

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成26年3月13日(2014.3.13)

【公表番号】特表2013-517789(P2013-517789A)

【公表日】平成25年5月20日(2013.5.20)

【年通号数】公開・登録公報2013-025

【出願番号】特願2012-550529(P2012-550529)

【国際特許分類】

C 12 N 15/09 (2006.01)

C 12 Q 1/68 (2006.01)

【F I】

C 12 N 15/00 Z N A A

C 12 Q 1/68 Z

【手続補正書】

【提出日】平成26年1月22日(2014.1.22)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

母体血液の試料を使用した胎児異数性の出生前検出の方法であつて、

a) 高メチル化DNA試料を得るために、母体の血液試料において、高メチル化DNAまたは低メチル化DNAを化学的に変性させることなく、または酵素的に消化させることなく、高メチル化DNAを低メチル化DNAと物理的に分離する工程；

b) 高メチル化DNA試料の高メチル化値を得るために、高メチル化DNA試料において、複数の特異的メチル化領域(DMR)のレベルを決定する工程；

c) 高メチル化DNA試料の高メチル化値を前記複数のDMRの標準参照高メチル化値と比較する工程；および

d) 前記比較に基づき、胎児異数性を検出する工程

を含む、前記方法。

【請求項2】

母体血液試料が母体の末梢血試料である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

高メチル化DNAが、メチル化DNAを免疫沈降する抗体を用いて低メチル化DNAから分離される、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

複数のDMRが、添付A～Eに示されたリストから選択される、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

複数のDMRレベルが、少なくとも3、5、8または10個のDMRについて決定される、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

高メチル化DNA試料における複数のDMRレベルが、リアルタイム定量ポリメラーゼ連鎖反応(リアルタイムQPCR)により決定される、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

高メチル化DNA試料の高メチル化値を正常な母体血液DNA試料の標準正常参照高メチル化値と比較し、高メチル化DNA試料の高メチル化値が正常な母体血液DNA試料の標準正常参照高メチル化値よりも高ければ、胎児異数性の検出がされる、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

21トリソミー検出のための複数のDMRが21番染色体上にある、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

複数のDMRが21番染色体上にあり、かつ

(a) 複数のDMRが、塩基対39279856-39280004(SEQ ID NO:33)、塩基対44161178-44161323(SEQ ID NO:34)、塩基対44161239-44161371(SEQ ID NO:35)、塩基対3320735-33320829(SEQ ID NO:36)、塩基対42189557-42189683(SEQ ID NO:37)、塩基対42355712-42355815(SEQ ID NO:38)、塩基対42357215-42357341(SEQ ID NO:39)、塩基対22403649-22403792(SEQ ID NO:40)、塩基対29136735-29136844(SEQ ID NO:41)、塩基対32268843-32268943(SEQ ID NO:42)、塩基対44079235-44079322(SEQ ID NO:43)、塩基対37841284-37841411(SEQ ID NO:44)、およびそれらの組み合わせから成る群から選択される3個またはそれ以上の領域を含む、

(b) 複数のDMRが、塩基対39279856-39280004(SEQ ID NO:33)、塩基対44161178-44161323(SEQ ID NO:34)、塩基対44161239-44161371(SEQ ID NO:35)、塩基対3320735-33320829(SEQ ID NO:36)、塩基対42189557-42189683(SEQ ID NO:37)、塩基対42355712-42355815(SEQ ID NO:38)、塩基対42357215-42357341(SEQ ID NO:39)、塩基対22403649-22403792(SEQ ID NO:40)、塩基対29136735-29136844(SEQ ID NO:41)、塩基対32268843-32268943(SEQ ID NO:42)、塩基対44079235-44079322(SEQ ID NO:43)、塩基対37841284-37841411(SEQ ID NO:44)、およびそれらの組み合わせから成る群から選択される8個またはそれ以上の領域を含む、または

(c) 複数のDMRが、塩基対33320735-33320829(SEQ ID NO:36)、塩基対42189557-42189683(SEQ ID NO:37)、塩基対42355712-42355815(SEQ ID NO:38)、塩基対42357215-42357341(SEQ ID NO:39)、塩基対22403649-22403792(SEQ ID NO:40)、塩基対32268843-32268943(SEQ ID NO:42)、塩基対44079235-44079322(SEQ ID NO:44)のヌクレオチド配列を有する8個の領域から成る、

