

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6412101号
(P6412101)

(45) 発行日 平成30年10月24日(2018.10.24)

(24) 登録日 平成30年10月5日(2018.10.5)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 Q 1/6806 (2018.01)

C 12 Q 1/6806 Z N A Z

C 12 M 1/00 (2006.01)

C 12 M 1/00 A

C 12 N 15/10 (2006.01)

C 12 N 15/10 1 O O Z

請求項の数 20 (全 73 頁)

(21) 出願番号	特願2016-503106 (P2016-503106)
(86) (22) 出願日	平成26年3月14日 (2014.3.14)
(65) 公表番号	特表2016-512694 (P2016-512694A)
(43) 公表日	平成28年5月9日 (2016.5.9)
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/029466
(87) 国際公開番号	W02014/144874
(87) 国際公開日	平成26年9月18日 (2014.9.18)
審査請求日	平成29年3月2日 (2017.3.2)
(31) 優先権主張番号	61/852,358
(32) 優先日	平成25年3月15日 (2013.3.15)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	61/852,357
(32) 優先日	平成25年3月15日 (2013.3.15)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	515179406 アベリノ ラボ ユーエスエー インコ ポレイテッド A v e l l i n o L a b U S A, I n c. アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94 025, メンロー パーク, アダムズ ド ライブ 1505, スイート B-2
(74) 代理人	100090251 弁理士 森田 憲一
(74) 代理人	100139594 弁理士 山口 健次郎
(74) 代理人	100185915 弁理士 長山 弘典

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】アレル検出用ゲノムDNAテンプレートの改良された単離方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

- (A) 基材の先端に付着した被験者からの口腔上皮細胞サンプルを提供する工程と、
 (B) 基材に付着した口腔細胞を45秒間以下で溶解可能な第一溶解溶液中で、前記の上皮細胞が付着した基材の先端を、45秒間以下攪拌させる工程と、
 (C) 前記の第一溶解溶液中での基材の先端の攪拌工程(B)の完了と同時に、前記第一溶解溶液から前記基材を除去する工程と、
 (D) 前記第一溶解溶液から前記基材を除去する工程(C)の後に、前記第一溶解溶液を45±3の温度で45±15分間インキュベーションして第一ゲノムDNAサンプルを提供する工程と
 を含む、一塩基多型検出用ゲノムDNA(gDNA)サンプルの調製方法であって、
 (E) 第一溶解溶液から前記基材を除去する工程(C)の後に、前記基材に付着した口腔細胞を溶解可能な第二溶解溶液中で、前記基材を攪拌させる工程と、
 (F) 前記第二溶解溶液から前記基材を除去する工程と、
 (G) 前記第二溶解溶液から前記基材を除去する工程(F)の後に、前記第二溶解溶液を45±3の温度で45±15分間インキュベーションして第二ゲノムDNAサンプルを提供する工程と
 により一塩基多型検出用の第二DNAサンプルを調製することをさらに含む、前記方法。

【請求項2】

前記第一溶解溶液から前記基材を除去する工程(C)の後、前記基材を凍結する工程(

I) と、

前記基材を搅拌させる工程(E)の前に、前記基材を解凍する工程(J)とをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

基材の先端を搅拌させる工程(E)が、前記第二溶解溶液中に前記基材の先端を浸漬させる工程と前記基材の先端を前記溶解溶液に浸漬させたままで前記基材を回転させる工程とを含む、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

溶解溶液の温度が、基材の先端を搅拌させる工程(E)の間、15 ~ 30 で維持される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項 5】

溶解溶液の温度が、基材の先端を搅拌させる工程(E)の間、18 ~ 25 で維持される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

基材の先端が、第二溶解溶液中で 45 秒間以下搅拌(E)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】

第二溶解溶液が、体積 100 μL ~ 200 μL を有する、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。 20

【請求項 8】

(K) 第一 g DNA 溶液、第二 g DNA 溶液、又は第一 g DNA 溶液及び第二 g DNA 溶液の各々における、温度 45 ± 3 での 45 ± 15 分のインキュベーション工程(D)、(G)、又は(D)及び(G)の各々の後に、第一溶解溶液、第二溶解溶液、又は第一溶解溶液及び第二溶解溶液の両方から、ゲノム DNA を単離する工程をさらに含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

第一 g DNA 溶液、第二 g DNA 溶液、又は第一 g DNA 溶液及び第二 g DNA 溶液の各々が、それぞれ体積 10 μL ~ 200 μL を有する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

(L) 第一 g DNA 溶液のサンプル、第二 g DNA 溶液のサンプル、又は第一 g DNA 溶液のサンプル及び第二 g DNA 溶液のサンプルのリアルタイム PCR 分析により、被験者の DNA のアレルの存在を検出する工程
をさらに含む、請求項 8 又は 9 に記載の方法。 30

【請求項 11】

リアルタイム PCR 分析に使用される、第一 g DNA 溶液のサンプル、第二 g DNA 溶液のサンプル、又は第一 g DNA 溶液のサンプル及び第二 g DNA 溶液のサンプルの各々が、それぞれ体積 2 μL 以下を有する、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

リアルタイム PCR 分析が、

- (1) 二本鎖核酸を変性させる工程と、
 - (2) フォワードプライマー、リバースプライマー、及び各々の前記 g DNA 溶液からのゲノム DNA の検出プローブをアニーリングする工程と、
 - (3) アニーリングされたフォワードプライマー及びアニーリングされたリバースプライマーから第二鎖 DNA を合成する工程と
- を含むステップの 40 サイクルを実施することを含む、請求項 10 又は 11 に記載の方法。
。

【請求項 13】

二本鎖核酸を変性させる工程(1)が、95 ~ 3 秒間のインキュベーションを含む、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

10

20

30

40

50

基材の先端に付着した被験者からの口腔上皮細胞サンプルを提供する工程（A）が、前記基材を被験者の口腔粘膜に接触させる工程を含む、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

基材が、先端が綿である綿棒又はレーヨンである綿棒である、請求項1～14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

基材の先端を攪拌させる工程（B）が、前記第一溶解溶液中に前記基材の先端を浸漬させる工程と前記基材の先端を前記溶解溶液に浸漬させたままで前記基材を回転させる工程とを含む、請求項1～15のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項17】

溶解溶液の温度が、基材の先端を攪拌させる工程（B）の間、15～30で維持される、請求項1～16のいずれか一項に記載の方法。

【請求項18】

溶解溶液の温度が、基材の先端を攪拌させる工程（B）の間、18～25で維持される、請求項1～17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

基材の先端が、第一溶解溶液中で30秒間以下攪拌（B）される、請求項1～18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項20】

第一溶解溶液が、体積100μL～200μLを有する、請求項1～19のいずれか一項に記載の方法。

20

【発明の詳細な説明】

【出願の技術分野】

【0001】

本出願は、一般的に疾患関連の遺伝子アレルの単離及び検出方法に関する。特に、この出願は、アベリノ角膜ジストロフィーに関連するアレルの改良された検出方法に関する。

【0002】

《関連出願に関する相互参照》

本出願は、米国仮出願第61/852,357号（2013年3月15日出願）及び米国仮出願第61/852,358号（2013年3月15日出願）の優先権を主張する。前記出願の両方は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

30

【0003】

《技術分野》

リアルタイムPCRは、実質的に同一の配列を有する核酸配列間の相違を検出するために使用されることができる。示差的に標識された蛍光核酸プローブ、例えば、一方は野生型配列に結合しそして一方は変異体配列に結合するものの使用により、ヒトのゲノムにおける单一ヌクレオチドの変化を迅速かつ確実に検出することができる。この解決力は、一塩基多型（SNP）、すなわち、タンパク質のコード配列及び／又は非コード配列内に見出される单一の塩基変化がヒト疾患と相關している医学的診断に適用されている。

40

【0004】

しかし、リアルタイムPCR分析は、高品質のサンプルの収集及び単離に大きく依存する。質の悪いサンプル収集及び／又は単離は、より長いアッセイ条件及びリアルタイムPCR試薬のより多い使用を必要とし、その両方がコスト増加及び生産性の低下につながる。また、リアルタイムPCRの一塩基多型検出アッセイの失敗は、追加サンプルを収集する必要性をもたらす可能性があり、それは時間と資源においてさらに大きな損失を引き起こす。

【0005】

従って、アッセイの全体的な成功率を向上させる、改良されたサンプル収集及び単離をもたらす方法は、アッセイに必要な試薬を削減し、そして後になってからの追加のサンプ

50

ル収集の必要性を減少し、非常に望ましい。また、サンプル材料のより少ない量でリアルタイムPCR SNP 検出アッセイを実施するための方法もまた、高品質サンプルの収集及び単離に伴う課題を減少させる。

【0006】

角膜ジストロフィーは、最初に患者の角膜の中央に視力障害を呈する、常染色体優性遺伝性疾患であることがある。視力障害は角膜の周辺部に向かって広がり、年齢が上がるにつれて、患者の視力を悪化させる。アベリノ角膜ジストロフィー（果粒状角膜ジストロフィー-2型としても知られている）、果粒状角膜ジストロフィー（1型）、ティール・ベンケ角膜ジストロフィー（Thiel-Behnke corneal dystrophy）、格子状角膜ジストロフィー（Lattice corneal dystrophy）、及びレイス・バックラー角膜ジストロフィー（Reis-bucklers corneal dystrophy）を含む、複数の種類の角膜ジストロフィーの特徴付けがされている。角膜ジストロフィーは、少なくともいくつかのケースでは、IG-H3タンパク質（TGFBIタンパク質、TGFBIp、及びケラトエピセリン（keratoepithelin）としても知られている）をコードするトランスフォーム増殖因子誘導（transforming growth factor beta induced）（TGFBI、TGF-Iとも略される）遺伝子の変異により引き起こされることが知られている。10

【0007】

アベリノ角膜ジストロフィーを患有ヘテロ接合患者は、年齢とともに視力の喪失を増加させており、人生の晩年において重症化する（severe in the later years of life）。20 対照的に、ホモ接合の患者は、症状を見つけることが可能であり、6歳までに視力の損失を完了する。アベリノ角膜ジストロフィーは、角膜ジストロフィーの特殊な種類として1988年頃に最初に認識された。その前は、顆粒状角膜ジストロフィーとして誤分類されがちであった。今日では、アベリノ角膜ジストロフィーは、世界中で最も一般的な間質角膜ジストロフィーの形態であることが知られている。韓国では、アベリノ角膜ジストロフィーは、およそ870人に1人の有病率（prevalence）を有すると考えられている（Lee, J. H. et al., Ophthalmic Epidemiol., 17:160, 2010参照；Holland, E. J. et al., Ophthalmology, 99:1564, 1992; Kennedy, S. M. et al., Br. J. Ophthalmol., 80:489, 1996; Dolmetsch, A. M. et al., Can. J. Ophthalmol., 31:29, 1996; Afshari, N. A. et al., Arch. Ophthalmol., 119:16, 2001; Stewart, H. S. Hum. Mutat., 14:126, 1999も参照）。30

【0008】

これまでに、（例えば、野生型TGFBIアレル1つと変異体TGFBIアレル1つとを有する）ヘテロ接合個体は、レーシック手術後の視力喪失の加速に対して非常に影響を受けやすいことが発見されている。特に、手術2年後の角膜の不透明度（opacity）の増加が、これらの悪性が深刻化している（increasing aggressiveness）患者で確認され、最終的には、視力の完全な喪失をもたらす（Jun, R. M. et al., Ophthalmology, 111:463, 2004）。以前は、目の手術は、レーシック又はエキシマレーザー手術が角膜ジストロフィーを患有患者の視界の混濁（vision blurriness）を取り除くであろうことを期待して行われていた。レーシック手術の仮定の数30万例について、アベリノ角膜ジストロフィーを患っているヘテロ接合患者の最小推定の1/1000に基づくと、300人がその視力を失っているであろう。レーシック手術を受けた患者は、主に生産活動を行っている20歳代、30歳代である。したがって、彼らの視力喪失は、社会と経済との両方に深刻なトラブルを引き起こす。40

【0009】

また、米国では2000年のレーシック手術の承認後、レーシック手術を受けたアベリノ角膜ジストロフィーを患っているアフリカ系アメリカ人の患者が失明することが発見されており、これにより、世界中で多くの同様のケースが発生する可能性があることが推測される。

【0010】

従って、レーシック手術によるアベリノ角膜ジストロフィーの進行を防止するためにア50

ペリノ角膜ジストロフィーの正確な診断が必要とされるが、アベリノ角膜ジストロフィーの診断は、単に角膜混濁の顕微鏡的観察（例えば、細隙灯検査（slit-lamp examination））により行っており、したがって、多くの場合、医師が患者の潜在症状を見落とし、視力喪失をもたらすレーシック手術を実行する。従って、角膜ジストロフィーの迅速かつ正確な遺伝子診断が求められている。

【0011】

アベリノ角膜ジストロフィーの原因であるTGFBI遺伝子における変異検出用DNAチップが開発された（韓国特許公開第10-2007-0076532号公報）。しかし、前記DNAチップを使用するアベリノ角膜ジストロフィーの診断は、不利益なことに、サンプル中のDNAを増幅する工程、DNAチップに増幅したDNAをハイブリダイズする工程、ハイブリダイズされたDNAチップを洗浄する工程、及び肯定的な応答を検出する工程を含む複数工程を必要とし、これらは時間がかかり、そしてエラーの一因となる可能性がある。10

【0012】

前記背景を考慮すると、当該技術分野において必要とされるものは、患者からの生物学的サンプル収集の、これらのサンプルからのゲノムDNA抽出の、そしてそれらからのアベリノ角膜ジストロフィー関連SNPの改良された検出方法である。

【0013】

《概要》

有利には、本開示は、患者からの生物学的サンプル収集の、これらのサンプルからのゲノムDNA抽出の、そしてそれらからのアベリノ角膜ジストロフィー関連SNPの改良された検出方法を提供する。これらの方法は、スループットを向上させ、分析時間を短縮させ、そしてアベリノ角膜ジストロフィー関連SNPを含む、疾患関連SNPの検出に関連する費用を削減する。20

【0014】

いくつかの観点では、本開示は、ヒトの疾患に関連するアレルの改良された検出方法を提供する。以下に記載する方法は、被験者に関する医療情報を得るアッセイの実施に関連する時間と費用とを減少させる。例えば、いくつかの実施態様では、改良された方法は、患者に対して低い費用で、アベリノ角膜ジストロフィーに関連するゲノムマーカーの同日の検出（same-day detection）を可能にする。30

【0015】

いくつかの実施態様では、これらの利点は、アレル検出用に使用されるゲノムサンプルの単離方法を改良することによって提供される。これらの改良された方法は、患者から採取された口腔細胞サンプル（buccal cell sample）からのゲノムDNAの全体の回収率を増加させる。いくつかの実施態様では、これらの改良された収率は、患者の口腔細胞が溶解されることによって実現される。

【0016】

いくつかの実施態様では、以下に記載の方法は、患者のサンプルの再利用を可能にし、ゲノムテストが繰り返される必要がある場合に、追加サンプルを採取する必要性を減少させる。慣例上、ゲノムテストが失敗した際に、被験者は、再テスト用の追加サンプルを提供する必要がある。これは、数日から数週間にかけて、重要なテスト結果の遅延をもたらす可能性がある。有利なことには、本明細書により提供される方法がゲノム核酸の有効性を向上させることから、患者のサンプルを再利用することができ、追加の患者サンプルの収集に関連する貴重な時間及び費用を潜在的に節約する。40

【0017】

いくつかの実施態様では、以下に記載される方法は、検出アッセイの感度を高め、テストに必要なサンプルの量を減少させる。反応ごとに必要なサンプル量の減少は、患者から単離された単一のサンプルに対して行うことができるアッセイ数を増加させ、再テストが必要な場合に患者から再度追加サンプルが収集される必要の可能性を減少させる。サンプルの必要量の減少はまた、各々のアッセイの実施用に必要な試薬の量の減少をもたらす。50

【図面の簡単な説明】**【0018】**

【図1A - 1B】いくつかの実施態様による、疾患に関連するゲノムのアレル検出用の改善された方法100を示す。

【0019】

【図2】いくつかの実施態様による、アベリノ角膜ジストロフィーに関連する一塩基多型のリアルタイムPCR検出用に有用なフォワード及びリバースプライマー対の配列リスト(SEQ_ID_NOS: 1 - 24)を提供している。

【0020】

【図3】いくつかの実施態様による、アベリノ角膜ジストロフィーに関連する一塩基多型のリアルタイムPCR検出用に有用な野生型及び変異型検出プローブ対の配列リスト(SEQ_ID_NOS: 25 - 42)を提供している。 10

【0021】

【図4】アベリノ角膜ジストロフィー関連マーカー検出用の改良されたリアルタイムPCRアッセイ条件の同定のために行った実験結果を示す。

【0022】

【図5】実施例7の表32に示されている、NN(ロット# ALU012-006)についての制御安定性の結果のグラフを提供する。

【0023】

【図6】実施例7の表33に示されている、HN(ロット# ALU912-007)についての制御安定性の結果のグラフを提供する。 20

【0024】

【図7】実施例7の表34に示されている、HH(ロット# ALU912-008)についての制御安定性の結果のグラフを提供する。

【0025】**《詳細な説明》****I . 序論**

疾患関連SNPの検出は、様々な医学的状態の診断及び予後のためにますます重要なツールとなっている。例えば、TGFBI遺伝子のエクソン4における单一ヌクレオチドの変化の存在が、アベリノ角膜ジストロフィーと強く関連している。このSNPのヘテロ接合の個体が、レーシック手術後の視力喪失のリスクが高いことが見出された。レーシックは多くの人々のクオリティオブライフを大きく向上させる医療処置であるが、G/A T G F B I SNPを保有する個体については、失明につながる可能性がある、4~18月の期間にわたる段階的な視力障害の原因となる。視力障害は、より長い又はより短い期間で発生する可能性がある。幸いなことに、スクリーニングにより、レーシック処置を避けるべきである変異を有する個体を同定することができる。 30

【0026】

本開示は、改良された、サンプル単離、調製、及び分析方法の発見に少なくとも部分的に基づいている。いくつかの実施態様では、前記方法は、例えば、アッセイが失敗した又は追加のフォローアップテストを実行する必要がある場合、患者サンプルの再使用を可能にするために提供される。いくつかの実施態様では、これらの改良された方法は、患者の口腔粘膜(buccal membrane)から剥離(sloughed-off)した細胞を保有する基材(substrate)(例えば、レーヨンが先端に付いた(a rayon-tipped)又は綿が先端に付いたアプリケーター(cotton-tipped applicator))を、溶解溶液中で(高温で20分間延長されたインキュベーションよりもむしろ)室温で30~45秒間静かに回転させる工程を含む。次に、前記溶解溶液を45度30分間インキュベートし、溶解性を改善させそしてゲノムサンプルの収率を向上させる。有利には、前記のレーヨンが先端に付いた又は綿が先端に付いたアプリケーターを、その後、再テスト用に使用されるゲノムDNAの再単離用に保存することができる(例えば、凍結又は冷蔵)。 40

【0027】

いくつかの実施態様において、本明細書で提供される改良は、リアルタイム P C R 検出アッセイ用のゲノム D N A テンプレートのより少ない量の使用を通して提供される。いくつかの実施態様では、これは、実施されるリアルタイム P C R のサイクルを増加させること（例えば約 40 サイクル）、及び / 又は 95 % で 3 秒の変性サイクルの時間を用いることにより達成される。有利なことには、必要なサンプル量がこれらの方によって減少することから、リアルタイム P C R に必要な試薬の量もまた減少する。診断アッセイにおいて使用される多くの試薬が特許に守られているので（proprietary）、試薬は高価である可能性がある。使用される試薬の量の減少により、試薬に関連するコストもまた有意に削減することができる。

【 0 0 2 8 】

10

これらの個々の工程の各々を実施するための特定の条件（サンプルハンドリング、インキュベーション温度、反応ボリューム、反応サイクル数、反応サイクル時間、反応サイクル温度）の組み合わせが、本明細書に記載される疾患関連 S N P 、例えば T G F B I 遺伝子のエクソン 4 中に発見されたアベリノ角膜ジストロフィー関連 S N P の検出方法を実施するために使用されることが期待される。

【 0 0 2 9 】

I I . 定義の選択

本明細書中で使用される用語「発明」又は「本発明」は、本発明の特定の実施態様のいずれかに限定することを意図せず、特許請求の範囲及び明細書に記載したように、本発明の任意の及び全ての実施態様に一般に適用される。

20

【 0 0 3 0 】

本明細書で使用される場合、文脈が特に明確に指示しない限りは、単数形「 a 」、「 a n 」及び「 t h e 」は複数の参照（plural references）を含む。したがって、例えば、「方法（ the method ）」の参照は、本開示を読めば当業者に明らかとなるであろう本明細書に記載の種類の方法の 1 つ又は複数、及び / 又は工程を含む。

【 0 0 3 1 】

本明細書で使用される用語「多型」及びその変形は、異なるゲノム又は個体間の、 2 又はそれ以上の選択的なゲノム配列又はアレルの発生を意味する。用語「遺伝子変異」又は「遺伝的変異」及びその変形は、多型を含む。

【 0 0 3 2 】

30

本明細書で使用される用語「一塩基多型」（「 S N P 」）とその変形は、アレル間で変化するヌクレオチドの 1 つの部位を意味する。一塩基多型（ S N P ）は、単一塩基の変化又は点変異であるが、個体間の遺伝的変異をもたらすいわゆる「インデル（ indel ）」変異（ヌクレオチドの挿入又は欠失）を含む。人間の全ての遺伝的変異の約 90 % を構成する S N P は、 3 億塩基のヒトゲノムに沿って 100 ~ 300 塩基毎に発生する。しかし、 S N P は、ウイルスのような他の生物においてははるかに頻繁に発生する可能性がある。 S N P は、ゲノムのコード又は非コード領域において生じる可能性がある。コード領域中の S N P は、タンパク質産物のアミノ酸配列を変更することができ又は変更しないことができる。非コード領域中の S N P は、プロモーター又はプロセシング部位を変更することができ、遺伝子の転写及び / 又はプロセシングに影響を及ぼす可能性がある。個人が関心のあるゲノム領域に特定の S N P を有するかどうかを知ることにより、種々の疾患のための、診断、予防、及び治療用途の開発用の十分な情報を提供することができる。いくつかの実施態様において、本開示は、アベリノ角膜ジストロフィーに関連する T G F B I 遺伝子のエクソン 4 に位置するグアニンからアデニンの S N P の検出に関する。

40

【 0 0 3 3 】

用語「プライマー」及びその変形は、 P C R 反応において D N A 合成の開始点として作用するオリゴヌクレオチドを意味する。プライマーの長さは、通常、約 15 ~ 約 35 ヌクレオチドでありそして標的配列に相補的な領域にハイブリダイズする。

【 0 0 3 4 】

用語「プローブ」及びその変形（例えば、検出プローブ）は、 P C R 反応において標的

50

核酸にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを意味する。標的配列は、分析されるべきである核酸の領域を意味しそして目的の多型部位を含む。

【0035】

特に定義しない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、一般的に、本発明が属する当業者によって理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと類似又は同等の任意の方法及び材料が、本発明の実施又は試験において使用することができますが、方法及び材料の様々な実施態様は、本明細書に具体的に記載されている。

【0036】

I I I . サンプル調製

10

いくつかの実施態様において、本開示は、リアルタイム P C R の一塩基多型検出アッセイで使用されるゲノムサンプルの改良された単離方法を提供する。いくつかの実施態様では、改良された方法 100 は、図 1 A - 1 B で説明されている工程の組み合わせを使用する。

【0037】

いくつかの実施態様では、前記方法は、被験者からの細胞サンプルを提供する工程を含む。いくつかの実施態様において、細胞は、患者の細胞表面を基材上に細胞を可逆的に固定化することが可能な基材に接触させることによって収集される。

【0038】

開示された方法は、様々な細胞型に適用可能である。いくつかの実施態様では、開示された方法で使用するための細胞型としては、上皮細胞、内皮細胞、結合組織細胞、骨格筋細胞、内分泌細胞、心臓細胞、尿路細胞、メラノサイト及びケラチノサイトが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施態様では、細胞は上皮細胞である。いくつかの実施態様では、細胞は白血球である。いくつかの実施態様では、細胞は：血、軟膜、及び唾液の 1 つ以上から得られる。いくつかの実施態様において、細胞は；被膜下血管周囲 (subcapsular-perivascular) (上皮型 1) ; ペール (pale) (上皮型 2) ; 中間 (intermediate) (上皮型 3) ; 暗 (dark) (上皮型 4) ; 未分化 (undifferentiated) (上皮型 5) ; 及び大髓質 (large-medullary) (上皮型 6) である。いくつかの実施態様において、細胞は、口腔上皮細胞 (例えば、口腔内スワップ (buccal swap) を使用して収集された上皮細胞) である。いくつかの実施態様では、開示された方法において使用される細胞のサンプルは、上記の特定の細胞型の任意の組み合わせを含む。

