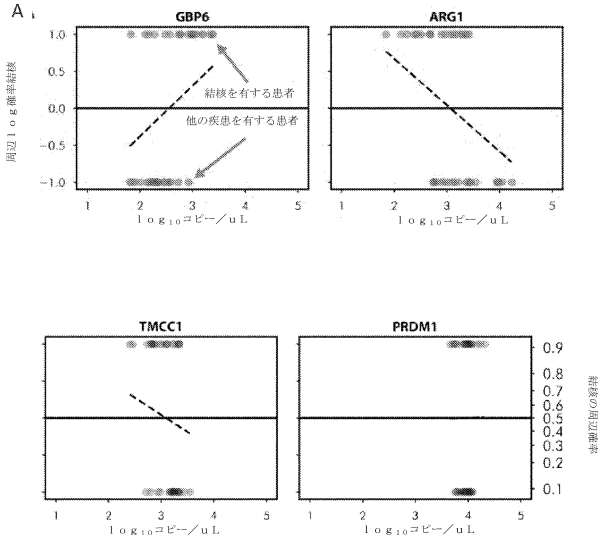
【図１０－２】

図１０（２／２）



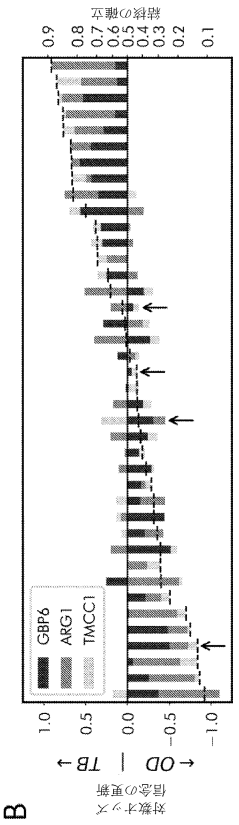
【図１１－１】

図１１（１／２）



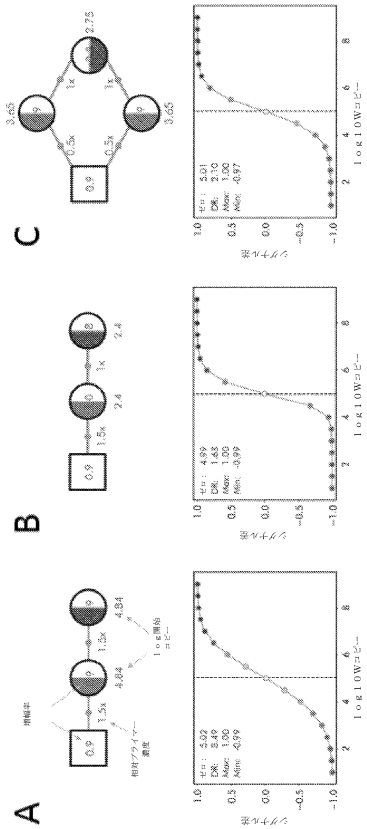
【図１１－２】

図１１（２／２）



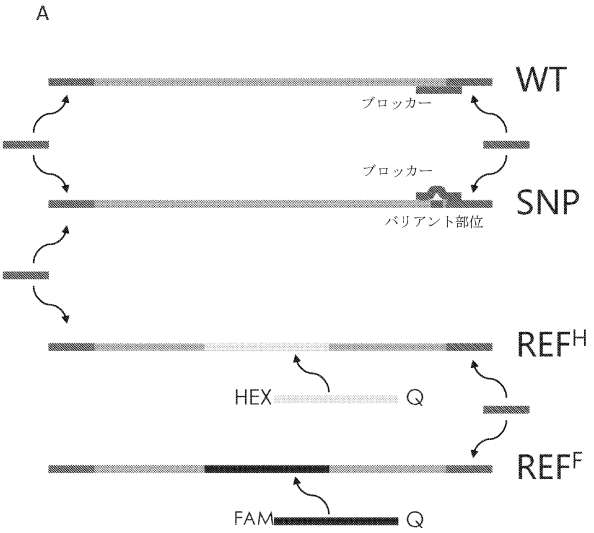
【図１２】

図１２

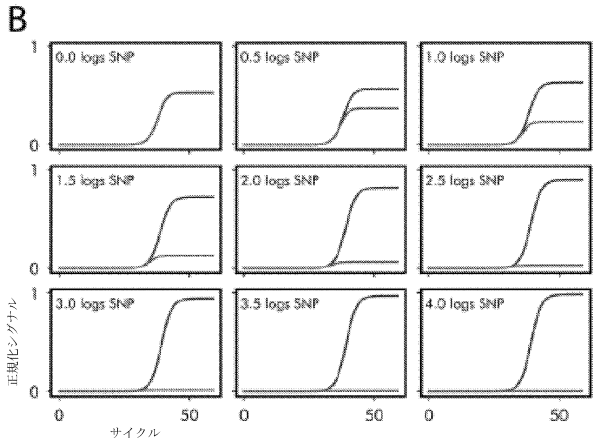


【図１３－１】

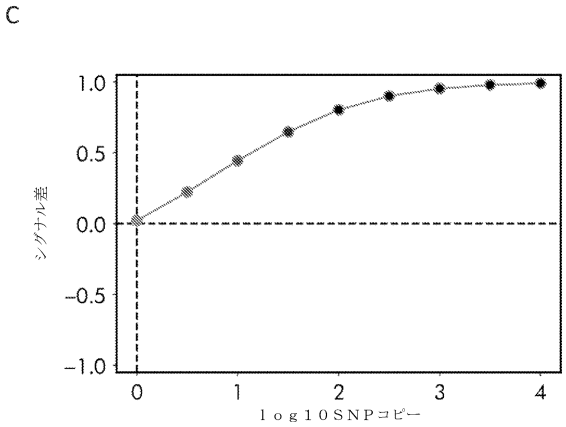
図１３（１／３）



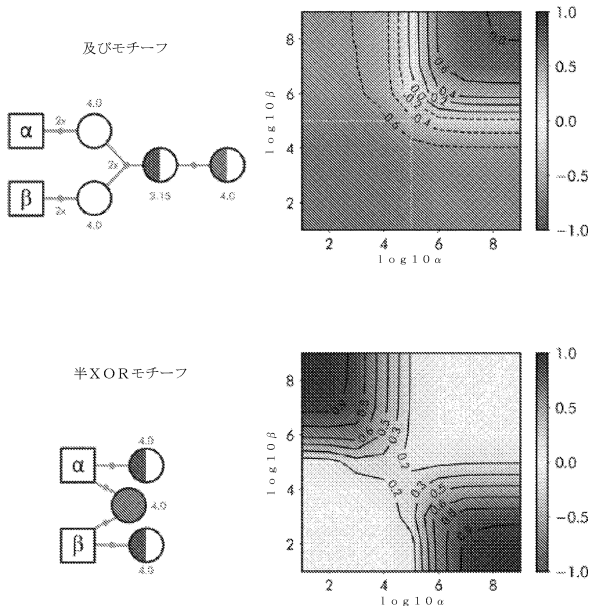
【図１３－２】
図１３（２／３）



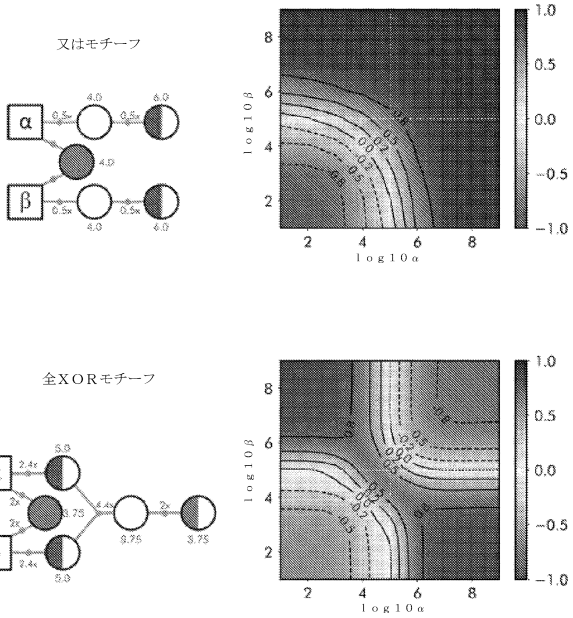
【図１３－３】
図１３（３／３）



【図１４－１】
図１４（１／２）

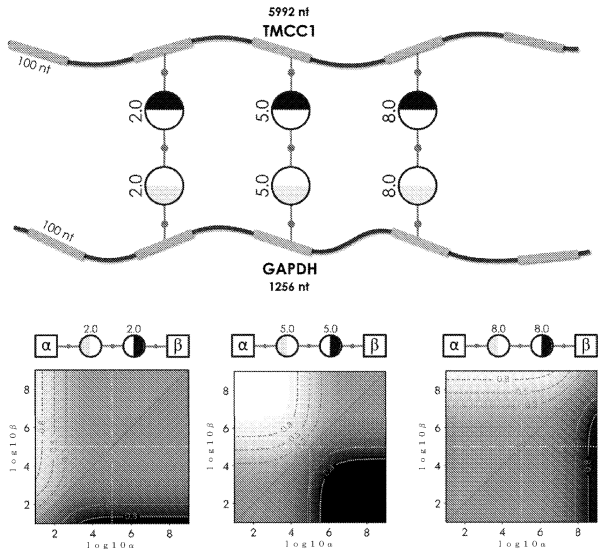


【図１４－２】
図１４（２／２）



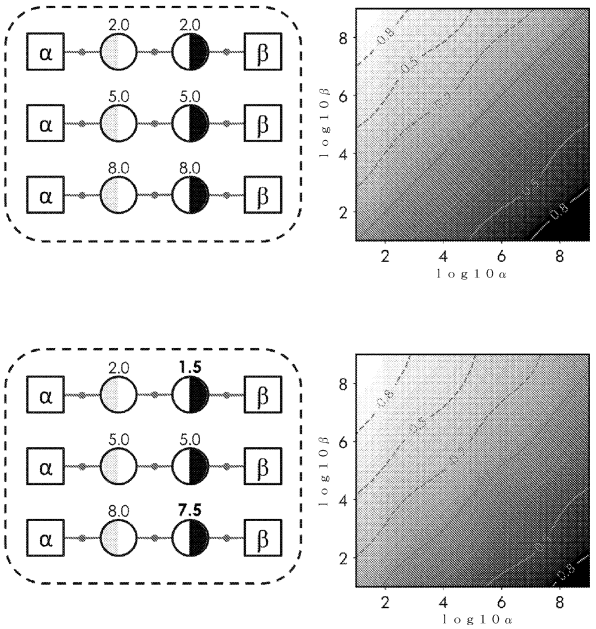
【図１５－１】

図１５（１／２）



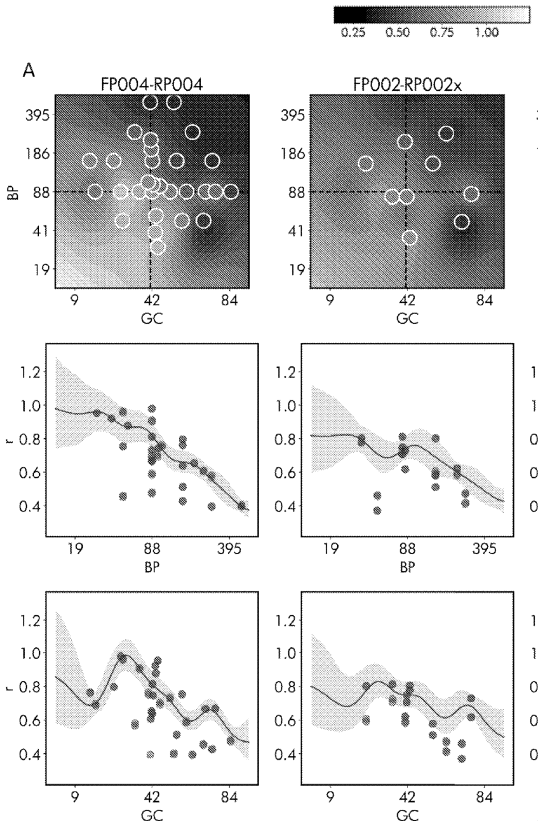
【図１５－２】

図１５（２／２）



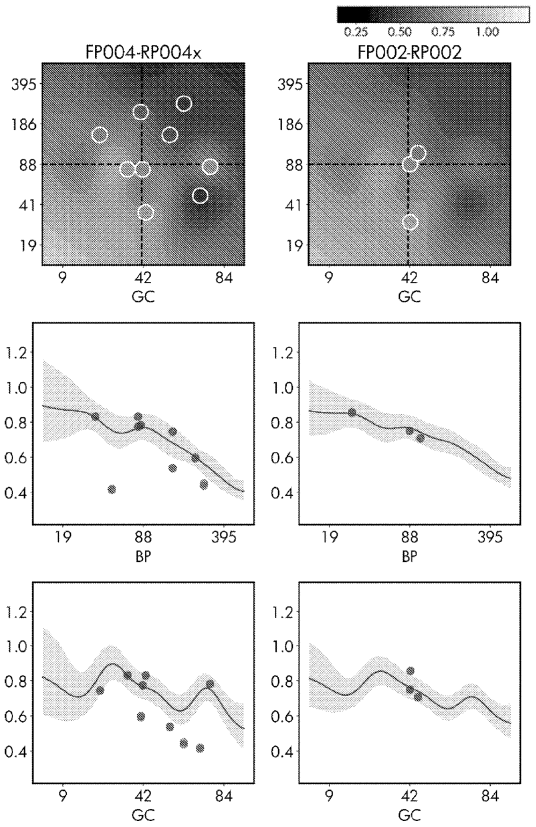
【図１６－１】

図１６（１／８）



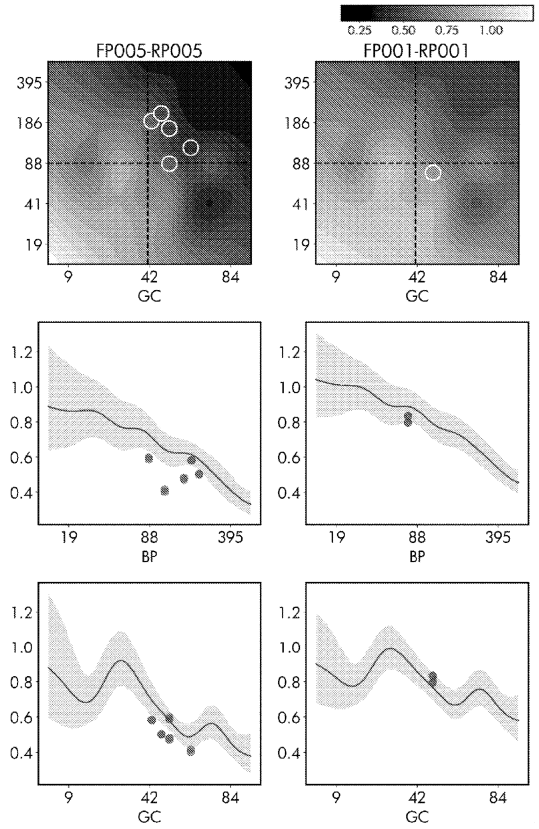
【図１６－２】

図１６（２／８）



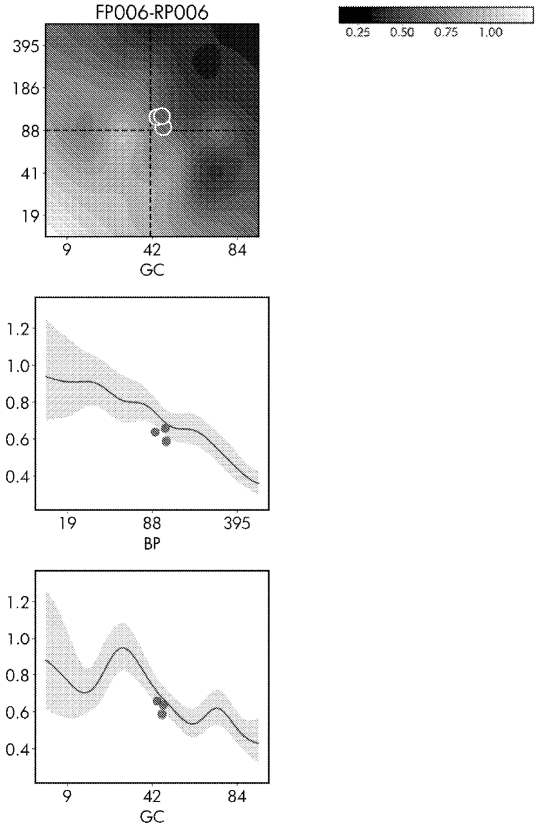
【図１６－３】

図１６（３／８）



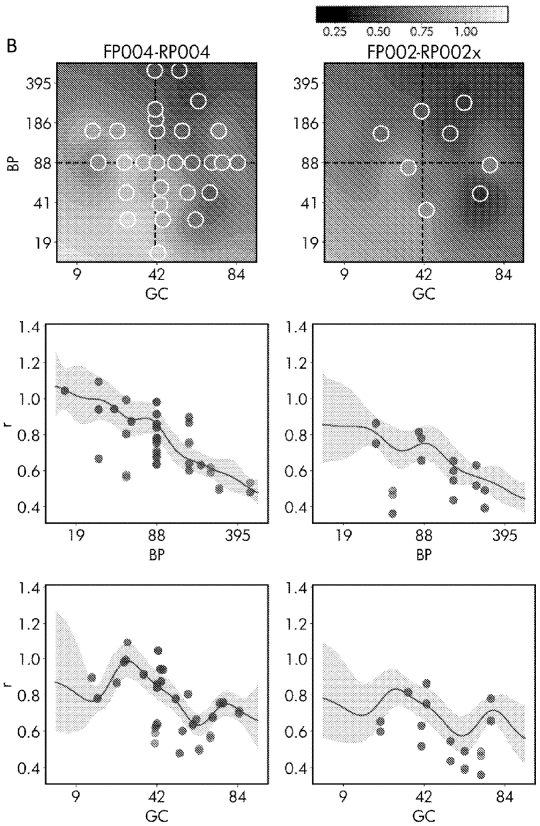
【図１６－４】

図１６（４／８）



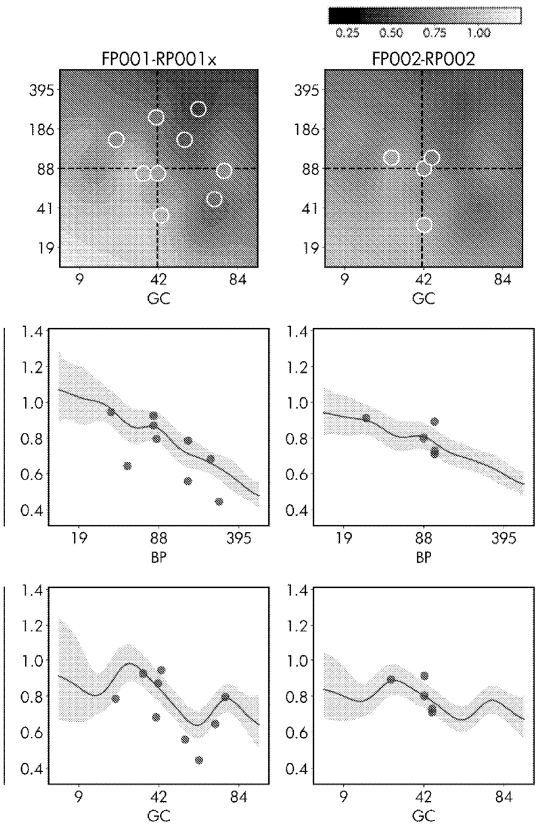
【図１６－５】

図１６（５／８）



【図１６－６】

図１６（６／８）



【図１６－７】

図１６（７／８）

【図１６－８】

図１６（８／８）

【図１７－１】

図１７（１／８）

名称	Fプライマー	コア	Rプライマー（相補体）	全配列	GC（コア）	BP（コア）	GC（グローバル）	BP（グローバル）	縦断された増幅率
TMCC1遺伝									
WT	GCTATTGCTG GGATTTTGAG G（配列番号１）	AGCTTTTCGTAAAAGGA TTGTACACTTACGAAGT GCTTAACGGAAGTGAT GAAGATAGGCATGAAGC CTCTTATATATTAACCT GCATG（配列番号２）	CGTAGTCACTGTT GAAGCAAATG（配列番号３）	GCTATTGCTGGCATTTTGACGAG CTTTTCCTAAAACGATTGTACACC TTAGAAGTGCTTAAGGAAGAGTGA TGAAGATAGGCATGAAGCCTTCGT CTCTTATATATTAACCTGCATCACT GTTGAAGCAAATG（配列番号４）	43%	88	44%	132	