請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

複数のDMRが、21番染色体、13番染色体、18番染色体、X染色体およびY染色体から成る群から選択された染色体上にある、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

母体の末梢血試料を使用した21トリソミーの出生前検出の方法であって、

a) 高メチル化DNA試料を得るために、母体末梢血の試料において、高メチル化DNAまたは低メチル化DNAを化学的に変性させることなく、または酵素的に消化させる

ことなく、高メチル化DNAを低メチル化DNAと物理的に分離する工程；

b) 高メチル化DNA試料の高メチル化値を得るために、高メチル化DNA試料において、21番染色体上の複数の特異的メチル化領域(DMR)レベルを決定する工程であって、

21番染色体上の複数のDMRが、塩基対39279856-39280004(SEQ ID NO:33)、塩基対44161178-44161323(SEQ ID NO:34)、塩基対44161239-44161371(SEQ ID NO:35)、塩基対33320735-33320829(SEQ ID NO:36)、塩基対42189557-42189683(SEQ ID NO:37)、塩基対42355712-42355815(SEQ ID NO:38)、塩基対42357215-42357341(SEQ ID NO:39)、塩基対22403649-22403792(SEQ ID NO:40)、塩基対29136735-29136844(SEQ ID NO:41)、塩基対32268843-32268943(SEQ ID NO:42)、塩基対44079235-44079322(SEQ ID NO:43)、塩基対37841284-37841411(SEQ ID NO:44)、およびそれらの組み合わせから成る群から選択される8個またはそれ以上の領域を含み、および

複数のDMRレベルがリアルタイム定量ポリメラーゼ連鎖反応(リアルタイムQPCR)により決定される、工程；

c) 高メチル化DNA試料の高メチル化値を21番染色体上の前記複数のDMRの標準正常参照高メチル化値と比較する工程；ならびに

d) 前記比較に基づき21トリソミーを検出する工程を含む、前記方法。

【請求項12】

高メチル化DNAが、メチル化DNA免疫沈降(MediP)により低メチル化DNAから物理的に分離される、請求項1~11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

高メチル化DNAが低メチル化DNAから物理的に分離された後、高メチル化DNAが増幅される、請求項1~12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

高メチル化DNAがライゲーション仲介ポリメラーゼ連鎖反応(LM-PCR)により増幅される、請求項1~13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

LM-PCR効率のコントロールとして、複数のDMRレベルが未処理の母体血液DNA試料全体においても決定される、請求項1~14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

高メチル化DNA試料の高メチル化値を正常な母体血液DNA試料の標準正常参照高メチル化値と比較し、高メチル化DNA試料の高メチル化値が、正常な母体血液DNA試料の標準正常参照高メチル化値よりも高ければ21トリソミーの検出がされる、請求項11に記載の方法。

【請求項17】

21番染色体上の複数のDMRが、塩基対33320735-33320829(SEQ ID NO:36)、塩基対42189557-42189683(SEQ ID NO:37)、塩基対42355712-42355815(SEQ ID NO:38)、塩基対42357215-42357341(SEQ ID NO:39)、塩基対22403649-22403792(SEQ ID NO:40)、塩基対32268843-32268943(SEQ ID NO:42)、塩基対44079235-44079322(SEQ ID NO:43)、および塩基対37841284-37841411(SEQ ID NO:44)のヌクレオチド配列を有する8個の領域から成る、請求項11に記載の方法。

【請求項 18】

胎児異数性の診断に利用するのに適し、関心対象の染色体上にある特異的メチル化領域（DMR）を同定する方法であって、

a) 以下：

- (i) 正常の成人女性の末梢血DNA試料（PB試料）；および
- (ii) 正常な胎盤DNA試料（PL試料）

を提供する工程；

b) 以下：

- (i) 分離されたPB試料；および
- (ii) 分離されたPL試料

を得るために、a)の各試料において、高メチル化DNAまたは低メチル化DNAを化学的に変性させることなく、または酵素的に消化させることなく、高メチル化DNAを低メチル化DNAから物理的に分離する工程；

c) b)の分離された各試料において、関心対象の染色体上の複数の領域のレベルを決定する工程；および

d) 分離されたPB試料では低メチル化され、かつ分離されたPL試料では高メチル化されている領域を選択する工程であって、それによって関心対象の染色体上の特異的メチル化領域（DMR）を同定する、工程