20

【0039】

いくつかの実施態様において、方法は、被験者からの細胞のサンプルを提供する工程 (102、図 1 A) を含む。いくつかの実施態様において、提供される細胞は、口腔上皮細胞である。

【0040】

細胞サンプルは、被験者の細胞の基材への可逆的結合を可能にする様々な方法のいずれかによって収集される。いくつかの実施態様では、基材は、基材に細胞を可逆的に結合するために、対象の細胞を含有するサンプルとの物理的相互作用において用いられる。いくつかの実施態様では、基材に細胞を可逆的に結合するために、被験者の身体との物理的相互作用に直接的に用いられる。いくつかの実施態様では、サンプルは口腔細胞サンプルでありそして口腔細胞のサンプルは、膜から除去される細胞を可逆的に固定化することができる基材を用いて被験者の口腔粘膜 (例えば、頬の内側) に接触させる (104、図 1 A) ことによって収集される。前記実施態様では、綿棒 (swab) は、人の歯のブラッシングに相当する力を用いて被験者の頬の内側に擦り付けられる (例えば、力又は圧力の軽い量)。被験者の細胞が基材に可逆的に結合することを可能にする任意の方法が、開示された方法で使用するために意図される。

40

【0041】

いくつかの実施態様において、サンプルは、有利には、非侵襲的な方法で収集されそして前記サンプル収集はどこでも及びほとんど誰でも達成される。例えば、いくつかの実施

50

態様において、サンプルは、診療所、被験者の自宅、又はレーシック手術が行われている又は行われるべき機関で採取される。いくつかの実施態様では、患者、患者の医師、看護師若しくは医師のアシスタント、又は他の臨床担当者がサンプルを収集する。

【0042】

いくつかの実施態様では、基材は、細胞が可逆的に結合する様々な材料のいずれかで製造されている。典型的な基材は、レーヨン、綿、シリカ、エラストマー、セラック、アンバー、天然若しくは合成ゴム、セルロース、ベークライト(BAKELITE)、ナイロン(NYLON)、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリアクリロニトリル、又は他の材料あるいはこれらの組み合わせから製造されたものを含む。いくつかの実施態様では、基材はレーヨンの先端又は綿の先端を有する綿棒である。

10

【0043】

基材の先端(例えば、レーヨン綿棒又は綿の綿棒の先端部)を、次いで、溶解溶液中で搅拌する(106、図1A)。いくつかの実施態様において、基材の先端部を、約10秒～60秒(1分)、又は約20秒～60秒、約20秒～約45秒、若しくは約20秒～約30秒、約15秒～約60秒、約15秒～約45秒、若しくは約15秒～約30秒、約10秒～約60秒、約10秒～約45秒、約10秒～約30秒、約10秒～約15秒、若しくは約10秒～約20秒溶解溶液中で搅拌する。いくつかの実施態様では、搅拌は、約60秒又は約1分間生じる。いくつかの実施態様では、搅拌は1分未満(例えば、60秒未満)の間生じる。いくつかの実施態様では、搅拌は15秒、20秒、30秒(108、図1A)、45秒、又は60秒間以下生じる。いくつかの実施態様では、搅拌は45秒間以下生じる。いくつかの実施態様では、搅拌は30秒間以下生じる。いくつかの実施態様では、搅拌は20秒間以下生じる。いくつかの実施態様では、搅拌は15秒間以下生じる。しかし、搅拌は、60秒間より長い間実施されることができる(例えば、120秒、180秒、240秒、300秒、600秒等)。

20

【0044】

いくつかの実施態様において、搅拌は、溶解溶液中の基材の任意の移動を含む。いくつかの実施態様では、搅拌は(110、図1A)、溶解溶液中に基材の先端を浸漬する工程及び基材の先端を溶解溶液に浸漬したままで基材を回転させる工程を含む。いくつかの実施態様において、後の時点で及び/又はそれ以降の時間の単離のために口腔細胞の複数が基材に固定されたままであるように、基材の先端(例えば、レーヨン綿棒又は綿の綿棒の先端部)を溶解溶液中で静かに移動させる。溶解溶液中の前記の動きは、いくつかの口腔細胞が溶解溶液中に分散されることを可能にする一方で前記先端部に複数の前記口腔細胞が基材に固定されたままであるような溶解溶液中の基材の渦運動(swirling motions)、左右の動き(side to side motions)、上下の動き(up and down motions)、及び/又は浸漬する動き(dipping motion)、又は任意の他の動きを含む。

30

【0045】

いくつかの実施態様では、搅拌工程は、例えば、室温で例えば、約15～約30(112、図1A)、約18～約28、約18～25、又は約20～約25で実施される。

40

【0046】

搅拌後、基材(例えば、レーヨン綿棒又は綿の綿棒の先端部)は除去され(114、図1A)、そしていくつかの実施態様では、再テスト又はさらなる(異なる又は追加の)テストに備えて後の使用のために貯蔵される。いくつかの実施態様では、基材(例えば、レーヨンの先端又は綿の先端を備えるバッカル綿棒(buccal swab))を容器に入れそして凍結保存する。いくつかの実施態様では、基材(例えば、レーヨンの先端又は綿の先端を備えるバッカル綿棒)を冷蔵する。いくつかの実施態様では、基材は、1つ又はそれ以上の追加の抽出のために未だ有用なままで維持される一方で、様々な温度のいずれか及び様々な時間のいずれかで貯蔵される。

【0047】

いくつかの実施態様では、サンプルを含有する基材は、0週、1週、2週、3週、4週

50

、5週、6週、7週、8週、9週、10週、11週、若しくは12週又はそれ以上の間保存されている。いくつかの実施態様では、サンプルを含有する基材は、0週～12週、1週～12週、2週～12週、3週～12週、4週～12週、5週～12週、6週～12週、7週～12週、8週～12週、9週、10週～12週、又は11週～12週の間貯蔵されている及び／又は貯蔵可能である。いくつかの実施態様では、サンプルを含有する基材は、1、2、3、4、5、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、30、若しくは36月又はそれ以上の間貯蔵される。いくつかの実施態様では、サンプルを含有する基材は、1月～36月、2月～36月、3月～36月、4月～36月、5月～36月、6月～36月、7月～36月、8月～36月、9月～36月、10月～36月、12月～36月、14月～36月、16月～36月、18月～36月の間貯蔵される。いくつかの実施態様では、サンプルを含有する基材は、1月～30月、2月～30月、3月～30月、4月～30月、5月～30月、6月～30月、7月～30月、8月～30月、9月～30月、10月～30月、12月～30月、14月～30月、16月～30月、18月～30月の間貯蔵される。いくつかの実施態様では、サンプルを含有する基材は、1月～24月、2月～24月、3月～24月、4月～24月、5月～24月、6月～24月、7月～24月、8月～24月、9月～24月、10月～24月、12月～24月、14月～24月、16月～24月、18月～24月の間貯蔵される。いくつかの実施態様では、サンプルを含有する基材は、1月～22月、2月～22月、3月～22月、4月～22月、5月～22月、6月～22月、7月～22月、8月～22月、9月～22月、10月～22月、12月～22月、14月～22月、16月～22月、18月～22月の間貯蔵される。いくつかの実施態様では、サンプルを含有する基材は、1月～20月、2月～20月、3月～20月、4月～20月、5月～20月、6月～20月、7月～20月、8月～20月、9月～20月、10月～20月、12月～20月、14月～20月、16月～20月、18月～20月の間貯蔵される。いくつかの実施態様では、サンプルを含有する基材は、1月～18月、2月～18月、3月～18月、4月～18月、5月～18月、6月～18月、7月～18月、8月～18月、9月～18月、10月～18月、12月～18月、14月～18月、16月～18月、又は17月～18月の間貯蔵される。いくつかの実施態様では、サンプルを含有する基材は、1月～12月、2月～12月、3月～12月、4月～12月、5月～12月、6月～12月、7月～12月、8月～12月、9月～12月、10月～12月、又は11月～12月の間貯蔵される。

【0048】

いくつかの実施態様では、サンプルを含有する基材は、約2、約3、約4、約5、約6、約7、又は約8で貯蔵される。いくつかの実施態様では、サンプルを含有する基材は、約2～約8、約3～約8、約4～約8、約5～約8、約6～約8、約7～約8で貯蔵される。いくつかの実施態様では、サンプルを含有する基材は、約-25、約-24、約-23、約-22、約-21、約-20、約-19、約-18、約-17、約-16、又は約-15で貯蔵される。いくつかの実施態様では、サンプルを含有する基材は、約-25～約-15、約-22～約-17、約-20～約-15、又は約-25～約-20で貯蔵される。いくつかの実施態様では、サンプルを含有する基材は、約-90、約-89、約-88、約-87、約-86、約-85、約-84、約-83、約-82、約-81、約-80、約-79、約-78、約-77、約-76、約-75、約-74、約-73、約-72、約-71、約-70、約-69、約-68、約-67、約-66、又は約-65で貯蔵される。いくつかの実施態様では、サンプルを含有する基材は、約-90～約-65、約-85～約-65、約-80～約-65、約-75～約-65、又は約-70～約-65で貯蔵される。いくつかの実施態様では、サンプルを含有する基材は、-90～-65で貯蔵される。

【0049】

いくつかの実施態様では、サンプルを含有する基材は、1回又はそれ以上凍結解凍され

10

20

30

40

50

(例えは、凍結された後、サンプルを含有する基材を解凍し、本発明の方法に使用してそして再凍結する)そして本発明に使用される。いくつかの実施態様では、サンプルを含有する基材は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20又はそれ以上の回数凍結解凍される。いくつかの実施態様では、サンプルを含有する基材は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20又はそれ以上の回数使用される。いくつかの実施態様では、サンプルを含有する基材は、1~20回、2~20回、3~20回、4~20回、5~20回、6~20回、7~20回、8~20回、9~20回、10~20回、11~20回、12~20回、13~20回、14~20回、15~20回、16~20回、17~20回、18~20回、19~20回、5~15回、5~10回、1~10回、又は1~5回凍結解凍される。いくつかの実施態様では、サンプルを含有する基材は、1~20回、2~20回、3~20回、4~20回、5~20回、6~20回、7~20回、8~20回、9~20回、10~20回、11~20回、12~20回、13~20回、14~20回、15~20回、16~20回、17~20回、18~20回、19~20回、5~15回、5~10回、1~10回、又は1~5回使用される。したがって、いくつかの実施態様では、サンプルを含有する基材は、複数回(例えは3回)凍結解凍されそして本発明に使用される。

【0050】

いくつかの実施態様では、サンプルを含有する基材は、室温で又は約15~約30で1週間貯蔵される。いくつかの実施態様では、サンプルを含有する基材は、約2~約8又は約4で約1、2、又は3週間貯蔵される。いくつかの実施態様では、サンプルを含有する基材は、約-25~約-15又は約-20で約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、又は12月の間貯蔵される。いくつかの実施態様では、サンプルを含有する基材は、約-90~約-65又は約-80で約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、又は12月の間貯蔵される。

【0051】

いくつかの実施態様において、基材に付着した口腔細胞を溶解可能な第二溶解溶液中で基材の先端部を搅拌する(122、図1B)。いくつかの実施態様では、第二溶解溶液は、第一溶解溶液と同じである。いくつかの実施態様では、第二溶解溶液は、第一溶解溶液とは異なる。いくつかの実施態様において、基材を凍結保存しそして解凍した後に、基材に付着した口腔細胞を溶解可能な第二溶解溶液中で基材の先端部を搅拌する。いくつかの実施態様では、基材の先端部を溶解溶液中で約45秒間以下搅拌する工程を含む(124、図1B)。いくつかの実施態様では、搅拌は(126、図1B)、第二溶解溶液中に基材の先端を浸漬する工程及び基材の先端を前記溶解溶液に浸漬したままで基材を回転させる工程を含む。いくつかの実施態様では、溶解溶液の温度は、搅拌中約18~30(128、図1B)に維持される。

【0052】

いくつかの実施態様では、基材は第二溶解溶液から除去される(130、図1B)。いくつかの実施態様では、第二溶解溶液は、インキュベートされる。いくつかの実施態様では、第二溶解溶液は、 45 ± 3 の温度で 45 ± 15 分間インキュベートされる(132、図1B)。いくつかの実施態様では、ゲノムDNAが第二溶解溶液から単離される(134、図1B)。いくつかの実施態様では、疾患又は障害に関連するアレルの存在が、単離されたゲノムDNAにおいて検出される。

【0053】

図1Aに示したプロセスのいくつかの特徴は、図1Bに示すプロセスに適用可能である。例えは、図1Aに関して記載したプロセスの様々な条件は、図1(b)に示すプロセス用に使用可能である。簡潔にするために、これらの詳細はここでは繰り返さない。

【0054】

有利に及び驚くべきことに、基材から抽出された細胞数の減少は、個々の細胞からの核酸の抽出物の増加によって相殺されることが見出された。いくつかの実施態様では、増加

10

20

30

40

50

した抽出物は、標準的な慣行 (standard practices) と比較して細胞を長時間インキュベーションすること、標準的な慣行と比較して高い温度で細胞をインキュベーションすること、又はその組み合わせにより達成される。

【0055】

いくつかの実施態様では、細胞の核酸の抽出物の増加は、標準的な慣行と比較して増加させた又はより長い期間の抽出物インキュベーションを実施することにより達成される。いくつかの実施態様では、抽出物インキュベーションは、約45分間、例えば 45 ± 5 、 45 ± 10 、 45 ± 15 、又は 45 ± 20 分間実施される(116、図1A)。いくつかの実施態様においては、抽出物インキュベーションは、約25分～約65分、約30分～約60分、約35分～約55分、約45分～約65分、約45分～約55分、又は約40分～約50分の間実施される。本発明による抽出物インキュベーション時間は、約25分、約30分、約35分、約40分、約45分、約50分、約55分、約60分、又は約65分である。
10

【0056】

いくつかの実施態様では、細胞の核酸の抽出物の増加は、標準的な慣行と比較して増加した又は高い温度の抽出物インキュベーションにより達成される。いくつかの実施態様では、抽出物インキュベーションは、約45、例えば 45 ± 2 、 45 ± 5 、又は 45 ± 10 で実施される(116、図1A)。いくつかの実施態様では、抽出物インキュベーション温度は、約35～約55、約40～約50、又は約43～約47である。いくつかの実施態様では、抽出物インキュベーション温度は、約43、約44、約45、約46、約47、約48、約49、約50、約51、約52、約53、約54、又は約55である。
20

【0057】

いくつかの実施態様では、実質的に少ない数の細胞が基材から次に続く本発明の方法の溶解のために放出される。いくつかの実施態様では、細胞の少なくとも1個、細胞の少なくとも2個、細胞の少なくとも5個、細胞の少なくとも10個、細胞の少なくとも15個、細胞の少なくとも20個、細胞の少なくとも50個、細胞の少なくとも75個、細胞の少なくとも100個、細胞の少なくとも125個、細胞の少なくとも150個、細胞の少なくとも175個、細胞の少なくとも200個、細胞の少なくとも250個、細胞の少なくとも300個、細胞の少なくとも350個、細胞の少なくとも400個、細胞の少なくとも450個、細胞の少なくとも500個、又はそれ以上が攪拌中に基材から放出される。いくつかの実施態様では、純度約0.55～2.00、約0.6～約2.00、約0.7～約2.00、約0.8～約2.00、約0.9～約2.00、約1.0～約2.00、約1.1～約2.00、約1.2～約2.00、約1.3～約2.00、約1.4～約2.00、約1.5～約2.00、約1.6～約2.00、約1.7～約2.00、約1.8～約2.00、又は約1.9～約2.00の核酸約1ng/ μ L～約50ng/ μ L、約1ng/ μ L～約40ng/ μ L、約1ng/ μ L～約30ng/ μ L、約1ng/ μ L～約20ng/ μ L、約1ng/ μ L～約10ng/ μ L、約1ng/ μ L～約5ng/ μ L、約1ng/ μ L～約4ng/ μ L、約1ng/ μ L～約3ng/ μ L、約1ng/ μ L～約2ng/ μ Lが、記載される方法に採用される。いくつかの実施態様では、純度約0.55～2.00の核酸約1ng/ μ L～50ng/ μ Lが、記載される方法に採用される。いくつかの実施態様では、純度約0.55～2.00の核酸約1ng/ μ L～40ng/ μ Lが、記載される方法に採用される。いくつかの実施態様では、純度約0.55～2.00の核酸約1ng/ μ L～30ng/ μ Lが、記載される方法に採用される。いくつかの実施態様では、純度約0.55～2.00の核酸約1ng/ μ L～20ng/ μ Lが、記載される方法に採用される。いくつかの実施態様では、純度約0.55～2.00の核酸約1ng/ μ L～10ng/ μ Lが、記載される方法に採用される。いくつかの実施態様では、純度約0.55～2.00の核酸約1ng/ μ L～5ng/ μ Lが、記載される方法に採用される。いくつかの実施態様では、純度約0.55～2.00の核酸約1ng/ μ L～4ng/ μ Lが、記載される方法に採用される。いくつかの実施態
30
40
50

様では、純度約 0.55 ~ 2.00 の核酸約 1 ng / μ L ~ 3 ng / μ L が、記載される方法に採用される。いくつかの実施態様では、純度約 0.55 ~ 2.00 の核酸約 1 ng / μ L ~ 2 ng / μ L が、記載される方法に採用される。いくつかの実施態様では、純度約 0.55 ~ 2.00 の核酸少なくとも約 1 ng / μ L が、記載される方法に採用される。

【0058】

I V . 溶解溶液

様々な溶解溶液が記載されておりそして当業者に公知である。これらの周知の溶解溶液のうちのいくつかは、本方法に使用することができ、サンプルから核酸を単離する。典型的な溶解溶液は、市販されているもの、例えば IN VITROGEN、QIAGEN、LIFFE TECHNOLOGIES 及び他の製造業者によって販売されているもの、並びに実験室の環境で当業者により生成することができるものが含まれる。溶解バッファもまた十分に記載されており、そして溶解バッファは記載された方法、例えば、Molecular Cloning (three volume set, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012) 及び Current Protocols (Genetics and Genomics; Molecular Biology; 2003-2013) に記載されたもの、を用いた使用を見出すことができ、これらの文献の両方は全ての目的のために参照により本明細書に組み込まれる。

【0059】

細胞溶解は、細胞内の核酸を回収するために一般的に実施される方法である。多くの場合、細胞を溶解溶液、一般に界面活性剤を含むアルカリ溶液と、又は溶菌酵素溶液と接触させる。前記溶解溶液は、典型的には、塩、界面活性剤、及びバッファ、並びに当業者が使用することを理解するであろう他の薬剤を含む。完全な及び / 又は部分的な溶解後、核酸は溶解溶液から回収される。

【0060】

いくつかの実施態様では、細胞は、pH 約 4 ~ 約 10、約 5 ~ 約 9、約 6 ~ 約 8、又は約 7 ~ 約 9 の pH 範囲で水溶液バッファ中で再懸濁される。

【0061】

いくつかの実施態様では、バッファ塩の濃度は約 10 mM ~ 約 200 mM、約 10 mM ~ 約 100 mM、又は約 20 mM ~ 約 80 mM である。

【0062】

いくつかの実施態様では、バッファは、キレート剤、例えば、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 又はエチレングリコール四酢酸 (EGTA) をさらに含む。

【0063】

いくつかの実施態様では、溶解溶液は、細胞からの核酸の放出を支援する他の化合物、例えばこれには限定されないが例としてスクロースを含むポリオール、並びに糖アルコール例えばマルチトール、ソルビトール、キシリトール、エリスリトール、及び / 又はイソマルトをさらに含む。いくつかの実施態様では、ポリオールは、約 2 % ~ 約 15 % w / w、又は約 5 % ~ 約 15 % w / w、又は約 5 % ~ 約 10 % w / w の範囲である。

【0064】

いくつかの実施態様では、溶解溶液は、界面活性剤例えば Triton X-100、SDS、CTAB、X-114、CHAPS、DOC、及び / 又は NP-40 をさらに含むが、これらに限定されない。いくつかの実施態様では、前記の界面活性剤は、約 1 % ~ 約 5 % w / w、約 1 % ~ 約 4 % w / w、又は約 1 % ~ 約 3 % w / w の範囲である。

【0065】

実施態様では、溶解溶液はカオトロープ (chaotropes) 例えば尿素、ドデシル硫酸ナトリウム、及び / 又はチオ尿素をさらに含むがこれらに限定されない。いくつかの実施態様では、カオトロープは、約 0.5 M ~ 8 M、又は約 1 M ~ 約 6 M、約 2 M ~ 約 6 M、又は約 1 M ~ 3 M の範囲の濃度で使用されている。

【0066】

いくつかの実施態様では、溶解溶液は、追加の溶解試薬の 1 種又はそれ以上をさらに含

10

20

30

40

50

み、例えば、溶解試薬は当該分野で周知である。いくつかの実施態様では、溶解試薬は、細胞壁溶解酵素例えばリゾチームを含むが、これには限定されない。いくつかの実施態様において、溶解試薬は、アルカリ性界面活性剤溶液、例えば0.5%ドデシル硫酸ナトリウムを含む0.1水酸化ナトリウム水溶液を含む。

【0067】

いくつかの実施態様では、溶解溶液は水性糖溶液、例えばスクロース溶液及びキレート化剤例えばEDTA例えばSTETバッファをさらに含む。特定の実施態様において、溶解試薬は、細胞懸濁液と所望の2倍の濃度を有する溶解溶液等量とを混合することによって調製される（例えば0.2水酸化ナトリウム、1.0%ドデシル硫酸ナトリウム）。

【0068】

いくつかの実施態様では、所望の程度の溶解が達成された後、溶解溶液と溶解した細胞とを含む混合物を中和又はクエンチ剤と接触させ、溶解試薬が所望の生成物に悪影響を与えないような条件に調整する。いくつかの実施態様では、pHを約5～約9、約6～約8、約5～約7、約6～約7、又は約6.5～7.5に調整し、例えばこれには限定されないが核酸を含む細胞内容物の分解を最小化及び/又は防止する。いくつかの実施態様では、溶解試薬がアルカリ性溶液を含む場合、中和試薬は、酸性バッファ例えばアルカリ金属酢酸塩/酢酸バッファを含む。いくつかの実施態様では、溶解条件例えば温度及び溶解試薬の組成物は、核酸を含むがこれに限定されるものではない所望の生成物の劣化を最小限に抑えながら、溶解が実質的に完了するように選択される。

【0069】

いくつかの実施態様では、第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三、第十四、第十五、又は第二十溶解溶液が本方法に使用される。いくつかの実施態様では、使用される溶解バッファは、約10μL、約20μL、約30μL、約40μL、約50μL、約60μL、約70μL、約80μL、約90μL、約100μL、約120μL、約130μL、約140μL、約150μL、約160μL、約170μL、約180μL、約190μL、約200μL、約220μL、約230μL、約240μL、約250μL、約260μL、約270μL、約280μL、約290μL、約300μL、約320μL、約330μL、約340μL、約350μL、約360μL、約370μL、約380μL、約390μL、約400μL、約500μL、約600μL、約700μL、約800μL、約900μL、又は約1000μLである。いくつかの実施態様では、溶解バッファは、約10μL～約400μL、約20μL～約400μL、約50μL～約300μL、約50μL～約200μL、約50μL～約400μL、約100μL～約400μL、約100μL～約300μL、約100μL～約200μL、約200μL～約500μL、約100μL～約1000μL、約200μL～約1000μL、約300μL～約200μL、約500μL～約1000μL、又は約600μL～約1000μLである。

【0070】

他の公知の及び通常の方法の組み合わせと同様に上記の任意の組み合わせが当業者によって使用ことができ、前記の組合せは、本発明によって意図される。

【0071】

V. 溶解溶液からの核酸の精製

いくつかの実施態様では、例えば、ゲノムDNAを含むがこれに限定されない核酸は、その後の分析を実施する前に、溶解バッファ(118、図1A)から単離される。いくつかの実施態様では、核酸は、追加の分析例えばこれには限定されないがリアルタイムPCR分析を実施する前に、溶解バッファから単離される。少量の核酸の単離に有用な様々な任意の方法が、開示された方法の様々な実施態様によって使用される。これらには、沈殿、ゲルfiltration、密度勾配、及び固相結合が含まれるが、これらに限定されない。前記の方法は、例えば、全ての目的のために本明細書に参照として組み込まれる、Molecular Cloning (three volume set, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012)及びCurrent Protocols (Genetics and Genomics; Molecular Biology; 2003-2013)に記載されている。

