

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-511989
(P2013-511989A)

(43) 公表日 平成25年4月11日(2013.4.11)

(51) Int.Cl.

C 12 N 15/09 (2006.01)
C 12 Q 1/68 (2006.01)

F 1

C 12 N 15/00 Z NAA
C 12 Q 1/68 A

テーマコード（参考）

4 B024
4 B063

(21) 出願番号	特願2012-541209 (P2012-541209)	(71) 出願人	502221282 ライフ テクノロジーズ コーポレーション アメリカ合衆国 カリフォルニア 920 08, カールスバッド, パン アレン ウェイ 5791
(86) (22) 出願日	平成22年11月24日 (2010.11.24)		
(85) 翻訳文提出日	平成24年7月9日 (2012.7.9)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2010/058111		
(87) 国際公開番号	W02011/066467		
(87) 国際公開日	平成23年6月3日 (2011.6.3)		
(31) 優先権主張番号	61/264,455	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成21年11月25日 (2009.11.25)	(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(33) 優先権主張国	米国(US)	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹

(54) 【発明の名称】アレリックラダー遺伝子座

(57) 【要約】

ヒトのD10S1248およびD12S391遺伝子座における、まれな短縦列反復（STR）対立遺伝子が開示される。各遺伝子座についての代表的なアレリックラダー、これらの対立遺伝子を用いる方法およびアッセイ、および広い範囲の個人の正確な遺伝子型解析および同定のための、これらの対立遺伝子を含むアレリックラダーを含むキットが提供される。一実施形態において、1つ以上の多型短縦列反復遺伝子座の対立遺伝子変異体である、単離された複数の核酸分子を組み合わせて含むアレリックラダーが提供され、ここで、該多型短縦列反復遺伝子座は、対立遺伝子-7を含むD10S1248および対立遺伝子-13を含むD12S391のうちの少なくとも1つである。

Figure 1.

125391 allele 14

D12S201 allele 27

5

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

1つ以上の多型短縦列反復遺伝子座の対立遺伝子変異体である、単離された複数の核酸分子を組み合わせて含むアレリックラダーであって、該多型短縦列反復遺伝子座は、対立遺伝子 - 7 を含む D 1 0 S 1 2 4 8 および対立遺伝子 - 1 3 を含む D 1 2 S 3 9 1 のうちの少なくとも 1 つである、アレリックラダー。

【請求項 2】

前記短縦列反復遺伝子座が D 1 0 S 1 2 4 8 である、請求項 1 に記載のアレリックラダー。

【請求項 3】

前記短縦列反復遺伝子座が D 1 2 S 3 9 1 である、請求項 1 に記載のアレリックラダー。

【請求項 4】

D 1 0 S 1 2 4 8 の前記アレリックラダーが、少なくとも 1 2 個の対立遺伝子を含む、請求項 2 に記載のアレリックラダー。

【請求項 5】

D 1 2 S 3 9 1 の前記アレリックラダーが、少なくとも 1 4 個の対立遺伝子を含む、請求項 3 に記載のアレリックラダー。

【請求項 6】

以下に示される最小および最大の対立遺伝子の指定とともに、下記の遺伝子座：

【表 4】

遺伝子座	低MW対立遺伝子	高MW対立遺伝子
D10S1248	7	19
D12S391	13	27

のうちの 1 つ以上についてのアレリックラダーを含む、アレリックラダー混合物。

【請求項 7】

前記混合物が、遺伝子座 D 1 0 S 1 2 4 8 および遺伝子座 D 1 2 S 3 9 1 についてのアレリックラダーを含む、請求項 6 に記載のアレリックラダー混合物。

【請求項 8】

D 1 0 S 1 2 4 8 の前記ラダーは、7 8 塩基対以上および / または 1 2 2 塩基対以下の範囲の対立遺伝子を含み、かつ D 1 2 S 3 9 1 の前記ラダーは、2 0 3 塩基対以上および / または 2 5 9 塩基対以下の範囲の対立遺伝子を含む、請求項 6 に記載のアレリックラダー混合物。

【請求項 9】

移動度修飾因子をさらに含む、請求項 8 に記載のアレリックラダー混合物。

【請求項 10】

前記移動度修飾因子がヘキサエチレンオキシド (H E O) である、請求項 9 に記載のアレリックラダー混合物。

【請求項 11】

短縦列反復配列の対立遺伝子を検出および同定するための方法であって、該方法は：

(a) 遺伝子座特異的オリゴヌクレオチドプライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) によって標的核酸サンプルから少なくとも 1 つの短縦列反復配列を増幅する工程であって、少なくとも 1 つの該短縦列反復配列は、短縦列反復遺伝子座内に位置する、工程、および

(b) 増幅された少なくとも 1 つの該短縦列反復配列と、該短縦列反復遺伝子座に対応する、請求項 1 に記載のアレリックラダーとを比較する工程、
を包含する、方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 2】

前記アレリックラダーが P C R によって増幅される、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

工程 (a) において、前記遺伝子座特異的オリゴヌクレオチドプライマーが、ポリメラーゼ連鎖反応によって前記アレリックラダーおよび前記標的核酸サンプルの両方を増幅する、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

増幅された前記短縦列反復配列および増幅された前記アレリックラダーを電気泳動し、そして前記サンプルのバンド形成パターンと該アレリックラダーのバンド形成パターンとを比較することによって、増幅された少なくとも 1 つの該短縦列反復配列と、対応する増幅された該アレリックラダーとを比較する、請求項 1 2 に記載の方法。
10

【請求項 1 5】

前記標的核酸サンプルが、毛髪、糞便、血液、組織、尿、唾液、頬細胞、膣細胞、皮膚、骨、歯、頬側サンプル、胎盤細胞を含む羊水、および胎児細胞を含む羊水および精液のうちの 1 つ以上に由来する、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記標的核酸サンプルが、犯罪現場から取得されたサンプル、犯罪現場に関連するサンプル、容疑者から採取されたサンプル、参照サンプルまたは検討中のヒトから採取したサンプルのうちの 1 つ以上である、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

核酸から異なる短縦列反復配列を検出するためのアッセイであって、該アッセイは：

a . 遺伝子座特異的プライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって該核酸内から少なくとも 2 つの異なる短縦列反復配列を同時増幅する (c o - a m p l i f y i n g) 工程；ならびに

b . 少なくとも 2 つの同時増幅された該短縦列反復配列と、対立遺伝子 - 7 を含む D 1 0 S 1 2 4 8 遺伝子座および対立遺伝子 - 1 3 を含む D 1 2 S 3 9 1 遺伝子座から選択される少なくとも 1 つのアレリックラダーとを比較する工程であって、少なくとも 2 つの異なる該短縦列反復配列の各々の対立遺伝子が検出される、工程、を包含する、アッセイ。

【請求項 1 8】

前記遺伝子座特異的プライマーが、P C R で使用される、請求項 1 7 に記載のアッセイ。

【請求項 1 9】

前記遺伝子座特異的プライマーのうちの少なくとも 1 つが、標識を含む、請求項 1 8 に記載のアッセイ。

【請求項 2 0】

前記遺伝子座特異的プライマーのうちの少なくとも 1 つが、移動度修飾因子を含む、請求項 1 9 に記載のアッセイ。

【請求項 2 1】

前記移動度修飾因子が H E O である、請求項 2 0 に記載のアッセイ。

【請求項 2 2】

サンプル中の S T R を分析する方法であって、該方法は：

該サンプルが、D 1 0 S 1 2 4 8 の対立遺伝子 - 7 を含むか否かを決定する工程を包含する、方法。

【請求項 2 3】

前記サンプルと、D 1 0 S 1 2 4 8 の対立遺伝子 - 7 についての標準とを比較する工程を包含する、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記サンプルを核酸増幅反応に供する、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 5】

10

20

30

40

50

前記サンプルを、D 1 0 S 1 2 4 8 に対する遺伝子座特異的プライマーを用いて増幅する、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記遺伝子座特異的プライマーのうちの少なくとも 1 つが、標識を含む、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記遺伝子座特異的プライマーのうちの少なくとも 1 つが、移動度修飾因子を含む、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記移動度修飾因子が H E O である、請求項 2 7 に記載の方法。

10

【請求項 2 9】

前記標準がアレリックラダーを含む、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記アレリックラダーを核酸増幅反応に供する、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記アレリックラダーを、D 1 0 S 1 2 4 8 に対する遺伝子座特異的プライマーを用いて増幅する、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記遺伝子座特異的プライマーのうちの少なくとも 1 つが、標識を含む、請求項 3 1 に記載の方法。

20

【請求項 3 3】

前記遺伝子座特異的プライマーのうちの少なくとも 1 つが、移動度修飾因子を含む、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記移動度修飾因子が H E O である、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記サンプルが、毛髪、糞便、血液、組織、尿、唾液、頬細胞、膣細胞、皮膚、骨、歯、頬側サンプル、胎盤細胞を含む羊水、および胎児細胞を含む羊水および精液のうちの 1 つ以上に由来する、請求項 2 2 に記載の方法。

30

【請求項 3 6】

前記サンプルが、犯罪現場から取得されるか、犯罪現場に関連するか、容疑者から採取されるか、参照サンプルであるか、または検討中のヒトから採取される、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

サンプル中の S T R を分析する方法であって、該方法は：

該サンプルが、D 1 2 S 3 9 1 の対立遺伝子 - 1 3 を含むか否かを決定する工程を包含する、方法。

【請求項 3 8】

前記サンプルと、D 1 2 S 3 9 1 の対立遺伝子 - 1 3 についての標準とを比較する工程を包含する、請求項 3 7 に記載の方法。

40

【請求項 3 9】

前記サンプルを核酸増幅反応に供する、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記サンプルを、D 1 2 S 3 9 1 に対する遺伝子座特異的プライマーを用いて増幅する、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記遺伝子座特異的プライマーのうちの少なくとも 1 つが、標識を含む、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記遺伝子座特異的プライマーのうちの少なくとも 1 つが、移動度修飾因子を含む、請