を含む、前記方法。

【請求項 19】

PL試料が二つの異なる試料、すなわち、第1トリメスターPL試料および第3トリメスターPL試料を含み、前記工程d)が、第1トリメスターの分離PL試料および第3トリメスターの分離PL試料の中で同じメチル化度を有する領域を選択する工程をさらに含む、請求項18に記載の方法。

【請求項 20】

関心対象の染色体が、21番染色体、13番染色体、18番染色体、X染色体およびY染色体から成る群から選択される、請求項18または19に記載の方法。

【請求項 21】

異数性がトリソミーまたはモノソミーである、請求項18または19に記載の方法。

【請求項 22】

以下を含む21トリソミーの出生前診断キット：

a) 21番染色体上の複数の特異的メチル化領域（DMR）のレベルを決定するための、1種または複数種の核酸組成物；および

b) 21トリソミーの出生前診断のための核酸組成物の利用ガイド。

【請求項 23】

21番染色体上の複数のDMRが、添付A～Eに示されたリストから選択される、請求項22に記載のキット。

【請求項 24】

21番染色体上の複数のDMRが、

(a) 塩基対39279856-39280004 (SEQ ID NO: 33)、塩基対44161178-44161323 (SEQ ID NO: 34)、塩基対44161239-44161371 (SEQ ID NO: 35)、塩基対33320735-33320829 (SEQ ID NO: 36)、塩基対42189557-42189683 (SEQ ID NO: 37)、塩基対42355712-42355815 (SEQ ID NO: 38)、塩基対42357215-42357341 (SEQ ID NO: 39)、塩基対22403649-22403792 (SEQ ID NO: 40)、塩基対29136735-29136844 (SEQ ID NO: 41)、塩基対32268843-32268943 (SEQ ID NO: 42)、塩基対44079235-44079322 (SEQ ID NO: 43)、塩基対37841284-37841411 (SEQ ID NO: 44)、およびそれらの組み合わせから成る群

から選択される 3 個またはそれ以上の領域を含む、

(b) 塩基対 3 9 2 7 9 8 5 6 - 3 9 2 8 0 0 0 4 (S E Q I D N O : 3 3) 、 塩基
対 4 4 1 6 1 1 7 8 - 4 4 1 6 1 3 2 3 (S E Q I D N O : 3 4) 、 塩基対 4 4 1 6
1 2 3 9 - 4 4 1 6 1 3 7 1 (S E Q I D N O : 3 5) 、 塩基対 3 3 3 2 0 7 3 5 -
3 3 3 2 0 8 2 9 (S E Q I D N O : 3 6) 、 塩基対 4 2 1 8 9 5 5 7 - 4 2 1 8 9
6 8 3 (S E Q I D N O : 3 7) 、 塩基対 4 2 3 5 5 7 1 2 - 4 2 3 5 5 8 1 5 (S
E Q I D N O : 3 8) 、 塩基対 4 2 3 5 7 2 1 5 - 4 2 3 5 7 3 4 1 (S E Q I D
N O : 3 9) 、 塩基対 2 2 4 0 3 6 4 9 - 2 2 4 0 3 7 9 2 (S E Q I D N O : 4
0) 、 塩基対 2 9 1 3 6 7 3 5 - 2 9 1 3 6 8 4 4 (S E Q I D N O : 4 1) 、 塩基
対 3 2 2 6 8 8 4 3 - 3 2 2 6 8 9 4 3 (S E Q I D N O : 4 2) 、 塩基対 4 4 0 7
9 2 3 5 - 4 4 0 7 9 3 2 2 (S E Q I D N O : 4 3) 、 塩基対 3 7 8 4 1 2 8 4 -
3 7 8 4 1 4 1 1 (S E Q I D N O : 4 4) 、 およびそれらの組み合わせから成る群
から選択される 8 個またはそれ以上の領域を含む、または