ISO	GCTATTGCTG GGATTTTGAG G（配列番号１）	TCTGTATCGCAAGTGTT CAGAGCTTCATATTGGC AACGCTCTGGTAACCT CTCTATATTGATACTTC CTTTATTATATTAACCT CTAG（配列番号５）	CGTAGTCACTGTT GAAGCAAATG（配列番号３）	GCTATTGCTGGCATTTTGACGCT GTATCCCAAGGTTCAGAGCTTCA TATTGGCAACGCTCTGGTAACCTC TCTAAATTGATACTTCGATTGCA ATTTATTATATTAACCTGCATCACTG TTGAAGCAAATG（配列番号６）	43%	88	44%	132	0.83
GC15	GCTATTGCTG GGATTTTGAG G（配列番号１）	TTTAATAATAATTAAA CAGAGCTTCATATTGGC AACGCTCTGGTAACCT CTCTATATTGATACTTC TTATTTAAATTAATTAA TA（配列番号７）	CGTAGTCACTGTT GAAGCAAATG（配列番号３）	GCTATTGCTGGCATTTTGAGGTA ATTTATTCCAAGGTTCAGAGCTTA ATTAGGCAACGCTCTGGTAACCTC TCTATATTATATTAATTAAATAAT TAATAATAATTAAATGTAGTCACTGTT GAAGCAAATG（配列番号８）	15%	88	25%	132	0.83
GC25	GCTATTGCTG GGATTTTGAG G（配列番号１）	TGTAATATTAACAAGTA CAGAGCTTCATATTGGC CAACGCTCTGGTAACC TCTCTATTTATTCAATT TAATGATTACCTTTATTA TCT（配列番号９）	CGTAGTCACTGTT GAAGCAAATG（配列番号３）	GCTATTGCTGGCATTTTGAGGGTGT ATTTATTCCAAGGTTCAGAGCTTA ATATAGGCAACGCTCTGGTAACCT CTCTATTTATTCAATTTAATGATTA CCTTTATTATCTCGTAGTCACTGTT GAAGCAAATG（配列番号１０）	25%	88	32%	132	1.00
GC35	GCTATTGCTG GGATTTTGAG G（配列番号１）	AACGTAGCAATATTGAA CAGAGCTTCATATTGGC CAACGCTCTGGTAACC TCTCTATTTATTCAATT ATCATACTCTAGTGTTT CGTT（配列番号１１）	CGTAGTCACTGTT GAAGCAAATG（配列番号３）	GCTATTGCTGGCATTTTGAGGAAC CTATTCCTAAGGTTCAGAGCTTA TTAGAAGACAACGCTCTGGTAACC TCTCTATTTATTCAATCTATCATCTC TAGTGTTTCGTTCGTAGTCACTGT TGAAGCAAATG（配列番号１２）	35%	88	39%	132	0.93