10

20

30

40

50

【0072】

核酸の沈殿は、当業者に知られている周知の単離方法である。様々な固相結合法 (solid phase binding methods) もまた、当該技術分野で公知であり、ビーズ、(例えば、シリカ、磁性体)、カラム、膜、又は他の様々な当該技術分野で公知の物理的形態を含む固相結合法を含むがこれらに限定されない。いくつかの実施態様では、開示された方法において使用される固相は、可逆的に核酸と結合する。前記の固相の例は、少なくとも 2 種の固相の混合物であるいわゆる「混合床 (mixed-bed)」固相を含み、各々のそれらは、異なる溶液条件下での核酸の限度容量、そして異なる条件下；例えば、全ての目的のために本明細書にその全体が参照として組み込まれる米国特許出願公開第 2002 / 0001812 号明細書、での核酸を放出する能力及び / 又は限度容量を有する。開示された方法による核酸の固相の親和性は、典型的には、基材への溶質を結合するために使用される多くの手段のいずれかを介してであることができる。前記の手段の例は、イオン性相互作用 (例えば、陰イオン交換クロマトグラフィー) 及び疎水性相互作用 (例えば、逆相クロマトグラフィー)、pH 値の差及び変化、塩の差及び変化 (例えば、濃度変化、カオトロピック塩 / エージェント) が含まれるが、これらに限定されない。pH に基づいた固相の典型的な例は、これには限定されないが IN VITROGEN Charge Switch Normalized Buccal Kit magnetic beads において使用されているものを含み、これは低 pH (< 6.5) で核酸に結合し、そして高 pH (> 8.5) で核酸を放出し、そしてモノ - アミノ - N - アミノエチル (MANAE) は 7.5 より低い pH で核酸と結合し、そして 8 より大きい pH で核酸を放出する。典型的なイオン交換系基材 (ion exchange based substrates) としては、PHARMACIA (Piscataway, N.J.) からの、DEA - SEPHAROSE™、Q - SEPHAROSE™、及び DEAE - SEPHADEX™、Dow Chemical Company (Midland, Mich.) からの DOWEX (登録商標) I、Rohm & Haas (Philadelphia, Pa.) からの AMBERLITE (登録商標) 、Duolite International, Inc. (Cleveland, Ohio) からの DUOLITE (登録商標) 、DIALON TI 及び DIALON TII が含まれるが、これらに限定されない。10 20

【0073】

任意の個々の方法が、単独での又は他の方法と組み合わせた使用が意図され、そして前記の有用な組み合わせは当業者には周知であり、よく理解されている。30

【0074】

V I . 核酸分析

開示された方法は、核酸例えば、ゲノム分析を含む様々な核酸分析のためのゲノム DNA (gDNA) を単離するために使用される。いくつかの実施態様において、本方法は、単離されたゲノム DNA における疾患又は障害に関連するアレルの存在を検出する工程を含む。いくつかの実施態様では、前記の分析は、様々な遺伝的変異の検出を含み、この遺伝的変異は、欠失、挿入、トランジション、及びトランスバージョンが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施態様では、変異は一塩基多型 (SNP) である。40

【0075】

前記の単離された核酸例えばこれには限定されないがゲノム DNA (gDNA) の様々な分析方法は、当該技術分野で公知であり、そして核酸の構成 (nucleic acid compositions) が分析され当業者に公知である様々な方法並びに PCR 法例えばリアルタイム PCR 分析、マイクロアレイ分析、ハイブリダイゼーション分析、及び核酸シーケンス分析を含む。例えば、Molecular Cloning (three volume set, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012) 及び Current Protocols (Genetics and Genomics; Molecular Biology; 2003-2013) 参照。

【0076】

a . リアルタイム PCR

リアルタイム PCR アッセイの設計のために、いくつかの部分は、多くの場合、アンプ50

リコンと頻繁に呼ばれる、プライマーの2つによって挟まれその後増幅されるDNA断片を含み、プライマーの2つ及び検出プローブの1つ又は複数が使用されるべきである。

【0077】

リアルタイムPCRは、配列特異的様式でゲノムのアレルに結合する短いポリヌクレオチド（検出プローブと称する）と結合する蛍光色素の視覚的な放出に依存している。単一ヌクレオチドが異なるリアルタイムPCRプローブは、異なる波長で蛍光を発するプローブの結合及び検出によるリアルタイムPCRアッセイにおいて区別することができる。リアルタイムPCRは、検出用途（診断用途）、定量化用途、及びジェノタイピング用途における使用を見出す。

【0078】

リアルタイムPCR実施のための関連するいくつかの方法は、TaqManプローブ（米国特許第5,210,015号明細書及び米国特許第5,487,972号明細書、並びにLee et al., Nucleic Acids Res. 21:3761-6, 1993）、分子ビーコンプローブ（molecular beacon probes）（米国特許第5,925,517号明細書及び米国特許第6,103,476号明細書、並びにTyagi and Kramer, Nat. Biotechnol. 14:303-8, 1996）、自己プローブ化アンプリコン（self-probing amplicons）（scorpions）（米国特許第6,326,145号明細書、及びWhitcombe et al., Nat. Biotechnol. 17:804-7, 1999）、Amplisensor（Chen et al., Appl. Environ. Microbiol. 64:4210-6, 1998）、Amplifluor（米国特許第6,117,635号明細書、及びNazarenko et al., Nucleic Acids Res. 25:2516-21, 1997）、置換ハイブリダイゼーションプローブ（displacement hybridization probes）（Li et al., Nucleic Acids Res. 30:E5, 2002）、DzyNA-PCR（Todd et al., Clin. Chem. 46:625-30, 2000）、蛍光制限酵素検出（fluorescent restriction enzyme detection）（Cairns et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 318:684-90, 2004）、並びに近接ハイブリダイゼーションプローブ（adjacent hybridization probes）（米国特許第6,174,670号明細書、及びWittwer et al., Biotechniques 22:130-1, 134-8, 1997）に依存するアッセイを含むものが、当該技術分野において公知である。

【0079】

いくつかの例では、リアルタイムPCRは、例えばSNPを含むがこれに限定されるものではない遺伝子変異の様々な検出をもたらすことができる。いくつかの実施態様では、特定の遺伝子候補（gene candidates）におけるSNPの検出は、繫留消光部分（tethered quenching moiety）を使用することによる蛍光分子の分子内消光の使用に基づいて、リアルタイムPCRを用いて行われる。したがって、例示的な実施態様によれば、リアルタイムPCR法はまた、分子ビーコン技術の使用を含む。分子ビーコン技術は、関心のあるDNA標的に結合することによってその蛍光を復元される内部消光蛍光体を用いたヘアピン状分子を利用する（例えば、Kramer, R. et al. Nat. Biotechnol. 14:303-308, 1996参照）。いくつかの実施態様では、蓄積しているPCR産物に対する分子ビーコンプローブの増加された結合は、ゲノムDNAにおけるSNPの存在を特異的に検出するために使用される。

【0080】

多くの適切なジェノタイピング手順の1つは、TaqMan（登録商標）アレル識別アッセイである。このアッセイのいくつかの例では、プローブの5'末端で蛍光レポーター色素によりそしてプローブの3'末端でクエンチャーダイ（quencher dye）により標識されるオリゴヌクレオチドプローブが利用される。インタクトプローブ（intact probe）に対するクエンチャーの近接は、レポーター用の低い蛍光を維持する。PCR反応の間、DNAポリメラーゼの5'ヌクレアーゼ活性がプローブを切断し、そして色素とクエンチャーとを分離する。これは、レポーターの蛍光の増加をもたらす。PCR産物の蓄積は、レポーター色素の蛍光の増加を監視することにより直接的に検出される。プローブが標的にハイブリダイズそしてPCRの間に増幅されている場合にのみ、DNAポリメラーゼの5'ヌクレアーゼ活性が、レポーターとクエンチャーとの間でプローブを切断する。プロ

10

20

30

40

50

ープは、標的 S N P 位置にまたがり (straddle) 、特定の S N P アレルが存在する場合にのみ核酸分子にハイブリダイズするように設計されている。

【 0 0 8 1 】

例として、T G F B I 遺伝子のエクソン 4 に位置するアベリノ角膜ジストロフィー関連 S N P を増幅するために、米国特許出願番号 2 0 1 2 / 0 0 7 7 2 0 0 号に記載されているように、フォワード及びリバースの P C R プライマー対が設計された（図 2 の S E Q I D N O S : 1 ~ 2 4 ）。いくつかの実施態様では、その中に開示されているフォワード及びリバースプライマー対のいずれかが、本明細書で開示されている改良された方法で使用されている。好ましい実施態様では、S E Q I D N O : 1 (フォワード) 及び S E Q I D N O : 2 (リバース) のプライマー対が、本明細書で開示されている改良された方法で使用される。10

【 0 0 8 2 】

T G F B I 遺伝子のエクソン 4 におけるグアニンからアデニンへの変異を検出するためには、米国特許出願番号 2 0 1 2 / 0 0 7 7 2 0 0 号に記載されているように、図 3 に示される S E Q I D N O S : 2 5 ~ 4 2 によるヌクレオチド配列を有する、野生型（「G」）及びアベリノ角膜ジストロフィー関連変異（「A」）検出用に蛍光標識されたリアルタイム P C R プローブ対が設計された。いくつかの実施態様では、野生型及び変異型プローブのいずれかが、本明細書中に開示される改良された方法において使用される。好ましい実施態様では、S E Q I D N O S : 2 5 (野生型) 及び S E Q I D N O S : 2 6 (変異体) の野生型及び変異体プローブ対が、本明細書で提供される改善された方法において使用される。疾患関連アレルから野生型アレルを識別するために、野生型プローブは V I C で標識し、そして変異型プローブは F A M で標識した。相補的な遺伝子断片への結合を促進するようにマイナーグループバイインダー (M G B) をプローブに結合した。20

【 0 0 8 3 】

b . リアルタイム P C R サイクル

リアルタイム P C R 法は、増幅のための方法の一部として、様々な工程又はサイクルを含む。これらのサイクルは、二本鎖核酸を変性させる工程、フォワードプライマー、リバースプライマー、及び標的ゲノム D N A 配列の検出プローブをアニーリングする工程、そしてアニーリングされたフォワードプライマー及びリバースプライマーから第二鎖 D N A を合成（すなわち、複製）する工程を含む。この 3 段階のプロセスは、本明細書ではサイクルと称する。30

【 0 0 8 4 】

いくつかの実施態様では、約 1 0 、 1 5 、 2 0 、 2 5 、 3 0 、 3 5 、 4 0 、 4 5 、 5 0 、 5 5 、 又は 6 0 サイクルが採用される。いくつかの実施態様では、約 1 0 ~ 約 6 0 サイクル、約 2 0 ~ 約 5 0 サイクル、又は約 3 0 ~ 約 4 0 サイクルが採用される。いくつかの実施態様では、4 0 サイクルが採用される。

【 0 0 8 5 】

いくつかの実施態様では、二本鎖核酸の変性工程は、約 1 秒 ~ 約 5 秒、約 2 秒 ~ 約 5 秒、又は約 3 秒 ~ 約 4 秒の間、約 8 0 ~ 1 0 0 、約 8 5 ~ 約 9 9 、約 9 0 ~ 約 9 5 の温度で生じる。いくつかの実施態様では、二本鎖核酸の変性工程は、約 3 秒の間、9 5 の温度で生じる。40

【 0 0 8 6 】

いくつかの実施態様では、フォワードプライマー、リバースプライマー、及び標的ゲノム D N A 配列の検出プローブをアニーリングする工程は、約 1 5 秒 ~ 約 4 5 秒、約 2 0 秒 ~ 約 4 0 秒、約 2 5 秒 ~ 約 3 5 秒の間、約 4 0 ~ 約 8 0 、約 5 0 ~ 約 7 0 、約 5 5 ~ 約 6 5 で生じる。いくつかの実施態様では、フォワードプライマー、リバースプライマー、及び標的ゲノム D N A 配列の検出プローブをアニーリングする工程は、約 3 0 秒の間、約 6 0 で生じる。

【 0 0 8 7 】

いくつかの実施態様では、アニーリングされたフォワードプライマー及びリバースプライ50

マーから第二鎖DNAを合成（すなわち、複製）する工程は、約15秒～約45秒、約20秒～約40秒、約25秒～約35秒の間、約40～約80、約50～約70、約55～約65で生じる。いくつかの実施態様では、フォワードプライマー、リバースプライマー、及び標的ゲノムDNA配列の検出プローブをアニーリングする工程は、約30秒の間、約60で生じる。

【0088】

いくつかの実施態様では、本明細書に記載される方法に従って調製したゲノムDNAサンプルの約1μL、約2μL、約3μL、約4μL、又は約5μLが、30X、35X、40X、45X、50X、又は100XのリアルタイムPCRマスターMixの、約0.05μL、約0.10μL、約0.15μL、約0.20μL、又は約0.25μL以下と組み合わされることが見出された。いくつかの実施態様では、上記のように調製されたゲノムDNAサンプル2μLが、40Xのカスタムジェノタイピングアッセイのわずか0.15μLと組み合わされることが見出された。10

【0089】

例示的な反応が本明細書に記載されているが、当業者は、プローブの設計に基づいて、温度と時間を変更する方法を理解するであろう。また、本方法は、前記の時間及び温度の任意の組み合わせを意図する。

【0090】

c. PCRプライマー及びプライマー設計

いくつかの実施態様において、プライマーは、実験室の設定において試験されそして設計される。いくつかの実施態様において、プライマーは、インシリコ方法(*in silico methods*)に基づいて、コンピュータによって設計される。プライマー配列は、アンプリコン又は増幅される標的核酸配列の配列に基づいている。より短いアンプリコンは、典型的には、より長いアンプリコンと比較して、より効率的に複製しそしてより効率的な増幅につながる。20

【0091】

プライマーの設計において、当業者は、二次構造の考慮事項と同様に設計されるプライマーのGC及びAT含量に基づき（増加されたGC含量は、二次構造の増加をもたらす可能性がある）、融解温度(melting temperature)(T_m ；プライマー標的二重鎖の半分が解離しそして一本鎖になるとされ、そして二本鎖の安定性の指標となる温度； T_m の増加は安定性の増加を示す）を考慮に入れる必要があることを理解するであろう。 T_m は、当該技術分野において公知の様々な方法を用いて計算されそして当業者は前記の様々な T_m の計算方法を容易に理解するであろう；前記方法は例えばこれには限定されないが、[omega.com/techserv/tools/biomath/calc11.htm](http://www.omegabiotech.com/techserv/tools/biomath/calc11.htm)でワールドワイドウェブで使用可能な T_m 計算機のようなオンラインで使用可能なものが含まれる。プライマーの特異性は、Taqポリメラーゼにより伸長する部分である3'末端配列と組み合せたその完全な配列によって定義される。いくつかの実施態様では、3'末端は、誤った増幅産物の偽プライミング(false-priming)及び生成を軽減するために、標的配列のどこにも見られない、固有のヌクレオチド少なくとも5～7個を有していなければならない。フォワード及びリバースプライマーは、典型的には、同様の効率で標的と結合する。いくつかの例では、ツール例えばNCBIBLAST([ncbi.nlm.nih.gov](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov)のワールドワイドウェブ上に位置する)がアラインメントを実行するために使用され、プライマー設計を支援する。3040

【0092】

当業者は、標的核酸配列についてのプライマー設計についての基本、並びに前記の方法に対して広範な教示を持つ様々なリファレンスマニュアル及びテキスト、例えば、Molecular Cloning (three volume set, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012)及びCurrent Protocols (Genetics and Genomics; Molecular Biology; 2003-2013)及びReal-time PCR in Microbiology: From Diagnostics to Characterization (Ian M. MacKay, Caster Academic Press; 2007); primerdigital.com/tools/PrimerAnalyser.htmlのワールドワイドウェブ上で使用可能なプライマーアナライザーツール、及びKalendar R,50

et al. (Genomics, 98(2): 137-144 (2011))を十分に承知しており、これらの全てが全ての目的のために参照により本明細書に組み込まれる。

【0093】

プライマー設計の追加の観点は、プライマーの複雑性 (primer complexity) 又は言語的配列複雑性 (linguistic sequence complexity) である (Kalendar R, et al. (Genomics, 98(2): 137-144 (2011) 参照)。多大な言語的配列複雑性を有しているプライマー (例えばヌクレオチドの配列及び組成) は、典型的にはより有効である。いくつかの実施態様では、言語的配列複雑性の計算方法は、単純反復配列 (simple sequence repeats)、不完全直接又は逆方向反復 (imperfect direct or inverted repeats)、ポリプリン及びポリピリミジン三本鎖 cDNA 構造 (triple-stranded cDNA structures)、及び四本鎖構造 (four-stranded structures) (例えば、G 四重鎖) を含む低複雑領域の検出のために、比較配列間の保存領域を探索するために使用される。いくつかの実施態様では、言語的複雑性 (LC) 測定は、アルファベットキャパシティ L - グラム法 (alphabet-capacity L-gram method) (A. Gabrielian, A. Bolshoy, Computer & Chemistry 23:263-274 (1999) 及び Y.L. Orlov, V.N. Potapov, Complexity: an internet resource for analysis of DNA sequence complexity, Nucleic Acids Res. 32: W628-W633 (2004) 参照) を用いて全長配列に沿って実施され、配列の長さについての期待された値の合計 (E) により除算された、配列における 1 ~ L の大きさの言葉 (word) の観察された範囲 (xi) の合計として計算される。いくつかの G リッチ (及び C リッチ) 核酸配列は、G カルテットのスタックを含有する四本鎖 DNA 構造に折り畳まれる (quadruplex.org でのワールドワイドウェブ参照)。いくつかの例では、これらの四重鎖は、DNA 分子 2 個又は 4 個の分子間集合、G 塩基 2 つを含む配列の二量体化により、又はグアニンの 4 ブロックを含む一本鎖分子間の折り畳みにより形成される (P.S. Ho, PNAS, 91:9549-9553 (1994); I.A. Il'icheva, V.L. Florent'ev, Russian Journal of Molecular Biology 26:512-531 (1992); D. Sen, W. Gilbert, Methods Enzymol. 211:191-199 (1992); P.A. Rachwal, K.R. Fox, Methods 43:291-301 (2007); S. Burge, G.N. Parkinson, P. Hazel, A.K. Todd, K. Neidle, Nucleic Acids Res. 34:5402-5415 (2006); A. Guedin, J. Gros, P. Alberti, J. Mergny, Nucleic Acids Res. 38:7858-7868 (2010); O. Stegle, L. Payet, J.L. Mergny, D.J. MacKay, J.H. Leon, Bioinformatics 25:i374-i382 (2009) 参照)。いくつかの例では、これらは、それらの低言語的複雑性のためにプライマー設計から除外される、(TTAGGG)₄ について LC = 32%。)。

【0094】

これらの方法は、CG 含量及び融解温度に関する、GC スキュー (GC skew)、(G-C)/(G+C)、AT スキュー、(A-T)/(A+T)、CG - AT スキュー、(S-W)/(S+W)、又はプリン - ピリミジン (R-Y)/(R+Y) スキューを有する配列におけるパターン分析用の様々なバイオインフォマティクスツールを含み、そして言語的配列複雑性プロファイルを決定するためのツールを提供する。例えば、n 塩基 (n は正の整数である) のスライディングウィンドウにおける GC スキューは、ウィンドウにおける全配列についての、G がグアニンの総数であり C がシトシンの総数である式 (G-C)/(G+C) に従って、1 塩基のステップを用いて計算される (Y. Benita, et al., Nucleic Acids Res. 31:e99 (2003))。負の GC - スキュー値は C 塩基の過剰を示すのに對し、正の GC - スキュー値は、G 塩基の過剰を示した。同様に、他のスキューが順次算出される。前記の及び他の方法は、いくつかの実施態様では、プライマーの複雑性を決定するために使用される。

【0095】

非限定的な例の実施態様によれば、リアルタイム PCR は、エキソヌクレアーゼプライマー (TaqMan (登録商標) プローブ) を用いて実施される。前記の実施態様では、プライマーは、熱安定性ポリメラーゼ例えば Taq のエキソヌクレアーゼ活性を利用して、增幅反応中に存在する二重標識プローブを切断する (例えば Wittwer, C. et al. Biotechniques 22:130-138, 1997 参照)。PCR 産物と相補的である一方で、このアッセイで

10

20

30

40

50

使用されたプライマープローブは、P C R プライマーとは異なり、そして蛍光可能な分子と蛍光を消光することができる分子との両方で二重標識されている。プローブがインタクトである場合、D N A プローブ内の蛍光シグナルの分子内消光が少ないシグナルをもたらす。蛍光分子が増幅中にT a q のエキソヌクレアーゼ活性によって遊離されると、消光が大幅に減少しそして蛍光シグナルの増加をもたらす。非限定的な例として、蛍光プローブは、6 - カルボキシ - 蛍光部分などが挙げられる。代表的なクエンチャーは、ブラックホールクエンチャー 1 部分 (Black Hole Quencher 1 moiety) などが挙げられる。

【 0 0 9 6 】

様々な P C R プライマーが、本発明の方法における使用を見出すことができる。例示的なプライマーは、本明細書に記載したものを含むがこれらに限定されない。開示された方法における使用のためのプライマーはまた、米国特許出願 2 0 1 2 0 0 7 7 2 0 0 号において見出され、この出願は全ての目的のために参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施態様では、本発明の方法において使用されるための P C R プライマーは、これに限定されるものではないが、以下の表 1 のリストを含み、そして T G F B I 遺伝子の検出における使用を見出す。表 2 及び 3 は、primerdigital.com/tools/PrimerAnalyser.htm でのワールドワイドウェブを使用して掲載されたような、各々のプライマーのための生物物理学的パラメータを提供する。

【表1】

T G F B I 遺伝子用の例示的なプライマー

Primer Name	SEQ ID NO:	Primer Sequence	
ACD Fw primer	SEQ ID NO: 1	5'-TCC ACC ACC ACT CAG CTG TA	10
ACD Re primer	SEQ ID NO: 2	5'-CCA TCT CAG GCC TCA GCT T (60 bp)	
AV Fw primer	SEQ ID NO: 3	5'-TGC AGC CCT ACC ACT CTC AA	
AV Re primer	SEQ ID NO: 4	5'-AGG CCT CGT TGC TAG G (150 bp)	
Real Fw primer	SEQ ID NO: 5	5'-TAG TCT CTT ATT CTA ATA GA	
Real Re primer	SEQ ID NO: 6	5'-GCT GCA GAC TCT GTG TTT AA (860 bp)	
ACD Fw2 primer	SEQ ID NO: 7	5'-CCA TCC CTC CTT CTG TCT TCT G	
ACD Re2 primer	SEQ ID NO: 8	5'-CGG GCC CCT CCA TCT C (140 bp)	
ACD Fw3 primer	SEQ ID NO: 9	5'-CAG AGA AGG GAG GGT GTG GTT	
ACD Re3 primer	SEQ ID NO: 10	5'-GGG CGA AGA TGG TGA AGC T (190 bp)	20
ACD Fw4 primer	SEQ ID NO: 11	5'-TCC TCG TCC TCT CCA CCT GTA	
ACD Re4 primer	SEQ ID NO: 12	5'-AGC TGG CAA GGA GGC CC	
ACD Fw5 primer	SEQ ID NO: 13	5'-TTT GGG CTT TCC CAC ATG C	
ACD Re5 primer	SEQ ID NO: 14	5'-GGC AGA CGG AGG TCA TCT CA	
ACD Fw6 primer	SEQ ID NO: 15	5'-GTA GTA CCG TGC TCT CTG	
ACD Re6 primer	SEQ ID NO: 16	5'-AGT TCC CCA TAA GAA TCC CCC	
ACD Fw7 primer	SEQ ID NO: 17	5'-GGC TGG ACC CCC AGA GG	
ACD Re7 primer	SEQ ID NO: 18	5'-ACC CCT CGG GGA AGT AAG G	
ACD Fw8 primer	SEQ ID NO: 19	5'-AAC CTT TAC GAG ACC CTG GGA	30
ACD Re8 primer	SEQ ID NO: 20	5'-GAC TCC CAT CCA TCA TGC CC	
ACD Fw9 primer	SEQ ID NO: 21	5'-AGT CGT TGG ATC CAC CAC CA	
ACD Re9 primer	SEQ ID NO: 22	5'-GAC GTC ATT TCC TAC TGT TTC AGG	
ACD Fw10 primer	SEQ ID NO: 23	5'-CCC CCC AGA AAC AGC CTG	
ACD Re10 primer	SEQ ID NO: 24	5'-TTC TAA GGG GTT AAG GAG AAA GCT T	40