(c) 塩基対 3 3 3 2 0 7 3 5 - 3 3 3 2 0 8 2 9 (S E Q I D N O : 3 6) 、 塩基
対 4 2 1 8 9 5 5 7 - 4 2 1 8 9 6 8 3 (S E Q I D N O : 3 7) 、 塩基対 4 2 3 5
5 7 1 2 - 4 2 3 5 5 8 1 5 (S E Q I D N O : 3 8) 、 塩基対 4 2 3 5 7 2 1 5 -
4 2 3 5 7 3 4 1 (S E Q I D N O : 3 9) 、 塩基対 2 2 4 0 3 6 4 9 - 2 2 4 0 3
7 9 2 (S E Q I D N O : 4 0) 、 塩基対 3 2 2 6 8 8 4 3 - 3 2 2 6 8 9 4 3 (S
E Q I D N O : 4 2) 、 塩基対 4 4 0 7 9 2 3 5 - 4 4 0 7 9 3 2 2 (S E Q I D
N O : 4 3) 、 および塩基対 3 7 8 4 1 2 8 4 - 3 7 8 4 1 4 1 1 (S E Q I D
N O : 4 4) のヌクレオチド配列を有する 8 個の領域から成る、

請求項 2 2 に記載のキット。

【請求項 2 5】

核酸組成物が、

GCTGGACCAGAAAGTGTGAG (SEQ ID NO: 1), GTGTGCTGCTTGCAATGTG
(SEQ ID NO: 2), GGTGAGTTTGTTGGTGTG (SEQ ID NO: 3),
CCACCGTCACTGTTCTAGA (SEQ ID NO: 4), CCTCGTGCTCGTGTCTGTAT
(SEQ ID NO: 5), GAGGAAACAGCTGGCTCTG (SEQ ID NO: 6),
CTGTTGCATGAGAGCAGAGG (SEQ ID NO: 7), CGTCCCCCTCGCTACTATCT
(SEQ ID NO: 8), TGCAGGATATTGGCAAGGT (SEQ ID NO: 9),
CTGTGCCGGTAGAAATGGTT (SEQ ID NO: 10), TGAATCAGTTCACCGACAGC
(SEQ ID NO: 11), GAAACAACCTGGCCATTCTC (SEQ ID NO: 12),
CCGTTATATGGATGCCTTGG (SEQ ID NO: 13), AAACCTGTTGGCTGAACCTGC
(SEQ ID NO: 14), CCAGGCAAGATGGCTTATGT (SEQ ID NO: 15),
ACCATGCTCAGCCAATTTT (SEQ ID NO: 16), GACCCAGACGATAACCTGGAA
(SEQ ID NO: 17), GCTGAACAAAACCTGGCTTC (SEQ ID NO: 18),
CCACATCCTGGCCATCTACT (SEQ ID NO: 19), TTCCACAGACAGCAGAGACG
(SEQ ID NO: 20), TGAGCTCACAGGTCTGGAAA (SEQ ID NO: 21),
CCCCACAGGGTTCTGGTAAT (SEQ ID NO: 22), ATTCTCCACAGGGCAATGAG
(SEQ ID NO: 23), TTATGTGGCCTTCCTCCTG (SEQ ID NO: 24)

、 およびそれらの組み合わせから成る群から選択される 1 種または複数種のオリゴヌクレオチドプライマーを含む、請求項 2 2 ~ 2 4 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 2 6】

血液試料において、高メチル化DNAまたは低メチル化DNAを化学的に変性させることなく、または酵素的に消化させることなく、高メチル化DNAを低メチル化DNAから物理的に分離する手段をさらに含む、請求項22～25のいずれか一項に記載のキット。

【請求項27】

高メチル化DNAを低メチル化DNAから物理的に分離する手段が、メチル化DNAを免疫沈降させる抗体を含む、請求項26に記載のキット。

【請求項28】

高メチル化DNAを増幅する手段をさらに含む、請求項26に記載のキット。

【請求項29】

高メチル化DNAを増幅する手段が、ライゲーション仲介ポリメラーゼ連鎖反応（LM-PCR）を行うためのオリゴヌクレオチドリンカーまたはオリゴヌクレオチドプライマーを含む、請求項28に記載のキット。