【図１７－２】

図１７（２／８）

名称	Fプライマー	コア	Rプライマー（相補体）	全配列	GC（コア）	BP（コア）	GC（グローバル）	BP（グローバル）	縦断された増幅率
TMCC1遺伝									
GC55	GCTATTGCT GGGATTTTG AGG（配列番号１）	TGGCTTCATTGCTGTG TGAGGTGAAGAGCTTA GAGGCACACGCTCTTG GTTAACCTCTCTACAC GCTTAGGAACGCTGC ATGTTGGAATCTTCCA（配列番号１３）	CGTAGTCACTGT TGAAGCAAATG（配列番号３）	GCTATTGCTCGGATTTTGAGGT GCGTCGATGCGGTGTGAGGTG AAGACCTAGAGGCAACGCTCTG GTAACCTCTCTACACGCTTAGC AACGCTGCATGTGGAGTCTCCA CGTAGTCACTGTTGAAGCAAAT G（配列番号１４）	55%	88	52%	132	0.74
GC65	GCTATTGCT GGGATTTTG AGG（配列番号１）	TGCGTTCGCGGCTGTG GAGGCAACAGCTTAGA GAGGCACACGCTCTTG GTTAACCTCTCTACAC GCTTAGGAACGCTGC ATGTTGGAATCTTCCA（配列番号１５）	CGTAGTCACTGT TGAAGCAAATG（配列番号３）	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGT CGCGCGCGTGCGCGTGTG CCGACTACAGGCAACGCTCTG GGTAACCTCTCTACACGCTTAG CGCACGCTCCCGCGCGAGCGGC CGCGTAGTCACTGTTGAAGCAA ATG（配列番号１６）	65%	88	58%	132	0.62
GC75	GCTATTGCT GGGATTTTG AGG（配列番号１）	GCGCGGCGGTGGAG CGCTCGCGGTGGTGC TCCGGCAAACGCTCT GGTTAACCTCTCTATG CGCGCGTGGCCACGCT CCCGCGCGCGACGCGCCG（配列番号１７）	CGTAGTCACTGT TGAAGCAAATG（配列番号３）	GCTATTGCTCGGATTTTGAGGG CGCCGCGGTGGAGCGCTCGCG CGCACGCGCCGCTCCTCCGCG GGTAACCTCTCTATGCGCGTG GCCACGCTCCCGCGCGAGCGC CGCGTAGTCACTGTTGAAGCAA ATG（配列番号１８）	75%	88	65%	132	0.67
GC80	GCTATTGCT GGGATTTTG AGG（配列番号１）	CGGCGCGCCGCGCGC GCGACGCGCGTCCGC TCCGGCAAACGCTCT GCTGCACACGCGCGCGC GCGCGCGCGCGAGCGCGCA（配列番号１９）	CGTAGTCACTGT TGAAGCAAATG（配列番号３）	GCTATTGCTCGGATTTTGAGGC CGCGCGCGCGCCCCCGACGC GCGTCCGTTCCGGCAAACGCTCT GCTGCACACGCGCGCGCGCGC CCGGCGCGCGCGAGCGCGCGC CACGTAGTCACTGTTGAAGCAA ATG（配列番号２０）	80%	88	68%	132	0.73
GC85	GCTATTGCT GGGATTTTG AGG（配列番号１）	GCGGCGGGGGGCGCGG GCGGCGCGTGGGCGC GGCGGCCAACGCTCT GGTAACCTCTCTAG GCGGCGGCGCGCACCGC GCGGCGTGGCGGGCGGC GCC（配列番号２１）	CGTAGTCACTGT TGAAGCAAATG（配列番号３）	GCTATTGCTCGGATTTTGAGGG CGGCCGCGCGCCGGCGCGCGC GTGGGCCGGCGGCAACGCTCT GGTAACCTCTCTAGCGCGCGG CGCACCGGCGGCCGCGGCCG CGCGCGTAGTCACTGTTGAAGC AAATG（配列番号２２）	85%	88	72%	132	

【図１７－３】

図１７（３／８）

名称	Fプライマー	コア	Rプライマー（相補体）	全配列	GC（コア）	BP（コア）	GC（グローバル）	BP（グローバル）	観察された増幅率
TMCC１標的									
BP240	GCTATTGCTGGGATTTTGAGG（配列番号１）	ACCACGGTAATTACTGTTAGACTGGTGGGTATAAACTTCGTTATTTGGATTGGAATTGTTGAGCCCTACCTGACTCTGTATCCCAAGTGTTCTCTGCTTCATATTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAAATTGATAGTTCCGATTGCAACTTGACGTCTAGCCCGTATAAATAGCCGGTCTAAACAGCGATGAAATTTCTGTAGAATCAACTAAATTTTCCGTTCAACGGATCCTCTGC（配列番号２３）	CGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG（配列番号３）	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGACCACGGTAATTACTGTTAGACTGGTGGGTATAAACTTCGTTATTTGGATTGGAATTGTTGAGCCCTACCTGACTCTGTATCCCAAGTGTTCTCTGCTTCATATTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAAATTGATAGTTCCGATTGCAACTTGACGTCTAGCCCGTATAAATAGCCGGTCTAAACAGCGATGAAATTTCTGTAGAATCAACTAAATTTTCCGTTCAACGGATCCTCTGCCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG（配列番号２４）	42%	240	43%	284	0.58
BP200	GCTATTGCTGGGATTTTGAGG（配列番号１）	AAGATCTGTTCATGCGTTCGTTATTTGGATTGGAATTGTTGAGCCCTACCTGACTCTGTATCCCAAGTGTTCTCTGCTTCATATTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAAATTGATAGTTCCGATTGCAACTTGACGTCTAGCCCGTATAAATAGCCGGTCTAAACAGCGATGAAATTTCGTCCGAACAAGTTTCAACTT（配列番号２５）	CGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG（配列番号３）	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGAAGATCTGTTCATGCGTTCGTTATTTGGATTGGAATTGTTGAGCCCTACCTGACTCTGTATCCCAAGTGTTCTCTGCTTCATATTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAAATTGATAGTTCCGATTGCAACTTGACGTCTAGCCCGTATAAATAGCCGGTCTAAACAGCGATGAAATTTCGTCCGAACAAGTTTCAACTTCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG（配列番号２６）	43%	200	43%	244	0.63

【図１７－４】

図１７（４／８）

名称	Fプライマー	コア	Rプライマー（相補体）	全配列	GC（コア）	BP（コア）	GC（グローバル）	BP（グローバル）	観察された増幅率
TMCC１標的									
BP160	GCTATTGCTGGGATTTTGAGG（配列番号１）	CGTTATTTGGATTGGAATTGTTGAGCCCTACCTGACTCTGTATCCCAAGTGTTCTCTGCTTCATATTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAAATTGATAGTTCCGATTGCAACTTGACGTCTAGCCCGTATAAATAGCCGGTCTAAACAGCGATGAAATTTC（配列番号２７）	CGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG（配列番号３）	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGCGTTATTTGGATTGGAATTGTTGAGCCCTACCTGACTCTGTATCCCAAGTGTTCTCTGCTTCATATTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAAATTGATAGTTCCGATTGCAACTTGACGTCTAGCCCGTATAAATAGCCGGTCTAAACAGCGATGAAATTTCCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG（配列番号２８）	43%	162	44%	206	0.66
BP55	GCTATTGCTGGGATTTTGAGG（配列番号１）	AGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAATTGATAGTTCCGATACGTGCAACTTGTCT（配列番号２９）	CGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG（配列番号３）	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGAGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAATTGATAGTTCCGATACGTGCAACTTGTCTCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG（配列番号３０）	45%	55	45%	99	0.90
BP40	GCTATTGCTGGGATTTTGAGG（配列番号１）	AGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAATTGATAGATTCCAG（配列番号３１）	CGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG（配列番号３）	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGAGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAATTGATAGATTCCAGCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG（配列番号３２）	45%	40	45%	84	0.95
BP30	GCTATTGCTGGGATTTTGAGG（配列番号１）	AGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAATATG（配列番号３３）	CGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG（配列番号３）	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGAGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAATATGCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG（配列番号３４）	47%	30	46%	74	0.97
BP15	GCTATTGCTGGGATTTTGAGG（配列番号１）	TTGCAACTTGACGTC（配列番号３５）	CGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG（配列番号３）	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGTTGCAACTTGACGTCCGTAGTCACTGTTGAAGCAAATG（配列番号３６）	47%	15	46%	59	