50

求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記移動度修飾因子が H E O である、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記標準がアレリックラダーを含む、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記アレリックラダーを核酸増幅反応に供する、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記アレリックラダーを、D 1 2 S 3 9 1 に対する遺伝子座特異的プライマーを用いて增幅する、請求項 4 5 に記載の方法。

10

【請求項 4 7】

前記遺伝子座特異的プライマーのうちの少なくとも 1 つが、標識を含む、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記遺伝子座特異的プライマーのうちの少なくとも 1 つが、移動度修飾因子を含む、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記移動度修飾因子が H E O である、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記サンプルが、毛髪、糞便、血液、組織、尿、唾液、頬細胞、膣細胞、皮膚、骨、歯、頬側サンプル、胎盤細胞を含む羊水、および胎児細胞を含む羊水および精液のうちの 1 つ以上に由来する、請求項 3 7 に記載の方法。

20

【請求項 5 1】

前記サンプルが、犯罪現場から取得されるか、犯罪現場に関連するか、容疑者から採取されるか、参照サンプルであるか、または検討中のヒトから採取される、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

核酸サンプルに由来する短縦列反復配列を分析するためのキットであって、該キットは、請求項 1 に記載の 1 つ以上のアレリックラダーを含む、少なくとも 1 つの容器を備えるキット。

30

【請求項 5 3】

少なくとも 1 つの多型短縦列反復遺伝子座および前記核酸サンプルの対立遺伝子を増幅する、少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドプライマーペアをさらに備える、請求項 5 2 に記載のキット。

【請求項 5 4】

前記アレリックラダーが、短縦列反復遺伝子座 D 1 0 S 1 2 4 8 のものである、請求項 5 2 に記載のキット。

【請求項 5 5】

前記アレリックラダーが、短縦列反復遺伝子座 D 1 2 S 3 9 1 のものである、請求項 5 2 に記載のキット。

40

【請求項 5 6】

少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドプライマーが標識を含む、請求項 5 3 に記載のキット。

【請求項 5 7】

少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドプライマーが移動度修飾因子を含む、請求項 5 6 に記載のキット。

【請求項 5 8】

前記移動度修飾因子が H E O である、請求項 5 7 に記載のキット。

【請求項 5 9】

ポリメラーゼ、検出可能なレポーターおよびプロトコールのうちの 1 つ以上をさらに備

50

える、請求項 5 2 に記載のキット。

【請求項 6 0】

前記サンプルが、毛髪、糞便、血液、組織、尿、唾液、頬細胞、膣細胞、皮膚、骨、歯、頬側サンプル、胎盤細胞を含む羊水、および胎児細胞を含む羊水および精液のうちの 1 つ以上に由来する、請求項 5 2 に記載のキット。

【請求項 6 1】

前記サンプルが、犯罪現場から取得されるか、犯罪現場に関連するか、容疑者から採取されるか、参照サンプルであるか、または検討中のヒトから採取される、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 2】

核酸サンプルに由来する短縦列反復配列を分析するためのキットであって、該キットは、D 1 0 S 1 2 4 8 の対立遺伝子 - 7 を検出するためのアレリックラダー、および該 D 1 0 S 1 2 4 8 遺伝子座から増幅産物を生成するための増幅プライマーの 1 つのペアを備える、キット。

【請求項 6 3】

少なくとも 1 つの増幅プライマーが標識を含む、請求項 6 2 に記載のキット。

【請求項 6 4】

少なくとも 1 つの増幅プライマーが移動度修飾因子を含む、請求項 6 2 に記載のキット。

。

【請求項 6 5】

前記移動度修飾因子が H E O である、請求項 6 4 に記載のキット。

【請求項 6 6】

ポリメラーゼ、検出可能なレポーターおよびプロトコールのうちの 1 つ以上をさらに備える、請求項 6 2 に記載のキット。

【請求項 6 7】

前記サンプルが、毛髪、糞便、血液、組織、尿、唾液、頬細胞、膣細胞、皮膚、骨、歯、頬側サンプル、胎盤細胞を含む羊水、および胎児細胞を含む羊水および精液のうちの 1 つ以上に由来する、請求項 6 2 に記載のキット。

【請求項 6 8】

前記サンプルが、犯罪現場から取得されるか、犯罪現場に関連するか、容疑者から採取されるか、参照サンプルであるか、または検討中のヒトから採取される、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 6 9】

核酸サンプルに由来する短縦列反復配列を分析するためのキットであって、該キットは、D 1 2 S 3 9 1 の対立遺伝子 - 1 3 を検出するためのアレリックラダー、および該 D 1 2 S 3 9 1 遺伝子座から増幅産物を生成するための増幅プライマーの 1 つのペアを備える、キット。

【請求項 7 0】

少なくとも 1 つの増幅プライマーが標識を含む、請求項 6 9 に記載のキット。

【請求項 7 1】

少なくとも 1 つの増幅プライマーが移動度修飾因子を含む、請求項 7 0 に記載のキット。

。

【請求項 7 2】

前記移動度修飾因子が H E O である、請求項 7 1 に記載のキット。

【請求項 7 3】

ポリメラーゼ、検出可能なレポーターおよびプロトコールのうちの 1 つ以上をさらに備える、請求項 6 9 に記載のキット。

【請求項 7 4】

前記サンプルが、毛髪、糞便、血液、組織、尿、唾液、頬細胞、膣細胞、皮膚、骨、歯、頬側サンプル、胎盤細胞を含む羊水、および胎児細胞を含む羊水および精液のうちの 1

10

20

30

40

50

つ以上に由来する、請求項 6 9 に記載のキット。

【請求項 7 5】

前記サンプルが、犯罪現場から取得されるか、犯罪現場に関連するか、容疑者から採取されるか、参照サンプルであるか、または検討中のヒトから採取される、請求項 7 4 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

一般的に、本開示された発明は、ヒトの D 1 0 S 1 2 4 8 遺伝子座および D 1 2 S 3 9 1 遺伝子座における新規の短縦列反復 (s h o r t t a n d e m r e p e a t) (S T R) 対立遺伝子の同定に関連する。新規対立遺伝子の発見は、各遺伝子座のより代表的なアレリックラダー (a l l e l i c l a d d e r) 、およびより広い範囲の個人を正確に遺伝子型同定する能力を提供する。10

【背景技術】

【0 0 0 2】

法医学、父系試験、組織型判定、および個別化医療の分野は、アイデンティティーの決定、遺伝子型解析、表現型予測のために、および疾患の予測および／または予防において、日常的に D N A に基づく技術を使用する。D N A タイピングは、通常「マーカー」と呼ばれる、関心のある特徴を有するゲノム D N A の対立遺伝子の分析を含む。今日使用されるほとんどのタイピング方法は、集団において少なくとも 2 つの異なる形態で現れることが公知である D N A マーカーの、1 つ以上の領域の長さおよび／または配列の違いを検出および分析するために的確にデザインされる。そのような長さおよび／または配列の変異 (v a r i a t i o n) は、「多型」と呼ばれる。そのような変異が起こる D N A のあらゆる領域 (すなわち「遺伝子座」) は、「多型遺伝子座」と呼ばれる。20

【0 0 0 3】

近年、多型短縦列反復 (S T R) の、遺伝子マーカーとしての発見および発展が、D N A タイピングにおいて重要な役割を果たしている。S T R は、ヒトのアイデンティティーおよび法医学的 D N A 試験の主な手段となった。F e d e r a l B u r e a u o f I n v e s t i g a t i o n によって運営される C o m b i n e d D N A I n d e x S y s t e m (C O D I S) D N A データベースは、選択された個人の D N A プロファイル情報を保存する。C O D I S プロファイルは、1 3 個の S T R マーカー (S T R 反復を有する 1 3 個の遺伝子座) 、2 つのさらなる対立遺伝子マーカーおよび A M E L 、性別決定対立遺伝子を含む。選択された D N A プロファイルは、多くの可能性のある供給源、例えば有罪判決を受けた犯罪者、逮捕者、行方不明者または身許不明者、および行方不明者参照 D N A (血縁者) 由来であり得る。未同定サンプルの D N A プロファイルを、C O D I S D N A プロファイルと比較することは、潜在的な身許確認照会 (i d e n t i f i c a t i o n m a t c h) または、可能性のある加害者の捜査の手掛かりを提供している。30

【0 0 0 4】

既存の市販の S T R アッセイから生じた D N A プロファイルのマッチングおよび比較は、データベース内およびデータベース間の D N A プロファイルの連續性および比較性、および改善された S T R アッセイを提供する。遺伝子座由来の増幅された対立遺伝子から構成されるサイズ標準、すなわちアレリックラダーの使用は、データベース、S T R アッセイ、実験室およびサンプル間の、その遺伝子座に関する S T R 対立遺伝子の比較を可能にして、D N A プロファイリングシステムの力を増加させる。40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 5】

従って、高度な識別力があり得る、まれな対立遺伝子の同定は、未同定サンプルにおける対立遺伝子の決定をさらに改善する。従って、ヒト D N A 配列における新規 S T R 対立50

遺伝子の発見に基づいて、DNAに基づく技術を改善するニーズが、当該分野に存在する。

【課題を解決するための手段】

【0006】

いくつかの実施態様において、単離された複数の核酸分子を組み合わせて含むアレリックラダーが開示され、それは1つ以上の多型短縦列反復遺伝子座の対立遺伝子変異体であり、ここでその多型短縦列反復遺伝子座は、対立遺伝子-7を含むD10S1248、および対立遺伝子-13を含むD12S391から成る群から選択される。アレリックラダーを用いる方法、アレリックラダーを採用するアッセイ、およびD10S1248およびD12S391STRマーカーに関するアレリックラダーを有するキットも想定される。