【請求項30】

GCTGGACCAGAAAGTGTGAG (SEQ

ID NO: 1), GTGTGCTGCTTGCAATGTG (SEQ ID NO: 2),

GGTCGAGTTTGGTGGTGT (SEQ ID NO: 3), CCACCGTCACTGTTCCCTAGA

(SEQ ID NO: 4), CCTCGTGCTCGTGTCTGTAT (SEQ ID NO: 5),

GAGGAAACAGCTGGCTCTG (SEQ ID NO: 6), CTGTTGCATGAGAGCAGAGG

(SEQ ID NO: 7), CGTCCCCCTCGCTACTATCT (SEQ ID NO: 8),

TGCAGGATATTGGCAAGGT (SEQ ID NO: 9), CTGTGCCGGTAGAAATGGTT

(SEQ ID NO: 10), TGAATCAGTTCACCGACAGC (SEQ ID NO: 11),

GAAACAACCTGGCCATTCTC (SEQ ID NO: 12), CCGTTATATGGATGCCTTGG

(SEQ ID NO: 13), AAACCTGTTGGCTGAACCTGC (SEQ ID NO: 14),

CCAGGCAAGATGGCTTATGT (SEQ ID NO: 15), ACCATGCTCAGCCAATTTC

(SEQ ID NO: 16), GACCCAGACGATACTGGAA (SEQ ID NO: 17),

GCTGAACAAACTCGGCTTC (SEQ ID NO: 18), CCACATCCTGGCCATCTACT

(SEQ ID NO: 19), TTCCACAGACACAGAGACG (SEQ ID NO: 20),

TGAGCTCACAGGTCTGGAAA (SEQ ID NO: 21), CCCCACAGGGTCTGGTAAT

(SEQ ID NO: 22), ATTCTCCACAGGGCAATGAG (SEQ ID NO: 23),

TTATGTGCCCTTCCTCCTG (SEQ ID NO: 24)

、およびそれらの組み合わせから成る群から選択される1種または複数種の単離オリゴヌクレオチドプライマーを含む、核酸組成物。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0024

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0024】

さらに別の態様では、本発明は、SEQ ID NOs: 1～24、およびそれらの組み合わせから成る群から選択される1種または複数種の単離オリゴヌクレオチドプライマーが含まれる。

[本発明1001]

母体血液の試料を使用した胎児異数性の出生前診断の方法であって、

a) 高メチル化DNA試料を得るために、母体の血液試料において、高メチル化DNAまたは低メチル化DNAを化学的に変性させることなく、または酵素的に消化させることなく、高メチル化DNAを低メチル化DNAと物理的に分離する工程；

b) 高メチル化DNA試料の高メチル化値を得るために、高メチル化DNA試料において、複数の特異的メチル化領域(DMR)のレベルを決定する工程；

c) 高メチル化DNA試料の高メチル化値を前記複数のDMRの標準参照高メチル化値と比較する工程；および

d) 前記比較に基づき、胎児異数性を診断する工程を含む、前記方法。

[本発明1002]

母体血液試料が母体の末梢血試料である、本発明1001の方法。

[本発明1003]

高メチル化DNAが、メチル化DNA免疫沈降(MeDIP)により低メチル化DNAから物理的に分離される、本発明1001の方法。

[本発明1004]

高メチル化DNAが低メチル化DNAから物理的に分離された後、該高メチル化DNAが増幅される、本発明1001の方法。

[本発明1005]

高メチル化DNAがライゲーション仲介ポリメラーゼ連鎖反応(LM-PCR)により増幅される、本発明1004の方法。

[本発明1006]

複数のDMRが、添付A～Eに示されたリストから選択される、本発明1001の方法。

[本発明1007]

複数のDMRレベルが、少なくとも3個のDMRに関して決定される、本発明1001の方法。

[本発明1008]

複数のDMRレベルが、少なくとも5個のDMRに関して決定される、本発明1001の方法。

[本発明1009]

複数のDMRレベルが、少なくとも8個のDMRに関して決定される、本発明1001の方法。

[本発明1010]

複数のDMRレベルが、少なくとも10個のDMRに関して決定される、本発明1001の方法。

[本発明1011]

複数のDMRが、添付A～Eに示されるリストから選択される、本発明1007～1010のいずれかの方法。

[本発明1012]

高メチル化DNA試料における複数のDMRレベルが、リアルタイム定量ポリメラーゼ連鎖反応(リアルタイムQPCR)により決定される、本発明1001の方法。

[本発明1013]