【表2】

フォワードプライマー用の生物物理学的パラメータ

Forward Primer	長さ	Tm1	Tm2	GC含量	%複雑性	PCR有効性.
SEQ ID NO:1	19	55.4	57.8	57.9	70	70
SEQ ID NO:3	20	57.1	58	55	81	66
SEQ ID NO:5	20	40.2	45.7	25	73	38
SEQ ID NO:7	22	55.9	60.2	54.5	62	43
SEQ ID NO:9	21	57.5	60.2	57.1	64	40
SEQ ID NO:11	21	57.6	60.2	57.1	66	57
SEQ ID NO:13	19	55.4	55.7	52.6	81	80
SEQ ID NO:15	18	50.6	55.3	55.6	75	66
SEQ ID NO:17	17	57.8	62.2	76.5	74	60
SEQ ID NO:19	21	56.6	58.2	52.4	82	73
SEQ ID NO:21	20	57.4	58	55	78	46
SEQ ID NO:23	18	56.5	59.9	66.7	69	69
Avg	19.67	54.96	57.80	56.05	72.69	59.85
Median	20	56.55	58.1	55.3	73.5	63
Std Dev	1.50	5.00	4.24	11.78	6.84	14.10

10

20

【表3】

リバースプライマー用の生物物理学的パラメータ

Reverse Primer	長さ	Tm1	Tm2	GC含量	%複雑性	PCR有効性.
SEQ ID NO:2	19	55.5	57.8	57.9	72	52
SEQ ID NO:4	16	52.1	54.5	62.5	78	78
SEQ ID NO:6	20	52.4	53.9	45	84	41
SEQ ID NO:8	16	55.2	59.6	75	63	53
SEQ ID NO:10	19	56.5	57.8	57.9	78	69
SEQ ID NO:12	17	58.5	59.8	70.6	74	66
SEQ ID NO:14	20	57.6	60.1	60	84	74
SEQ ID NO:16	21	54.9	58.2	52.4	71	51
SEQ ID NO:18	19	56.6	60	63.2	78	60
SEQ ID NO:20	20	56.5	60.1	60	65	65
SEQ ID NO:22	24	55.5	58.7	45.8	88	67
SEQ ID NO:24	25	55.3	57.2	40	74	40
Avg	19.69	55.61	58.13	57.33	76.54	60.69
Median	19.5	55.5	58.45	58.95	76	62.5
Std Dev	2.77	1.86	2.10	10.33	7.52	12.30

30

40

いくつかの実施態様において、開示された方法で使用するためのリアルタイムPCRプライマーは、言語的配列複雑性の少なくとも70%、少なくとも72%、少なくとも75%、少なくとも77%、少なくとも80%、少なくとも82%、少なくとも85%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも97%、又は少なくとも99%を有する。

【0098】

d. 検出プローブ設計及び検出プローブ

様々な検出プローブが開示された発明と一緒にの使用を見出すことができそしてジェノタイピング及び／又は定量化のために用いられる。当業者に一般的に採用される検出プローブは、加水分解プローブ(Taq-Manプローブ、5'ヌクレアーゼプローブ、又は二重標識プローブとしても公知である)、ハイブリダイゼーションプローブ、及びスコーピオンプライマー、(プライマーを組み合わせそして検出プローブは1つの分子内にある)が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施態様では、検出プローブの設計は、プローブが用いられたPCRプライマーと互換性があるように、所望のプローブの標的に基づいて当業者によって決定される(例えば、プライマー及びプローブは、リアルタイムPCRアッセイにおいてお互いの機能を妨害してはならない)。いくつかの実施態様では、プローブは、効果的なシグナルの生成を促進するために、プライマーよりも高いTmを有するように設計される。Tmは、当該技術分野で公知の様々な方法のいずれかを使用して計算され、当業者はTmを計算するための様々な方法を容易に理解するであろう；前記の方法には、オンラインツールで使用可能なものの例えば、promega.com/techserv/tools/biomath/calc11.htmでのワールドワイドウェブで使用可能な計算機が含まれる。いくつかの実施態様では、検出プローブの増加したTmは、プライマーがポリメラーゼによって伸長される前に検出プローブが結合していることを提供する。

【0099】

いくつかの実施態様において、検出プローブは、様々な修飾を含む。いくつかの実施態様では、検出プローブには核酸残基の修飾、例えば2'-O-メチルリボヌクレオチド修飾、ホスホロチオエート骨格修飾、ホスホジチオエート骨格修飾、ホスホロアミデート骨格修飾、メチルホスホネート骨格修飾、3'末端リン酸修飾、及び3'アルキル置換が含まれるが、これらに限定されない。

【0100】

いくつかの実施態様では、検出プローブは、修飾のために、標的配列に対する増加した親和性を有する。前記の検出プローブは、化学修飾を含む検出プローブと同様に、長さが増加した検出プローブを含む。前記の修飾は、2'-フルオロ(2'-デオキシ-2'-フルオロ-ヌクレオシド)修飾、LNA(ロックド核酸)、PNA(ペプチド核酸)、ZNA(ジッパー核酸)、モルホリノ、メチルホスホネート、ホスホロアミド酸、ポリカチオン複合体、及び2'-ピレン修飾を含むがこれらに限定されない。いくつかの実施態様において、検出プローブは、2'フルオロ修飾(別名、2'-デオキシ-2'-フルオロ-ヌクレオシド)、LNA(ロックド核酸)、PNA(ペプチド核酸)、ZNA(ジッパー核酸)、モルホリノ、メチルホスホネート、ホスホロアミド酸、及び／又はポリカチオン複合体を含む修飾の1つ又はそれ以上を含む。

【0101】

いくつかの実施態様において、検出プローブは、検出可能な部分、例えば当業者に公知の任意の検出可能な部分と本明細書で記載したものとを含む。前記の検出可能な部分は、例えば蛍光標識及び化学発光標識を含むがこれらに限定されない。前記の検出可能な部分の例としてはまた、FRET対の群を含むことができる。いくつかの実施態様において、検出プローブは、検出可能な実体(detectable entity)を含んでいる。

【0102】

蛍光標識の例としては、AMCA、DEAC(7-ジエチルアミノクマリン-3-カルボン酸)、7-ヒドロキシ-4-メチルクマリン-3；MCA(7-メトキシクマリン-4-酢酸)；7-メトキシクマリン-3；AMF(4'-(アミノメチル)フルオレセイ

10

20

30

40

50

ン) ; 5 - D T A F (5 - (4 , 6 - ジクロロトリアジニル) アミノフルオレセイン) ; 6 - D T A F (6 - (4 , 6 - ジクロロトリアジニル) アミノフルオレセイン) ; 6 - F A M (6 - カルボキシフルオレセイン) 、 5 (6) - F A M カダベリン ; 5 - F A M カダベリン ; 5 (6) - F A M エチレンジアミン ; 5 - F A M エチレンジアミン ; 5 - F I T C (F I T C 異性体 I ; フルオレセイン - 5 - イソチオシアネート) ; 5 - F I T C カダベリン ; フルオレセイン - 5 - マレイミド ; 5 - I A F (5 - ヨードアセトアミドフルオレセイン) ; 6 - J O E (6 - カルボキシ - 4 ' , 5 ' - ジクロロ - 2 ' , 7 ' - ジメトキシフルオレセイン) ; 5 - C R 1 1 0 - (5 - カルボキシローダミン 1 1 0) ; 6 - C R 1 1 0 - (6 - カルボキシローダミン 1 1 0) ; 5 - C R 6 G (5 - カルボキシローダミン 6 G) ; 6 - C R 6 G (6 - カルボキシローダミン 6 G) ; 5 (6) - カルボキシローダミン 6 G カダベリン ; 5 (6) - カルボキシローダミン 6 G エチレンジアミン ; 5 - R O X (5 - カルボキシ - X - ローダミン) ; 6 - R O X (6 - カルボキシ - X - ローダミン) ; 5 - T A M R A (5 - カルボキシテトラメチルローダミン) ; 6 - T A M R A (6 - カルボキシテトラメチルローダミン) ; 5 - T A M R A カダベリン ; 6 - T A M R A カダベリン ; 5 - T A M R A エチレンジアミン ; 6 - T A M R A エチレンジアミン ; 5 - T M R C 6 マレイミド ; 6 - T M R C 6 マレイミド ; T R C 2 マレイミド ; T R カダベリン ; 5 - T R I T C ; G 異性体 (テトラメチルローダミン - 5 - イソチオシアネート) ; 6 - T R I T C ; R 異性体 (テトラメチルローダミン - 6 - イソチオシアネート) ; ダンシルカダベリン (5 - ジメチルアミノナフタレン - 1 - (N - (5 - アミノペンチル)) スルホンアミド) ; E D A N S C 2 マレイミド ; フルオレスカミン (fluorescamine) ; N B D ; 及びピロメテン (pyrromethene) 並びにそれらの誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。
10

【 0 1 0 3 】

化学発光標識の例は、 Southern Blot and Western Blot protocols (例えれば全体が参照として本明細書に組み込まれる Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (3rd ed.) (2001) 参照) と共に用いられる標識を含むが、これらに限定されない。例としては、 - (2 ' - スピロアダマンタン) - 4 - メトキシ - 4 - (3 " - ホスホリルオキシ) フェニル - 1 , 2 - ジオキセタン (A M P P D) ; アクリジニウムエステル、及びアダマンチル安定化 1 , 2 - ジオキセタン並びにそれらの誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。
20

【 0 1 0 4 】

プローブの標識は、当該技術分野で公知である。標識プローブは、増幅中に増幅された領域内でハイブリダイズするために使用される。プローブは修飾され、増幅用プライマーとして作用することから回避する。検出プローブは蛍光色素の 2 つを用いて標識され、 1 つは、他の色素の蛍光を消光することができるものである。色素の 1 つがプローブの 5 ' 末端に結合され、そして他方は、内部部位に結合されており、プローブは、非ハイブリダイズ状態 (non-hybridized state) にあるときに消光が起こる。
30

【 0 1 0 5 】

典型的には、リアルタイム P C R プローブは、蛍光共鳴エネルギー移動 (F R E T) に関与している染料の対 (レポーター色素とアクセプター色素) から成り、それによってアクセプター色素は、レポーター色素の発光を消光する。一般に、蛍光標識したプローブはアンプリコン定量の特異性を高める。
40

【 0 1 0 6 】

開示された方法のいくつかの実施態様において使用されるリアルタイム P C R はまた、本開示を考慮して、当業者によって決定されるように、ハイブリダイゼーションプローブ (すなわち、検出プローブ) の 1 つ以上の使用を含む。非限定的な例として、前記のハイブリダイゼーションプローブとしては、記載された方法において提供されたものの 1 つ又はそれ以上が含まれるが、これには限定されない。例示的プローブ例えは H E X チャネル (HEX channel) 及び / 又は F A M チャネル (FAM channel) プローブは、当業者により理解される。
50

【0107】

例示的な実施態様によれば、検出プローブ及びプライマーは、好都合には、例えばプライマー設計ソフトウェアを用いたインシリコ分析、並びにNational Center for Biotechnology Information (NCBI) に寄託された遺伝子及びゲノムの利用可能なスクレオチドデータベースに対する相互参照を使用して選択される。いくつかの追加的なガイドラインが、いくつかの実施態様において、プライマー及び／又はプローブの選択のために使用されることができる。例えば、いくつかの実施態様において、プライマー及びプローブは、それらが互いに近くにあるものの重複しないように選択される。いくつかの実施態様において、プライマーは、同じ（又は近いT_M）（例えば、約58 ~ 約60）を有することができる。いくつかの実施態様では、プローブのT_Mは、プライマーのT_Mのために選択されたものよりも約10 高い。いくつかの実施態様では、プローブ及びプライマーの長さは、約17 ~ 39 塩基対などであるように選択される。これら及び他のガイドラインは、適切なプライマー及び／又はプローブを選択する際に、いくつかの場合において当業者により使用されている。10

【0108】

本発明の方法において使用するためのプローブとしては、以下の表4に示す例示的なプローブが含まれるが、これらに限定されない。

【表4】

T G F B I 遺伝子用の例示的なプローブ

Probe Name	SEQ ID NO:	Probe Sequence	
Normal probe 1	SEQ ID NO: 25	VIC-CAC GGA CCG CAC GGA-NFQ (15 bp)	10
Mutant probe 1	SEQ ID NO: 26	FAM-CAC GGA CCA CAC GGA-NFQ	
Normal probe 2	SEQ ID NO: 27	VIC-ACA CGG ACC GCA CG-NFQ	
Mutant probe 2	SEQ ID NO: 28	FAM-ACA CGG ACC ACA CG-NFQ (14 bp)	
Normal probe 3	SEQ ID NO: 29	VIC-TAC ACG GAC CGC A-NFQ	
Mutant probe 3	SEQ ID NO: 30	FAM-TAC ACG GAC CAC A-NFQ (13 bp)	
Normal probe 4	SEQ ID NO: 31	VIC-CTG TAC ACG GAC CGC ACG-NFQ	
Mutant probe 4	SEQ ID NO: 32	FAM-CTG TAC ACG GAC CAC ACG-NFQ (18 bp)	
Normal probe 5	SEQ ID NO: 33	VIC-CTG TAC ACG GAC CGC ACG GAG-NFQ	
Mutant probe 5	SEQ ID NO: 34	FAM-CTG TAC ACG GAC CAC ACG GAG-NFQ (21 bp)	20
Normal probe 6	SEQ ID NO: 35	VIC-GCT GTA CAC GGA CCG CAC GGA GAA-NFQ	
Mutant probe 6	SEQ ID NO: 36	FAM-GCT GTA CAC GGA CCA CAC GGA GAA-NFQ	
Normal probe 7	SEQ ID NO: 37	VIC-ACC GCA CGG AGA AGC-NFQ	
Mutant probe 7	SEQ ID NO: 38	FAM-ACC ACA CGG AGA AGC-NFQ	
Normal probe 8	SEQ ID NO: 39	VIC-ACC GCA CGG AGA AGC TGA GGC-NFQ	
Mutant probe 8	SEQ ID NO: 40	FAM-ACC ACA CGG AGA AGC TGA GGC-NFQ	
Normal probe 9	SEQ ID NO: 41	VIC-ACC GCA CGG AGA AGC TGA GGC CTG-NFQ	
Mutant probe 9	SEQ ID NO: 42	FAM-ACC ACA CGG AGA AGC TGA GGC CTG-NFQ	

【0109】

V I I . 診断テスト

いくつかの実施態様において、診断テストは、様々な変異の検出により遺伝的条件の1つ又はそれ以上を決定するために使用される。いくつかの実施態様において、診断テストは、特定の条件が、例えば物理的な症状、徵候及び／又は症状、並びに家族歴情報に基づいて疑われる場合に、診断を確定するために使用される。いくつかの実施態様では、診断テストの結果は、任意の患者に対する適切な治療計画の決定において医学分野の当業者を支援し、そしてより個人化されさらにより効果的な治療計画を可能にする。いくつかの実施態様において、治療計画は、当業者によって決定されるような、様々な薬剤治療、外科的治療、ライフスタイルの変化、又はそれらの組み合わせのいずれかを含む。

【0110】

開示された方法により得られた核酸は、変異、例えば欠失、挿入、トランスバージョン及びトランジションを検出するためのテストを含む様々な診断テストに有用である。いくつかの実施態様では、前記の診断は、発現されるべき病気のために2コピーを必要とする病気について遺伝子の1コピーを保有する影響を受けていない個体を同定するのに有用であり、遺伝子の1コピーを保有する影響を受けていない個体の同定における情報は、治療

10

20

30

40

50

計画、着床前遺伝子診断、出生前診断検査、新生児スクリーニング、家系DNAテスト（遺伝的系譜目的）、成人発症型障害例えはハンチントン病予測用の前駆症状テスト、成人発症型がん及びアルツハイマー病発症リスク推定用前駆症状テスト、症候性個体の確定診断（confirmational diagnosis of a symptomatic individual）、及び／又は法医学/同一性試験の開発における使用を見出すことができる。いくつかの実施態様では、本方法は、角膜ジストロフィーの検出における例えはTGFBI遺伝子のR124変異（例えはC（G/A）C SNPとも称される、TGFBI遺伝子の第418塩基のGからAへのトランジションにより生じるR124H変異）をもたらすものなどのアベリノ角膜ジストロフィー関連SNPの検出を介した使用を見出す。

【0111】

10

いくつかの実施態様では、新生児スクリーニングは、遺伝的障害を識別するためにのみ使用される任意の出生後遺伝子スクリーニングを含む。いくつかの実施態様では、新生児スクリーニングは、遺伝的疾患の識別における使用を見出し、治療計画が人生の早い段階で決定される。前記のテストとしては、フェニルケトン尿症（phenylketonuria）及び先天性甲状腺機能低下症（congenital hypothyroidism）のために幼児をテストすることが挙げられるが、これらに限定されない。

【0112】

いくつかの実施態様では、保因者テスト（carrier testing）は、遺伝子変異の単一のコピーを保有する人の識別用に使用される。いくつかのケースでは、コピー2つが存在する場合に、変異は遺伝的障害を引き起こす可能性がある。いくつかのケースでは、コピー1つが遺伝病を引き起こすのに十分である。いくつかのケースでは、コピー2つの存在が、特定の治療計画について例えはアベリノ突然変異の存在下で及び外科的処置実行前のスクリーニングで禁忌とされており（contra-indicated）、任意の患者のために追及する適切な治療計画を保証する。いくつかの実施態様では、前記の情報はまた、個々の生殖力検討（contemplating procreation）のために有用でありそして個々の患者に重要なアドバイスを提供する医学分野の当業者を支援するのと同様に個人の詳細な情報を得たうえでの決断（informed decision）を支援する。

20

【0113】

いくつかの実施態様では、テストの予測の及び前駆症状の種類は、様々な障害に関連する遺伝的変異を検出するために使用される。いくつかのケースでは、これらのテストは、遺伝性疾患を持つ家族を有するがテスト時には障害のない特徴を示す可能性がある人に有用である。いくつかの実施態様では、予測テストは、例えは特定の種類のがんを含むがこれには限定されない遺伝的背景を有する障害の発症の機会を増加させる変異を同定する。いくつかの実施態様では、発症前検査は、任意の物理的な徵候や症状が現れる前に、人が、遺伝性疾患を発症するかどうかを決定するのに有用である。予測及び発症前検査テストの結果は、特定の障害を発症する人のリスクに関する情報を提供し、適切な医療処置計画に関する意思決定を行う助けとなる。いくつかの実施態様では、予測テストはまた、アベリノ角膜ジストロフィー存在下での禁忌であるレーザ眼科手術、例えは屈折矯正手術（例えは、LASIK、LASEK、PTK、及びPRK）の実施のような特定の治療計画において禁忌となる変異を検出するために使用される。例えは、アベリノ角膜ジストロフィーを示す患者は、レーザ眼科手術（例えは、LASIK、LASEK、PTK、及びPRK）を受けるべきではない。

30

【0114】

いくつかの実施態様において、診断テストはまた、薬物応答における遺伝的変異の影響を決定する遺伝子テストを含む薬理ゲノミクスを含む。前記の薬理ゲノミクス分析からの情報は、適切な治療計画の決定及び開発における使用が見出される。医学分野の当業者は、適切な治療計画を設計する際の遺伝子変異の存在及び／又は不存在に関する情報を使用する。

【0115】

いくつかの実施態様において、その遺伝子プロファイルが本発明の方法を用いて決定さ

40

50

れる疾患は、角膜ジストロフィー、がん、糖尿病 (diabetes mellitus) 、高血圧症、統合失調症、並びに最も一般的な先天性奇形、例えば口唇裂 (cleft lip) 、口蓋裂 (cleft palate) 、神経管欠陥 (neural tube defects) 、軟骨無形成症 (Achondroplasia) 、
- 1 アンチトリプシン欠損症 (Alpha-1 Antitrypsin Deficiency) 、抗リン脂質症候群 (Antiphospholipid Syndrome) 、自閉症、常染色体優性多発性囊胞腎病 (Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease) 、シャルコー・マリー・トゥース (Charcot-Marie-Tooth) 、大腸癌、猫鳴き症候群 (Cri du chat) 、クローン病、囊胞性線維症 (Cystic fibrosis) 、有痛脂肪症 (Dercum Disease) 、ダウン症、デュアン症候群 (Duane Syndrome) 、デュシェンヌ筋ジストロフィー (Duchenne Muscular Dystrophy) 、第 V 因子ライデン血栓形成 (Factor V Leiden Thrombophilia) 、家族性高コレステロール血症 (Familial Hypercholesterolemia) 、家族性地中海熱 (Familial Mediterranean Fever) 、脆弱 X 症候群 (Fragile X Syndrome) 、ゴーシェ病 (Gaucher Disease) 、ヘモクロマトーシス (Hemochromatosis) 、血友病 (Hemophilia) 、全前脳症 (Holoprosencephaly) 、ハンチントン病、クラインフェルター症候群 (Klinefelter syndrome) 、マルファン症候群 (Marfan syndrome) 、筋緊張性ジストロフィー (Myotonic Dystrophy) 、神経線維腫症 (Neurofibromatosis) 、ヌーナン症候群 (Noonan Syndrome) 、骨形成不全症 (Osteogenesis imperfecta) 、パーキンソン病 (Parkinson's disease) 、フェニルケトン尿症、ポーランド異常 (Poland Anomaly) 、ポルフィリノ症 (Porphyria) 、早老症 (Progeria) 、網膜色素変性症 (Retinitis Pigmentosa) 、重症複合免疫不全 (SCID) (Severe Combined Immunodeficiency) 、鎌状赤血球症 (Sickle cell disease) 、脊髄性筋萎縮症 (Spina Muscular Atrophy) 、ティ・サックス (Tay-Sachs) 、サラセミア (Thalassemia) 、トリメチルアミン尿症 (Trimethylaminuria) 、ターナー症候群 (Turner Syndrome) 、口蓋心顔面症候群 (Velocardiofacial) 、WAGR 症候群 (WAGR Syndrome) 、ウィルソン病 (Wilson Disease) 、並びに遺伝的要素を有するその他の疾患が含まれるがこれらに限定されない。角膜ジストロフィーとしては、アベリノ角膜ジストロフィー、課粒状角膜ジストロフィー (タイプ 2) 、ティール - ベンケ角膜ジストロフィー、格子状角膜ジストロフィー、及びレイス・バックラー角膜ジストロフィーが含まれるが、これらに限定されない。がんとしては、癌腫、肉腫、芽細胞腫、リンパ腫、白血病、及び生殖細胞腫瘍が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施態様では、がんとしては、頭頸部、皮膚、結腸、経口、神経膠芽腫、胸部、喉頭、食道、内皮細胞、子宮内膜、卵巣、肺、泌尿生殖器、直腸、前立腺、腎臓、黒色腫、腎臓、脾臓、消化管、血液、肝臓、子宮、脳、及びウイルス誘導性のがん例えばパピローマウイルス誘発性のものが含まれるが、これらに限定されない。

【 0116 】

いくつかの実施態様では、本方法は、個人の遺伝子プロファイルの決定に使用されたゲノム DNA を提供することにより、個別化医療処置計画の開発における使用を見出す。いくつかの実施態様では、前記の遺伝子プロファイル情報は、治療計画を開発及び / 又は決定するために当業者によって使用される。いくつかの実施態様において、記載された方法により単離された核酸において同定された様々な遺伝的変異及び変異の存在及び / 又は不存在は、個別化医療処置計画又は計画の一部として、当業者によって使用される。例えば、いくつかの実施態様では、開示された方法を用いた情報は、データベース又は他の確立された情報と比較され、特定の疾患の診断を決定する及び / 又は治療計画を決定する。いくつかのケースでは、特定の患者における遺伝子変異の有無に関する情報は、データベース又は他の権威ある情報源と比較され、提案された治療計画に対する決定をする。いくつかの場合において、遺伝子変異の存在は、特定の治療計画を追求することを示す。いくつかのケースでは、遺伝子変異の不存在は、特定の治療計画を追求しないことを示す。

【 0117 】

いくつかの実施態様では、特定の遺伝子変異の存在及び / 又は不存在に関する情報は、治療的実体での治療の治療効果を決定するため、並びに治療的実体での治療のための治療計画を調整するために使用される。いくつかの実施態様では、遺伝子変異の存在及び / 又

は不存在に関する情報は、治療計画を追求するかどうかを決定するために使用される。いくつかの実施態様では、遺伝子変異の存在及び／又は不存在に関する情報は、治療計画を継続するか否かを決定するために使用される。いくつかの実施態様では、遺伝子変異の存在及び／又は不存在は、治療計画を中止するかどうかを決定するために使用される。他の実施態様では、遺伝子変異の存在及び／又は不存在は、治療計画を変更するかどうかを決定するために使用される。いくつかの実施態様では、遺伝子変異の存在及び／又は不存在は、治療計画の一部として投与される治療の投薬量を増加又は減少させるかどうかを決定するために使用される。他の実施態様では、遺伝子変異の存在及び／又は不存在は、治療計画の一部として投与される治療の投与頻度を変更するかどうかを決定するために使用される。いくつかの実施態様では、遺伝子変異の存在及び／又は不存在は、一日当たりの、週当たりの投薬数、治療の一一日当たりの回数を変更するかどうかを決定するために使用される。いくつかの実施態様では、遺伝子変異の存在及び／又は不存在は、治療の投薬量を変更するかどうかを決定するために使用される。いくつかの実施態様において、遺伝子変異の存在及び／又は不存在は、治療計画を開始する前及び／又は治療計画を開始した後に決定される。いくつかの実施態様では、遺伝子変異の存在及び／又は不存在は、遺伝子変異の有無に関する所定の基準情報と比較されそして決定される。