10

【0007】

本教示のこれらの実施態様および他の特徴は、本明細書中の記載からより明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】図1は、D12S391遺伝子座の対立遺伝子14および27のSTR領域を示す図である。

20

【発明を実施するための形態】

【0009】

本明細書を解釈する目的のために、以下の定義が適用され、そして適当な場合はいつでも、単数形で使用される用語は複数も含み、そして逆もまた同じである。下記で述べるあらゆる定義が、本明細書中で参考として援用されるあらゆる文書を含む、あらゆる他の文書におけるその用語の使用と対立する場合には、反対の意味が明らかに意図されなければ（例えばその用語がもともと使用される文書において）、本明細書およびその関連する特許請求の範囲を解釈する目的のために、下記で述べる定義が常に統制する。本明細書および添付の特許請求の範囲において使用されるように、単数形「a」、「an」、および「the」は、明白におよび明解に1つの指示対象に制限しなければ、複数の指示対象を含むことに注意する。「または」の使用は、他に述べなければ「および／または」を意味する。制限としてではなく例示の目的のために、「Xおよび／またはY」は、「X」または「Y」または「XおよびY」を意味し得る。「含む(comprise)」、「含む(comprises)」、「含む(comprising)」、「含む(include)」、「含む(includes)」および「含む(including)」の使用は、交換可能であり、そして制限することを意図しない。さらに、1つ以上の実施態様の記載が、「含む(comprising)」という用語を使用する場合、当業者は、いくつかの特定の例において、その実施態様または複数の実施態様は、代わりに「実質的に～から成る(consisting essentially of)」および／または「～から成る(consisting of)」という言葉を用いて記載し得ることを理解する。「および／または」という用語は、1つまたは全ての列挙した要素または列挙した要素の任意の2つ以上の組み合わせを意味する。

30

【0010】

本明細書中で使用されるその項の表題は、組織化の目的のみであり、そしていかなる方法においても記載された内容を制限するとは解釈されるべきでない。特許、特許出願、記事、書籍、および論文を含むがこれに限らない、本明細書中で引用される全ての文献は、あらゆる目的のためにその全体として明白に参考文献に組込まれる。組込まれた文献のいずれかが、本明細書中で定義されたいずれかの用語と矛盾する場合、本明細書が統制する。本教示は、様々な実施態様と組み合わせて記載されるが、本教示がそのような実施態様に限られることを意図しない。反対に、当業者によって認識されるように、本教示は様々な代替物、改変物、および同等物を包含する。

40

【0011】

50

本発明の実施は、有機化学、ポリマー技術、分子生物学（組換え技術を含む）、細胞生物学、生化学、および免疫学の従来の技術および説明を採用し得、それらは当該分野の技術の範囲内である。そのような従来の技術は、オリゴヌクレオチド合成、ハイブリダイゼーション、伸長反応、および標識を用いたハイブリダイゼーションの検出を含む。適当な技術の具体的な説明は、下記の本明細書中の実施例を参照し得る。しかし、他の等価な従来の手順ももちろん使用し得る。そのような従来の技術および説明を、Genome Analysis: A Laboratory Manual Series (第I - IV巻)、PCR Primer: A Laboratory Manual, and Molecular Cloning: A Laboratory Manual (全てCold Spring Harbor Laboratory Press, 1989から)、Gait、「Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach」1984、IRL Press, London、NelsonおよびCox (2000)、Lehninger, Principles of Biochemistry 第3版、W.H. Freeman Pub.、New York, N.Y. およびBergら (2002) Biochemistry、第5版、W.H. Freeman Pub.、New York, N.Y. のような標準的な実験室マニュアルにおいて見出し得、それらは全て、全ての目的のためにその全体として本明細書中で参考として援用される。
10

【0012】

本明細書中で使用される「対立遺伝子」という用語は、遺伝子またはDNAのセグメントに関連する遺伝的変異、すなわち同じ遺伝子座を占めるDNA配列の、2つ以上の代替形態の1つを指す。
20

【0013】

本明細書中で使用される「遺伝子座」という用語は、染色体または核酸分子上の特定の物理的位置を指す。遺伝子座の対立遺伝子は、相同染色体の同一の位置にある。本明細書中で使用される、「遺伝子座 (locus)」の複数形「遺伝子座 (loci)」は、同じまたは異なる染色体のいずれかの特定の物理的位置、ならびにその核酸分子上の同じまたは異なるいずれかの特定の物理的位置を指す。

【0014】

本明細書中で使用される「アレリックラダー」という用語は、特定のSTRマーカーの、1つ以上の対立遺伝子に関するサイズ標準を含む、核酸サイズ標準を指す。アレリックラダーは、遺伝子座由来の增幅対立遺伝子についての、参照標準および核酸サイズマーカーとしてはたらく。いくつかの実施態様において、そのアレリックラダーは、異なるSTRの対立遺伝子のサイズ標準を含み得る。いくつかの実施態様において、そのアレリックラダーは、DNAから成り得る。いくつかの実施態様において、そのアレリックラダーは、非天然核酸アナログから成り得る。アレリックラダー中の異なる個々のサイズ標準を、いくつかの実施態様において、検出可能な標識、例えばフルオロフォアで標識し得る。いくつかの実施態様において、そのアレリックラダー構成要素を、同じフルオロフォアで標識する。いくつかの実施態様において、そのアレリックラダー構成要素を、異なるフルオロフォアで標識する。そのサイズ標準を、オリゴヌクレオチドプライマーの特定のペア（または複数のペア）について働くよう選択し得る。例えば、もしマーカーXのための第1のプライマーセットが、対立遺伝子7に対応する150塩基対のアンプリコンを产生するなら、その対応するマーカーは150塩基アンプリコンのためのサイズ標準としてはたらく；一方マーカーXの第2のプライマーペアが、対立遺伝子7に対応する175塩基対のアンプリコンを产生するなら、その対応するマーカーは、175塩基アンプリコンのためのサイズ標準としてはたらく。従って、同じ対立遺伝子の、異なるサイズのアンプリコンについての異なるサイズ標準が企図される。所定の対立遺伝子由来の所定のアンプリコンのためのサイズ標準は、アンプリコンまたはそのアンプリコンが得られる対立遺伝子の核酸塩基配列と同じまたは異なる核酸塩基配列を有し得る。電気泳動システムにおける対立遺伝子分析のために、そのサイズ標準を、関心のあるアンプリコンと同じ電気泳動移動度
30
40
40
50

を有するように選択し得る。あるいは、いくつかの実施態様において、そのサイズ標準を、関心のあるアンプリコンと異なる電気泳動移動度を有するように選択し得、その差異の性質が予測可能であるとの理解を考慮して、そのアンプリコンのアイデンティティーを決定し得る。質量分析システムにおける対立遺伝子分析のために、そのサイズ標準を（電気泳動移動度ではなく、重量／電荷比）、関心のあるアンプリコンと同じシグナルを有するように選択し得る。あるいは、いくつかの実施態様において、そのサイズ標準を（電気泳動移動度ではなく、重量／電荷比）、関心のあるアンプリコンと異なる分離性質を有するように選択し得、その差異の性質が予測可能であるとの理解を考慮して、そのアンプリコンのアイデンティティーを決定し得る。

【0015】

10

本明細書中で使用される「対立遺伝子変異体」という用語は、遺伝子座における2つ以上の対立遺伝子間の変異を指す。対立遺伝子変異体はまた、多型とも呼ばれ得る。

【0016】

本明細書中で使用する場合、「塩基対モチーフ」という用語は、反復配列、生物学的有意性を有する配列、縦列反復配列等を含むがこれに限らない、核酸塩基配列の構成を指す。

【0017】

本明細書中で使用する場合、「比較する」という用語は、2つ以上の核酸配列間の違いを広く指す。類似性または差異を、核酸配列決定、配列決定の読み取りの整列、ゲル電気泳動、制限酵素消化、1本鎖コンフォメーション多型等を含むがこれに限らない、様々な方法によって決定し得る。

20

【0018】

「検出する」および「検出」という用語は、本明細書中で広い意味で使用され、そして核酸配列の存在を決定し得る、または核酸配列を同定し得るあらゆる技術を包含する。いくつかの実施態様において、検出することは、制限無しに、定量的PCR（「Q-PCR」）のようなリアルタイム検出方法を含む、核酸からの検出可能なシグナルを定量することを含む。いくつかの実施態様において、検出することは、鋳型として増幅産物を使用して产生した、配列決定産物または配列決定産物のファミリーの配列を決定することを含む；いくつかの実施態様において、そのような検出は、配列決定産物のファミリーの配列を得ることを含む。他の実施態様において、検出することを、核酸増幅産物のサイズを測定することによって達成し得る。

30

【0019】

本明細書中で使用される場合、「DNA」は、ゲノムDNA、cDNA、単離核酸分子、ベクターDNA、および染色体DNAのような、当該分野で理解されるような様々な形態におけるデオキシリボ核酸を指す。「核酸」は、あらゆる形態におけるDNAまたはRNAを指す。単離核酸分子の例は、ベクターに含まれる組換えDNA分子、異種性の宿主細胞において維持される組換えDNA分子、部分的にまたは実質的に精製された核酸分子、および合成DNA分子を含むがこれに限らない。典型的には、「単離」核酸は、その核酸が由来する生物のゲノムDNAにおいて、天然にその核酸に隣接する配列（すなわち、その核酸の5'および3'末端に位置する配列）を含まない。さらに、cDNA分子のような「単離」核酸分子は一般的に、組換え技術によって產生される場合は実質的に他の細胞物質または培地を含まない、または化学合成される場合は化学的前駆体または他の化学物質を含まない。