LM-PCR効率のコントロールとして、複数のDMRのレベルが未処理の母体血液DNA試料全体においても決定される、本発明1005の方法。

[本発明1014]

高メチル化DNA試料の高メチル化値を正常な母体血液DNA試料の標準正常参照高メチル化値と比較し、高メチル化DNA試料の高メチル化値が正常な母体血液DNA試料の標準正常参照高メチル化値よりも高ければ、胎児異数性の診断が下される、本発明1001の方法。

[本発明1015]

21トリソミー診断のための複数のDMRが21番染色体上にある、本発明1001の方法。

[本発明1016]

21番染色体上の複数のDMRが、塩基対39279856 - 39280004 (SEQ ID NO:33)、塩基対44161178 - 44161323 (SEQ ID NO:34)、塩基対44161239 - 44161371 (SEQ ID NO:35)、塩基対33320735 - 33320829 (SEQ ID NO:36)、塩基対42189557 - 42189683 (SEQ ID NO:37)、塩基対42355712 - 42355815 (SEQ ID NO:38)、塩基対42357215 - 42357341 (SEQ ID NO:39)、塩基対22403649 - 22403792 (SEQ ID NO:40)、塩基対29136735 - 29136844 (SEQ ID NO:41)、塩基対32268843 - 32268943 (SEQ ID NO:42)、塩基対44079235 - 44079322 (SEQ ID NO:43)、塩基対37841284 - 37841411 (SEQ ID NO:44)、およびそれらの組み合わせから成る群から選択される3個またはそれ以上の領域を含む、本発明1001の方法。

[本発明1017]

21番染色体上の複数のDMRが、塩基対39279856 - 39280004 (SEQ ID NO:33)、塩基対44161178 - 44161323 (SEQ ID NO:34)、塩基対44161239 - 44161371 (SEQ ID NO:35)、塩基対33320735 - 33320829 (SEQ ID NO:36)、塩基対42189557 - 42189683 (SEQ ID NO:37)、塩基対42355712 - 42355815 (SEQ ID NO:38)、塩基対42357215 - 42357341 (SEQ ID NO:39)、塩基対22403649 - 22403792 (SEQ ID NO:40)、塩基対29136735 - 29136844 (SEQ ID NO:41)、塩基対32268843 - 32268943 (SEQ ID NO:42)、塩基対44079235 - 44079322 (SEQ ID NO:43)、塩基対37841284 - 37841411 (SEQ ID NO:44)、およびそれらの組み合わせから成る群から選択される8個またはそれ以上の領域を含む、本発明1001の方法。

[本発明1018]

21番染色体上の複数のDMRが、塩基対33320735 - 33320829 (SEQ ID NO:36)、塩基対42189557 - 42189683 (SEQ ID NO:37)、塩基対42355712 - 42355815 (SEQ ID NO:38)、塩基対42357215 - 42357341 (SEQ ID NO:39)、塩基対22403649 - 22403792 (SEQ ID NO:40)、塩基対32268843 - 32268943 (SEQ ID NO:42)、塩基対44079235 - 44079322 (SEQ ID NO:43)および塩基対37841284 - 37841411 (SEQ ID NO:44)のヌクレオチド配列を有する8個の領域から成る、本発明1017の方法。

[本発明1019]

複数のDMRが、13番染色体、18番染色体、X染色体およびY染色体から成る群から選択された染色体上にある、本発明1001の方法。

[本発明1020]

母体の末梢血試料を使用した21トリソミーの出生前診断の方法であって、

a) 高メチル化DNA試料を得るために、母体末梢血の試料において、高メチル化DNAまたは低メチル化DNAを化学的に変性させることなく、または酵素的に消化させることなく、高メチル化DNAを低メチル化DNAと物理的に分離する工程；

b) 高メチル化DNA試料の高メチル化値を得るために、高メチル化DNA試料において、21番染色体上の複数の特異的メチル化領域(DMR)レベルを決定する工程であって、