【図１７－５】

図１７（５／８）

名称	Fプライマー	コア	Rプライマー（相補体）	全配列	GC（コア）	BP（コア）	GC（グローバル）	BP（グローバル）	観察された増幅率
ＡＲＧ１標的									
ＷＴ	CGCCAAGTCCAGAACCATAG（配列番号３７）	GGATTATTGGAGCTCCTTTCTCAAAGGGACAGCCACGAGGAGGGGTGGAAGAAGGCCCTACAGTATTGAGAAAGGCTGGTCTGCTTGAGAAACTTAAAGAACAAGAGT（配列番号３８）	GTGATGTGAAGGATTATGGGGA（配列番号３９）	CGCCAAGTCCAGAACCATAGGGATTATTGGAGCTCCTTTCTCAAAGGGACAGCCACGAGGAGGGGTGGAAGAAGGCCCTACAGTATTGAGAAAGGCTGGTCTGCTTGAGAAACTTAAAGAACAAGAGTGTGATGTGAAGGATTATGGGGA（配列番号４０）	48%	108	49%	150	
ISO	CGCCAAGTCCAGAACCATAG（配列番号３７）	GGATTATTGGAGCTCCTTTCTCAAAGGGACAGCCACGAGGAGGGGTGGAAGAAGGCCCTACAGTATTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAAATTAAAGAACAAGAGT（配列番号４１）	GTGATGTGAAGGATTATGGGGA（配列番号３９）	CGCCAAGTCCAGAACCATAGGGATTATTGGAGCTCCTTTCTCAAAGGGACAGCCACGAGGAGGGGTGGAAGAAGGCCCTACAGTATTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAAATTAAAGAACAAGAGTGTGATGTGAAGGATTATGGGGA（配列番号４２）	49%	108	49%	150	
BP88_GC43	CGCCAAGTCCAGAACCATAG（配列番号３７）	TCTGTATCCCAAGTGTTCAGAGCTTCATATTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAAATTGATAGTTCCGATTGCAACTTGACGTCTAG（配列番号４３）	GTGATGTGAAGGATTATGGGGA（配列番号３９）	CGCCAAGTCCAGAACCATAGTCTGTATCCCAAGTGTTCAGAGCTTCATATTGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAAATTGATAGTTCCGATTGCAACTTGACGTCTAGGTGATGTGAAGGATTATGGGGA（配列番号４４）	43%	88	45%	130	
BP30_GC43	CGCCAAGTCCAGAACCATAG（配列番号３７）	GGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAAATTAA（配列番号４５）	GTGATGTGAAGGATTATGGGGA（配列番号３９）	CGCCAAGTCCAGAACCATAGGGCAACGCTCTGGTAACCTCTCTAAATTAAGTGATGTGAAGGATTATGGGGA（配列番号４６）	43%	30	47%	72	
BP108_GC25	CGCCAAGTCCAGAACCATAG（配列番号３７）	TAATTATTATAGCTAATTTCTCAAATTTACAGAAACGAATAGAAGTTTAAGAATTAAATACAGTATTGG（配列番号４７）	GTGATGTGAAGGATTATGGGGA（配列番号３９）	CGCCAAGTCCAGAACCATAGTAATTATTATAGCTAATTTCTCAAATTTACAGAAACGAATAGAAGTTTAAGAATTAAATACAGTATTGGGTGATGTGAAGGATTATGGGGA（配列番号４８）	22%	69	32%	111	

【図１７－６】

図１７（６／８）

名称	Fプライマー	コア	Rプライマー（相補体）	全配列	GC（コア）	BP（コア）	GC（グローバル）	BP（グローバル）	観察された増幅率
ＧＢＰ６標的									
WT	GCAAGAACCAAGACCCTCAG（配列番号４９）	GGAGGGAATCACAGTCACTGGGAATCGTCTGGGAACTCTGGCAGTGACTTATGTAGAGGCCATCAACAGTGGAG（配列番号５０）	CAGTGCCTTGTCTGGAGAAT（配列番号５１）	GCAAGAACCAAGACCCTCAGGGAGGGAATCACAGTCACTGGGAATCGTCTGGGAACTCTGGCAGTGACTTATGTAGAGGCCATCAACAGTGGAGCAGTGCCTTGTCTGGAGAAT（配列番号５２）	53%	74	53%	114	
ISO	GCAAGAACCAAGACCCTCAG（配列番号４９）	GGAGGGAATCACAGTCACGCATGAAGCCTTCGTCTCACAGCTCGTGACTTATGTAGAGGCCATCAACAGTGGAG（配列番号５３）	CAGTGCCTTGTCTGGAGAAT（配列番号５１）	GCAAGAACCAAGACCCTCAGGGAGGGAATCACAGTCACGCATGAAGCCTTCGTCTCACAGCTCGTGACTTATGTAGAGGCCATCAACAGTGGAGCAGTGCCTTGTCTGGAGAAT（配列番号５４）	53%	74	53%	114	
BP88_GC43	GCAAGAACCAAGACCCTCAG（配列番号４９）	ATCTGTATCCCAAGTGTTCAGAGCTTCATATTGCATGAAGCCTTCGTCTCACAGCTATTGATAGTTCCGATTGCAACTTGACGTCTAG（配列番号５５）	CAGTGCCTTGTCTGGAGAAT（配列番号５１）	GCAAGAACCAAGACCCTCAGATCTGTATCCCAAGTGTTCAGAGCTTCATATTGCATGAAGCCTTCGTCTCACAGCTATTGATAGTTCCGATTGCAACTTGACGTCTAGCAGTGCCTTGTCTGGAGAAT（配列番号５６）	43%	88	46%	128	
BP30_GC53	GCAAGAACCAAGACCCTCAG（配列番号４９）	GCATGAAGCCTTCGTCTCACAGCTCGTGAT（配列番号５７）	CAGTGCCTTGTCTGGAGAAT（配列番号５１）	GCAAGAACCAAGACCCTCAGGCATGAAGCCTTCGTCTCACAGCTCGTGATCAGTGCCTTGTCTGGAGAAT（配列番号５８）	53%	30	53%	70	
ＥＧＦＲ標的									
ＷＴ	GCAGCATGTCAAGATCACAGATT（配列番号５９）	TTGGGCTGGCCAAACTGCTGGGTGCGGAAGAGAAAGAATACCATGCA（配列番号６０）	GAAGGAGGCAAAGTAAGGAGGT（配列番号６１）	GCAGCATGTCAAGATCACAGATTTTGGGCTGGCCAAACTGCTGGGTGCGGAAGAGAAAGAATACCATGCAGAAGGAGGCAAAGTAAGGAGGT（配列番号６２）	53%	47	50%	92	

【図１７－７】

図１７（７／８）

名称	Fプライマー	コア	Rプライマー（相補体）	全配列	GC（コア）	BP（コア）	GC（グローバル）	BP（グローバル）	隣接された増幅帯
SNP	GCAGCATGT CAAGATCAC AGATT（配列番号５９）	TTGGGCGGGCGCAAC TGCTGGGTGCGGAAG AGAAAGAATACCATG CA（配列番号６３）	GAAGGAGGCAA AGTAAGGAGGT（配列番号６１）	GCAGCATGTCAAGATCACAGATT TTTGGGCGGGCGCAAACTGCTG GGTGCGGAAGAGAAAGAATAC CATGCAGAAGGAGGCAAAGTA AGGAGGT（配列番号６４）	55%	47	51%	92	
A	CATTTGCTT CAACAGTGA CTACG（配列番号６６）	AAGATCTGTTCATGGG TTCGTTATTTGGATTG GAATTGTTGAGCCCTA CCTGACTCTGTATCCC AAGTGTTCTTGCTTC ATCTTTCATAGCCGTGG TTCGTCTCACAAGCTA ATTCAATAGTTCCGATT GCAACTTGACGTCTA GCCCGTATAAATAGC CGCCGTTAAGCGTGG TGAAATTTCGTCCGAA CAAGTTTCAACTT（配列番号６６）	GAAGGAGGCAA AGTAAGGAGGT（配列番号６１）	CATTTGCTTCAACAGTGACTAC GAAGATCTGTTCATGGGTTCGT TATTTGGATTGGAATTGTTGAG CCCTACCTGACTCTGTATCCCA AGTGTTCTTGCTTCATTATTGC ATCTTTCATAGCCGTGGCACGCT AATTCAATAGTTCCGATTGCAAC TTCGACGTCTAAACAGGGATGAA ATTTCGATCCGAACAAGTTCAA AGCCCGTATAAATAGCCGTGAAGG AGGT（配列番号６７）	43%	200	43%	245	
B	GCTATTGCT GGGATTTTG AGG（配列番号６８）	AAGATCTGTTCATGGG TTCGTTATTTGGATTG GAATTGTTGAGCCCTA CCTGACTCTGTATCCC AAGTGTTCTTGCTTC ATATTTGACAACGCTAC ATTCAATAGTTCCGATT GCAACTTGACGTCTA GCCCGTATAAATAGC CGCCGTTAAGCGTGG TGAAATTTCGTCCGAA CAAGTTTCAACTT（配列番号６６）	CGTAGTCACTGT TGAAGCAAATG（配列番号７０）	GCTATTGCTGGGATTTTGAGGA AGATCTGTTCATGGGTTCGTTA TTTGGATTGGAATTGTTGAGCC CTACCTGACTCTGTATCCCAAG TGTTCTCTTGCTATTGGCA ACGCTCTGGTAACCTCTTAAA TTCAATAGTTCCGATTGCAATT GACGTCTAGCCGTATAAATAG CCGGTCTAAACAGGGATGAAAT TCGTCCGAACAAGTTTCAACT TCGTAGTCACTGTTGAAGCAAA TG（配列番号７１）	43%	200	43%	244	

【図１７－８】

図１７（８／８）

配列	配列番号
プライマー	
GCTATTGCTGGGATTTTGAGG	配列番号１
GCAAGAACCAAGACCCTCAG	配列番号４９
ATTCTCCAGACAAGGCACTG	配列番号７２
CATTTGCTTCAACAGTGACTACG	配列番号６５
CGCCAAGTCCAGAACCATAG	配列番号３７
TCCCCATAATCCTTCACATCAC	配列番号７３
GCAGCATGTCAAGATCACAGATT	配列番号５９
ACCTCCTTACTTTGCCTCCTTC	配列番号７４
CATTTGCTTCAACAGTGACTACG	配列番号６５
GCTATTGCTGGGATTTTGAGG	配列番号１
ブロッカー	
GATCACAGATTTTGGGCTGGCCAAACATAA-C3	配列番号７５
GATCACAGATTTTGGGCGGGCCAAACATAA-C3	配列番号７６
プローブ	
/56-FAM/AGCTGTGAG/Zen/ACGAAGGCTTCATGC/3IABkFQ/	配列番号７７
/5HEX/TAGAGAGGT/ZEN/TACCAGAGCGTTGCC/3IABkFQ/	配列番号７８
/56-FAM/AGTTTCTCA/Zen/AGCAGACCAGCCTTTCTC/3IABkFQ/	配列番号７９
/56-HEX/CCAGAGTTC/Zen/CCAGACGATTCCCA/3IABkFQ/	配列番号８０