40

【0020】

本明細書中で使用される場合、「隣接配列」という用語は、短縦列反復配列を含むがこれに限らない、標的核酸配列の5'および/または3'の核酸配列を指す。その隣接配列は、増幅産物内に存在し得るかまたはその外側、すなわち増幅産物に隣接して存在し得る。増幅プライマーを、STRマーカーについて特異的な対立遺伝子の指標となるサイズのアンプリコンを产生するように、そのSTRマーカーの変異部分（variable portion）に隣接する配列にハイブリダイズするよう選択し得る。

50

【0021】

本明細書中で使用される場合、「短縦列反復（STR）遺伝子座」という用語は、2から7塩基対の長さの短い反復配列要素を含むゲノムの領域を指す。各配列要素は、STR内で少なくとも1回反復され、そして本明細書中で「反復ユニット」と呼ばれる。STRという用語はまた、配列の少なくとも1つがタンデムで少なくとも2回反復される限り、1つ超の反復ユニットがタンデムで、または介在塩基と共に反復する、ゲノムDNAの領域も包含する。STRの例は、トリプレットリピート、例えばATCのタンデム、例えばATC ATC ATC ATCAACATC ATC（配列番号1）；4-ピート（peat）（テトラリピート）、例えばGATAのタンデム、例えばGATAGATAGATA CA TAGATA（配列番号2）；および5-ピート（ペンタリピート）、例えばATTGCのタンデム、例えばATTGC ATTGC ATTGC（配列番号3）等を含むがこれに限らない。遺伝子マーカーとして使用し得る特定のSTR（specific STR）についての情報を、特にwww.cstl.nist.gov/strbaseのSTRbaseにおいて見出し得る。

【0022】

本明細書中で使用される場合、「不完全（imperfect）反復」、「不完全（incomplete）反復」、および「変異体反復」という用語は、その反復ユニットが、タンデムであるが、1つ以上の反復ユニットの間に配列の妨害（付加または欠失）をその中に有する縦列反復、例えばATCGATCGAACGATCGATCG（配列番号4）を指し、ここで3番目の反復ユニットが他の反復ユニットと同じではなく、そしてそれゆえ不完全（imperfect）反復であり；不完全（incomplete）反復は、反復ユニット中の塩基対の数が、不完全（incomplete）な反復である縦列反復として見出され得る、例えばTH01遺伝子座の対立遺伝子9は、TH01遺伝子座の完全反復「AATG」に関して、9つの4-ピート反復ユニット（[AATG]9）を含むが、9.3対立遺伝子は、9つの「AATG」反復および3ヌクレオチドからなる「ATG」である1つの不完全（incomplete）反復、すなわち[AATG]6 ATG [AATG]3という不完全（incomplete）反復を含む；一方変異体反復は、反復ユニット中に変異（複数可）、例えばATCCATCGATCCATCGATCG ATCCATCC（配列番号5）を有し、ここで4-ピート反復ユニットは、反復ユニットの4番目の位置で変異塩基対、「C」または「G」ヌクレオチドのいずれかを有する。

【0023】

本明細書中で使用される場合、「多型短縦列反復遺伝子座」という用語は、ゲノムDNAの特定の領域における反復配列要素の数（および配列の正味の長さ）が、対立遺伝子ごとに、および個人ごとに変動するSTR遺伝子座を指す。

【0024】

本明細書中で使用される場合、「縦列反復」という用語は、逐次的な連続物で存在する反復配列を指す。

【0025】

本明細書中で使用される場合、「縦列反復遺伝子座」という用語は、縦列反復を含む遺伝子座を指す。

【0026】

本明細書中で使用される場合、「D10S1248、対立遺伝子-7」とは、第10染色体の10q26.3のD10S1248遺伝子座に位置する、STRマーカーD10S1248を指す。対立遺伝子-7の反復構造は、[GGAA]7であると推定されるが、対立遺伝子-7に変異反復および不完全（imperfect）反復を有することも可能である。D10S1248、対立遺伝子-7に言及する場合、D10S1248、対立遺伝子-7の可能性のある不完全（incomplete）反復、変異反復、および不完全（imperfect）反復も想定される。

【0027】

本明細書中で使用される場合、「D12S391、対立遺伝子-13」は、第12染色

10

20

30

40

50

体の D 1 2 S 3 9 1 遺伝子座に位置する、 S T R マーカー D 1 2 S 3 9 1 を指す。対立遺伝子 - 1 3 の反復構造は、 [A G A T]₆ [A G A C]₆ [A G A T] と推定される。 D 1 2 S 3 9 1 、対立遺伝子 - 1 3 に言及する場合、 D 1 2 S 3 9 1 、対立遺伝子 - 1 3 の不完全 (i n c o m p l e t e) 反復、変異反復、および不完全 (i m p e r f e c t) 反復も想定され、それはこのマーカー内の他の対立遺伝子、例えば対立遺伝子 1 7 および 1 7 . 3 、 1 9 および 1 9 . 3 、 2 0 および 2 0 ' 、 2 1 および 2 1 ' 、 2 2 および 2 2 ' 、 2 3 および 2 3 ' 、 2 4 、 2 4 ' および 2 4 " 、 2 5 および 2 5 ' 、 2 6 および 2 6 ' の間で一般的である。

【 0 0 2 8 】

本明細書中で使用される場合、「増幅する」は、特定のヌクレオチド配列の量を酵素的に増加させる過程を指す。この増幅は、制限されないが、一般的には P C R によって達成される。本明細書中で使用される場合、「変性」は、 2 つの相補的なヌクレオチド鎖の、アニーリングした状態からの分離を指す。変性を、例えば緩衝液のイオン強度、温度、または塩基対形成相互作用を破壊する化学物質のような、いくつかの因子によって誘導し得る。本明細書中で使用される場合、「アニーリング」は、ヌクレオチドの鎖間の特異的相互作用を指し、ここでその鎖は、実質的にワトソン - クリック塩基対形成によって決定される鎖間の相補性に基づいてお互いに結合する。アニーリングが起こるために、相補性が 1 0 0 % である必要はない。本明細書中で使用される場合、「伸長」は、プライマーオリゴヌクレオチドおよび標的核酸がお互いにアニーリングした後の増幅サイクルを指し、ここでそのポリメラーゼ酵素はプライマーの伸長を触媒し、それによって標的核酸を複製錆型として使用した増幅を可能にする。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 9 】

「アンプリコン」、「増幅産物」および「増幅配列」という用語は、本明細書中で交換可能に使用され、そして直線的または指数関数的に、ポリヌクレオチド配列を増加させるための広い範囲の技術を指し、そして増幅反応の産物であり得る。アンプリコンは、 2 本鎖または 1 本鎖であり得、そして 2 本鎖増幅産物を変性させることによって得られる、分離した構成要素の鎖を含み得る。特定の実施態様において、 1 回の増幅サイクルのアンプリコンが、続く増幅サイクルにおける錆型として作用し得る。代表的な増幅技術は、 P C R またはプライマー伸長工程を採用するあらゆる他の方法を含むがこれに限らない。増幅の他の制限しない例は、リガーゼ検出反応 (L D R) 、およびリガーゼ連鎖反応 (L C R) を含むがこれに限らない。増幅方法は、熱サイクリングを含み得る、または等温で行い得る。様々な実施態様において、「増幅産物」および「増幅配列」という用語は、増幅反応の任意のサイクル数に由来する産物を含む。

【 0 0 3 0 】

「遺伝子マーカー」は、一般的に、 D N A タイピングのような分析にとって関心のある特徴を有する、ゲノム D N A 遺伝子座の対立遺伝子であり、ここで個人は、その D N A における変異に基づいて区別される。ほとんどの D N A タイピング方法は、集団において少なくとも 2 つの異なる形態、または対立遺伝子で現れることが公知である D N A マーカーの 1 つ以上の領域の長さおよび / または配列の差を検出および分析するようにデザインされる。そのような変異は、「多型」と呼ばれ、そしてそのような変異が起こる D N A のあらゆる領域は「多型遺伝子座」と呼ばれる。 D N A タイピングを行う 1 つの可能な方法は、 P C R 増幅技術 (K B M u l l i s 、米国特許第 4 , 6 8 3 , 2 0 2 号) を、長さ変異多型 (length variation polymorphism) の分析と組み合わせることを含む。 P C R は伝統的に、比較的小さい D N A セグメントを信頼性高く増幅するためのみに使用することができる；すなわち長さが 3 , 0 0 0 塩基未満の D N A セグメントを増幅することのみに使用することができる (M . P o n c e および L . M i c o l (1 9 9 2) 、 N A R 2 0 (3) : 6 2 3 ; R . D e c o r t e ら (1 9 9 0) 、 D N A C E L L B I O L . 9 (6) : 4 6 1 4 6 9) 。短縦列反復 (S T R) 、ミニサテライトおよび縦列反復数変異 (V N T R) は、長さ変異多型のいくつかの例である。ミニサテライトまたは V N T R を含む D N A セグメントは一般的に、長すぎて P C R

によって信頼性高く増幅できない。対照的に、増幅プロトコールを、DNAの他の、長さが変異する領域(variable length region)から起こり得るよりも小さい産物を产生するようにデザインし得るので、約3から7個のヌクレオチドの反復ユニットを含むSTRは、十分に短く、PCR増幅における遺伝子マーカーとして有用である。

【0031】

本明細書中で使用される場合、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、および「核酸」という用語は、本明細書中で交換可能に使用され、そして制限無しにヌクレオチド間ホスホジエステル結合、またはヌクレオチド間アナログによって連結した、2'-デオキシリボヌクレオチド(DNA)およびリボヌクレオチド(RNA)を含む、ヌクレオチドモノマーの1本鎖および2本鎖ポリマー、および会合対イオン、例えばH⁺、NH₄⁺、トリアルキルアンモニウム、Mg²⁺、Na⁺等を指す。ポリヌクレオチドは、全部デオキシリボヌクレオチドから、全部リボヌクレオチドから、またはそのキメラ混合物から成り得、そしてヌクレオチドアナログを含み得る。そのヌクレオチドモノマーユニットは、あらゆるヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを含み得る。ポリヌクレオチドは、典型的にはサイズが数モノマーユニット、例えば当該分野においてオリゴヌクレオチドと呼ばれることがある5-40個から、数千のモノマーヌクレオチドユニットまでの範囲である。他に述べなければ、ポリヌクレオチド配列が示される場合はいつでも、そのヌクレオチドは左から右へ5'から3'の順であること、および他に述べなければ、「A」はデオキシアデノシンを意味し、「C」はデオキシシトシンを意味し、「G」はデオキシグアノシンを意味し、「T」はチミジンを意味し、そして「U」はデオキシウリジンを意味することが理解される。10 20