【0118】

いくつかの実施態様では、遺伝子変異の1つ又はそれ以上の存在及び／又は不存在の複合体（composite）は、開示された方法を用いて生成され、前記の複合体は、複数の遺伝子変異の存在及び／又は不存在に関する情報の任意の集合を含む。いくつかの実施態様において、遺伝子変異の2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、20以上、30以上、又は40以上の存在及び／又は不存在が検査され、複合体の生成に使用される。いくつかの実施態様における例示的な情報は、核酸及び／又はタンパク質の遺伝子変異の両方に関する組み合わせの、又は核酸若しくはタンパク質の情報が含まれる。一般に、複合体は、遺伝子変異の存在及び／又は不存在に関する情報を含む。いくつかの実施態様では、前記の複合材料は、所定の基準情報と比較されそして治療計画が、追求、維持、又は中止される。

【0119】

V I I I . 実施例

実施例1：少ないDNA量を用いてシグナルを改善するためのリアルタイムPCR条件

少量の分離されたゲノムDNA及びPCR試薬を用いる場合に改善されたシグナルを提供したリアルタイムPCR条件を確認するために、行われた変性時間及びリアルタイムPCRサイクルの回数を変化させながら実験を行った。簡単に、標準収集慣例に従ってバッカル綿棒で収集したヒト細胞を溶解することによりゲノムサンプルを調製した。前記バッカル綿棒を溶解溶液内で簡単に回転させ（例えば、約30秒間）、後の再使用のために凍結させた。前記バッカル綿棒から回収された細胞を含有する溶解溶液を、以後45で30分間インキュベーションした。インキュベーションの後、製造者の説明書に従ってChargéSwitch（登録商標）磁気ビード・基礎核酸精製（Life Technologies）を用いてゲノムDNAを回収した。バッカル綿棒上に収集された経口上皮細胞からゲノムDNAを回収するために商業的に利用可能なOmega E.Z.N.A.（登録商標）Tissue DNAキットは、収集細胞からゲノムDNAを精製するための特殊なバッファシステムを伴うシリカ膜技術を用いる。

【0120】

アベリノ角膜ジストロフィーと関連した、TGFBI遺伝子内のC(G/A)C一塩基多形(SNP)を検出するように設計されたリアルタイムPCRアッセイを、バッカル細胞から単離されたゲノム材料の減少した体積(2μL)及び前記TGFBI遺伝子のアベリノ角膜ジストロフィーSNP含有領域を增幅するように設計されたフォワード(SEQ ID NO:1)及びリバース(SEQ ID NO:2)プライマー；及び蛍光的にラベリングされた野生型(SEQ ID NO:25)及び突然変異(SEQ ID NO:26)

10

20

30

40

50

) リアルタイム P C R プローブを含有する 4 0 X 濃縮カスタムジェノタイピングアッセイの減少した量 (0 . 1 μ L ~ 0 . 2 μ L) を用いて行った。

【 0 1 2 1 】

A B I 7 5 0 0 F a s t リアルタイム P C R システム (A p p l i e d B i o s y s t e m s) 又は S t e p O n e P l u s リアルタイム P C R システム (A p p l i e d B i o s y s t e m s) のいずれかを用いて、 3 6 ~ 4 0 P C R サイクルでリアルタイム P C R アッセイを行った。各々のサイクルは、 3 又は 5 秒の変性時間を含んでいる。図 4 に示したように、前記反応での 4 0 P C R サイクルの使用は、さらに少量の出発材料を十分に補償した。際立って、標準 5 秒ステップよりさらに短い 3 秒変性時間は、遙かに良くはなくとも、同様に作用した。まとめると、前記結果は、ここで開示された方法がさらに少ない細胞数、減少したレベルのゲノム D N A 、及び減少したリアルタイム P C R 試薬を用いてアベリノ角膜ジストロフィー関連 S N P の効果的な検出を可能とするということを証明している。
10

【 0 1 2 2 】

前記リアルタイム P C R アッセイを変更させることにより、減少した量のゲノム物質 (例えば、 D N A) が使用可能であることが明らかになった。例えば、上述したように調製されたゲノム D N A サンプル 2 μ L は、単に 4 0 X カスタムジェノタイピングアッセイの約 0 . 1 5 μ L と組み合わせ可能であることが明らかになった。いくつかの場合には、これは、前記アッセイで行われた P C R サイクルの回数を約 4 0 まで増加させることにより達成された。前記添加的な P C R サイクルを行うために要求される前記増加した時間は、前記 P C R サイクルの変性時間を約 3 秒に減少させることにより解消された。前記 P C R 反応の変性サイクルは、 9 5 で行われる。前記リアルタイム P C R アッセイは、 S E Q
I D N O : 1 のスクレオチド配列を有するフォワード P C R プライマー及び S E Q I
D N O : 2 のスクレオチド配列を有するリバース P C R プライマーを用いて行われた。前記アッセイで用いられた野生型検出プローブは、 S E Q I D N O : 2 5 のスクレオチド配列を有し、前記アッセイで用いられた変異型検出プローブは、 S E Q I D N O : 2 6 のスクレオチド配列を有している。
20

【 0 1 2 3 】

一塩基多形を検出するための標準手順と比較して、これらの方法は、医学的診断と関連した時間及び費用を減少させた。
30

【 0 1 2 4 】

実施例 2 : 安定性研究プロトコル

この安定性研究プロトコルは開発され、試薬安定性及び凍結融解サイクルに対する試験要件を含んでいる。

【 0 1 2 5 】

A v e l l i n o L a b U S A , I n c . (A v e l l i n o) で (D N A 抽出及びリアルタイム P C R) 試験用に用いられた試薬を、製品安定性を確立するために、この安定性研究で試験した。適切な試薬の有効期限は、実施例 5 - 1 0 に示したような様々な温度条件で安定性試験を通して決定された。

【 0 1 2 6 】

前記試薬に加えて、商業用のバッカル綿棒サンプル及びバッカル綿棒から抽出された D N A に対して安定性試験を行った。凍結融解サイクルを有する適切な保管条件に従ってバッカル綿棒及び D N A の安定性及び性能を確立するために実験を行った。
40

【 0 1 2 7 】

下記の実施例は、試薬、バッカル綿棒、及びバッカル綿棒から抽出された D N A の安定性を試験する工程を略述し、実施例 5 - 1 0 で用いられたプロトコルであった。

【 0 1 2 8 】

試薬

O m e g a E . Z . N . A . T i s s u e D N A キット、 T a q M a n ジェノタイピングマスター・ミックス及びカスタム T a q M a n S N P ジェノタイピングアッセイを含
50

む次の試薬を実施例 5 - 10 で用いた。

【0129】

サンプル

バッカル綿棒及びバッカル綿棒から抽出された DNA を含めて次のサンプルを実施例 5 - 10 で検査した。

【0130】

実施例 5 - 10 で用いられた用語に対する定義は、下記を含む：

R T = 15 ~ 30 に設定された室温

4 の冷蔵庫 = 2 ~ 8 の温度設定

- 20 の冷凍庫 = - 25 ~ - 15 の温度設定

10

- 80 の冷凍庫 = - 90 ~ - 65 の温度設定

バッカル綿棒 = 口腔上皮細胞を収集するために用いられた綿棒（例えば、レーヨン、ナイロン、綿等）

抽出された DNA = 口腔上皮細胞から抽出された DNA

【0131】

前記手順は、下記の試薬及びサンプルを用いた。用いられた試薬は、Omega E. Z. N. A. Tissue DNA キット、TaqMan ジェノタイピングマスター・ミックス及びカスタム TaqMan SNP ジェノタイピングアッセイを含んでいる。用いられたサンプルは、バッカル綿棒及びバッカル綿棒から抽出された DNA を含んでいる。 択一的に、Copan Diagnostics, Inc. により製造された輸送綿棒（transport swab）も用いられた。

20

【表 5】

試薬及び材料の情報

名称	販売者	部分番号	保管条件
Omega E.AZ.N.A. Tissue DNA キット	Omega	101319-018	室温
TaqMan ジェノタイピングマスター・ミックス	Applied Biosystems	4371355	2°C~8°C
カスタム TaqMan SNP ジェノタイピングアッセイ	Applied Biosystems	4332072	-15°C~-25°C
バッカル綿棒	Good Vista Medical and Health Products Co., Ltd.	NA	RT 2°C~8°C -25°C~-15°C -90°C~-65°C
抽出された DNA	NA	NA	2°C~8°C -25°C~-15°C -90°C~-65°C

【0132】

40

手順

安定性試験用のバッカル綿棒及び抽出された DNA

結果としての遺伝子型が易感染性になる時の時間及び条件を決定するために、検査サンプルを安定性について試験した。これらの研究を縦断的に行った。

【0133】

新たに収集されたドナー綿棒をこの研究に用いた。それぞれの条件に対して、異なるサンプル綿棒 3 個を試験した。

【0134】

前記正確性研究からの DNA を集めた。前記綿棒安定性 DNA サンプルに加えて NN 正常遺伝子型 DNA サンプル 70 個があった。1 プレート当たりウェル 20 個を有し、1 ウ

50

エル当たり 100 μL DNA を有するプレート 5 個を調製した。

【0135】

一つのプレートを 4 の冷蔵庫に貯蔵した。一つのプレートを -20 の冷凍庫に貯蔵して凍結させた。全体凍結融解サイクルの回数は 8 であり、3ヶ月の期間にわたった。プレートの一つを前記 -80 の冷凍庫に貯蔵して凍結させた。全体凍結融解サイクルの回数は 10 であり、1 年の期間にわたった。6 ヶ月及び 1 年のデータポイントに対して二つのプレートを -80 の冷凍庫に貯蔵して凍結させた。DNA に対する凍結融解効果を評価するために、前記凍結融解されたプレートと共にこれらのプレートを試験した。

【0136】

0 日後、下記表で記載された様々な温度にサンプルを貯蔵した。それぞれのサンプルを下記表で表示されたデータ収集日に作動させ、凍結融解サイクルを記録した。

【表 6】

バッカル綿棒

保管	データ収集日
4 °C の冷蔵庫	0、1週、2週、3週、4週、6週、8週、10週、12週
室温	0、1週、2週、3週、4週、6週、8週、10週、12週
-20 °C の冷凍庫	0、1週、2週、3週、4週、6週、8週、10週、12週、6ヶ月、8ヶ月、10ヶ月、12ヶ月
-80 °C の冷凍庫	0、1週、2週、3週、4週、6週、8週、10週、12週、6ヶ月、8ヶ月、10ヶ月、12ヶ月

【表 7】

96 - ウェルプレート内で抽出されたDNAサンプル

保管	凍結融解サイクル	データ収集日
4 °C の冷蔵庫	N/A	0、1週、2週、3週、4週、6週、8週、10週、12週
-20 °C の冷凍庫	サイクル 1 ~ 8	0、1週、2週、3週、4週、6週、8週、10週、12週、6ヶ月、8ヶ月、10ヶ月、12ヶ月
-80 °C の冷凍庫	サイクル 1 ~ 10	0、1週、2週、3週、4週、6週、8週、10週、12週、6ヶ月、8ヶ月、10ヶ月、12ヶ月

【0137】

試薬の安定性研究

下記の試薬のそれぞれに対して一つのロットを隔離させた：Omega Tissue DNA キット、TaqMan ジェノタイピングマスター・ミックス及びカスタム TaqMan SNP ジェノタイピングアッセイ。

【0138】

前記バッカル綿棒及び抽出されたDNA安定性試験に対して同じ試薬を用いた。

【0139】

解釈

各々のアレルのリアルタイムPCR結果の評価

それぞれのアレルに対する結果は、確立されたサンプル範囲内に属しなければならない。仮に、いかなる結果でも前記サンプル範囲の外側に属したら、前記研究の特定部分を中断し、前記安定性が前記データポイントにより決定される。

【表8】

隔壁された試薬情報

試薬	ロット回数	保管	体積
Omega Tissue DNA キット -C2719	D33960205241210CN050312	15°C~30°C	1 キット
TaqMan ジェノタイピング マスター・ミックス	1204073	2°C~8°C	3 キット
カスタム TaqMan SNP ジェ ノタイピングアッセイ	P120727-004 D07 P120814-006 H01	-25°C~-15°C	1 キット 1 キット

10

【表9】

コントロール試薬情報

試薬	ロット回数	期待遺伝子型	TaqMan により 確認される
NN コントロール{抽出から PCR 分析まで工 程コントロールとして用いられた正常個体 のバッカル綿棒から分離された、精製された DNA; TGFB1 R124R 正常}	ALU-0912-006	NN 正常	イエス
HN コントロール{公知になった異型個体の 全血サンプルから分離された、精製された DNA ; TGFB1 R124R ヘテロ接合}	ALU-0912-007	HN ヘテロ接合	イエス
HH コントロール{大韓民国ソウル市所在の Bionics Co., Ltd, (ISO0911)によりクローニン グ、精製及び特性化された DNA; TGFB1 R124H ホモ接合}	ALU-0912-008	HH ホモ接合	イエス

20

【0140】

実施例3:

この実施例は、実施例5-10に対して口腔上皮綿棒からのDNA抽出を行う方法に関する手順を提供する。

30

【0141】

手順

試験手順

前処理。12.5mLのシリンジを有するリピーターピペットを用いて、PBS 1.0mLを1.5mLのマイクロ遠心分離チューブに添加した。綿棒をPBS内で回転させ、綿棒を絞って乾燥させた。チューブを13,000 RPMで2分間遠心分離させた。遠心分離しながら、前記カラムを標識し、溶出チューブ2セット及び1.5mLのマイクロ遠心分離チューブ1セットを調製した。ペレットを確認した。上清をピペットで捨てて、いかなるペレットも失わないように注意した。

40

【0142】

DNA抽出。5.0mLのシリンジを有するリピーターピペットを用いて、T L バッファ 200 μLを添加した。再構成されたOBプロテアーゼ 25 μLを添加し、ボルテックスして混合した。加熱ブロック内で 56 (許容可能な温度範囲 50 - 60) で 7 分間インキュベーションした。チューブを約 3 分混合させた。12.5mLのシリンジを有するリピーターピペットを用いて B L バッファ 250 μLを添加した。12.5mLのシリンジを有するリピーターピペットを用いてエタノール 250 μLを添加した。前記チューブをプラスチックホールディングブロック内で 15 回反転させた。混合しながら体積を確認した。250 RPM以下で迅速回転させた。チューブからカラムに内容物をピッティングした。チューブ識別番号が一致するかを確認した。前記カラムを 13,000 RPM

50

で1分間遠心分離させた。前記収集チューブを捨てて、カラムを新たな2mLの収集チューブ内に挿入した。12.5mLのシリングジを有するリピーターピペットを用いてH B バッファ500μLを添加した。13,000 RPMで1分間遠心分離させた。前記収集チューブを捨てて、新たな収集チューブ内に挿入した。12.5mLのシリングジを有するリピーターピペットを用いてDNA洗浄バッファ700μLを添加した。13,000 RPMで1分間遠心分離させ、液体を捨てて、同じ収集チューブ内に再び入れた。12.5mLのシリングジを有するリピーターピペットを用いて二次DNA洗浄バッファ700μLを添加した。13,000 RPMで1分間遠心分離させた。液体を捨てて、チューブを前記収集チューブ内に再び配置した。

【0143】

10

乾燥ステップ。チューブを13,000 RPMで2分間遠心分離させた。収集チューブを捨てて、カラムを1.5mLのマイクロ遠心分離チューブ内に入れ、キャップを開けておいた。加熱ブロック内で56（許容可能な温度範囲50-60）で1分間インキュベーションした。前記1分の最後にエタノールが残っているかどうかを決定するために臭いを嗅いだ。必要であれば、さらにインキュベーションした。5mLのシリングジを有するリピーターピペット（Dial 1）を用いて加熱ブロック内から抜け出るように100μLの蒸留水を添加した。キャップを閉じた。56（許容可能な温度範囲50-60）で2分間インキュベーションした。カラムキャップを閉じて1.5mLの蓋を開けたまま13,000 RPMで1分間遠心沈殿した。カラムを捨てて、マイクロ遠心分離チューブ6個のグループを垂直にチューブラック上に水平に配置した。

20

【0144】

TECAN NanoQuant Infinite M200 PROによるDNA定量。前記溶出液100μLを適宜標識された透明な96-ウェルUVプレートにピッティングする。定量測定値を得るためにTECANシステムを備えた「Magellan」プログラムを用いた。前記TECANシステムは、商業的に利用可能であった（www.tecan.com; Tecan Trading AG, Switzerland参照）。

【0145】

30

DNA濃度及び純度限界値。濃度及び純度限界値を確立した。正確な結果を得ることができる適切な濃度の範囲は、1ng/μL～50ng/μLであり、純度の範囲は、0.55～2.00である。この限界値の外側に属するいかなるサンプルも前記抽出工程から繰り返される必要がある。

【0146】

実施例4：PCR手順

この実施例は、実施例5～10で用いられたリアルタイムPCR手順を提供する。これらの実施例は、Applied Biosystems 7500/7500 FastリアルタイムPCRシステム及びApplied Biosystems StepOne及びStepOnePlusリアルタイムPCRシステムを用いており、これらは、いずれもApplied Biosystems（Life Technologies Corporation, USA）から商業的に利用可能である。

40

【0147】

手順

マスターMix（MM）調製。1.5mLのマイクロ遠心分離チューブ内でMMを調製した。TaqジェノタイピングマスターMixの特定量を添加した。水の特定量を添加した。Primer（40XアッセイMix）の特定量を添加した。フリッキング及び以後の迅速回転により前記MMを混合させた。

【0148】

プレート調製。96-ウェルPCRプレート（適宜標識されている）を支持台上に配置した。自動ピペット又はRainin手動ピペットを用いることによりMM 8.0 μLをそれぞれのウェルに添加した。10 μLの12チャネルマルチチャネルピペットを用いる

50

ことによりサンプル 2 . 0 μ L を適切なウェルに添加した。適切なコントロールを添加した。これらが混合及び遠心沈殿されたことを確認した。正常(N N) 隆性(N T C) ヘテロ接合(H N) ホモ接合(H H) 隆性(N T C) の順に配置した。 P C R プレートを A B I 光学接着フィルムで覆い、前記ウェルの周辺周囲に固定されたことを確認した。プレートを 1 0 0 0 R P M で 1 分間回転させ、泡について確認した。仮に、泡が存在すれば、フリックし、再び回転させた。

【 0 1 4 9 】

機器駆動。使用される P C R 機器、 7 5 0 0 F a s t 又は S t e p O n e P l u s に電源を供給し、使用のために準備させた。サンプルをランした： N N (ポジティブコントロールアレル 1 / アレル 1) ； N T C (ネガティブコントロール) ； H N (ポジティブコントロールアレル 1 / アレル 2) ； H H (アレル 2 / アレル 2) ；及び N T C (ネガティブコントロール) 。次のサイクリングステップを作動させるために設定させた： プレ - P C R 読み取り (ホールディングステップ) 3 0 秒間 6 0 ；ホールディングステップ 1 0 分間 9 5 ；サイクリングステップ 3 秒間 9 5 と 3 0 秒間 6 0 の 3 6 サイクル；及びポスト - P C R 読み取り (ホールディングステップ) 3 0 秒間 6 0 。前記 P C R プレートを前記機器内にローディングし、始動させた。

10

【 0 1 5 0 】

実施例 5 : 0 ~ 6 週時点までの綿棒安定性

この実施例は、例示的な安定性研究データを提供する。前記研究は、試験用に用いられた商業的バッカル綿棒、バッカル綿棒から抽出された D N A 及び様々な試薬の許容可能な安定性を決定するように設計された。

20

【 0 1 5 1 】

バッカル綿棒

表 1 0 で示されたように、バッカル綿棒を本実施例の手順の間、様々な温度で貯蔵した。

【 表 1 0 】

バッカル保管条件

保管	データ収集日
4 °C の冷蔵庫	0 、 1 週、 2 週、 3 週、 4 週、 6 週
室温	0 、 1 週、 2 週、 3 週、 4 週、 6 週
- 2 0 °C の冷凍庫	0 、 1 週、 2 週、 3 週、 4 週、 6 週
- 8 0 °C の冷凍庫	0 、 1 週、 2 週、 3 週、 4 週、 6 週

30

【 0 1 5 2 】

次に、 D N A 抽出前に下記の表 1 1 で示されたように、バッカル綿棒を、様々な温度及び時点で貯蔵及び融解した。示された温度での適切な時間後、バッカル綿棒を融解し、 D N A を前記バッカル綿棒から 9 6 - ウェルプレートフォーマット内で抽出した。

【 表 1 1 】

9 6 - ウェルプレート内で抽出された D N A サンプル

保管	凍結融解サイクル	データ収集日
4 °C の冷蔵庫	N / A	0 、 1 週、 2 週、 3 週、 4 週、 6 週
- 2 0 °C の冷凍庫	サイクル 1 ~ 8	0 、 1 週、 2 週、 3 週、 4 週、 6 週
- 8 0 °C の冷凍庫	サイクル 1 ~ 1 0	0 、 1 週、 2 週、 3 週、 4 週、 6 週

40

【 0 1 5 3 】

結果

最初の 7 個のデータポイントから収集された結果が下記表に要約される。

第 1 週時点

【表 1 2】

0 時点の P C R 結果

サンプルの タイプ	保管条件	機器 (7500 Fast 又は StepOnePlus)	平均アレル 1 (範囲=0.44~ 1.81)	平均アレル 2 (範囲=0.027~ 0.249)	凍結融解 サイクル	合格/不合格
抽出された DNA	4°C	7500 Fast	1.636	0.247	N/A	合格
抽出された DNA	4°C	StepOnePlus	0.985	0.079	N/A	合格
抽出された DNA	-20°C	7500 Fast	1.508	0.216	N/A	合格
抽出された DNA	-20°C	StepOnePlus	0.935	0.077	N/A	合格
抽出された DNA	-80°C	7500 Fast	1.530	0.218	N/A	合格
抽出された DNA	-80°C	StepOnePlus	0.925	0.079	N/A	合格
抽出された DNA	-80°C (6mo)	7500 Fast	1.479	0.197	N/A	合格
抽出された DNA	-80°C (6mo)	StepOnePlus	0.872	0.065	N/A	合格
抽出された DNA	-80°C (1yr)	7500 Fast	1.433	0.180	N/A	合格
抽出された DNA	-80°C (1yr)	StepOnePlus	0.793	0.050	N/A	合格
バッカル 綿棒	全ての 保管条件 に対して	7500 Fast	1.582	0.226	N/A	合格
バッカル 綿棒	全ての 保管条件 に対して	StepOnePlus	0.910	0.087	N/A	合格

10

20

30

【表13】

第1週時点のPCR結果

サンプルの タイプ	保管条件	機器 (7500 Fast 又は StepOnePlus)	平均アレル1 (範囲=0.44~ 1.81)	平均アレル2 (範囲=0.027~ 0.249)	凍結融解 サイクル	合格/不合格
抽出された DNA	4°C	7500 Fast	1.329	0.177	N/A	合格
抽出された DNA	4°C	StepOnePlus	0.881	0.066	N/A	合格
抽出された DNA	-20°C	7500 Fast	1.329	0.186	1	合格
抽出された DNA	-20°C	StepOnePlus	0.852	0.082	1	合格
抽出された DNA	-80°C	7500 Fast	1.515	0.226	1	合格
抽出された DNA	-80°C	StepOnePlus	0.914	0.094	1	合格
バッカル 綿棒	RT	7500 Fast	1.240	0.167	N/A	合格
バッカル 綿棒	RT	StepOnePlus	0.725	0.055	N/A	合格
バッカル 綿棒	4°C	7500 Fast	1.236	0.182	N/A	合格
バッカル 綿棒	4°C	StepOnePlus	0.687	0.052	N/A	合格
バッカル 綿棒	-20°C	7500 Fast	1.040	0.160	N/A	合格
バッカル 綿棒	-20°C	StepOnePlus	0.648	0.040	N/A	合格
バッカル 綿棒	-80°C	7500 Fast	1.407	0.233	N/A	合格
バッカル 綿棒	-80°C	StepOnePlus	0.762	0.066	N/A	合格

【0154】

第1週時点の結論

全ての抽出されたDNA、バッカル綿棒、及び試薬は、第1週についての様々な保管条件で信頼できる結果を出した。従って、全てが前記様々な温度で第1週について適している。