【図１８】

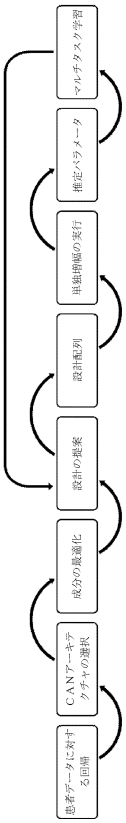
図１８

【図１９】

図１９

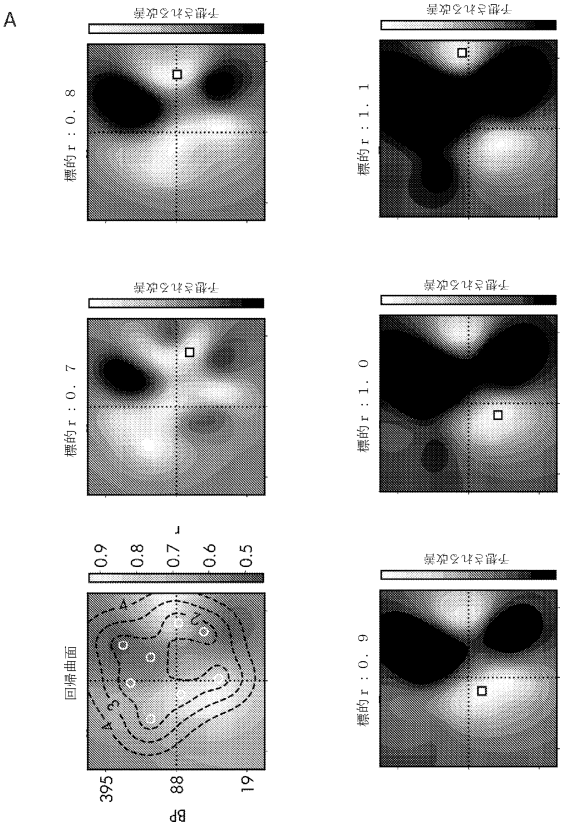
【図２０】

図２０



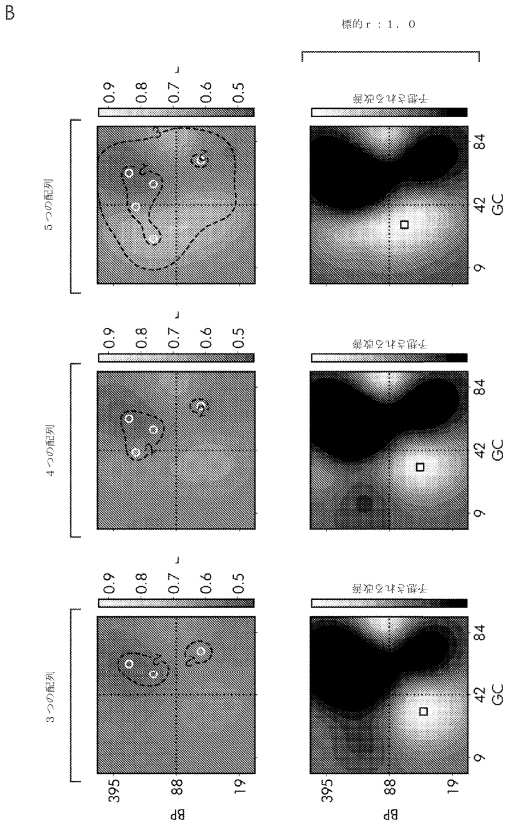
【図２１－１】

図２１（１／３）



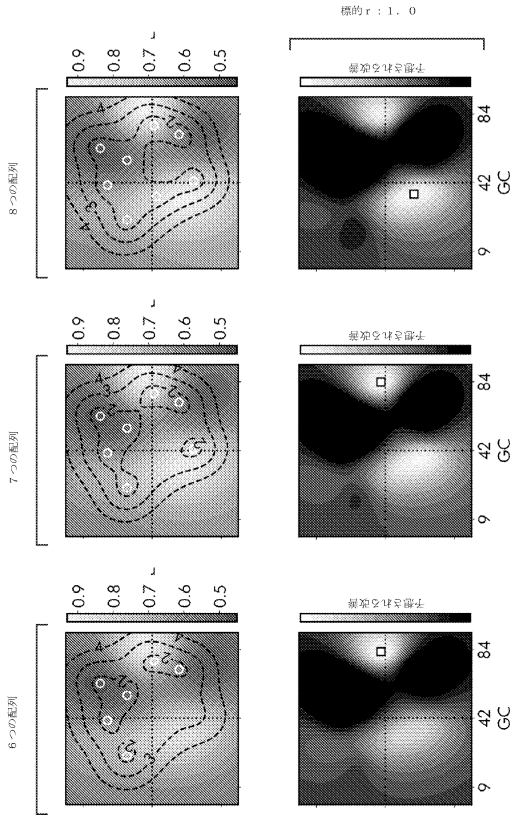
【図２１－２】

図２１（２／３）



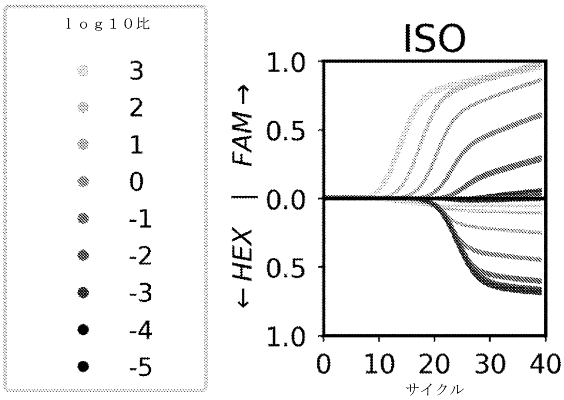
【図２１－３】

図２１（３／３）



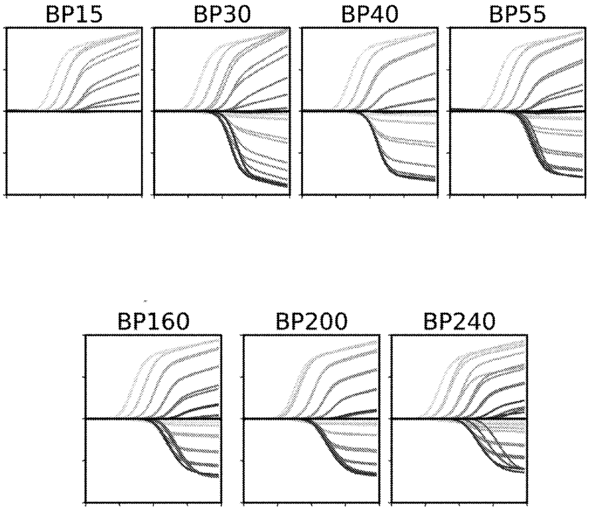
【図２２－１】

図２２（１／３）



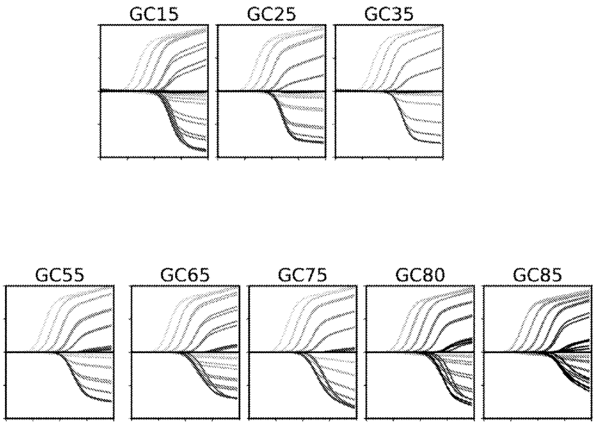
【図２２－２】

図２２（２／３）



【図２２－３】

図２２（３／３）



【図２３－１】

図２３（１／９）

	名称	BP	GC	レポーター	τ	F0_lg	ρ	r	K	m	ＦＰ名称	ＦＰ配列番号	ＲＰ名称	ＲＰ配列番号	プローブ配列番号	ＣＯ配列番号
0	S044.0	16	0.4375	色素	24.65853	-7.52511	0.111405748	1.01650026	1.393834061	3.55E-05	FP004	81	RP004	88	-	262
1	S044.1	30	0.266667	色素	21.86603	-7.07723	0.096597868	1.076087425	0.897247676	3.67E-05	FP004	81	RP004	88	-	267
2	S036.3	30	0.433333	色素	26.39468	-7.08112	0.150006115	0.891669668	1.480879929	0.000294135	FP002	82	RP002	89	-	132
3	S044.2	30	0.466667	色素	25.96957	-7.38082	0.133982444	0.942177802	1.757524886	0.000393802	FP004	81	RP004	88	-	195
4	S044.3	30	0.666667	色素	26.39147	-5.16687	0.246654083	0.650432977	1.131530443	0.001301042	FP004	81	RP004	88	-	242
5	S057.6.2	33	0.393939	色素	21.95238	-3.97314	0.290898538	0.597302528	0.819884373	0.0012879	FP003	83	RP008x	90	-	268
6	S057.5.2	33	0.393939	色素	22.55477	-5.30734	0.202436436	0.780147017	0.722710085	0.001309915	FP003	83	RP008	285	-	269
7	S057.8.2	33	0.393939	色素	17.66352	-4.38678	0.199598548	0.824140979	1.219114841	0.001052296	FP057.1.0	84	RP003x	91	-	280
8	S056.2.8	36	0.444444	色素	19.77602	-4.5139	0.222613228	0.755430919	1.914602158	0.004452044	FP002	82	RP002x	284	-	105
9	S056.4.8	36	0.444444	色素	24.45625	-6.10608	0.177953676	0.82685146	0.904293765	0.001839575	FP004	81	RP004x	283	-	197
10	S056.2.8	36	0.444444	色素	22.66316	-5.92217	0.168214974	0.865508727	0.625904081	0.001765114	FP002	82	RP002x	284	-	106
11	S056.1.8	36	0.444444	色素	21.48975	-6.06302	0.143584204	0.937543561	0.641910939	0.001009214	FP001	85	RP001x	92	-	159
12	S044.4	40	0.45	色素	24.22461	-6.77879	0.141430313	0.929251259	1.834889896	0.000271747	FP004	81	RP004	88	-	199
13	S056.2.5	49	0.755102	色素	27.30521	-3.41213	0.385152773	0.40974029	1.897509728	0.000108765	FP002	82	RP002x	284	-	112
14	S056.2.5	49	0.755102	色素	35.00627	-6.63325	0.246662997	0.615971951	0.589325634	0.001762546	FP002	82	RP002x	284	-	113
15	S056.4.5	49	0.755102	色素	30.15123	-5.71757	0.247615544	0.626085997	0.817942093	0.002623364	FP004	81	RP004x	283	-	206
16	S056.1.5	49	0.755102	色素	29.37189	-5.90212	0.23119948	0.664757994	0.520001152	0.00138668	FP001	85	RP001x	92	-	171
17	S044.5	50	0.26	色素	22.00935	-6.43317	0.129602264	0.972425616	1.169952759	0.000426952	FP004	81	RP004	88	-	233
18	S044.6	50	0.62	色素	22.59062	-5.25477	0.202504339	0.774854997	1.384715516	0.001251832	FP004	81	RP004	88	-	220
19	S044.7	50	0.74	色素	36.15022	-7.34075	0.217180527	0.670949313	1.08604582	0.001918933	FP004	81	RP004	88	-	208
20	S044.8	55	0.454545	色素	25.44057	-6.89321	0.15148972	0.894360176	2.142305393	0.000819897	FP004	81	RP004	88	-	201
21	S057.6.4	62	0.306452	色素	21.36097	-3.875	0.292404957	0.600297353	1.12923505	0.001458583	FP003	83	RP008x	90	-	272