【0032】

本明細書中で使用される場合、「標的ポリヌクレオチド」、「核酸標的」および「標的核酸」という用語は、本明細書中で交換可能に使用され、そして関心のある特定の核酸配列を指す。その「標的」は、増幅しようとするポリヌクレオチド配列であり得、そして他の核酸分子の存在下で、またはより大きな核酸分子中に存在し得る。その標的ポリヌクレオチドを、あらゆる供給源から得ることができ、そしてあらゆる数の異なる組成物の構成要素を含み得る。例えば、その標的是、核酸(例えばDNAまたはRNA)であり得る。その標的是、メチル化、非メチル化、または両方であり得る。さらに、「標的ポリヌクレオチド」は、標的ポリヌクレオチド自体、ならびにその代用物、例えば増幅産物、および天然配列を指し得ることが認識される。いくつかの実施態様において、その標的ポリヌクレオチドは、例えば、法医学的サンプルにおいて見出し得るもののような、しかしこれに限らない、分解した供給源由来の短いDNA分子である(例えばButler, 2001、Forensic DNA Typing: Biology and Technology Behind STR Markersを参照のこと)。本教示の標的ポリヌクレオチドは、多くの供給源のいずれか由来であり得る。これらの供給源は、全血、組織生検材料、リンパ、骨、骨髄、歯、羊水、毛髪、皮膚、精液、肛門分泌物、膣分泌物、汗、唾液、頬側スワブ(buccal swab)、様々な環境サンプル(例えば農業サンプル、水サンプル、および土サンプル)、研究サンプル一般、精製サンプル一般、および溶解した細胞を含み得るがこれに限らない。標的ポリヌクレオチドを、当該分野で公知の様々な手順のいずれか、例えばPrepSEQ™ Kits(Applied Biosystems製)、Boomら、および米国特許第5,234,809号等を用いて、サンプルから単離し得ることが認識される。標的ポリヌクレオチドを、機械力、超音波処理、制限エンドヌクレアーゼ切断、または当該分野で公知のあらゆる方法などの手順の使用を含んで、分析の前に切断または剪断し得ることが認識される。30 40

【0033】

本明細書中で使用される場合、「ポリメラーゼ連鎖反応」またはPCRは、2本鎖核酸サンプルの鎖を分離する最初の変性工程、続く(i)増幅プライマーが標的配列に隣接する位置に特異的にアニーリングすることを可能にするアニーリング工程；(ii)プライ50

マーを 5' から 3' の方向へ伸長し、それによって標的配列に相補的なアンブリコンポリヌクレオチドを形成する伸長工程、および (iii) アンブリコンの標的配列からの分離を引き起こす変性工程の繰り返しから成る、核酸の増幅である (Mullis ら編、The Polymerase Chain Reaction, Birkhäuser, Boston, Mass. (1994))。上記の各工程を、好ましくは自動化サーモサイクラー (Applied Biosystems LLC, Life Technologies Corporation の部門、Foster City, CA) を用いて、異なる温度で行い得る。所望の場合、RNA サンプルを DNA / RNA ヘテロ二本鎖に、または二本鎖 cDNA に、当業者に公知の方法によって変換し得る。PCR 法はまた、逆転写酵素 PCR および PCR の原理に従う他の反応を含む。

10

【0034】

「プライマー」という用語は、標的核酸または「鑄型」、標的領域隣接配列に、または増幅産物の対応するプライマー結合部位に選択的にハイブリダイズし得；そしてそのプライマーの 3' 末端から、対応するポリヌクレオチド鑄型、隣接配列または増幅産物に相補的な配列の合成を可能にする、ポリヌクレオチド（オリゴヌクレオチド）およびそのアナログを指す。典型的には、プライマーは長さが約 10 から 100 ヌクレオチドの間であり得、そして鑄型に相補的なポリヌクレオチドの、鑄型指向性合成の開始点を提供し得、それは適当な酵素（複数可）、補助因子、ヌクレオチド（dNTP）等のような基質の存在下で起こり得る。

20

【0035】

本明細書中で使用される場合、「増幅プライマー」および「オリゴヌクレオチドプライマー」という用語は、交換可能に使用され、そしてそれは、標的配列に隣接する RNA または DNA 領域にアニーリングし得、そして当該分野で周知の適当な条件下で DNA 合成のための開始プライマーとして作用し得る、オリゴヌクレオチドを指す。典型的には、PCR 反応は、「上流」または「前向き」プライマー、および「下流」または「逆向き」プライマーを含む、「オリゴヌクレオチドプライマーペア」とも呼ばれる「増幅プライマーペア」を採用し、それは増幅する RNA または DNA の領域の範囲を定める。第 1 のプライマーおよび第 2 のプライマーは、前向きまたは逆向きプライマーのいずれかであり得、そして本明細書中で交換可能に使用され、そして制限しない。

30

【0036】

本明細書中で使用される場合、「プライマー結合部位」という用語は、ポリヌクレオチド配列の領域、典型的には標的領域に隣接する配列および／またはアンブリコンの領域を指し、その領域は、当該分野で公知のあらゆる適当なプライマー伸長反応（例えば PCR であるがこれに限らない）の場合に、プライマーがアニーリングし得る鑄型として、直接、またはその相補部分（complement）に基づき作用し得る。2つのプライマー結合部位が、2本鎖ポリヌクレオチドに存在する場合、2つのプライマー結合部位の方向は一般的に異なることが、当業者によって認識される。例えば、プライマーペアの 1 つのプライマーは、第 1 のプライマー結合部位と相補的であり、そしてそこにハイブリダイズし得、一方そのプライマーペアの対応するプライマーは、第 2 のプライマー結合部位の相補部分とハイブリダイズするようデザインされる。言い換えると、いくつかの実施態様において、第 1 のプライマー結合部位は、センス方向に存在し得、そして第 2 のプライマー結合部位は、アンチセンス方向に存在し得る。アンブリコンのプライマー結合部位は、標的隣接配列またはその相補部分と同じ配列または少なくともその配列のいくらかを含み得るが、必ずしもその必要はない。

40

【0037】

当業者は、標的領域が、特定の増幅手段によって増幅される場合、プライマー結合部位の相補部分は、相補的なアンブリコンまたはアンブリコンの相補鎖において合成されることを理解する。従って、プライマー結合部位の相補部分は、本明細書中で使用されるプライマー結合部位という用語の意図する意味に、明白に含まれるということを理解されたい。

50

【0038】

本明細書中で使用される場合、「移動度修飾因子」という用語は、P C R プライマーの5'末端に結合した色素およびP C R プライマーの5'末端の間の、非ヌクレオチドリンカーラーを指す。移動度修飾因子の例は、ヘキサエチレンオキシド(H E O)のようなオリゴエチレンオキシド移動度修飾因子を含むがこれに限らない(本明細書中で参考として援用される、G r o s s m a n ら、N A R 2 2 : 2 5 2 7 - 2 5 3 4 (1 9 9 4)、米国特許第5,470,705; 5,703,222および5,989,871号)。

【0039】

本明細書中で使用される場合、「核酸サンプル」という用語は、例えば毛髪、糞便、血液、組織、尿、唾液、頬細胞、膣細胞、皮膚、例えば指紋に含まれる皮膚細胞、骨、歯、頬側サンプル、胎盤細胞を含む羊水、および胎児細胞を含む羊水および精液を含むがこれに限らない、本発明による生物学的サンプルにおいて見出される核酸を指す。サンプルを、侵襲的に、または非侵襲的に採取し得ることが企図される。サンプルは、線維、布、タバコ、チューブインガム、接着性物質、土または無生物物体上に存在し得、その中に存在し得、その内部に存在し得、それ由来であり得る、またはそれに結合して見出し得る。本明細書中で使用される「サンプル」は、その最も広い意味で使用され、そして核酸を含むことが疑われるサンプルを指し、そして、それは、細胞、細胞から単離された染色体(例えば中期染色体の広がり)、ゲノムD N A、R N A、c D N A等を含み得る。サンプルは、細菌、ウイルス、植物、家畜、家内ペット、およびヒトのサンプルを含むがこれに限らない、核酸を含むあらゆる生物を包含する動物または植物起源であり得る。

10

20

30

【0040】

本明細書中でまた、端点による数字の範囲の指定は、その範囲に包含される全ての数を含む(例えば、1から5は、1、1.5、2、2.75、3、3.80、4、5等を含む)。

【0041】

本教示の様々な実施態様は、S T R 、D 1 0 S 1 2 4 8 およびD 1 2 S 3 9 1 の新規に発見された対立遺伝子に関連する。請求される発明の実施態様は、D 1 0 S 1 2 4 8 およびD 1 2 S 3 9 1 のこれらの新規対立遺伝子の検出のためのアレリックラダーを含む。いくつかの実施態様において、各遺伝子座のアレリックラダーは、D 1 0 S 1 2 4 8 マーカーの対立遺伝子7またはD 1 2 S 3 9 1 マーカーの対立遺伝子13についてのサイズ標準として作用する、単離された複数の核酸分子を組み合わせて有する。遺伝子座内の対立遺伝子は、多型のタンデムに反復する塩基対モチーフを有する核酸分子を含む。遺伝子座内の対立遺伝子を区別するのは、タンデムの反復ユニットの数の変異である。