第二週時点

10

20

30

40

【表14】

第2週時点のPCR結果

サンプルの タイプ	保管条件	機器 (7500 Fast 又は StepOnePlus)	平均アレル1 (範囲=0.44~ 1.81)	平均アレル2 (範囲=0.027~ 0.249)	凍結融解 サイクル	合格/不合格
抽出された DNA	4°C	7500 Fast	1.167	0.186	N/A	合格
抽出された DNA	4°C	StepOnePlus	0.877	0.066	N/A	合格
抽出された DNA	-20°C	7500 Fast	1.046	0.154	2	合格
抽出された DNA	-20°C	StepOnePlus	0.789	0.068	2	合格
抽出された DNA	-80°C	7500 Fast	1.165	0.173	2	合格
抽出された DNA	-80°C	StepOnePlus	0.862	0.078	2	合格
バッカル 綿棒	RT	7500 Fast	0.379	0.063	N/A	不合格
バッカル 綿棒	RT	StepOnePlus	0.247	0.010	N/A	不合格
バッカル 綿棒	4°C	7500 Fast	1.424	0.209	N/A	合格
バッカル 綿棒	4°C	StepOnePlus	0.783	0.062	N/A	合格
バッカル 綿棒	-20°C	7500 Fast	1.346	0.189	N/A	合格
バッカル 綿棒	-20°C	StepOnePlus	0.826	0.060	N/A	合格
バッカル 綿棒	-80°C	7500 Fast	1.658	0.247	N/A	合格
バッカル 綿棒	-80°C	StepOnePlus	0.910	0.088	N/A	合格

【0155】

第2週時点の結論

前記室温綿棒は、さらに低い温度で貯蔵されたものより信頼性が低い結果を示した。従って、室温で貯蔵されたバッカル綿棒の安定性は、1週であった。室温で貯蔵されたバッカル綿棒に対して、それ以上の時点を取ることはなかった。

【0156】

全ての抽出されたDNA、バッカル綿棒（前記室温綿棒以外）、及び試薬は、第2週時点に対して様々な保管条件で信頼できる結果を出した。

【0157】

従って、安定性は、様々な冷蔵された温度及びさらに冷たい温度で2週と決定された。

第3週時点

10

20

30

40

【表15】

第3週時点のPCR結果

サンプルの タイプ	保管条件	機器 (7500 Fast 又は StepOnePlus)	平均アレル1 (範囲=0.44~ 1.81)	平均アレル2 (範囲=0.027~ 0.249)	凍結融解 サイクル	合格/不合格
抽出された DNA	4°C	7500 Fast	1.507	0.217	N/A	合格
抽出された DNA	4°C	StepOnePlus	0.816	0.051	N/A	合格
抽出された DNA	-20°C	7500 Fast	1.461	0.204	3	合格
抽出された DNA	-20°C	StepOnePlus	0.840	0.075	3	合格
抽出された DNA	-80°C	7500 Fast	1.502	0.204	3	合格
抽出された DNA	-80°C	StepOnePlus	0.851	0.079	3	合格
バッカル 綿棒	4°C	7500 Fast	1.514	0.233	N/A	合格
バッカル 綿棒	4°C	StepOnePlus	0.847	0.060	N/A	合格
バッカル 綿棒	-20°C	7500 Fast	1.525	0.235	N/A	合格
バッカル 綿棒	-20°C	StepOnePlus	0.943	0.065	N/A	合格
バッカル 綿棒	-80°C	7500 Fast	1.674	0.243	N/A	合格
バッカル 綿棒	-80°C	StepOnePlus	0.967	0.076	N/A	合格

【0158】

第3週時点の結論：

全ての抽出されたDNA、バッカル綿棒（前記室温綿棒以外）、及び試薬は、3週に対して様々な保管条件で信頼できる結果を出した。従って、安定性は、様々な冷蔵された温度及びさらに冷たい温度で3週と決定された。

第4週時点

10

20

30

【表16】

第4週時点のPCR結果：

サンプルの タイプ	保管条件	機器 (7500 Fast 又は StepOnePlus)	平均アレル1 (範囲=0.44~ 1.81)	平均アレル2 (範囲=0.027~ 0.249)	凍結融解 サイクル	合格/不合格
抽出された DNA	4°C	7500 Fast	1.590	0.225	N/A	合格
抽出された DNA	4°C	StepOnePlus	0.914	0.065	N/A	合格
抽出された DNA	-20°C	7500 Fast	1.526	0.206	4	合格
抽出された DNA	-20°C	StepOnePlus	0.894	0.085	4	合格
抽出された DNA	-80°C	7500 Fast	1.551	0.200	4	合格
抽出された DNA	-80°C	StepOnePlus	0.884	0.080	4	合格
バッカル 綿棒	4°C	7500 Fast	1.358	0.202	N/A	合格
バッカル 綿棒	4°C	StepOnePlus	0.713	0.060	N/A	不合格
バッカル 綿棒	-20°C	7500 Fast	1.445	0.199	N/A	合格
バッカル 綿棒	-20°C	StepOnePlus	0.810	0.065	N/A	合格
バッカル 綿棒	-80°C	7500 Fast	1.845	0.290	N/A	合格
バッカル 綿棒	-80°C	StepOnePlus	0.963	0.092	N/A	合格

【0159】

第4週時点の結論：

前記4の温度の綿棒のうちの一つは、信頼できない結果を示した（アレル1は、0.33であった）。従って、4の温度で貯蔵冷蔵されたバッカル綿棒の安定性は、3週と決定された。この部分の研究を中断した。

【0160】

全ての抽出されたDNA、バッカル綿棒（前記4の温度の綿棒以外）、及び試薬は、4週で様々な保管条件で信頼できる結果を出した。従って、安定性は、前記DNA抽出物に対して全ての試験温度で、及び前記バッカル綿棒に対して-20及び-80で4週と決定された。

第6週時点

10

20

30

40

【表17】

第6週時点のPCR結果

サンプルの タイプ	保管条件	機器 (7500 Fast 又は StepOnePlus)	平均アレル1 (範囲=0.44~ 1.81)	平均アレル2 (範囲=0.027~ 0.249)	凍結融解 サイクル	合格/不合格
抽出された DNA	4°C	7500 Fast	1.664	0.229	N/A	合格
抽出された DNA	4°C	StepOnePlus	0.957	0.085	N/A	合格
抽出された DNA	-20°C	7500 Fast	1.407	0.188	5	合格
抽出された DNA	-20°C	StepOnePlus	0.806	0.069	5	合格
抽出された DNA	-80°C	7500 Fast	1.473	0.220	5	合格
抽出された DNA	-80°C	StepOnePlus	0.878	0.073	5	合格
バッカル 綿棒	-20°C	7500 Fast	1.341	0.179	N/A	合格
バッカル 綿棒	-20°C	StepOnePlus	0.732	0.046	N/A	合格
バッカル 綿棒	-80°C	7500 Fast	1.590	0.227	N/A	合格
バッカル 綿棒	-80°C	StepOnePlus	0.913	0.072	N/A	合格

【0161】

第6週時点の結論 :

全ての抽出されたDNA、バッカル綿棒（室温及び4°Cの温度の綿棒以外）、及び試薬は、6週について様々な保管条件で信頼できる結果を出した。従って、安定性は、5凍結/融解サイクルを有する前記DNA抽出物に対して全ての試験温度で、及び前記バッカル綿棒に対して-20°C及び-80°Cで6週と決定された。

【0162】

要約結論

前記一次許容基準は、前記検証研究から確立されたアレル1及びアレル2の範囲であった。アレル1及びアレル2の平均結果を様々な保管温度で計算した。前記データは、次の安定性の主張を検証した：

10

20

30

40

【表 1 8】
安定性情報の要約

材料及び保管条件	安定性	凍結/融解サイクル
4°Cで抽出されたDNA	6週	N/A
-20°Cで抽出されたDNA	6週	5
-80°Cで抽出されたDNA	6週	5
室温でのOmega Tissue DNA キット	6週	N/A
2°C~8°CでのTaqMan ジェノタイピングマスターMix	6週	N/A
-25°C~-15°CでのカスタムTaqMan SNP ジェノタイピングアッセイ	6週	N/A
室温でのバッカル綿棒	1週	N/A
4°Cの温度でのバッカル綿棒	3週	N/A
-20°Cの温度でのバッカル綿棒	6週	N/A
-80°Cの温度でのバッカル綿棒	6週	N/A

10

【0163】**実施例6：8週、10週及び12週での安定性研究**

この実施例は、実施例5での研究から続いた例示的な安定性研究データを提供する。前記研究は、試験用に用いられた商業的バッカル綿棒、バッカル綿棒から抽出されたDNA及び様々な試薬の許容可能な安定性を決定するように設計された。この実施例は、行われた安定性研究の第8週、第10週、及び第12週の間に発生したデータの要約を含む。

20

【0164】**バッカル綿棒**

表19で示されたように、バッカル綿棒を本実施例の手順の間、様々な温度で貯蔵した。

【表 1 9】**保管条件及びデータ収集日**

保管	データ収集日
4°Cの冷蔵庫	8週、10週、12週
室温	8週、10週、12週
-20°Cの冷凍庫	8週、10週、12週
-80°Cの冷凍庫	8週、10週、12週

30

【0165】

バッカル綿棒を、以後、DNA抽出以前に下記の表20で示されたような様々な温度及び時点で貯蔵及び融解した。示された温度での適切な時間後、前記バッカル綿棒を融解し、DNAを96-ウェルプレートフォーマット内で前記バッカル綿棒から抽出した。

【表 2 0】**保管、凍結融解サイクル及びデータ収集日**

40

保管	凍結融解サイクル	データ収集日
4°Cの冷蔵庫	N/A	8週、10週、12週
-20°Cの冷凍庫	サイクル1~8	8週、10週、12週
-80°Cの冷凍庫	サイクル1~10	8週、10週、12週

【0166】**結果**

第8週、第10週、及び第12週のデータポイントからの結果が下記表に要約される。
第8週時点

【表 2 1】

第8週時点のPCR結果

サンプルの タイプ	保管条件	機器 (7500 Fast 又は StepOnePlus)	平均アレル1 (範囲 \geq -2SD 0.44)	平均アレル2 (範囲 \geq -2SD 0.027)	凍結融解 サイクル	合格/不合格
抽出された DNA	4°C	7500 Fast	1.728	0.232	N/A	合格
抽出された DNA	4°C	StepOnePlus	0.888	0.117	N/A	合格
抽出された DNA	-20°C	7500 Fast	1.486	0.234	6	合格
抽出された DNA	-20°C	StepOnePlus	0.668	0.085	6	合格
抽出された DNA	-80°C	7500 Fast	1.721	0.264	6	合格
抽出された DNA	-80°C	StepOnePlus	0.881	0.126	6	合格
バッカル 綿棒	-20°C	7500 Fast	1.277	0.188	N/A	合格
バッカル 綿棒	-20°C	StepOnePlus	0.706	0.041	N/A	合格
バッカル 綿棒	-80°C	7500 Fast	1.296	0.212	N/A	合格
バッカル 綿棒	-80°C	StepOnePlus	0.821	0.036	N/A	合格

【0167】

第8週時点の結論 :

全ての抽出されたDNA、バッカル綿棒（室温及び4°Cの温度の綿棒以外）及び試薬は、8週について前記様々な保管条件で信頼できる結果を出した。従って、安定性は、6凍結／融解サイクルを有する前記DNA抽出物に対して全ての試験温度で、及び前記バッカル綿棒に対して-20°C及び-80°Cで8週と決定された。

第10週時点

10

20

30

【表22】

第10週時点のPCR結果

サンプルの タイプ	保管条件	機器 (7500 Fast 又は StepOnePlus)	平均アレル1 (範囲 \geq -2SD 0.44)	平均アレル2 (範囲 \geq -2SD 0.027)	凍結融解 サイクル	合格/不合格
抽出された DNA	4°C	7500 Fast	1.650	0.248	N/A	合格
抽出された DNA	4°C	StepOnePlus	0.958	0.079	N/A	合格
抽出された DNA	-20°C	7500 Fast	1.603	0.237	7	合格
抽出された DNA	-20°C	StepOnePlus	0.915	0.104	7	合格
抽出された DNA	-80°C	7500 Fast	1.650	0.248	7	合格
抽出された DNA	-80°C	StepOnePlus	0.957	0.104	7	合格
バッカル 綿棒	-20°C	7500 Fast	1.546	0.254	N/A	合格
バッカル 綿棒	-20°C	StepOnePlus	0.858	0.066	N/A	合格
バッカル 綿棒	-80°C	7500 Fast	1.447	0.233	N/A	合格
バッカル 綿棒	-80°C	StepOnePlus	0.880	0.067	N/A	合格

【0168】

第10週時点の結論：

全ての抽出されたDNA、バッカル綿棒（室温及び4°Cの温度の綿棒以外）及び試薬は、10週について前記様々な保管条件で信頼できる結果を出した。従って、安定性は、7凍結／融解サイクルを有する前記DNA抽出物に対して全ての試験温度で、及び前記バッカル綿棒に対して-20°C及び-80°Cで10週までと決定された。

第12週時点

10

20

30

【表23】

第12週時点のPCR結果

サンプルの タイプ	保管条件	機器 (7500 Fast 又は StepOnePlus)	平均アレル1 (範囲 \geq -2SD 0.44)	平均アレル2 (範囲 \geq -2SD 0.027)	凍結融解 サイクル	合格/不合格
抽出された DNA	4°C	7500 Fast	1.681	0.246	N/A	合格
抽出された DNA	4°C	StepOnePlus	0.981	0.089	N/A	合格
抽出された DNA	-20°C	7500 Fast	1.623	0.243	8	合格
抽出された DNA	-20°C	StepOnePlus	0.949	0.094	8	合格
抽出された DNA	-80°C	7500 Fast	1.724	0.246	8	合格
抽出された DNA	-80°C	StepOnePlus	1.015	0.107	8	合格
バッカル 綿棒	-20°C	7500 Fast	1.218	0.154	N/A	合格
バッカル 綿棒	-20°C	StepOnePlus	0.721	0.053	N/A	合格
バッカル 綿棒	-80°C	7500 Fast	1.456	0.185	N/A	合格
バッカル 綿棒	-80°C	StepOnePlus	0.918	0.075	N/A	合格

【0169】

第12週時点の結論：

全ての抽出されたDNA、バッカル綿棒（室温及び4°Cの温度の綿棒以外）及び試薬は、12週について前記様々な保管条件で信頼できる結果を出した。従って、安定性は、8凍結／融解サイクルを有する前記DNA抽出物に対して全ての試験温度で、及び前記バッカル綿棒に対して-20°C及び-80°Cで12週までと決定された。

【0170】

結論

アレル1及びアレル2に対する平均結果を様々な保管温度で計算した。前記データは、次の安定性の主張を検証した：

10

20

30

【表 2 4】

材料及び保管条件

材料及び保管条件	安定性	凍結/融解サイクル
4°Cで抽出されたDNA	12週	N/A
-20°Cで抽出されたDNA	12週	8
-80°Cで抽出されたDNA	12週	8
室温でのOmega Tissue DNA キット	12週	N/A
2°C~8°CでのTaqMan ジェノタイピングマスターMix	12週	N/A
-25°C~-15°CでのカスタムTaqMan SNP ジェノタイピングアッセイ	12週	N/A
室温でのバッカル綿棒	1週	N/A
4°Cの温度でのバッカル綿棒	3週	N/A
-20°Cの温度でのバッカル綿棒	12週	N/A
-80°Cの温度でのバッカル綿棒	12週	N/A

10

【0171】

実施例7：6ヶ月での安定性研究；0ヶ月及び6ヶ月でのコントロール

この実施例で記述された研究は、試験用に用いられた商業的バッカル綿棒、バッカル綿棒から抽出されたDNA、様々な試薬、及びコントロールの許容可能な安定性を決定するように設計された。この実施例は、実施例5及び6から続いた、6ヶ月で生成された安定性データの要約を含む。この報告書は、第0日～6ヶ月で生成されたコントロール安定性データの要約もまた含む。

20

バッカル綿棒

【表 2 5】

保管条件及び収集日

保管	データ収集日
4°Cの冷蔵庫	6ヶ月
室温	6ヶ月
-20°Cの冷凍庫	6ヶ月
-80°Cの冷凍庫	6ヶ月

30

【表 2 6】

9.6 - ウエルプレート内で抽出されたDNAサンプル

保管	凍結融解サイクル	データ収集日
4°Cの冷蔵庫	N/A	6ヶ月
-20°Cの冷凍庫	サイクル1～10	6ヶ月
-80°Cの冷凍庫	サイクル1～10	6ヶ月

40

隔離された試薬を前記バッカル綿棒及び抽出されたDNA安定性試験に用いた。この研究の末期に、前記並んでいる試薬の使用に対する有効期限を確立した。

【0172】

結果

6ヶ月データポイントからの結果が下記表に要約される。

6ヶ月時点

【表27】

月時点試薬ロット情報

試薬	ロット#	
Omega E.Z.N.A. Tissue DNA キット	D33960205241210CN050312	
TaqMan ジェノタイピングマスターMix	1204073	
カスタム TaqMan SNP ジェノタイピングアッセイ	P120814-006 H01	
NN コントロール{抽出から PCR 分析まで工程コントロールとして用いられた正常個体のバッカル綿棒から分離された、精製された DNA}	ALU-0912-006	
HN コントロール{公知になった異型個体全血サンプルから分離された、精製された DNA}	ALU-0912-007	10
HH コントロール{韓国ソウル市所在の Bionics Co., Ltd,(ISO0911)によりクローニング、精製及び特性化された DNA}	ALU-0912-008	

【表28】

6ヶ月時点のPCR結果

サンプルの タイプ	保管条件	機器 (7500 Fast 又は StepOnePlus)	平均アレル1 (範囲 \geq -2SD 0.44)	平均アレル2 (範囲 \geq -2SD 0.027)	凍結融解 サイクル	合格/不合格	
抽出された DNA	4°C	7500 Fast	N/A	N/A	N/A	N/A	20
抽出された DNA	4°C	StepOnePlus	N/A	N/A	N/A	N/A	
抽出された DNA	-20°C	7500 Fast	1.496	0.217	9	合格	
抽出された DNA	-20°C	StepOnePlus	0.783	0.054	9	不合格	
抽出された DNA	-80°C	7500 Fast	1.642	0.245	9	合格	30
抽出された DNA	-80°C	StepOnePlus	0.811	0.069	9	不合格	
バッカル 綿棒	-20°C	7500 Fast	N/A	N/A	N/A	N/A	
バッカル 綿棒	-20°C	StepOnePlus	N/A	N/A	N/A	N/A	
バッカル 綿棒	-80°C	7500 Fast	1.654	0.274	N/A	合格	
バッカル 綿棒	-80°C	StepOnePlus	0.881	0.067	N/A	不合格	40

【0174】

6ヶ月時点の結論：

7500 PCR 機器上で作動させた、抽出された DNA (-20 及び -80 で貯蔵された)、バッカル綿棒 (-80 で貯蔵された)、及び試薬を含む全てのサンプルは、6ヶ月について様々な保管条件で信頼できる結果を出した。7500 PCR 機器に対する安定性は、9 凍結 / 融解サイクルを有し、-20 及び -80 で貯蔵された前記 DNA 抽出物及び -80 で貯蔵されたバッカル綿棒に対して 6ヶ月と決定された。StepOnePlus PCR 機器に対する安定性は、8 凍結 / 融解サイクルを有し、4 、 50

- 20 及び - 80 で貯蔵された全てのDNA抽出物及び - 80 で貯蔵されたバッカル綿棒に対して依然として12週と決定された。

【0175】

コントロールに対する0及び6ヶ月時点

第0日乃至6ヶ月データポイントでの結果が下記表及び下記グラフに要約される：

【表29】

NNコントロールーALU0912-006

データ 収集日	DNAサンプルのタイプ	サンプル 保管条件	機器 (7500 Fast又は StepOnePlus)	平均アレル1 範囲: 0.71-1.91(±2sd) 0.21-2.21(±3sd)	平均アレル2 範囲: 0.05-0.27(±2sd) 0.00-0.34(±3sd)	合格/不合格
第0日	抽出された	4°C	7500Fast	1.94	0.33	合格
	抽出された	4°C	StepOnePlus	1.11	0.13	合格
	抽出された	-20°C	7500Fast	1.80	0.26	合格
	抽出された	-20°C	StepOnePlus	1.05	0.09	合格
	抽出された	-80°C	7500Fast	1.88	0.28	合格
	抽出された	-80°C	StepOnePlus	1.07	0.12	合格
第1週	抽出された	4°C、-20°C、 -80°C	7500Fast	1.60	0.23	合格
	抽出された	4°C、-20°C、 -80°C	StepOnePlus	1.03	0.10	合格
第2週	抽出された	4°C、-20°C、 -80°C	7500Fast	0.69	0.09	合格
	抽出された DNA	4°C、-20°C、 -80°C	StepOnePlus	0.82	0.10	合格
第3週	抽出された DNA	4°C、-20°C、 -80°C	7500Fast	1.44	0.20	合格
	抽出された DNA	4°C、-20°C、 -80°C	StepOnePlus	0.99	0.08	合格
第4週	抽出された DNA	4°C、-20°C、 -80°C	7500Fast	1.32	0.17	合格
	抽出された DNA	4°C、-20°C、 -80°C	StepOnePlus	0.91	0.10	合格
第6週	抽出された DNA	4°C、-20°C、 -80°C	7500Fast	0.95	0.09	合格
	抽出された DNA	4°C、-20°C、 -80°C	StepOnePlus	0.68	0.03	合格
第8週	抽出された DNA	4°C、-20°C、 -80°C	7500Fast	1.28	0.18	合格
	抽出された DNA	4°C、-20°C、 -80°C	StepOnePlus	0.66	0.09	合格
第10週	抽出された DNA	4°C、-20°C、 -80°C	7500Fast	1.20	0.16	合格
	抽出された DNA	4°C、-20°C、 -80°C	StepOnePlus	0.81	0.07	合格
第12週	抽出された DNA	4°C、-20°C、 -80°C	7500Fast	1.31	0.150	合格
	抽出された DNA	4°C、-20°C、 -80°C	StepOnePlus	0.92	0.07	合格
6ヶ月	抽出された DNA	4°C、-20°C、 -80°C	7500Fast	1.46	0.21	合格

10

20

30

40

【表30】

HNコントロールーALU0912-007

データ 収集日	サンプルの タイプ	サンプル 保管条件	機器 (7500 Fast 又は StepOnePlus)	平均アレル1 範囲: 0.46-1.25(±2sd) 0.25-1.45(±3sd)	平均アレル2 範囲: 0.32-1.85(±2sd) 0.00-2.23(±3sd)	合格/不合格
第0日	抽出された DNA	4°C	7500Fast	1.23	1.74	合格
	抽出された DNA	4°C	StepOnePlus	0.85	1.23	合格
	抽出された DNA	-20°C	7500Fast	1.27	1.78	合格
	抽出された DNA	-20°C	StepOnePlus	0.69	0.90	合格
	抽出された DNA	-80°C	7500Fast	1.26	1.77	合格
	抽出された DNA	-80°C	StepOnePlus	0.71	0.96	合格
	バッカル 綿棒	RT、4°C、 -20°C、-80°C	7500Fast	1.32	1.96	合格
	バッカル 綿棒	RT、4°C、 -20°C、-80°C	StepOnePlus	0.72	1.00	合格
第1週	抽出された DNA	4°C、-20°C、 -80°C	7500Fast	0.90	1.28	合格
	抽出された DNA	4°C、-20°C、 -80°C	StepOnePlus	0.61	0.83	合格
	バッカル 綿棒	RT、4°C、 -20°C、-80°C	7500Fast	1.00	1.43	合格
	バッカル 綿棒	RT、4°C、 -20°C、-80°C	StepOnePlus	0.57	0.79	合格
第2週	抽出された DNA	4°C、-20°C、 -80°C	7500Fast	0.84	1.11	合格
	抽出された DNA	4°C、-20°C、 -80°C	StepOnePlus	0.48	0.69	合格
	バッカル 綿棒	RT、4°C、 -20°C、-80°C	7500Fast	0.97	1.35	合格
	バッカル 綿棒	RT、4°C、 -20°C、-80°C	StepOnePlus	0.56	0.79	合格
第3週	抽出された DNA	4°C、-20°C、 -80°C	7500Fast	0.92	1.35	合格
	抽出された DNA	4°C、-20°C、 -80°C	StepOnePlus	0.51	0.67	合格
	バッカル 綿棒	4°C、-20°C、 -80°C	7500Fast	0.95	1.36	合格
	バッカル 綿棒	4°C、-20°C、 -80°C	StepOnePlus	0.62	0.80	合格