【図２３－２】

図２３（２／９）

	名称	BP	GC	レポーター	τ	F0_lg	ρ	r	K	m	FP名称	FP配列番号	RP名称	RP配列番号	プローブ配列番号	CO配列番号
22	S057.5.4	62	0.306452	色素	22.95594	-5.28325	0.208755846	0.764157403	0.874556803	0.001826124	FP003	83	RP008	285	-	273
23	S057.8.4	62	0.306452	色素	17.49557	-4.26076	0.207824697	0.808213367	1.48388026	0.00068011	FP057.1.0	84	RP003x	91	-	282
24	S036.5	74	0.527027	色素	21.43727	-5.32385	0.187200967	0.823899091	2.174642424	0.001238399	FP001	85	RP001	286	-	181
25	S036.6	74	0.527027	色素	22.56923	-5.75439	0.175604818	0.845598774	2.265008968	0.000714334	FP001	85	RP001	286	-	178
26	S056.2.1	80	0.3375	色素	20.86904	-5.10064	0.194657577	0.811020717	0.890709561	0.001788856	FP002	82	RP002x	284	-	137
27	S056.4.1	80	0.3375	色素	20.83949	-5.293	0.183010427	0.841874742	1.240115326	0.001893667	FP004	81	RP004x	283	-	231
28	S056.1.1	80	0.3375	色素	18.76496	-5.1847	0.156213969	0.918520785	0.944309514	0.000920471	FP001	85	RP001x	92	-	183
29	S056.1.9	80	0.425	色素	19.91795	-5.19247	0.174929881	0.86553919	0.928979825	0.001139497	FP001	85	RP001x	92	-	184
30	S056.2.7	84	0.797619	色素	23.6902	-4.88981	0.240841537	0.681055284	2.673741214	0.006332732	FP002	82	RP002x	284	-	116
31	S056.2.7	84	0.797619	色素	25.30386	-6.12206	0.184821611	0.800336352	1.072077768	0.004693838	FP002	82	RP002x	284	-	117
32	S056.1.7	84	0.797619	色素	24.56026	-6.07276	0.180415875	0.817270639	1.162031717	0.003555065	FP001	85	RP001x	92	-	172
33	S056.4.7	84	0.797619	色素	24.21622	-6.02593	0.177993774	0.824488944	1.342147049	0.00265798	FP004	81	RP004x	283	-	210
34	S057.6.0	85	0.294118	色素	22.60534	-4.10096	0.288044688	0.598019927	1.114918836	0.001426017	FP003	83	RP008x	90	-	270
35	S057.5.0	85	0.294118	色素	24.70262	-5.75281	0.199119896	0.772296882	1.030933818	0.002513671	FP003	83	RP008	285	-	271
36	S057.8.0	85	0.294118	色素	18.23201	-4.44436	0.204055826	0.809919032	1.718028195	0.000164523	FP057.1.0	84	RP003x	91	-	281
37	S044.9	88	0.147727	色素	25.22	-5.74767	0.204318251	0.758259949	2.198177864	0.006168834	FP004	81	RP004	88	-	263
38	S044.10	88	0.25	色素	23.8542	-6.9906	0.127439076	0.972200018	2.248585595	0.002201928	FP004	81	RP004	88	-	260
39	S044.11	88	0.352273	色素	25.01305	-7.01978	0.140757677	0.92803974	2.470400248	0.000702507	FP004	81	RP004	88	-	187
40	S036.2	88	0.431818	色素	23.74954	-5.75443	0.18983436	0.802940098	2.229267176	0.00044569	FP002	82	RP002	89	-	143
41	S044.12	88	0.431818	色素	24.67649	-6.22622	0.173048909	0.839189749	2.360427081	0.002745813	FP004	81	RP004	88	-	245
42	S044.13	88	0.431818	色素	25.49836	-6.86896	0.159112219	0.881726622	2.289582183	0.00103616	FP004	81	RP004	88	-	194

【図２３－３】

図２３（３／９）

	名称	BP	GC	レポーター	τ	F0_lg	ρ	r	K	m	FP名称	FP配列番号	RP名称	RP配列番号	プローブ配列番号	CO配列番号
43	S036.7	88	0.431818	色素	21.97007	-6.03219	0.152182728	0.912691246	2.250461875	0.000240107	FP001	85	RP001	286	-	163
44	S044.14	88	0.545455	色素	25.62734	-5.85128	0.202072092	0.759388879	2.705744133	0.003209506	FP004	81	RP004	88	-	251
45	S044.15	88	0.647727	色素	24.62975	-5.60579	0.219687109	0.737331517	2.792340651	0.000366468	FP004	81	RP004	88	-	253
46	S044.16	88	0.75	色素	24.39622	-5.78804	0.206859201	0.767703296	3.164287663	0.001051159	FP004	81	RP004	88	-	228
47	S044.17	88	0.795455	色素	29.12396	-7.58454	0.163657626	0.849334684	3.039924378	0.000583586	FP004	81	RP004	88	-	212
48	S044.18	88	0.852273	色素	35.43473	-9.34891	0.150533979	0.861390483	2.072098945	0.001509776	FP004	81	RP004	88	-	224
49	S036.4	108	0.25	色素	26.93994	-6.77725	0.168150187	0.839929004	2.318966986	0.00182191	FP002	82	RP002	89	-	134
50	S036.1	108	0.481481	色素	23.8664	-5.17577	0.224701631	0.719253584	2.560986659	0.001311985	FP002	82	RP002	89	-	130
51	S036.0	108	0.481481	色素	22.184	-4.83636	0.229909485	0.721059187	2.536634412	0.00014066	FP002	82	RP002	89	-	129
52	S056.2.4	152	0.203947	色素	20.16035	-3.738	0.295392498	0.610957513	3.176629065	0.002160525	FP002	82	RP002x	284	-	145
53	S056.2.4	152	0.203947	色素	22.24042	-4.52407	0.251510891	0.671837801	1.17650233	0.003119346	FP002	82	RP002x	284	-	146
54	S056.4.4	152	0.203947	色素	21.90508	-4.8608	0.223733998	0.73670491	1.561801378	0.004144096	FP004	81	RP004x	283	-	247
55	S056.1.4	152	0.203947	色素	29.82336	-7.06505	0.179963484	0.786470883	1.239545963	0.002684943	FP001	85	RP001x	92	-	185
56	S056.2.6	152	0.592105	色素	21.90466	-3.10191	0.384676959	0.4610999	3.235507218	0.002854266	FP002	82	RP002x	284	-	124
57	S056.4.6	152	0.592105	色素	23.3767	-3.80598	0.324718444	0.534175007	1.941211973	0.005284191	FP004	81	RP004x	283	-	222
58	S056.2.6	152	0.592105	色素	22.17672	-3.80692	0.310703538	0.564803551	1.570064464	0.003277497	FP002	82	RP002x	284	-	125
59	S056.1.6	152	0.592105	色素	21.84216	-3.83274	0.305942105	0.577120754	1.594118383	0.001423933	FP001	85	RP001x	92	-	176
60	S044.19	160	0.13125	色素	22.592	-5.90165	0.166760151	0.869381477	1.407293615	0.003170533	FP004	81	RP004	88	-	236
61	S044.20	160	0.21875	色素	23.57248	-6.01541	0.17176229	0.848361131	1.898367777	0.002490637	FP004	81	RP004	88	-	265
62	S044.21	160	0.43125	色素	22.67854	-4.94512	0.236282582	0.709571458	3.119322832	0.000792741	FP004	81	RP004	88	-	217
63	S044.22	160	0.5875	色素	23.01352	-4.13034	0.288756188	0.594390253	2.443828524	0.003057071	FP004	81	RP004	88	-	243
64	S044.23	160	0.78125	色素	36.96463	-10.3064	0.129661638	0.920068678	1.150401227	0.000396712	FP004	81	RP004	88	-	255

【図２３－４】

図２３（４／９）

	名称	BP	GC	レポーター	τ	F0_lg	ρ	r	K	m	FP名称	FP配列番号	RP名称	RP配列番号	プローブ配列番号	CO配列番号
65	S044.24	200	0.425	色素	23.21749	-4.9249	0.24640739	0.687218919	3.427291284	0.003028616	FP004	81	RP004	88	-	189
66	S056.2.2	232	0.413793	色素	19.34331	-3.0764	0.356469512	0.523503692	4.060533663	0.000143841	FP002	82	RP002x	284	-	120
67	S056.4.2	232	0.413793	色素	22.10906	-4.25517	0.274790691	0.63419512	2.092694079	0.004796028	FP004	81	RP004x	283	-	214
68	S056.2.2	232	0.413793	色素	20.11051	-3.94627	0.273706328	0.647647543	1.784416097	0.003729637	FP002	82	RP002x	284	-	121
69	S056.1.2	232	0.413793	色素	18.66527	-3.88687	0.257449214	0.689529129	1.894137176	0.000189413	FP001	85	RP001x	92	-	173
70	S044.25	240	0.420833	色素	24.1875	-5.1029	0.249290487	0.679081624	3.759592547	0.001506206	FP004	81	RP004	88	-	191
71	S056.2.3	272	0.672794	色素	21.40841	-2.62491	0.426887961	0.403514758	4.583873912	6.24E-05	FP002	82	RP002x	284	-	149
72	S056.1.3	272	0.672794	色素	26.69774	-3.76202	0.350045353	0.464459716	2.44304943	0.003966982	FP001	85	RP001x	92	-	186
73	S056.4.3	272	0.672794	色素	24.94727	-3.69985	0.349095937	0.486360398	2.787871987	0.006012187	FP004	81	RP004x	283	-	249
74	S056.2.3	272	0.672794	色素	24.52717	-3.87393	0.329340594	0.517652855	2.375256188	0.006121578	FP002	82	RP002x	284	-	150
75	S044.27	280	0.682143	色素	29.07709	-4.50359	0.316848782	0.509671148	3.20246311	0.005098751	FP004	81	RP004	88	-	226
76	S044.28	500	0.418	色素	26.18572	-2.71316	0.49584226	0.352729916	2.099881709	0.000837512	FP004	81	RP004	88	-	240
77	S044.29	500	0.57	色素	24.49291	-3.58733	0.351766044	0.482520733	4.59781937	4.74E-05	FP004	81	RP004	88	-	203
78	S036.3	30	0.433333	プローブ	26.48099	-6.69646	0.168138223	0.840482061	0.568292491	0.007916798	FP002	82	RP002	89	94	133
79	S044.2	30	0.466667	プローブ	25.5079	-7.21511	0.134472525	0.940679357	0.805211519	0.011628964	FP004	81	RP004	88	-	196
80	S036.8	30	0.533333	プローブ	26.97503	-7.27253	0.14696	0.896754314	1.117398466	0.012654387	FP001	85	RP001	286	95	174
81	S036.8	30	0.533333	プローブ	25.68873	-7.38753	0.129323385	0.956515894	1.021689767	0.017109545	FP001	85	RP001	286	95	175
82	S056.2.8	36	0.444444	プローブ	21.17774	-4.94842	0.207458871	0.775628609	0.668860258	0.003156745	FP002	82	RP002x	284	94	107
83	S056.2.8	36	0.444444	プローブ	23.0588	-5.50564	0.194998269	0.793641273	0.458133411	0.007481535	FP002	82	RP002x	284	94	108
84	S056.4.8	36	0.444444	プローブ	24.79408	-6.13635	0.178948626	0.822296183	0.580755328	0.013714002	FP004	81	RP004x	283	94	198
85	S044.4	40	0.45	プローブ	24.12529	-6.6807	0.144232575	0.920407573	0.797028002	0.006467551	FP004	81	RP004	88	94	200
86	S057.2.0	49	0.693878	プローブ	23.39717	-4.65159	0.254713818	0.660056936	0.591198417	0.032559746	FP001	85	RP001	286	95	158