40

【0042】

本明細書中で使用される特定のS T R 遺伝子座に関する用語は、当該分野で公知であるようにこれらの遺伝子座につけられた名前を指す。その遺伝子座は、例えば様々な参考文献において、および以下のリストにおける様々な受託番号によって同定され、それらは全てその全体として本明細書中で参考として援用される。以下の参考文献のリストは、遺伝子座情報の供給源の单なる例として意図される。これらの遺伝子座を含むD N A領域に関する、およびアレリックラダーの構築のために企図される情報は、公的に入手可能であり、そして以下のまたは他の参考文献および/または受託番号を調べることによって、容易に見出される。適当な場合、G e n B a n k (登録商標)(N a t i o n a l C e n t e r f o r B i o t e c h n o l o g y I n f o r m a t i o n, B e t h e s d a, M D .)によって提供されるような、出願時点現在の受託番号が示される。例えば、遺伝子座D 1 0 S 1 2 4 8 に関して、M D C o b l e およびJ M B u t l e r (2 0 0 5)、J . F O R E N S I C S c i . 5 0 (1) : 4 3 - 5 3 、G e n B a n k 受託番号A L 3 9 1 8 6 9 ; およびD 1 2 S 3 9 1 に関して、M V L a r e u ら(1 9 9 6)、G E N E 1 8 2 : 1 5 1 - 1 5 3 、G e n B a n k 受託番号G 0 8 9 2 1 を参照のこと。

50

【0043】

現在まで、位置 1 0 Q 2 6 . 3 において第 10 染色体の長腕に位置する D 1 0 S 1 2 4 8 マーカーは、8 縦列反復から 19 縦列反復の範囲で「 G G A A 」テトラ - リピートの縦列反復を有する、12 個の対立遺伝子から成ることが報告された (N I S T S t a n d a r d R e f e r e n c e D a t a b a s e S R D 1 3 0 , G a i t h e r s b u r g , M D) 。本教示は、7 個の「 G G A A 」縦列反復を有すると推定される、新規に発見された対立遺伝子 - 7 を包含する。全ての報告された場合において、D 1 0 S 1 2 4 8 の縦列反復は、完全反復である。すなわち、「 G G A A 」反復が、対立遺伝子 - 7 に関しては 7 回タンデムで、対立遺伝子 - 8 に関しては 8 回タンデムで現れる等である。

【 0 0 4 4 】

第 12 染色体に位置する D 1 2 S 3 9 1 マーカーは、以前 15 個の対立遺伝子、および複合反復 (c o m p o u n d r e p e a t) として示される、さらなる 8 個のマイクロバリエント対立遺伝子を有することが報告された ; [A G A T]_{8 . 1 7} [A G A C]₆ ,_{8 . 1 0} [A G A T]_{0 . 1} (N I S T 、前出) 。報告された縦列反復は、15 反復から 26 反復の範囲であった。本教示は、D 1 2 S 3 9 1 についての 3 つの新規対立遺伝子、それぞれ 13 、 14 および 27 個の縦列反復を有する新規対立遺伝子 - 13 、 - 14 、および - 27 を提供する。

【 0 0 4 5 】

各遺伝子座についての新規対立遺伝子を、表 1 にまとめることができる :

【 0 0 4 6 】

【 表 1 】

表 1

遺伝子座	新規対立遺伝子	ラダーのための アンプリコンの サイズ範囲	S T R 反復のサイズ (b p)
D10S1248	7	78-122 bp	28
D12S391	13	203 bp	52
	14	207 bp	56
	27	259 bp	108

新規に開発されたアレリックラダー内の対立遺伝子を、表 2 にまとめる。アレリックラダーの構成のために、対立遺伝子型のあらゆる組み合わせが想定されるので、表 2 で示された対立遺伝子の数は、対立遺伝子反復を完全、不完全 (i m p e r f e c t) 、変異、または不完全 (i n c o m p l e t e) であるとして区別しない。

【 0 0 4 7 】

10

20

30

【表2】

表2

遺伝子座	アレリックラダー中の対立遺伝子の数	アレリックラダーの範囲	ラダーのためのアンプリコンのサイズ範囲	最初の対立遺伝子のためのSTR反復のサイズ (bp)
D10S1248	12	7-18	78-122 bp	28
	13	7-19	78-126 bp	
D12S391	15*	13-27	203-259 bp	52

10

ヒトゲノムDNAの624個の集団サンプルの多重スクリーニングの間に、D10S1248対立遺伝子-7およびD12S391についての対立遺伝子-13、-14、および-27を、それぞれサンプルIBB-83、IBB-725、IBB-923およびIBB-496において同定した(Interstate Blood Bank, Inc.、Memphis、TN)。

【0048】

IBB-83についての電気泳動図は、D10S1248マーカーについてのヘテロ接合性(heterozygosity)を示した。2つのピークは、「トラッキングラダー」の外側にある新規対立遺伝子-7および対立遺伝子-14のピークを示す。D10S1248の対立遺伝子-7を同定するために使用したアレリックラダーは、対立遺伝子8-18を示す、11個のサイズ標準を含んでいた。

20

【0049】

IBB-725についての電気泳動図は、その個人はD12S391マーカーに関してヘテロ接合体であることを示した。2つのピークが観察され、1つは新規対立遺伝子-13を示し、そして「トラッキングラダー」の外側にあり、そして2番目のピークは対立遺伝子-15を示した。IBB-923についての電気泳動図は、その個人はD12S391マーカーに関してヘテロ接合体であることを示した。2つのピークが観察され、1つは新規対立遺伝子-14を示し、そして2番目のピークは対立遺伝子-18を示した。IBB-496についての電気泳動図は、その個人はD12S391マーカーに関してヘテロ接合体であることを示した。2つのピークが観察され、1つは対立遺伝子-23を示し、そして2番目のピークは新規対立遺伝子-27のものであった。D12S391についての対立遺伝子-13、-14、および-27を同定するために使用したアレリックラダーは、対立遺伝子15-26を示す12個のサイズ標準を含んでいた。

30

【0050】

いくつかの実施態様において、そのアレリックラダーは、D10S1248アレリックラダーおよびD12S391アレリックラダーの少なくとも1つの混合物である。他の実施態様において、そのアレリックラダーは少なくともD10S1248アレリックラダーおよびD12S391アレリックラダーの混合物である。さらに他の実施態様において、そのアレリックラダーは、D10S1248アレリックラダーおよびD12S391アレリックラダーの混合物であり、そして表1で示したような本明細書中で開示された新規に同定された対立遺伝子を含む。D10S1248ラダーは、78塩基対(対立遺伝子-7)から122塩基対(対立遺伝子-18)までの範囲の対立遺伝子を含み、そしてD12S391アレリックラダーは、203塩基対(対立遺伝子-13)から263塩基対(対立遺伝子-27)までの範囲の対立遺伝子を含む。D12S391の対立遺伝子-14および対立遺伝子-27の配列を、プラスミドベクターにクローニングし、そして配列決定した。図1は、対立遺伝子-14および-27の配列データを示す。

40

【0051】

アレリックラダーの1つの実施態様を、特定のSTRマーカーについてのSTR変異を

50

代表する対立遺伝子を有する、Applied Biosystemsの社内DNAコレクション内の個人を同定することによって構築した。Applied BiosystemsのDNAコレクションは、1251人のDNAサンプルから成る（395人のラテンアメリカ人、350人の白人、350人のアフリカ系アメリカ人、および156人のアジア人）。そのDNAを、以前にAmpFLSTR（登録商標）Identifier（登録商標）キット（Applied Biosystems、Foster City、CA）のような、他の商業的に入手可能なSTR multiplexキットによって遺伝子型を同定した。各遺伝子座についての対立遺伝子をまずPCRによって増幅し、そして次いでTOPO（登録商標）TAアプローチ（Invitrogen、Carlsbad、CA）を用いて細菌にクローニングした。正しい対立遺伝子がクローニングされたことを確認するために、新規に同定された対立遺伝子それぞれの少数のクローンについてのDNA配列決定を行い得る。D12S391対立遺伝子-14および対立遺伝子-27の配列決定の結果を、図1に示す。

10

20

30

40

【0052】

いくつかの実施態様において、本教示は、標的核酸において、短縦列反復（STR）配列の対立遺伝子を検出および同定するための方法に関連する。いくつかの実施態様において、STR配列の対立遺伝子を検出および同定するための方法は、遺伝子座特異的オリゴヌクレオチドプライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって、標的核酸から少なくとも1つの短縦列反復配列を増幅することを含む。同じ遺伝子座特異的オリゴヌクレオチドプライマーを、サンプルおよびマーカーのためのアレリックラダーの両方について使用し、そしてそのプライマーは、D10S1248またはD12S391マーカーのいずれかに特異的である。そのSTR配列は、D10S1248またはD12S391いずれかの短縦列反復遺伝子座内に位置する。増幅後、増幅産物の結果として生ずる増幅短縦列反復配列を、増幅したアレリックラダーと比較して、サンプルの増幅産物とアレリックラダー中で見出された対立遺伝子標準とのマッチングに基づいて、対立遺伝子を予想する。いくつかの実施態様において、短縦列反復配列の対立遺伝子を検出および同定するための方法は、標的核酸のPCR増幅を使用し、そしてオリゴヌクレオチドプライマーペアを採用する。D10S1248およびD12S391についてのPCRプライマーペアは、STRbaseから容易に入手可能である、または当業者に日常的な方法によってデザインし得る。