10

20

30

40

第4週	抽出されたDNA	4°C、-20°C、-80°C	7500Fast	0.90	1.22	合格
	抽出されたDNA	4°C、-20°C、-80°C	StepOnePlus	0.55	0.78	合格
	バッカル綿棒	4°C、-20°C、-80°C	7500Fast	1.05	1.46	合格
	バッカル綿棒	4°C、-20°C、-80°C	StepOnePlus	0.65	0.83	合格
第6週	抽出されたDNA	4°C、-20°C、-80°C	7500Fast	0.86	1.14	合格
	抽出されたDNA	4°C、-20°C、-80°C	StepOnePlus	0.53	0.69	合格
	バッカル綿棒	-20°C、-80°C	7500Fast	0.91	1.36	合格
	バッカル綿棒	-20°C、-80°C	StepOnePlus	0.52	0.70	合格
第8週	抽出されたDNA	4°C、-20°C、-80°C	7500Fast	0.84	1.02	合格
	抽出されたDNA	4°C、-20°C、-80°C	StepOnePlus	0.46	0.58	合格
	バッカル綿棒	-20°C、-80°C	7500Fast	0.93	1.22	合格
	バッカル綿棒	-20°C、-80°C	StepOnePlus	0.56	0.77	合格
第10週	抽出されたDNA	4°C、-20°C、-80°C	7500Fast	1.02	1.38	合格
	抽出されたDNA	4°C、-20°C、-80°C	StepOnePlus	0.53	0.71	合格
	バッカル綿棒	-20°C、-80°C	7500Fast	0.96	1.28	合格
	バッカル綿棒	-20°C、-80°C	StepOnePlus	0.56	0.78	合格
第12週	抽出されたDNA	4°C、-20°C、-80°C	7500Fast	0.93	1.27	合格
	抽出されたDNA	4°C、-20°C、-80°C	StepOnePlus	0.45	0.57	合格
	バッカル綿棒	-20°C、-80°C	7500Fast	0.93	1.27	合格
	バッカル綿棒	-20°C、-80°C	StepOnePlus	0.45	0.57	合格
6ヶ月	抽出されたDNA	-20°C、-80°C	7500Fast	0.98	1.32	合格
	バッカル綿棒	-80°C	7500Fast	0.77	0.98	合格

10

20

30

40

【表31】

HHコントロールーALU0912-008

データ 収集日	サンプルの タイプ	サンプル 保管条件	機器 (7500 Fast 又は StepOnePlus)	平均アレル1 範囲: 0.12-0.25(±2sd) 0.09-0.27(±3sd)	平均アレル2 範囲: 0.50-3.12(±2sd) 0.00-3.79(±3sd)	合格/不合格
第0日	抽出された DNA	4°C	7500Fast	0.23	2.61	合格
	抽出された DNA	4°C	StepOnePlus	0.16	1.52	合格
	抽出された DNA	-20°C	7500Fast	0.24	2.64	合格
	抽出された DNA	-20°C	StepOnePlus	0.14	1.33	合格
	抽出された DNA	-80°C	7500Fast	0.24	2.62	合格
	抽出された DNA	-80°C	StepOnePlus	0.15	1.44	合格
	バッカル 綿棒	RT、4°C、 -20°C、-80°C	7500Fast	0.26	2.70	合格
	バッカル 綿棒	RT、4°C、 -20°C、-80°C	StepOnePlus	0.13	1.45	合格
第1週	抽出された DNA	4°C、-20°C、 -80°C	7500Fast	0.18	1.87	合格
	抽出された DNA	4°C、-20°C、 -80°C	StepOnePlus	0.13	1.36	合格
	バッカル 綿棒	RT、4°C、 -20°C、-80°C	7500Fast	0.20	2.47	合格
	バッカル 綿棒	RT、4°C、 -20°C、-80°C	StepOnePlus	0.13	1.33	合格
第2週	抽出された DNA	4°C、-20°C、 -80°C	7500Fast	0.15	1.55	合格
	抽出された DNA	4°C、-20°C、 -80°C	StepOnePlus	0.093	1.00	合格
	バッカル 綿棒	RT、4°C、 -20°C、-80°C	7500Fast	0.16	1.90	合格
	バッカル 綿棒	RT、4°C、 -20°C、-80°C	StepOnePlus	0.12	1.22	合格
第3週	抽出された DNA	4°C、-20°C、 -80°C	7500Fast	0.18	1.94	合格
	抽出された DNA	4°C、-20°C、 -80°C	StepOnePlus	0.11	1.13	合格
	バッカル 綿棒	4°C、-20°C、 -80°C	7500Fast	0.17	2.00	合格
	バッカル 綿棒	4°C、-20°C、 -80°C	StepOnePlus	0.13	1.21	合格

第4週	抽出されたDNA	4°C、-20°C、-80°C	7500Fast	0.14	1.49	合格
	抽出されたDNA	4°C、-20°C、-80°C	StepOnePlus	0.10	1.10	合格
	バッカル綿棒	4°C、-20°C、-80°C	7500Fast	0.16	1.86	合格
	バッカル綿棒	4°C、-20°C、-80°C	StepOnePlus	0.111	1.08	合格
第6週	抽出されたDNA	4°C、-20°C、-80°C	7500Fast	0.14	1.54	合格
	抽出されたDNA	4°C、-20°C、-80°C	StepOnePlus	0.080	0.86	不合格
	バッカル綿棒	-20°C、-80°C	7500Fast	0.16	1.84	合格
	バッカル綿棒	-20°C、-80°C	StepOnePlus	0.10	0.96	合格
第8週	抽出されたDNA	4°C、-20°C、-80°C	7500Fast	0.14	1.41	合格
	抽出されたDNA	4°C、-20°C、-80°C	StepOnePlus	0.13	0.84	合格
	バッカル綿棒	-20°C、-80°C	7500Fast	0.20	2.46	合格
	バッカル綿棒	-20°C、-80°C	StepOnePlus	0.10	1.02	合格
第10週	抽出されたDNA	4°C、-20°C、-80°C	7500Fast	0.16	1.61	合格
	抽出されたDNA	4°C、-20°C、-80°C	StepOnePlus	0.083	0.72	不合格
	バッカル綿棒	-20°C、-80°C	7500Fast	0.14	1.69	合格
	バッカル綿棒	-20°C、-80°C	StepOnePlus	0.11	1.04	合格
第12週	抽出されたDNA	4°C、-20°C、-80°C	7500Fast	0.21	2.11	合格
	抽出されたDNA	4°C、-20°C、-80°C	StepOnePlus	0.12	1.25	合格
	バッカル綿棒	-20°C、-80°C	7500Fast	0.21	2.11	合格
	バッカル綿棒	-20°C、-80°C	StepOnePlus	0.12	1.24	合格
6ヶ月	抽出されたDNA	-20°C、-80°C	7500Fast	0.21	1.92	合格
	バッカル綿棒	-80°C	7500Fast	0.13	1.52	合格

【表 3 2】

NN (ロット# ALU012-006) -図5

番号	配置番号	NN(ALU-0912-006)		機器	合格(A) 警告(W) 不合格(R)
		アレル1(x)	アレル2(y)		
1	第0日	1.940	0.330	7500	W
2	第0日	1.800	0.260	7500	A
3	第0日	1.880	0.280	7500	A
4	第0日	1.110	0.130	StepOnePlus	A
5	第0日	1.050	0.090	StepOnePlus	A
6	第0日	1.070	0.120	StepOnePlus	A
7	第1週	1.600	0.230	7500	A
8	第1週	1.030	0.100	StepOnePlus	A
9	第2週	0.690	0.090	7500	A
10	第2週	0.820	0.100	StepOnePlus	A
11	第3週	1.440	0.200	7500	A
12	第3週	0.990	0.080	StepOnePlus	A
13	第4週	1.320	0.170	7500	A
14	第4週	0.910	0.100	StepOnePlus	A
15	第6週	0.950	0.090	7500	A
16	第6週	0.680	0.030	StepOnePlus	A
17	第8週	1.280	0.180	7500	A
18	第8週	0.660	0.090	StepOnePlus	A
19	第10週	1.200	0.160	7500	A
20	第10週	0.810	0.070	StepOnePlus	A
21	第12週	1.310	0.150	7500	A
22	第12週	0.920	0.070	StepOnePlus	A
23	6ヶ月	1.460	0.210	7500	A
(+3sd		2.28	0.37	(+)3sd (+)2sd (+)1sd 平均 SD (-)1sd (-)2sd (-)3sd	
(+2sd		1.91	0.30		
(+1sd		1.54	0.22		
平均		1.17	0.14		
SD		0.37	0.08		
(-)1sd		0.80	0.07		
(-)2sd		0.43	-0.01		
(-)3sd		0.06	-0.08		

10

20

30

40

【表 3 3】

HN (ロット# ALU0912-007) - 図 6

番号	配置番号	HN(ALU-0912-007)		機器	合格(A) 警告(W) 不合格(R)
		アレル1(x)	アレル2(y)		
1	第 0 日	1.230	1.740	7500	A
2	第 0 日	1.270	1.780	7500	W
3	第 0 日	1.260	1.770	7500	W
4	第 0 日	1.320	1.960	7500	W
5	第 0 日	0.850	1.230	StepOnePlus	A
6	第 0 日	0.690	0.900	StepOnePlus	A
7	第 0 日	0.710	0.960	StepOnePlus	A
8	第 0 日	0.720	1.000	StepOnePlus	A
9	第 1 週	0.900	1.280	7500	A
10	第 1 週	1.000	1.430	7500	A
11	第 1 週	0.610	0.830	StepOnePlus	A
12	第 1 週	0.570	0.790	StepOnePlus	A
13	第 2 週	0.840	1.110	7500	A
14	第 2 週	0.970	1.350	7500	A
15	第 2 週	0.480	0.690	StepOnePlus	A
16	第 2 週	0.560	0.790	StepOnePlus	A
17	第 3 週	0.920	1.350	7500	A
18	第 3 週	0.950	1.360	7500	A
19	第 3 週	0.510	0.670	StepOnePlus	A
20	第 3 週	0.620	0.800	StepOnePlus	A
21	第 4 週	0.900	1.220	7500	A
22	第 4 週	1.050	1.460	7500	A
23	第 4 週	0.550	0.780	StepOnePlus	A
24	第 4 週	0.650	0.830	StepOnePlus	A
25	第 6 週	0.860	1.140	7500	A
26	第 6 週	0.910	1.360	7500	A
27	第 6 週	0.530	0.690	StepOnePlus	A
28	第 6 週	0.520	0.700	StepOnePlus	A
29	第 8 週	0.840	1.020	7500	A
30	第 8 週	0.930	1.220	7500	A
31	第 8 週	0.460	0.580	StepOnePlus	A
32	第 8 週	0.560	0.770	StepOnePlus	A
33	第 10 週	1.020	1.380	7500	A
34	第 10 週	0.960	1.280	7500	A
35	第 10 週	0.530	0.710	StepOnePlus	A
36	第 10 週	0.560	0.780	StepOnePlus	A
37	第 12 週	0.930	1.270	7500	A
38	第 12 週	0.930	1.270	7500	A
39	第 12 週	0.450	0.570	StepOnePlus	A

10

20

30

40

40	第 12 週	0.450	0.570	StepOnePlus	A
41	6 ヶ月	0.980	1.320	7500	A
42	6 ヶ月	0.770	0.980	7500	A
	(+)3sd	1.52	2.16		
	(+)2sd	1.27	1.80		
	(+)1sd	1.03	1.44		
	平均	0.79	1.09		
	SD	0.24	0.36		
	(-)1sd	0.55	0.73		
	(-)2sd	0.31	0.37		
	(-)3sd	0.07	0.02		

10

【表 3 4】

HH (ロット# A L U 0 9 1 2 – 0 0 8) - 図 7

番号	配置番号	HH(ALU-0912-008)		機器	合格(A) 警告(W) 不合格(R)
		アレル 1(x)	アレル 2(y)		
1	第 0 日	0.230	2.610	7500	A
2	第 0 日	0.240	2.640	7500	A
3	第 0 日	0.240	2.620	7500	A
4	第 0 日	0.260	2.700	7500	W
5	第 0 日	0.160	1.520	StepOnePlus	A
6	第 0 日	0.140	1.330	StepOnePlus	A
7	第 0 日	0.150	1.440	StepOnePlus	A
8	第 0 日	0.130	1.450	StepOnePlus	A
9	第 1 週	0.180	1.870	7500	A
10	第 1 週	0.200	2.470	7500	A
11	第 1 週	0.130	1.360	StepOnePlus	A
12	第 1 週	0.130	1.330	StepOnePlus	A
13	第 2 週	0.150	1.550	7500	A
14	第 2 週	0.160	1.900	7500	A
15	第 2 週	0.093	1.000	StepOnePlus	A
16	第 2 週	0.100	1.220	StepOnePlus	A
17	第 3 週	0.180	1.940	7500	A
18	第 3 週	0.170	1.950	7500	A
19	第 3 週	0.110	1.130	StepOnePlus	A
20	第 3 週	0.130	1.210	StepOnePlus	A
21	第 4 週	0.140	1.490	7500	A
22	第 4 週	0.160	1.860	7500	A
23	第 4 週	0.100	1.100	StepOnePlus	A
24	第 4 週	0.110	1.080	StepOnePlus	A
25	第 6 週	0.140	1.540	7500	A
26	第 6 週	0.160	1.840	7500	A
27	第 6 週	0.080	0.860	StepOnePlus	W
28	第 6 週	0.097	0.960	StepOnePlus	A
29	第 8 週	0.140	1.410	7500	A
30	第 8 週	0.200	2.460	7500	A
31	第 8 週	0.130	0.840	StepOnePlus	A
32	第 8 週	0.100	1.017	StepOnePlus	A
33	第 10 週	0.160	1.610	7500	A
34	第 10 週	0.140	1.690	7500	A
35	第 10 週	0.083	0.720	StepOnePlus	W
36	第 10 週	0.110	1.040	StepOnePlus	n/a
37	第 12 週	0.210	2.110	7500	n/a
38	第 12 週	0.210	2.110	7500	n/a
39	第 12 週	0.120	1.250	StepOnePlus	n/a

10

20

30

40

40	第 12 週	0.120	1.250	StepOnePlus	n/a
41	6 ヶ月	0.210	1.920	7500	n/a
42	6 ヶ月	0.130	1.520	7500	n/a
(+)3sd	0.29	3.19			
(+)2sd	0.24	2.66			
(+)1sd	0.20	2.13			
平均	0.15	1.59			
SD	0.05	0.53			
(-)1sd	0.11	1.06			
(-)2sd	0.06	0.53			
(-)3sd	0.02	-0.01			

【 0 1 7 6 】

全てのコントロール、NN(ロット# ALU-0912-006)、HN(ロット# ALU-0912-007)、及びHH(ロット# ALU-0912-008)は、それぞれの時点で全ての許容可能なアレルの範囲を通過した。コントロール安定性は、6ヶ月と決定された。

【 0 1 7 7 】

結論

アレル1及びアレル2の平均結果を様々な保管温度で計算した。前記データは、用いられたそれぞれの機器に対して次の安定性の主張を検証した：

【表 3 5 】

7500 PCR 機器

材料及び保管条件	安定性	凍結/融解サイクル
4°Cで抽出されたDNA	12週	N/A
-20°Cで抽出されたDNA	6ヶ月	9
-80°Cで抽出されたDNA	6ヶ月	9
室温でのOmega Tissue DNA キット	6ヶ月	N/A
2°C~8°CでのTaqMan ジェノタイピングマスターMix	6ヶ月	N/A
-25°C~-15°Cでのカスタム TaqMan SNP ジェノタイピングアッセイ	6ヶ月	N/A
室温でのバッカル綿棒	1週	N/A
4°Cの温度でのバッカル綿棒	3週	N/A
-20°Cの温度でのバッカル綿棒	12週	N/A
-80°Cの温度でのバッカル綿棒	6ヶ月	N/A

10

20

30

【表 3 6】

StepOnePlus PCR 機器

材料及び保管条件	安定性	凍結/融解サイクル
4°Cで抽出された DNA	12 週	N/A
-20°Cで抽出された DNA	12 週	8
-80°Cで抽出された DNA	12 週	8
室温での Omega Tissue DNA キット	12 週	N/A
2°C~8°Cでの TaqMan ジェノタイピングマスターMix	12 週	N/A
-25°C~-15°Cでのカスタム TaqMan SNP ジェノタイピングアッセイ	12 週	N/A
室温でのバッカル綿棒	1 週	N/A
4°Cの温度でのバッカル綿棒	3 週	N/A
-20°Cの温度でのバッカル綿棒	12 週	N/A
-80°Cの温度でのバッカル綿棒	12 週	N/A

10

【0178】

下記表でのデータは、それぞれのコントロールに対して次の安定性の主張を検証した。

【表 3 7】

コントロールに対する 6 ヶ月安定性

20

コントロール	安定性	コントロール保管条件
NN (ロット# ALU0912-06)	6 ヶ月	-90°C~-65°C
HN (ロット# ALU0912-07)	6 ヶ月	-90°C~-65°C
HH (ロット# ALU0912-08)	6 ヶ月	-90°C~-65°C

【0179】

実施例 8：8 ヶ月での安定性研究

この実施例で記述された研究は、試験用に用いられた商業的バッカル綿棒、バッカル綿棒から抽出された DNA、様々な試薬、及びコントロールの許容可能な安定性を決定するように設計された。この実施例は、実施例 5、6 及び 7 から続いた、8 ヶ月で生成された安定性データの要約を含む。この実施例は、8 ヶ月で生成されたコントロール安定性データの要約もまた含む。

30

バッカル綿棒

【表 3 8】

保管条件及び収集日

保管	データ収集日
-20°Cの冷凍庫	8 ヶ月
-80°Cの冷凍庫	8 ヶ月

【表 3 9】

9.6 - ウエルプレート内で抽出された DNA サンプル

40

保管	凍結融解サイクル	データ収集日
-20°Cの冷凍庫	サイクル 1 から材料が全て用いられるか、又は不合格になるまで	8 ヶ月
-80°Cの冷凍庫	サイクル 1 から材料が全て用いられるか、又は不合格になるまで	8 ヶ月

【0180】

隔離された試薬を、前記バッカル綿棒及び抽出された DNA 安定性試験に用いた。この研究の末期に、前記並んでいる試薬の組み合わせ使用に対して有効期限を確立する。

50

【0181】

結果

8ヶ月データポイントからの結果が下記表に要約される。

8ヶ月時点

【表40】

8ヶ月時点のPCR結果

サンプルの タイプ	保管条件	機器 (7500 Fast 又は StepOnePlus)	平均アレル1 (範囲 \geq -2SD 0.44)	平均アレル2 (範囲 \geq -2SD 0.027)	凍結融解 サイクル	合格/不合格
抽出された DNA	4°C	7500 Fast	N/A	N/A	N/A	N/A
抽出された DNA	4°C	StepOnePlus	N/A	N/A	N/A	N/A
抽出された DNA	-20°C	7500 Fast	1.423	0.279	10	合格
抽出された DNA	-20°C	StepOnePlus	N/A	N/A	N/A	N/A
抽出された DNA	-80°C	7500 Fast	1.516	0.269	10	合格
抽出された DNA	-80°C	StepOnePlus	N/A	N/A	N/A	N/A
バッカル 綿棒	-20°C	7500 Fast	1.122	0.229	N/A	N/A
バッカル 綿棒	-20°C	StepOnePlus	N/A	N/A	N/A	N/A
バッカル 綿棒	-80°C	7500 Fast	1.113	0.246	N/A	合格
バッカル 綿棒	-80°C	StepOnePlus	N/A	N/A	N/A 2	N/A

【0182】

8ヶ月時点の結論：

7500 PCR機器上で作動させた、抽出されたDNA(-20及び-80で貯蔵された)、バッカル綿棒(-20及び-80で貯蔵された)、及び試薬を含む全てのサンプルは、8ヶ月について様々な保管条件で信頼できる結果を出した。従って、7500 PCR機器に対する安定性は、10凍結/融解サイクルを有する-20及び-80で貯蔵された前記DNA抽出物、及び-20及び-80で貯蔵されたバッカル綿棒に対して8ヶ月と決定された。

【0183】

コントロール安定性

8ヶ月データポイントでの結果が7500 FastリアルタイムPCRシステムに対して下記表に要約される。

10

20

30

40

【表41】

NNコントロール—ALU0912-006

データ 収集日	サンプルの タイプ	保管条件	機器 7500 Fast	平均アレル1 範囲: 0.71-1.91(±2sd) 0.41-2.21(±3sd)	平均アレル2 範囲: 0.05-0.27(±2sd) 0.00-0.34(±3sd)	合格/不合格
8ヶ月	抽出された DNA	-20°C、-80°C	7500 Fast	1.38	0.27	合格

【表42】

HNコントロール—ALU0912-007

データ 収集日	サンプルの タイプ	保管条件	機器 7500 Fast	平均アレル1 範囲: 0.46-1.25(±2sd) 0.25-1.45(±3sd)	平均アレル2 範囲: 0.32-1.85(±2sd) 0.00-2.23(±3sd)	合格/不合格
8ヶ月	抽出された DNA	-20°C、-80°C	7500 Fast	0.76	1.07	合格
	パックカル 綿棒	-20°C、-80°C	7500 Fast	0.74	1.11	合格

【表43】

HHコントロール—ALU0912-008

データ 収集日	サンプルの タイプ	保管条件	機器 7500 Fast	平均アレル1 範囲: 0.12-0.25(±2sd) 0.09-0.27(±3sd)	平均アレル2 範囲: 0.50-3.12(±2sd) 0.00-3.79(±3sd)	合格/不合格
8ヶ月	抽出された DNA	-20°C、-80°C	7500 Fast	0.17	1.64	合格
	パックカル 綿棒	-20°C、-80°C	7500 Fast	0.14	1.79	合格

【0184】

全てのコントロール、NN（ロット# ALU-0912-006）、HN（ロット# ALU-0912-007）、及びHH（ロット# ALU-0912-008）は、8ヶ月時点で全ての許容可能なアレルの範囲を通過した。コントロール安定性は、7500 Fast PCR機器に対して8ヶ月と決定された。

【0185】

結論

アレル1及びアレル2の平均結果を様々な保管温度で計算した。前記データは、用いられたそれぞれの機器に対して次の安定性の主張を検証した：

10

20

30

40

【表44】

7500リアルタイムPCRシステム

材料及び保管条件	安定性	凍結/融解サイクル	
4°Cで抽出されたDNA	12週	N/A	
-20°Cで抽出されたDNA	8ヶ月	10	
-80°Cで抽出されたDNA	8ヶ月	10	
室温でのOmega Tissue DNAキット	8ヶ月	N/A	
2°C~8°CでのTaqMan ジェノタイピングマスターMix	8ヶ月	N/A	10
-25°C~-15°CでのカスタムTaqMan SNPジェノタイピングアッセイ	8ヶ月	N/A	
室温でのバッカル綿棒	1週	N/A	
4°Cの温度でのバッカル綿棒	3週	N/A	
-20°Cの温度でのバッカル綿棒	8ヶ月	N/A	
-80°Cの温度でのバッカル綿棒	8ヶ月	N/A	

【表45】

StepOnePlusリアルタイムPCRシステム

材料及び保管条件	安定性	凍結/融解サイクル	
4°Cで抽出されたDNA	12週	N/A	
-20°Cで抽出されたDNA	12週	8	
-80°Cで抽出されたDNA	12週	8	
室温でのOmega Tissue DNAキット	12週	N/A	
2°C~8°CでのTaqMan ジェノタイピングマスターMix	12週	N/A	20
-25°C~-15°CでのカスタムTaqMan SNPジェノタイピングアッセイ	12週	N/A	
室温でのバッカル綿棒	1週	N/A	
4°Cの温度でのバッカル綿棒	3週	N/A	
-20°Cの温度でのバッカル綿棒	12週	N/A	
-80°Cの温度でのバッカル綿棒	12週	N/A	

【0186】

次の7500機器データは、それぞれのコントロールに対して下記表46に示したように、次の安定性の主張を検証した。

【表46】

コントロール及び安定性データ

コントロール	安定性	
NN(ロット#ALU0912-06)	7500に対して8ヶ月	
HN(ロット#ALU0912-07)	7500に対して8ヶ月	
HH(ロット#ALU0912-08)	7500に対して8ヶ月	

【0187】

実施例9：10ヶ月での安定性研究

この実施例で記述された研究は、試験用に用いられた商業的バッカル綿棒、バッカル綿棒から抽出されたDNA、様々な試薬、及びコントロールの許容可能な安定性を決定するように設計された。この実施例は、実施例5、6、7及び8から続いた、10ヶ月で生成された安定性データの要約を含む。この報告書は、10ヶ月で生成されたコントロール安定性データの要約もまた含む。

バッカル綿棒

10

20

30

40

50

【表47】

保管条件及び収集日

保管	データ収集日
-20°Cの冷凍庫	10ヶ月
-80°Cの冷凍庫	10ヶ月

【表48】

96—ウェルプレート内で抽出されたDNAサンプル

保管	凍結融解サイクル	データ収集日
-20°Cの冷凍庫	サイクル1から材料が全て用いられるか、又は不合格になるまで	10ヶ月
-80°Cの冷凍庫	サイクル1から材料が全て用いられるか、又は不合格になるまで	10ヶ月