【図２３－５】

図２３（５／９）

	名称	BP	GC	レポーター	τ	F0_lg	ρ	r	K	m	FP名称	FP配列番号	RP名称	RP配列番号	プローブ配列番号	CO配列番号
87	S056.2.5	49	0.755102	プローブ	28.66048	-3.44254	0.392216173	0.394551857	0.421544123	0.016380531	FP002	82	RP002x	284	94	114
88	S056.4.5	49	0.755102	プローブ	30.56403	-4.60875	0.327337967	0.486807345	0.329988613	0.015298884	FP004	81	RP004x	283	94	207
89	S056.2.5	49	0.755102	プローブ	27.7589	-4.12237	0.332798823	0.487304154	0.303859889	0.016387458	FP002	82	RP002x	284	94	115
90	S044.5	50	0.26	プローブ	24.20062	-6.99505	0.129734871	0.959880771	0.519288351	0.006916405	FP004	81	RP004	88	94	234
91	S044.6	50	0.62	プローブ	25.49996	-5.68227	0.208926676	0.740206722	0.516235409	0.006113741	FP004	81	RP004	88	94	221
92	S044.7	50	0.74	プローブ	32.26196	-4.49848	0.332574697	0.461121907	0.444022174	0.010801041	FP004	81	RP004	88	94	209
93	S044.8	55	0.454545	プローブ	25.32923	-6.71744	0.156658014	0.87927371	0.782697792	0.005797605	FP004	81	RP004	88	94	202
94	S037.08.01	57	0.280702	プローブ	18.48296	-5.00458	0.164542224	0.899980327	0.636912889	0.022145551	FP003	83	RP008	285	-	274
95	S036.5	74	0.527027	プローブ	26.26203	-6.34788	0.182208789	0.801963424	0.746524387	0.005563503	FP001	85	RP001	286	97	179
96	S036.6	74	0.527027	プローブ	24.18969	-5.94335	0.181599019	0.817293793	1.065550804	0.010041843	FP001	85	RP001	286	95	177
97	S036.5	74	0.527027	プローブ	23.30964	-5.88179	0.175474436	0.838409789	0.836697518	0.006578007	FP001	85	RP001	286	97	180
98	S037.02.02	77	0.571429	プローブ	22.90283	-3.89164	0.308142198	0.562211782	0.776925654	0.007073816	FP001	85	RP005	287	95	170
99	S056.2.1	80	0.3375	プローブ	22.74352	-5.08721	0.219833027	0.738019367	0.43590881	0.00830186	FP002	82	RP002x	284	94	138
100	S056.2.1	80	0.3375	プローブ	21.08062	-5.22001	0.189939118	0.81974236	0.629962927	0.002783262	FP002	82	RP002x	284	94	139
101	S056.4.1	80	0.3375	プローブ	22.50478	-5.60995	0.183353524	0.827348014	0.532959339	0.004992415	FP004	81	RP004x	283	94	232
102	S056.2.9	80	0.425	プローブ	23.50752	-4.98929	0.231813246	0.704113193	0.604437311	0.004123805	FP002	82	RP002x	284	94	140
103	S056.2.9	80	0.425	プローブ	22.57127	-5.04981	0.217532374	0.743290446	0.396418856	0.008839617	FP002	82	RP002x	284	94	141
104	S056.4.9	80	0.425	プローブ	23.27576	-5.34652	0.207578193	0.763245507	0.508943627	0.00570027	FP004	81	RP004x	283	94	235
105	S037.02.01	81	0.54321	プローブ	18.5253	-3.44871	0.292546984	0.619296653	0.812093458	0.006453263	FP001	85	RP005	287	95	156
106	S056.2.7	84	0.797619	プローブ	29.34833	-5.50264	0.25150352	0.621515905	0.543362253	0.007725275	FP002	82	RP002x	284	94	118
107	S056.2.7	84	0.797619	プローブ	26.86971	-5.88689	0.210123646	0.727521509	0.37587344	0.014974122	FP002	82	RP002x	284	94	119
108	S056.4.7	84	0.797619	プローブ	25.63802	-6.00963	0.192272766	0.778610953	0.423802364	0.01844697	FP004	81	RP004x	283	94	211

【図２３－６】

図２３（６／９）

	名称	BP	GC	プローター	r	FD lg	p	t	K	m	FP名称	FP配列番号	RP名称	RP配列番号	プローブ配列番号	COR配列番号
109	S057.3.4	85	0.52941	プローブ	20.6235	-3.7574	0.29401131	0.60480067	0.87377059	0.00806249	FP001	85	RP005	287	95	154
110	S057.4.0	87	0.55172	プローブ	26.4452	-4.6219	0.28440527	0.58061060	0.54432658	0.00897766	FP005	86	RP005	287	94	277
111	S044.9	88	0.14772	プローブ	26.7387	-5.7885	0.21901991	0.71466969	0.90707583	0.00790756	FP004	81	RP004	88	94	264
112	S056.2.12	88	0.25	プローブ	21.6938	-4.5506	0.24390195	0.69586477	0.61493110	0.01140530	FP002	82	RP002x	284	95	153
113	S056.4.12	88	0.25	プローブ	22.9628	-5.5197	0.19352984	0.79793240	0.79003301	0.00692842	FP004	81	RP004x	283	95	258
114	S057.9.1	88	0.25	プローブ	22.3138	-5.7541	0.17123039	0.85894040	0.63262020	0.01424762	FP004	81	RP004	88	95	259
115	S044.10	88	0.25	プローブ	24.2005	-7.1873	0.12353914	0.98425995	0.77558102	0.00609205	FP004	81	RP004	88	94	261
116	S044.11	88	0.35227	プローブ	26.0293	-7.2198	0.14171975	0.91834573	0.81286354	0.00605750	FP004	81	RP004	88	94	188
117	S056.2.11	88	0.43181	プローブ	20.1217	-4.0797	0.26098832	0.67110687	0.56432401	0.01119927	FP002	82	RP002x	284	95	109
118	S056.4.11	88	0.43181	プローブ	24.1746	-5.1721	0.22730761	0.71031421	0.73008709	0.00645387	FP004	81	RP004x	283	95	205
119	S036.2	88	0.43181	プローブ	24.4626	-5.5266	0.20860270	0.74997220	0.52019689	0.00796476	FP002	82	RP002	89	94	144
120	S044.12	88	0.43181	プローブ	26.1360	-6.3856	0.17973348	0.81132237	0.67689006	0.00626710	FP004	81	RP004	88	94	246
121	S036.7	88	0.43181	プローブ	25.5082	-6.4030	0.17265745	0.83360036	1.12330908	0.00504429	FP001	85	RP001	286	95	161
122	S044.13	88	0.43181	プローブ	24.5601	-6.1923	0.17355965	0.83765841	1.12148068	0.01398240	FP004	81	RP004	88	95	193
123	S036.7	88	0.43181	プローブ	23.5332	-6.1512	0.16373906	0.86937845	1.05031638	0.00671101	FP001	85	RP001	286	95	162
124	S044.14	88	0.54545	プローブ	26.7857	-5.8657	0.21336879	0.72579852	0.74179961	0.00899152	FP004	81	RP004	88	94	252
125	S044.15	88	0.64772	プローブ	25.9981	-5.2004	0.25236079	0.65357993	0.72928696	0.01031007	FP004	81	RP004	88	94	254
126	S044.16	88	0.75	プローブ	26.3346	-5.2834	0.24380122	0.66324800	0.73530527	0.02316187	FP004	81	RP004	88	94	229
127	S044.17	88	0.79545	プローブ	30.7346	-6.6208	0.21441391	0.70679439	0.81573598	0.01620667	FP004	81	RP004	88	94	213
128	S044.18	88	0.85227	プローブ	36.6025	-7.9507	0.20779870	0.70646909	0.56400798	0.03496132	FP004	81	RP004	88	94	225
129	S057.3.0	90	0.45555	プローブ	20.7771	-3.6080	0.30755069	0.57820590	0.85304967	0.00849495	FP001	85	RP005	287	95	167
130	S057.0.0	92	0.45652	プローブ	19.9525	-4.0772	0.25759612	0.67762800	0.62337200	0.01143203	FP002	82	RP006	93	95	111