30

【0053】

いくつかの実施態様において、増幅産物、すなわち所定の遺伝子座についてのSTRを含むアンプリコンの電気泳動移動度を、別の異なるSTR遺伝子座アンプリコンの電気泳動移動度の範囲と重複することを避けるために調整し得る。これを、単独で、またはお互いに組み合わせて使用し得る、少なくとも2つの異なるアプローチで行い得る。1つのアプローチにおいて、電気泳動の間、別の遺伝子座の分子量サイズと重複することを避けるために、そのプライマーの位置を、より小さいまたはより大きい増幅産物を生じるように調整する。別のアプローチにおいて、例えばヘキサエチレンオキシド（HEO）を含むがこれに限らない移動度修飾因子を、プライマーの5'末端の蛍光色素およびプライマー配列の間の非ヌクレオチドリンクとして採用し得る。例えば、本明細書中でその全体として参考文献に組込まれる、米国特許第6,395,486および6,734,296号を参照のこと。同様に、その増幅プライマーは、その遺伝子座にハイブリダイズしないが、採用される検出方法、例えば電気泳動または質量分析のために、アンプリコンの望ましい移動度を生じるように加えられた、さらなるヌクレオチドを（5'末端に）含み得る。（2つのPCR産物のうち大きい方の）結果として生ずるPCR増幅産物は、移動度修飾分子を含み、PCR産物の分子量を増加させ、そして従ってより大きなPCR産物の分子量のより大きなサイズへの認識されたシフトを増加させる。

40

【0054】

核酸を分析するための方法は、PCRによる増幅についての方法と同様、当業者に周知である。PCR増幅産物、すなわちアンプリコンの分析は、増幅産物の検出、およ

50

びある場合には配列決定、良く確立され、そして当業者に公知である方法を含むがこれに限らない。いくつかの実施態様において、短縦列反復配列の対立遺伝子を検出および同定するための方法は、増幅した短縦列反復増幅配列を、電気泳動によって対応するアレリックラダーと比較することを含む。対立遺伝子の分離のための多くの電気泳動法が当業者に公知であり、そして、それには、変性および非変性ゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動等が含まれるがこれに限らない。いくつかの実施態様において、対象のアレリックラダーは、電気泳動の間に、増幅した短縦列反復増幅配列と同時に泳動するために利用可能であり、そしてアレリックラダーおよび増幅サンプルのバンド形成パターンを比較する利点を提供する。増幅産物を配列決定するための方法、例えばサンガー配列決定法がよく確立され、そして当業者に公知である。

10

【0055】

本教示のいくつかの実施態様において、サンプル中に存在するSTR対立遺伝子の決定のために1つ以上のサンプルを分析する方法が提供される。いくつかの実施態様において、サンプルがD10S1248の対立遺伝子-7またはD12S391の対立遺伝子-13を含むかどうかを調べるために、そのサンプルを試験する。いくつかの実施態様において、その方法は、サンプルから核酸を単離すること、およびその核酸をPCR増幅して増幅産物を産生する事を含む。その増幅産物を次いで1つ以上のアレリックラダーを含むアレリックラダー混合物と比較する。遺伝子座D10S1248のために選択されたアレリックラダーは、対立遺伝子-7から-18、または対立遺伝子-7から-19までを有し得る。遺伝子座D12S391のためのアレリックラダーは、対立遺伝子-13から-27を有し得る。

20

【0056】

いくつかの実施態様において、分析する標的核酸を含むサンプルは、毛髪、糞便、血液、組織、尿、唾液、頬細胞、膣細胞、皮膚、骨、歯、頬側サンプル、胎盤細胞を含む羊水、および胎児細胞を含む羊水および精液の1つ以上に由来する。いくつかの実施態様において、そのサンプルは、犯罪現場、犯罪現場に関連するサンプル、容疑者から採取したサンプル、参照サンプル、または検討中の(under consideration)ヒトから採取したサンプル由来であり得る。他の実施態様において、そのサンプルは、考古学的サンプル、母系サンプル、父系サンプル、行方不明者サンプルであり得る。

30

【0057】

いくつかの実施態様において、本教示は、上に記載した方法を利用する、核酸サンプル由来の短縦列反復配列を分析するためのキットに関する。いくつかの実施態様において、核酸サンプル中の短縦列反復配列を分析するためのキットは、対立遺伝子-7を含むD10S1248アレリックラダーおよび対立遺伝子-13を含むD12S391アレリックラダーから成る群から選択される、アレリックラダーを含む少なくとも1つの容器を含む。いくつかの実施態様において、基本的なキットは、少なくとも1つのアレリックラダーを有し得る。そのアレリックラダーは、D10S1248またはD12S391に關し得る、またはそのアレリックラダーは、少なくともD10S1248およびD12S391アレリックラダーのアレリックラダー混合物を含み得る。そのキットはまた、例えば1つ以上の以下の構成要素のような、他の任意選択のキット構成要素を有し得る：キットに含まれるアレリックラダー中の少なくとも(at least)1つの個々のサイズ標準に対応するサイズのアンプリコンを産生するようにマーカーD10S1248を増幅し得るオリゴヌクレオチドプライマーペア、および標的核酸サンプル、キットに含まれるアレリックラダー中の少なくとも1つの個々のサイズ標準に対応するサイズのアンプリコンを産生するようにマーカーD10S1248を増幅し得るオリゴヌクレオチドプライマーペア、マーカーD12S391および標的核酸サンプル、増幅のために十分な量の酵素、増幅を促進するための増幅バッファー、酵素活性を促進するための二価の陽イオン溶液、増幅中の鎖伸長のためのdNTP、電気泳動のために増幅した物質を調製するための添加溶液(loading solution)、鑄型コントロールとしてのゲノムDNA、分離媒体において予測されたように物質が移動することを確認するサイズマーカー、および使用

40

50

者を教育し、そして誤使用を制限するためのプロトコールおよびマニュアル。キット中の様々な試薬の量はまた、そのプロセスの最適な感受性のような多くの因子に依存して変動し得る。手動の適用において使用するための試験キット、または自動化されたサンプル調製、反応設定、検出器または分析器で使用するための試験キットを提供することは、本教示の範囲内である。

【0058】

当業者は、採用される検出技術は一般的に制限しないことを理解する。むしろ、広く様々な検出手段が、決定すべきアンプリコンの存在または欠如を可能にする限り、それらは、開示された方法およびキットの範囲内である。

【0059】

本発明の原理を、特定の実施態様に関連して記載したが、これらの記載は、例としてのみなされたものであり、本発明の範囲を制限することを意図していないことが明らかに理解されるべきである。本明細書中で開示されたものは、図解および説明の目的のために提供された。網羅的であること、または開示されたものを、記載された正確な形態に制限することは意図されない。多くの修飾および変化が、当業者に明らかである。開示されたものは、記載された技術の開示された実施態様の原理および実用的な適用を最も良く説明するために選択および記載され、それによって他の当業者が、様々な実施態様および企図される特定の使用のために適当である様々な修飾を理解することを可能にする。開示されたものの範囲は、以下の特許請求の範囲およびその同等のもの (equivalence) によって規定されることが意図される。

10

20

【0060】

本教示の局面を、以下の実施例を考慮してさらに理解し得、それらはいかなる方法においても本教示の範囲を制限すると解釈されるべきでない。

【実施例】

【0061】

当業者は、多くの改変物、代替物、および同等物が可能であることを理解する。全てのそのような改変物、代替物、および同等物は、本明細書中に含まれることが意図される。

【0062】

以下の手順は、サンプル中の標的核酸の単離および増幅、および多型遺伝子座 D10S1248 および D12S391 の短縦列反復配列、およびそれから作製したアレリックラダーの検出、同定、および分析のために採用し得る、試薬および手順の代表である。

30

【0063】

サンプルの増幅

実施例 A . アレリックラダーの構築

特定の STR マーカーについての変異の代表である対立遺伝子を有すると同定された個人から血液サンプルを採取し、そして当業者に公知の方法によって、DNA をその血液サンプルから単離する。関心のある遺伝子座のための PCR プライマーによって、関心のある対立遺伝子についての DNA を増幅する。

【0064】

1. 25 μl の PCR 反応物を調製する：

40

DNA 鑄型 (> 1 ng) 10.0 μl

10 × PCR 緩衝液 2.5 μl

2.5 mM MgCl₂ 2.0 μl

5.0 mM dNTP (0.2 mM の各ヌクレオチド 3' リン酸 (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)) 0.10 μl の各 dNTP

プライマー (各 100 ~ 200 ng) 各 1 μM 0.75 μl

AmpliciTaq Gold (登録商標) DNA ポリメラーゼ (1 ユニット / μl)

1.25 μl

水 8.4 μl 。

【0065】

50

プラスミドDNAを鋳型として用いるなら、より少ないDNAを使用し、そしてゲノムDNAを鋳型として用いるなら、より多いDNAを使用する。

【0066】

熱サイクリング条件：

94 / 11分 30サイクル [94 / 15秒、60 / 30秒、72 / 45秒]
 72 / 30分 4 / 維持。全てのPCR産物が全長であり、そして3'アデニル化されていることを保証するために、最後のサイクル後に72における7から30分の伸長を含める。そのPCR産物を、アガロースゲル電気泳動によって確認し、そして次いで製造業者の指示に従って、Topo (登録商標) TA Cloning Reaction Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いてプラスミドにクローニングする。10

【0067】

2. クローニング反応：

【0068】

【表3】

試薬*	ケミカリーコンピテントE.coli	エレクトロコンピテントE. coli
新しいPCR産物	0.5 ~ 4 μl	0.5 ~ 4 μl
塩溶液	1 μl	--
希釈塩溶液	--	1 μl
水	5 μlの全容積まで加える	5 μlの全容積まで加える
TOPO®ベクター	1 μl	1 μl
最終的な容積	6 μl	6 μl

* 終了したら全ての試薬を -20 で保存する。塩溶液および水は、室温または +4 で保存し得る。20

【0069】

反応物をおだやかに混合し、そして室温(22 ~ 23)で5分間インキュベートした。そのクローニング反応は、30秒から30分まで変動し得る。PCR産物の日常的なサブクローニングのために、30秒が十分であり得るが、大きなPCR産物(>1kb)またはPCR産物のプールの場合、反応時間の増加は、より多くのコロニーを生じる。インキュベーション後、その反応物を氷上に置いた、または -20 で保存した。30