【0188】試薬

隔離された試薬を前記バッカル綿棒及び抽出されたDNA安定性試験に用いた。この研究の末期に、割り当てられた有効期限を前記並んでいる試薬の組み合わせ使用に対して確立した。

【0189】結果

10ヶ月データポイントからの結果が下記表に要約される。

10ヶ月時点

10

20

【表49】

10ヶ月時点のPCR結果

サンプルの タイプ	保管条件	機器 (7500 Fast)	平均アレル1 (範囲 \geq -2SD 0.44)	平均アレル2 (範囲 \geq -2SD 0.027)	凍結融解 サイクル	合格/不合格
抽出された DNA	4°C	7500 Fast	N/A	N/A	N/A	N/A
抽出された DNA	4°C	StepOnePlus	N/A	N/A	N/A	N/A
抽出された DNA	-20°C	7500 Fast	1.41	0.24	11	合格
抽出された DNA	-20°C	StepOnePlus	N/A	N/A	N/A	N/A
抽出された DNA	-80°C	7500 Fast	1.48	0.23	11	合格
抽出された DNA	-80°C	StepOnePlus	N/A	N/A	N/A	N/A
バッカル 綿棒	-20°C	7500 Fast	0.72	0.19	N/A	合格
バッカル 綿棒	-20°C	StepOnePlus	N/A	N/A	N/A	N/A
バッカル 綿棒	-80°C	7500 Fast	0.74	0.16	N/A	合格
バッカル 綿棒	-80°C	StepOnePlus	N/A	N/A	N/A	N/A

【0190】

10ヶ月時点の結論:

前記 7500 Fast リアルタイム PCR 機器上で作動させた、抽出された DNA (-20 及び -80 で貯蔵された)、バッカル綿棒 (-20 及び -80 で貯蔵された)、及び試薬を含む全てのサンプルは、10ヶ月に対して様々な保管条件で信頼できる結果を出した。従って、7500 Fast リアルタイム PCR 機器に対する安定性は、11凍結 / 融解サイクルを有する -20 及び -80 で貯蔵された前記 DNA 抽出物及び -20 及び -80 で貯蔵されたバッカル綿棒に対して 10ヶ月と決定された。

【0191】

10ヶ月コントロール安定性

10ヶ月データポイントでの結果が 7500 Fast リアルタイム PCR システムに
対して下記表に要約される。

【表50】

NNコントロール-ALU0912-006

データ 収集日	サンプルの タイプ	保管条件	機器 7500 Fast	平均アレル1 範囲: 0.71-1.91(\pm 2sd) 0.41-2.21(\pm 3sd)	平均アレル2 範囲: 0.05-0.27(\pm 2sd) 0.00-0.34(\pm 3sd)	合格/不合格
10ヶ月	抽出された DNA	-20°C、-80°C	7500 Fast	1.51	0.24	合格

10

20

30

40

【表 5 1】

HNコントロール—ALU0912—007

データ 収集日	サンプルの タイプ	保管条件	機器	平均アレル 1 範囲: 0.46-1.25(±2sd) 0.25-1.45(±3sd)	平均アレル 2 範囲: 0.32-1.85(±2sd) 0.00-2.23(±3sd)	合格/不合格
10 ヶ月	抽出された DNA	-20°C、-80°C	7500 Fast	0.89	1.22	合格
	パッカル 綿棒	-20°C、-80°C	7500 Fast	0.70	0.95	合格

10

【表 5 2】

HHコントロール—ALU0912—008

データ 収集日	サンプルの タイプ	保管条件	機器	平均アレル 1 範囲: 0.12-0.25(±2sd) 0.09-0.27(±3sd)	平均アレル 2 範囲: 0.50-3.12(±2sd) 0.00-3.79(±3sd)	合格/不合格
10 ヶ月	抽出された DNA	-20°C、-80°C	7500 Fast	0.17	1.63	合格
	パッカル 綿棒	-20°C、-80°C	7500 Fast	0.14	1.20	合格

20

【0192】

全てのコントロール、NN(ロット# ALU-0912-006)、HN(ロット# ALU-0912-007)、及びHH(ロット# ALU-0912-008)は、10ヶ月の時点で全ての許容可能なアレルの範囲を通過した。コントロール安定性は、7500 Fast PCRシステムに対して10ヶ月と決定された。

【0193】

結論

30

アレル1及びアレル2の平均結果を様々な保管温度で計算した。前記データは、用いられたそれぞれの機器に対して次の安定性の主張を検証した：

【表 5 3】

7500 PCR機器

材料及び保管条件	安定性	凍結/融解 サイクル
4°Cで抽出されたDNA	12週	N/A
-20°Cで抽出されたDNA	10ヶ月	11
-80°Cで抽出されたDNA	10ヶ月	11
室温でのOmega Tissue DNA キット	10ヶ月	N/A
2°C~8°CでのTaqMan ジェノタイピングマスター・ミックス	10ヶ月	N/A
-25°C~-15°Cでのカスタム TaqMan SNP ジェノタイピングアッセイ	8ヶ月	N/A
室温でのパッカル綿棒	1週	N/A
4°Cの温度でのパッカル綿棒	3週	N/A
-20°Cの温度でのパッカル綿棒	10ヶ月	N/A
-80°Cの温度でのパッカル綿棒	10ヶ月	N/A

40

【表 5 4】

S t e p O n e P l u s P C R 機器

材料及び保管条件	安定性	凍結/融解サイクル	
4°Cで抽出された DNA	12 週	N/A	
-20°Cで抽出された DNA	12 週	8	
-80°Cで抽出された DNA	12 週	8	
室温での Omega Tissue DNA キット	12 週	N/A	
2°C~8°Cでの TaqMan ジェノタイピングマスターMix	12 週	N/A	10
-25°C~-15°Cでのカスタム TaqMan SNP ジェノタイピングアッセイ	12 週	N/A	
室温でのバッカル綿棒	1 週	N/A	
4°Cの温度でのバッカル綿棒	3 週	N/A	
-20°Cの温度でのバッカル綿棒	12 週	N/A	
-80°Cの温度でのバッカル綿棒	12 週	N/A	

【0194】

次の 7500 Fast リアルタイム機器データは、それぞれのコントロールに対して次の安定性の主張を検証した：

【表 5 5】

コントロール及び安定性時間

コントロール	安定性
NN (ロット# ALU0912-06)	7500 に対して 10 ヶ月
HN (ロット# ALU0912-07)	7500 に対して 10 ヶ月
HH (ロット# ALU0912-08)	7500 に対して 10 ヶ月

【0195】

実施例 10：12 ヶ月での安定性研究

この実施例で記述された研究は、試験用に用いられた商業的バッカル綿棒、バッカル綿棒から抽出された DNA、様々な試薬、及びコントロールの許容可能な安定性を決定するように設計された。この実施例は、実施例 5、6、7、8 及び 9 から続いた、12 ヶ月で生成された安定性データの要約を含む。この報告書は、10 ヶ月で生成されたコントロール安定性データの要約もまた含む。

【0196】

12 ヶ月データポイントからの結果が下記表に要約される。

12 ヶ月時点

10

20

30

【表56】

12ヶ月時点のPCR結果

サンプルの タイプ	保管条件	機器 (7500 Fast)	平均アレル1 (範囲 \geq -2SD 0.44)	平均アレル2 (範囲 \geq -2SD 0.027)	凍結融解 サイクル	合格/不合格
抽出された DNA	4°C	7500 Fast	N/A	N/A	N/A 2	N/A
抽出された DNA	4°C	StepOnePlus	N/A	N/A	N/A	N/A
抽出された DNA	-20°C	7500 Fast	1.37	0.21	12	合格
抽出された DNA	-20°C	StepOnePlus	N/A	N/A	N/A 2	N/A
抽出された DNA	-80°C	7500 Fast	1.40	0.19	12	合格
抽出された DNA	-80°C	StepOnePlus	N/A	N/A	N/A 2	N/A
バッカル 綿棒	-20°C	7500 Fast	0.64	0.12	3	合格
バッカル 綿棒	-20°C	StepOnePlus	N/A	N/A	N/A	N/A
バッカル 綿棒	-80°C	7500 Fast	0.94	0.23	3	合格
バッカル 綿棒	-80°C	StepOnePlus	N/A	N/A	N/A 2	N/A

【0197】

12ヶ月時点の結論：

前記7500 FastリアルタイムPCR機器上で作動させた、抽出されたDNA(-20及び-80で貯蔵された)、バッカル綿棒(-20及び-80で貯蔵された)、及び試薬を含む全てのサンプルは、12ヶ月に対して様々な保管条件で信頼できる結果を出した。従って、前記7500 FastリアルタイムPCR機器に対する安定性は、12凍結/融解サイクルを有し、-20及び-80で貯蔵された前記DNA抽出物及び3凍結/融解サイクルを有し、-20及び-80で貯蔵されたバッカル綿棒に対して12ヶ月と決定された。

【0198】

12ヶ月コントロール安定性

12ヶ月データポイントでの結果が7500 FastリアルタイムPCRシステムに
対して下記表に要約される。

【表57】

NNコントロールーALU0912-006

データ 収集日	サンプルの タイプ	保管条件	機器 7500 Fast	平均アレル1 範囲: 0.71-1.91($\pm 2\text{sd}$) 0.41-2.21($\pm 3\text{sd}$)	平均アレル2 範囲: 0.05-0.27($\pm 2\text{sd}$) 0.00-0.34($\pm 3\text{sd}$)	合格/不合格
12ヶ月	抽出された DNA	-20°C、-80°C	7500Fast	1.12	0.21	合格

10

20

30

40

50

【表 5 8】

HNコントロール—ALU0912—007

データ 収集日	サンプルの タイプ	保管条件	機器	平均アレル1 範囲: 0.46-1.25(±2sd) 0.25-1.45(±3sd)	平均アレル2 範囲: 0.32-1.85(±2sd) 0.00-2.23(±3sd)	合格/不合格
12 ヶ月	抽出された DNA	-20°C、 -80°C	7500 Fast	0.66	0.90	合格
	バッカル 綿棒	-20°C、 -80°C	7500 Fast	0.70	1.03	合格

10

【表 5 9】

HHコントロール—ALU0912—008

データ 収集日	サンプルの タイプ	保管条件	機器	平均アレル1 範囲: 0.12-0.25(±2sd) 0.09-0.27(±3sd)	平均アレル2 範囲: 0.50-3.12(±2sd) 0.00-3.79(±3sd)	合格/不合格
12 ヶ月	抽出された DNA	-20°C、 -80°C	7500 Fast	0.10	0.95	合格
	バッカル 綿棒	-20°C、 -80°C	7500 Fast	0.08	1.24	合格

20

【0199】

全てのコントロール、NN(ロット# ALU-0912-006)、HN(ロット# ALU-0912-007)、及びHH(ロット# ALU-0912-008)は、前記12ヶ月の時点で全ての許容可能なアレルの範囲を通過した。コントロール安定性は、7500 Fast PCRシステムに対して10ヶ月と決定された。

【0200】

結論 30

アレル1及びアレル2の平均結果を様々な保管温度で計算した。前記データは、次の安定性を検証した。

【表 6 0】

7500 PCR機器

材料及び保管条件	安定性	凍結/融解 サイクル
4°Cで抽出されたDNA	12週	N/A
-20°Cで抽出されたDNA	12ヶ月	12
-80°Cで抽出されたDNA	12ヶ月	12
室温でのOmega Tissue DNA キット	12ヶ月	N/A
2°C~8°CでのTaqMan ジェノタイピングマスターMix	12ヶ月	N/A
-25°C~-15°CでのカスタムTaqMan SNP ジェノタイピングアッセイ	12ヶ月	N/A
室温でのバッカル綿棒	1週	N/A
4°Cの温度でのバッカル綿棒	3週	N/A
-20°Cの温度でのバッカル綿棒	12ヶ月	N/A
-80°Cの温度でのバッカル綿棒	12ヶ月	N/A

40

【表 6 1】

StepOnePlus PCR機器

材料及び保管条件	安定性	凍結/融解サイクル	
4°Cで抽出されたDNA	12週	N/A	
-20°Cで抽出されたDNA	12週	8	
-80°Cで抽出されたDNA	12週	8	
室温でのOmegaTissue DNAキット	12週	N/A	
2°C~8°CでのTaqMan ジェノタイピングマスターMix	12週	N/A	10
-25°C~-15°CでのカスタムTaqMan SNP ジェノタイピングアッセイ	12週	N/A	
室温でのバッカル綿棒	1週	N/A	
4°Cの温度でのバッカル綿棒	3週	N/A	
-20°Cの温度でのバッカル綿棒	12週	N/A	
-80°Cの温度でのバッカル綿棒	12週	N/A	

【0201】

次の7500 Fastリアルタイム機器データは、それぞれのコントロールに対して次の安定性の主張を検証した：

【表 6 2】

コントロール及び安定性時間

コントロール	安定性
NN(ロット#ALU0912-06)	7500に対して12ヶ月
HN(ロット#ALU0912-07)	7500に対して12ヶ月
HH(ロット#ALU0912-08)	7500に対して12ヶ月

【0202】

《参照文献》

すべての見出しとセクションの指定は、明確性及び参照のみを目的として使用され、そして決して限定と考えるべきではない。例えば、当業者は、本明細書に記載の本発明の精神及び範囲に従って、異なる見出しの様々な観点の組み合わせの有用性を適宜理解するであろう。

【0203】

各々の個々の刊行物若しくは特許又は特許出願が、特別に及び個々にその全体が全ての目的のために参照により本明細書に組み込まれた場合と同視し得る程度、本明細書で引用される全ての参考文献は、全ての目的のためにその全体が参考により本明細書に組み込まれる。

【0204】

当業者に明らかであるように、本出願の多くの変更及び変形は、その精神及び範囲から逸脱することなく行うことが可能である。本明細書に記載の特定の実施態様及び実施例は、例としてのみ提供され、用途は、特許請求の範囲が権利を有しているために等価物の全範囲とともに、添付の請求項によってのみ限定されるものである。

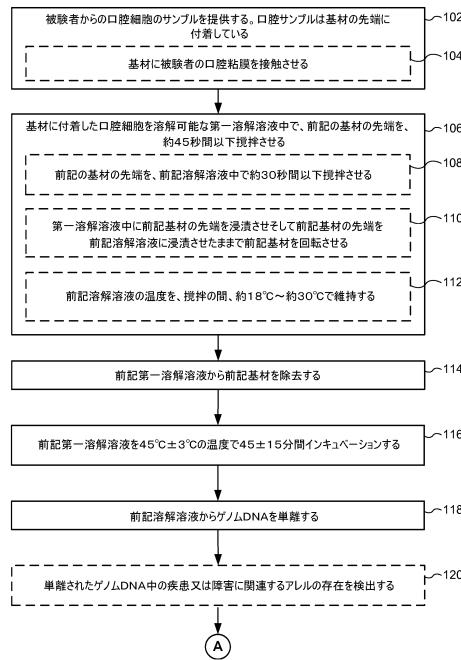
10

20

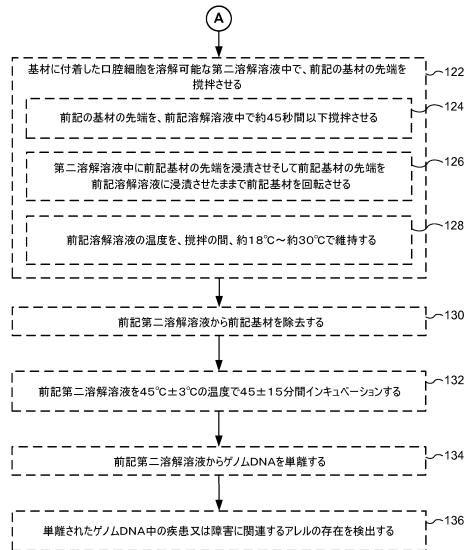
30

40

【図1A】



【図1B】



【図2】

ACD Fw primer: (SEQ ID NO: 1)	ACD Fw5 primer: (SEQ ID NO: 13)
5'-TCC ACC ACC ACT CAG CTG TA	5'-TTT GGG CTT TCC CAC ATG C
ACD Re primer: (SEQ ID NO: 2)	ACD R6 primer: (SEQ ID NO: 14)
5'-CCA TCT CAG GCC TCA GCT T (60 bp)	5'-GGC AGA CGG AGG TCA TCT CA
AV Fw primer: (SEQ ID NO: 3)	ACD Fw6 primer: (SEQ ID NO: 15)
5'-TGC AGC CCT ACC ACT CTC AA	5'-GTA GTA CGG TGC TCT CTG
AV Re primer: (SEQ ID NO: 4)	ACD R67 primer: (SEQ ID NO: 16)
5'-AGG CCT CGT TGC TAG G (150 bp)	5'-AGT TCC CCA TAA GAA TCC CCC
Real Fw primer: (SEQ ID NO: 5)	ACD Fw7 primer: (SEQ ID NO: 17)
5'-TAG TCT CTT ATT CTA ATA GA	5'-GGC TGG ACC CCC AGA GG
Real Re primer: (SEQ ID NO: 6)	ACD R67 primer: (SEQ ID NO: 18)
5'-GCT GCA GAC TCT GTG TTT AA (600 bp)	5'-ACC CCT CGG GGA AGT AAG G
ACD Fw2 primer: (SEQ ID NO: 7)	ACD Fw8 primer: (SEQ ID NO: 19)
5'-CCA TCC CTC CTT CTG TCT TGT G	5'-AAC CTT TAC GAG AAC CTG GGA
ACD Re2 primer: (SEQ ID NO: 8)	ACD R8 primer: (SEQ ID NO: 20)
5'-CGG GCC CCT CCA TCT C (140 bp)	5'-GAC TCC CAT CCA TCG CC
ACD Fw3 primer: (SEQ ID NO: 9)	ACD Fw9 primer: (SEQ ID NO: 21)
5'-CAG AGA AGG GAG GGT AGC TT (190 bp)	5'-AGT CGT TGG ATC CAC CAC CA
ACD Fw4 primer: (SEQ ID NO: 10)	ACD R9 primer: (SEQ ID NO: 22)
5'-GGG CGA AGA TGG TGA AGC T (190 bp)	5'-GAC GTC ATT TCC TAC TGT TTC AGG
ACD Fw10 primer: (SEQ ID NO: 24)	ACD Re10 primer: (SEQ ID NO: 23)
5'-TCC TCG TCC TCT CCA CCT GTA	5'-CCC CCC AGA AAC AGC CTG
ACD Fw4 primer: (SEQ ID NO: 12)	
5'-AGC TGG CAA CGA GGC CC	

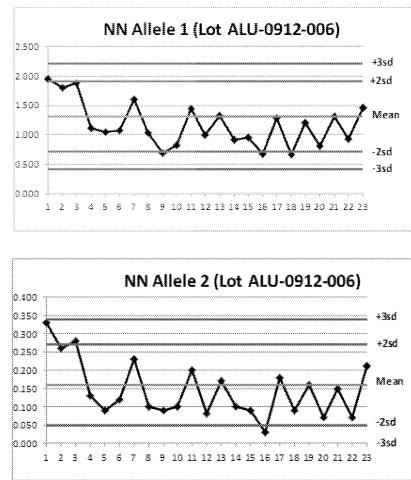
【図3】

Normal probe 5: (SEQ ID NO: 33)	VIC-CTG TAC ACG GAC CGC ACG GAG-NFQ
Mutant probe 5: (SEQ ID NO: 34)	FAM-CTG TAC ACG GAC CAC ACG GAG-NFQ (21 pp)
Normal probe 6: (SEQ ID NO: 35)	VIC-GCT GTA CAC CGG CGG CAC GGA GAA-NFQ
Mutant probe 6: (SEQ ID NO: 36)	FAM-GCT GTA CAC CGG CGG CAC GGA GAA-NFQ
Normal probe 7: (SEQ ID NO: 37)	VIC-ACC GCA CGG AGA AGC AGC-NFQ
Mutant probe 7: (SEQ ID NO: 38)	FAM-ACC ACA CGG AGA AGC AGC-NFQ
Normal probe 8: (SEQ ID NO: 39)	VIC-ACC GCA CGG AGA AGC TGA GGC-NFQ
Mutant probe 8: (SEQ ID NO: 40)	FAM-ACC ACA CGG AGA AGC TGA GGC-NFQ
Normal probe 8: (SEQ ID NO: 41)	VIC-ACC GCA CGG AGA AGC TGA GGC CTG-NFQ
Mutant probe 8: (SEQ ID NO: 42)	FAM-ACC ACA CGG AGA AGC TGA GGC CTG-NFQ

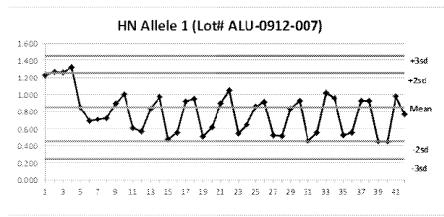
【図4】

	Time	40X volume	7500 結果		StepOnePlus 結果		結果の質 / 信頼性	
			Allele 1	Allele 2	Allele 1	Allele 2	Allele 1	Allele 2
36 cycles 3 second @ 95°C	60 min	0.2 μL	R1: 0.582	R1: 0.123	R1: 0.260	R1: 0.006	許容可能	不合格
			R2: 0.347	R2: 0.099	R2: 0.150	R2: 0.000		
40 cycles 3 second @ 95°C	83 min	0.15 μL	R3: 0.326	R3: 0.099	R3: 0.161	R3: 0.000	優れている	良好
			R1: 1.293	R1: 0.223	R1: 0.786	R1: 0.091		
36 cycles 5 second @ 95°C	75 min	0.15 μL	R2: 0.165	R2: 0.260	R2: 0.719	R2: 0.085	許容可能	不合格
			R3: 1.070	R3: 0.174	R3: 0.617	R3: 0.076		
37 cycles 5 second @ 95°C	78 min	0.15 μL	R1: 0.724	R1: 0.164	R1: 0.343	R1: 0.034	許容可能	不合格
			R2: 0.386	R2: 0.153	R2: 0.229	R2: 0.020		
38 cycles 5 second @ 95°C	80 min	0.15 μL	R3: 0.415	R3: 0.155	R3: 0.202	R3: 0.012	優れている	良好
			R1: 0.893	R1: 0.187	R1: 0.511	R1: 0.053		
39 cycles 5 second @ 95°C	82 min	0.15 μL	R2: 0.614	R2: 0.163	R2: 0.325	R2: 0.023	許容可能	許容可能
			R3: 0.592	R3: 0.155	R3: 0.300	R3: 0.022		
40 cycles 5 second @ 95°C	85 min	0.15 μL	R1: 0.951	R1: 0.181	R1: 0.604	R1: 0.066	良好	許容可能
			R2: 0.572	R2: 0.119	R2: 0.429	R2: 0.040		
			R3: 0.710	R3: 0.164	R3: 0.403	R3: 0.037	優れている	良好
			R1: 1.167	R1: 0.250	R1: 0.698	R1: 0.084		
			R2: 0.806	R2: 0.190	R2: 0.546	R2: 0.052	許容可能	許容可能
			R3: 0.812	R3: 0.170	R3: 0.528	R3: 0.056		

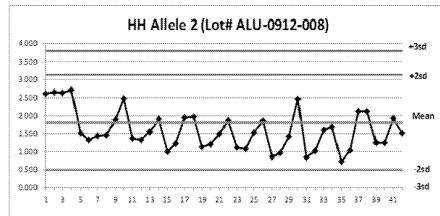
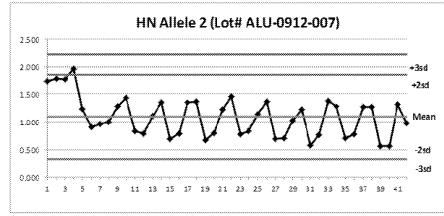
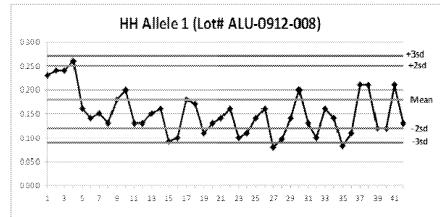
【図5】



【図6】



【図7】



【配列表】

0006412101000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100194973

弁理士 尾崎 祐朗

(72)発明者 チャオ - シェーン コニー

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 94025, メンロー パーク, アダムズ ドライブ 15
05, スイート B-2

審査官 福澤 洋光

(56)参考文献 Rapid Isolation of Genomic DNA from Small Quantities of Human Tissue , Profiles in DNA , 1999年, Vol.2, No.3, p.7-9

Comparison of methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissues and buccal cells , Cancer Detection and Prevention , 2003年, Vol.27, p.397-404

Reliability of non-invasively acquired human genomic DNA as a substrate for real-time PCR-assisted analysis of genetic polymorphisms , Arch Toxicol , 2004年, Vol.78, p.390-396

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/00 - 15/90

C12Q 1/00 - 3/00

CA / MEDLINE / BIOSIS / WPIDS (STN)

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)

PubMed