【図２３－７】

図２３（７／９）

	名称	BP	GC	プローター	r	FD lg	p	t	K	m	FP名称	FP配列番号	RP名称	RP配列番号	プローブ配列番号	COR配列番号
131	S037.02.0 4	92	0.55434	プローブ	19.0671 4	-3.3269 5	0.31136807	0.57904493 3	0.76728328 9	0.00638318 5	FP001	85	RP005	287	95	155
132	S057.1.0	93	0.49462 4	プローブ	22.1101 2	-4.2391 4	0.26891004 8	0.63638735 4	0.49109855 8	0.00792929 7	FP006	87	RP006	93	94	99
133	S037.02.0 3	95	0.48421 4	プローブ	19.9463 7	-4.3362 4	0.23556277 3	0.72089645 8	0.84273542 3	0.00709212 4	FP001	85	RP005	287	95	160
134	S037.06.0 1	98	0.47959 2	プローブ	19.6875 9	-4.1543 8	0.24740321 6	0.69919818 1	0.43996383 1	0.01159063 5	FP004	81	RP004	88	94	219
135	S057.3.1	98	0.57142 9	プローブ	22.9202 5	-3.6102 6	0.33337041 7	0.52265515 7	0.86044989 4	0.00871628 7	FP001	85	RP005	287	95	166
136	S037.04.0 1	100	0.48	プローブ	20.0492 6	-3.0761 1	0.35340234 4	0.50787113 4	1.26819822 4	0.01170888 8	FP002	82	RP006	93	94	136
137	S057.0.1	100	0.48	プローブ	21.7621 6	-4.2246 1	0.26850006 1	0.64422890 3	0.62595461 6	0.01252107 7	FP002	82	RP006	93	95	110
138	S037.06.0 2	101	0.43564 4	プローブ	19.5949 5	-4.4380 9	0.22344783 4	0.75087387 6	0.48483914 8	0.01040776 3	FP004	81	RP004	88	94	216
139	S057.0.2	103	0.44663 2	プローブ	21.5831 7	-4.2864 8	0.26030797 6	0.66629126 7	0.63473396 7	0.01234678 7	FP002	82	RP006	93	95	104
140	S037.05.0 1	103	0.48543 7	プローブ	19.5032 9	-3.9248 7	0.26284147 3	0.66759026 8	0.68161457 6	0.00776310 9	FP006	87	RP006	93	95	101
141	S037.04.0 4	104	0.43269 2	プローブ	21.1265 4	-3.3125 1	0.33449474 1	0.52099118 3	1.28180058 6	0.01233762 1	FP002	82	RP006	93	94	103
142	S037.06.0 2	106	0.40565	プローブ	18.0705 8	-4.112	0.22855606 4	0.75501117 5	0.48828412 9	0.01009371 4	FP004	81	RP004	88	94	257
143	S037.05.0 2	106	0.44339 6	プローブ	16.4862 5	-3.5365 4	0.25345794 4	0.71218034 9	0.66425225 3	0.00838489 6	FP006	87	RP006	93	95	100
144	S036.4	108	0.25	プローブ	30.2631 8	-7.2793 7	0.17466559 7	0.79919457 9	0.57839388 9	0.00716433 6	FP002	82	RP002	89	94	135
145	S036.0	108	0.48148 1	プローブ	22.0713 5	-4.5877 7	0.24151638 2	0.69003636 3	0.88629088 9	0.01407211 3	FP002	82	RP002	89	96	128
146	S036.1	108	0.48148 1	プローブ	26.5228 2	-5.6239 2	0.22275520 6	0.70350093 5	0.50655227 5	0.00819674 5	FP002	82	RP002	89	94	131
147	S057.1.2	111	0.45945 9	プローブ	21.7856 3	-4.2613 5	0.26402042 4	0.64992736 9	0.50493128 6	0.00753609 6	FP006	87	RP006	93	94	98
148	S057.1.1	113	0.48672 6	プローブ	21.3317 6	-3.7539 1	0.30159663 1	0.583598	0.47957338 1	0.00860030 5	FP006	87	RP006	93	94	102
149	S057.3.2	115	0.52173 9	プローブ	22.1601 6	-3.4656 3	0.33576295 5	0.51917381 7	0.82114165 4	0.00993011 1	FP001	85	RP005	287	95	169
150	S037.03.0 2	117	0.67521 4	プローブ	25.1265 1	-3.2628 1	0.38098769 3	0.42863316 8	0.46536968 5	0.01262932 5	FP005	86	RP005	287	94	276
151	S056.2.4	152	0.20394 7	プローブ	25.6221	-4.5301 8	0.28101052 7	0.58837519	0.42434627 1	0.01091847 1	FP002	82	RP002x	284	94	147
152	S056.4.4	152	0.20394 7	プローブ	24.2829 7	-5.3649 9	0.21639157 3	0.73442242 8	0.58259733 2	0.00559329 2	FP004	81	RP004x	283	94	248

【図２３－８】

図２３（８／９）

	名称	BP	GC	プローター	r	FD lg	p	t	K	m	FP名称	FP配列番号	RP名称	RP配列番号	プローブ配列番号	COR配列番号
153	S056.2.4	152	0.20394 7	プローブ	22.8468 8	-5.4551 2	0.19502569 6	0.79360017 9	0.64860601 2	0.00359828 7	FP002	82	RP002x	284	94	148
154	S056.2.6	152	0.59210 5	プローブ	26.6266	-4.6815 5	0.32356679 1	0.50831504 1	0.59376641 1	0.00873415 1	FP002	82	RP002x	284	94	126
155	S056.4.6	152	0.59210 5	プローブ	26.5740 1	-4.2931 5	0.3075113 9	0.53577850 9	0.48860617 5	0.01013336 7	FP004	81	RP004x	283	94	223
156	S056.2.6	152	0.59210 5	プローブ	24.4789 4	-4.2585 9	0.29125387 1	0.57716976 7	0.38672703 4	0.01136054 3	FP002	82	RP002x	284	94	127
157	S044.19	160	0.13125	プローブ	29.1539	-6.9540 6	0.18235224 3	0.79108675 9	0.40088319 4	0.01325931 2	FP004	81	RP004	88	94	237
158	S044.20	160	0.21875	プローブ	29.0736 6	-6.8634 3	0.18341302 8	0.78488030 4	0.54391533 6	0.00515509 7	FP004	81	RP004	88	94	266
159	S044.21	160	0.43125	プローブ	25.3945 1	-5.4802 2	0.22907349 2	0.70454403 4	0.71475876 6	0.00618019 3	FP004	81	RP004	88	94	218
160	S044.22	160	0.5875	プローブ	28.8359 6	-4.6542 8	0.30121701 8	0.53262382 7	0.49397129 2	0.00685815 7	FP004	81	RP004	88	94	244
161	S044.23	160	0.78125	プローブ	35.0131 2	-7.2852 8	0.23565148 6	0.66428809 3	0.24937812 7	0.01966329 7	FP004	81	RP004	88	94	256
162	S037.01.0 1	161	0.57764 5	プローブ	22.9699 9	-4.4209 9	0.26442067 1	0.63673782 1	0.57836805 2	0.02471867 2	P001	85	RP001	286	95	182
163	S057.4.1	167	0.55089 8	プローブ	27.1195 5	-3.9563 9	0.34039720 8	0.48165553 8	0.55287318 8	0.01001590 1	FP005	86	RP005	287	94	278
164	S037.03.0 1	192	0.44270 8	プローブ	21.0768 3	-3.8814 2	0.28660537 3	0.60799033 3	0.56122314 7	0.00663030 3	P005	86	RP005	287	94	279
165	S044.24	200	0.425	プローブ	24.9636 9	-4.9022 4	0.25397054 4	0.64979471 7	0.69427027 2	0.00628142 7	FP004	81	RP004	88	94	190
166	S057.4.2	221	0.50226 2	プローブ	26.0055 7	-3.8927 7	0.33417274 7	0.49633219 9	0.53644923 9	0.01064008 7	P005	86	RP005	287	94	275
167	S056.2.2	232	0.41379 3	プローブ	23.8725 9	-4.2503 7	0.28639986 1	0.59003522 6	0.35420148 1	0.01149569 7	FP002	82	RP002x	284	94	122
168	S056.4.2	232	0.41379 3	プローブ	26.2070 9	-4.7538 5	0.27556608 1	0.59945908 6	0.45424713 6	0.00786191 7	FP004	81	RP004x	283	94	215
169	S056.2.2	232	0.41379 3	プローブ	24.3095 2	-4.4392 2	0.27620116 5	0.60795280 3	0.56088516 3	0.00615904 4	FP002	82	RP002x	284	94	123
170	S044.25	240	0.42083 3	プローブ	26.5779 5	-4.8271 6	0.27172789 6	0.60244272 9	0.65403614 7	0.00619029 7	FP004	81	RP004	88	94	192
171	S056.2.3	272	0.67279 4	プローブ	25.6505 6	-3.3143 3	0.37959597 3	0.42703394 3	0.50241611 1	0.01127652 2	FP002	82	RP002x	284	94	151
172	S056.4.3	272	0.67279 4	プローブ	28.7167 4	-4.0898 4	0.34168226 3	0.46905184 3	0.42828650 9	0.01347609 4	FP004	81	RP004x	283	94	250
173	S056.2.3	272	0.67279 4	プローブ	24.3361 1	-3.5843 5	0.34471251 5	0.48683846 3	0.35173427 6	0.01353415 7	FP002	82	RP002x	284	94	152
174	S044.26	280	0.325	プローブ	32.7360 2	-6.2065 7	0.24547408 7	0.62338423 1	0.48041455 3	0.00481640 3	FP004	81	RP004	88	94	230

【図２３－９】

図２３（９／９）

	名称	BP	GC	プローター	r	FD lg	p	t	K	m	FP名称	FP配列番号	RP名称	RP配列番号	プローブ配列番号	COR配列番号
175	S044.27	280	0.68214 3	プローブ	33.5668 2	-4.2539 9	0.35993197 4	0.41568908 8	0.42202557 4	0.01586244 7	FP004	81	RP004	88	94	227
176	S037.01.0 3	326	0.49693 3	プローブ	22.1023 7	-3.8154 4	0.30091365 1	0.57307962 7	0.52167236 8	0.02872255 5	FP001	85	RP001	286	95	165
177	S057.2.2	331	0.51661 6	プローブ	21.7726 1	-3.8624 4	0.29581785 1	0.58783072 9	0.50940842 9	0.03880495 2	FP001	85	RP001	286	95	157
178	S057.2.4	380	0.48684 2	プローブ	24.5664 3	-4.3752 1	0.28286309 9	0.58998963 9	0.45277815 8	0.06331865 8	FP001	85	RP001	286	95	164
179	S057.2.1	461	0.50542 1	プローブ	24.8182 7	-3.8845 6	0.32450576 3	0.51817688 3	0.51080961 4	0.03430290 4	FP001	85	RP001	286	95	168
180	S044.28	500	0.418	プローブ	39.0472 4	-5.2713 2	0.33421251 9	0.4368245 4	0.40445753 6	0.02042622 7	FP004	81	RP004	88	94	241
181	S056.2.10	500	0.418	プローブ	27.3176 2	-3.7103 5	0.35902886 5	0.44859957 3	0.47466250 6	0.01721191 5	FP002	82	RP002x	284	95	142
182	S056.4.10	500	0.418	プローブ	30.6063 5	-4.2321 8	0.34866582 6	0.45159884 4	0.56194897 4	0.01847163 5	FP004	81	RP004x	283	95	238
183	S057.9.0	500	0.418	プローブ	29.2148 5	-4.2863 3	0.32975639 6	0.48235258 8	0.50822676 6	0.01738748 9	FP004	81	RP004	88	95	239
184	S044.29	500	0.57	プローブ	32.3858	-4.0431 9	0.36435097 8	0.41211520 9	0.33653668 6	0.02246003 9	FP004	81	RP004	88	94	204

【配列表】
0007618028000001.app

フロントページの続き

，インペリアル カレッジ，レベル １ ファカルティー ビルディング
(72)発明者 スティーブンス モリー
イギリス エスダブリュー７ ２エーゼット，ロンドン，エキシビション ロード，インペリアル カレッジ，レベル １ ファカルティー ビルディング

審査官 太田 雄三

(56)参考文献 特表２０１５－５３５４３１（ＪＰ，Ａ）
米国特許出願公開第２０１４／０１９３８１９（ＵＳ，Ａ１）
イメージアナライザーによるＤＮＡ検査，医学のあゆみ，1997年11月22日，Vol. 183, No. 8，p. 525-529

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １５／００
Ｃ１２Ｑ １／６８
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）