【0070】

3. コンピテント細胞を形質転換する

One Shot (登録商標) Mach 1™ T1R ケミカリーコンピテント E. coli 細胞 (Invitrogen) を、ケミカリーコンピテント E. coli のためのクローニング反応を用いて形質転換した。選択プレートは、アンピシリンまたはカナマイシン選択性のいずれかであった。後者は、コロニーを視覚化するために一晩インキュベートすることが必要であった。

【0071】

S.O.C. 培地のバイアルを室温に温め、そして選択プレートを少なくとも30分間37に温めた。40 μlの40mg/ml X-galを、各LBプレートに広げ、そして使用するまで37でインキュベートした。各形質転換のためにOne Shot (登録商標) 細胞の1本のバイアルを解凍し、そして使用するまで氷上に維持した。40

【0072】

One Shot (登録商標) Chemical Transformation のための方法を、販売業者の指示に従って行った。

【0073】

1. One Shot (登録商標) ケミカリーコンピテント E. coli 細胞のバイアルに、2 μlのTOPO (登録商標) クローニング反応物を加え、そしておだやかに混合するが、ピペッティングで混合することは避け、そして氷上で5から30分間インキュベートする。50

【0074】

2. 振とうせずに42で30秒間細胞に熱ショックを与え、そしてすぐに氷に移す。

【0075】

3. 250μlの室温S.O.C.培地を加える。

【0076】

4. チューブにふたを固くしめ、そして37で1時間、水平にチューブを振とうする(200rpm)。

【0077】

5. 水平に振とうした後、各形質転換物からの10~50μlを、前もって温めた選択プレートに広げる。さらに室温で20μlのS.O.C.を加えて、拡散を促進し得る。2つの異なる容積をプレーティングすることは、2つの選択プレートのうち少なくとも1つで、よく広がったコロニーを有することを助ける。

【0078】

6. プレートを37でインキュベートする。アンピシリン選択に関して、青/白スクリーニングによって目に見えるコロニーが8時間後に現れ得、12時間後に青/白スクリーニングを行う。カナマイシン選択のために、プレートを一晩インキュベートする。

【0079】

7. 分析のために、濃青色のコロニーは避けて、約10個の白色または淡青色のコロニーを取る。

【0080】

選択したコロニーを、大量のDNAが必要である場合には一晩培地で増殖させた、そして/または正しい対立遺伝子がクローニングされたことを確認するために、DNA配列決定のために使用した。各対立遺伝子についての高品質のDNAを、プラスミドクローンから単離し、そして増幅した。そのクローン調製(conditional prep)を、遺伝子座の各対立遺伝子に関して繰り返した。その対立遺伝子調製物を定量化し、典型的な濃度は50から350ng/μLの範囲であった。その結果生じた増幅対立遺伝子は、各遺伝子座についてのアレリックラダーの「シード」を形成した。

【0081】

遺伝子座についてのアレリックラダーの合成は、対立遺伝子シードストックからの希釈物のPCR増幅の反復プロセス、各対立遺伝子についてのその結果生じたピークの高さを比較すること、ラダーのために最適なピークの高さを決定すること、および最終的にラダー中の各対立遺伝子に関して等しいピークの高さを得るために希釈度を調整することを含む。アレリックラダーの構築は、当業者に公知であり、そして代表的な方法は、米国特許第5,783,406および7,087,380号において見出しえ、それらはそれぞれアレリックラダーの構築に関して本明細書中で参考として援用される。

【0082】

熱サイクル条件：95/11分、32サイクル(94/20秒、61/2分、72/2分)、60/75分、続いて4/維持。熱サイクリングを、反応容積を100μLに設定し、MAX熱サイクリングモードに設定したApplied Biosystems 9700サーマルサイクラー(Applied Biosystems, Foster City, CA)で行った。

【0083】

試薬の供給業者：

Amplicaq Gold (登録商標) DNAポリメラーゼ、12×250ユニット、Gold BufferおよびMgCl₂溶液付き(P/N 4311820、Applied Biosystems, Foster City, CA)

GeneAmp (登録商標) dNTPブレンド、100mM(N 8080261、Applied Biosystems)

グリコーゲン、イガイ由来、Roche Diagnostics Corp. (P/

10

20

30

40

50

N 1 0 9 0 1 3 9 3 0 0 1)
G e n S c a n ^{T M} 6 0 0 L I Z ^{T M} サイズ標準 (P / N 4 3 6 6 5 8 9 、 A p p l i
e d B i o s y s t e m s)
H i - D i ^{T M} ホルムアミド (P / N 4 3 1 1 3 2 0 、 A p p l i e d B i o s y
s t e m s) 。

(1)

Figure 1:

D12S391 対立遺伝子-14

5'

ACCGGCCGCGAATTGCCCTTCTGGAGCTGCGACACATTCTGCCCTGGAAGTCAGAGCTCCAGGCTCCTGTCTTGACTCTGGACTTAT
ACCAGGGGACTCCAGGTTCTCAGGCCTCCACCTGGATGGATAATTACACCATCAGTTCCCTGGTTTTGGCTTTAGACCTGGACTGAGCCATG
CTCCTAGTGTCCCTGGGCTCCAGCTGCAGATGGACTGTCAAGAGATTTTCAGCCTCCATATCACTTGAGCTAACCTCTAATAAAATCCCCCTCA
TCTGTCTGICGTCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTATCTATCTACCTATGCATCCATTGATCCTGTTGATTCTTCTCTGGAGAA
GCCTTACTAATACAGTCTTTTCATCTCCCTGATATCATTCTCTTCTCACCAGAAGGGCGAATTGTTAACCTGCAGGACTAGTCC
CTTTAGTGAAGGTTAATTCTGAGCTTGGCGTAATCATGGTC 3' (配列番号:6)

D12S391 対立遺伝子-27

5'

AGCGGCCGCAATTGCCCTTCTGGAGCTGCGACACATTCTGCCCTGGAAGTCAGAGCTCCAGGCTCCTGTCTTGACTCTGGACTTAT
ACCAGGGGACTCCAGGTTCTCAGGCCTCCACCTGGATGGATAATTACACCATCAGTTCCCTGGTTTTAACAGGATCAATGGAT**TCATAGGTAGA**
TAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGACAGACAGACAGACAGACAGACAGACAG
ACAGATGAGAGGGGATTIATTAGAGGAATTAGCTCAAGTGATATGGAGGCTGAGAAAATCTCATGACAGTCCATCTGCAAGCTGGAGACCCAGGGACACT
AGGAGCATGGCTCAGTCAGGTCTAAAGCCAGATTCTTCTCTGGAGAACCTTAATAACAGTCTCTTTTCACTTCCCTGATATCATTCTC
TTTCTCTTCAACAGAAGGGCGAATTGTTAACCTGCAGGACTAGTCCTTAGTGAGGGTTAATTCTGAGCTGGCGTAATCATGGTC 3' (配列番号:7)

【配列表】

201351198900001.app

【手續補正書】

【提出日】平成24年8月9日(2012.8.9)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2013511989000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2010/058111
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C12N 15/11(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 15/11; C12Q 1/68		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal), Google, PubMed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2009-0142764 A1 (HENNESSY, L. K. et al.) 04 June 2009 See abstract, paragraphs 62-63, claims 1, 15, 20	1-21,22-36,52-61 ,62-68
A	MICHAEL, D. et al., Characterization of new miniSTR loci to aid analysis of degraded DNA, J. Forensic Sci., January 2005, Vol. 50, No. 1, pp. 43-53 See abstract, table 1	1-21,22-36,52-61 ,62-68
A	CHUNG, U. et al., Population data of nine miniSTR loci in Koreans, Forensic Science International, Vol. 168, No. 2-3, 24 May 2007, pp. e51-e53 See abstract, table 1	1-21,22-36,52-61 ,62-68
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
<p>* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </p>		<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family </p>
Date of the actual completion of the international search 07 SEPTEMBER 2011 (07.09.2011)	Date of mailing of the international search report 07 SEPTEMBER 2011 (07.09.2011)	
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer Park, Jung Min Telephone No. 82-42-481-8291	
		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2010/058111**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Group I. Claims 1-21(partly), 22-36, 52-61(partly), 62-68 are related to allele-7 of D10S1248 as a short tandem repeat marker.

Group II. Claims 1-21(partly), 37-51, 52-61(partly), 69-75 are related to allele-13 of D12S391 as a short tandem repeat marker.

The inventions listed as Groups I-II are not related to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding special technical feature for the following reasons; they are separate inventions with distinct field of search.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-21(partly), 22-36, 52-61(partly), 62-68

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US2010/058111

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2009-0142764 A1	04.06.2009	AU 2008-318554 A1 CA 2704463 A1 CN 101932726 A EP 2055787 A1 JP 2011-501967 A TW 200930818 A WO 2009-059049 A1	07.06.2009 07.06.2009 29.12.2010 06.05.2009 20.01.2011 16.07.2009 07.05.2009

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,R,S,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 グリーン , ロバート

アメリカ合衆国 カリフォルニア 95014 , クパチーノ , ペニンシュラ アベニュー 1
0120

(72)発明者 ムレロ , フリオ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94086 , サニーベール , アジロマー テラス 979
ナンバー7

(72)発明者 ヘネシー , ロリ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94403 , サン マテオ , 29ティーエイチ アベニュー
- 687

(72)発明者 レゲス , ロバート

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94618 , オークランド , ロス ストリート 5831

(72)発明者 チャン , チエン - ウェイ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94002 , ベルモント , カールモント ドライブ 21
70 , アパートメント 2

F ターム(参考) 4B024 AA11 AA20 CA01 CA09 HA11

4B063 QA01 QA18 QQ42 QR32 QR62 QS25 QS34 QX02