21番染色体上の複数のDMRが、塩基対39279856 - 39280004 (SEQ ID NO:33)、塩基対44161178 - 44161323 (SEQ ID NO:34)、塩基対44161239 - 44161371 (SEQ ID NO:35)、塩基対33320735 - 33320829 (SEQ ID NO:36)、塩基対42189557 - 42189683 (SEQ ID NO:37)、塩基対42355712 - 42355815 (SEQ ID NO:38)、塩基対42357215 - 42357341 (SEQ ID NO:39)、塩基対22403649 - 22403792 (SEQ ID NO:40)、塗基対29136735 - 29136844 (SEQ ID NO:41)、塗基対32268843 - 32268943 (SEQ ID NO:42)、塗基対44079235 - 44079322 (SEQ ID NO:43)、塗基対37841284 - 37841411 (SEQ

I D N O : 44) 、およびそれらの組み合わせから成る群から選択される8個またはそれ以上の領域を含み、および

複数の D M R レベルがリアルタイム定量ポリメラーゼ連鎖反応（リアルタイム Q P C R ）により決定される、工程；

c) 高メチル化 D N A 試料の高メチル化値を21番染色体上の前記複数の D M R の標準正常参照高メチル化値と比較する工程；ならびに

d) 前記比較に基づき21トリソミーを診断する工程
を含む、前記方法。

[本発明1021]

高メチル化 D N A が、メチル化 D N A 免疫沈降（ M e D i P ）により低メチル化 D N A から物理的に分離される、本発明1020の方法。

[本発明1022]

高メチル化 D N A が低メチル化 D N A から物理的に分離された後、高メチル化 D N A が増幅される、本発明1020の方法。

[本発明1023]

高メチル化 D N A がライゲーション仲介ポリメラーゼ連鎖反応（ L M - P C R ）により増幅される、本発明1022の方法。

[本発明1024]

L M - P C R 効率のコントロールとして、複数の D M R レベルが未処理の母体血液 D N A 試料全体においても決定される、本発明1020の方法。

[本発明1025]

高メチル化 D N A 試料の高メチル化値を正常な母体血液 D N A 試料の標準正常参照高メチル化値と比較し、高メチル化 D N A 試料の高メチル化値が、正常な母体血液 D N A 試料の標準正常参照高メチル化値よりも高ければ21トリソミーの診断が下される、本発明1020の方法。

[本発明1026]

21番染色体上の複数の D M R が、塩基対 33320735 - 33320829 (S E Q I D N O : 36) 、塩基対 42189557 - 42189683 (S E Q I D N O : 37) 、塩基対 42355712 - 42355815 (S E Q I D N O : 38) 、塩基対 42357215 - 42357341 (S E Q I D N O : 39) 、塩基対 22403649 - 22403792 (S E Q I D N O : 40) 、塩基対 32268843 - 32268943 (S E Q I D N O : 42) 、塩基対 44079235 - 44079322 (S E Q I D N O : 43) 、および塩基対 37841284 - 37841411 (S E Q I D N O : 44) のヌクレオチド配列を有する8個の領域から成る、本発明1020の方法。

[本発明1027]

胎児異数性の診断に利用するのに適し、関心対象の染色体上にある特異的メチル化領域（ D M R ）を同定する方法であって、

a) 以下：

(i) 正常の成人女性の末梢血 D N A 試料（ P B 試料）；および

(i i) 正常な胎盤 D N A 試料（ P L 試料）

を提供する工程；

b) 以下：

(i) 分離された P B 試料；および

(i i i) 分離された P L 試料

を得るために、 a) の各試料において、高メチル化 D N A または低メチル化 D N A を化学的に変性させることなく、または酵素的に消化させることなく、高メチル化 D N A を低メチル化 D N A から物理的に分離する工程；

c) b) の分離された各試料において、関心対象の染色体上の複数の領域のレベルを決定する工程；および

d) 分離された P B 試料では低メチル化され、かつ分離された P L 試料では高メチル化されている領域を選択する工程であって、それによって関心対象の染色体上の特異的メ

チル化領域（ D M R ）を同定する、工程
を含む、前記方法。

[本発明1028]

P L 試料が二つの異なる試料、すなわち、第1トリメスター P L 試料および第3トリメスター P L 試料を含み、前記工程 d) が、第1トリメスターの分離 P L 試料および第3トリメスターの分離 P L 試料の中で同じメチル化度を有する領域を選択する工程をさらに含む、本発明1027の方法。

[本発明1029]

関心対象の染色体が21番染色体である、本発明1027の方法。

[本発明1030]

関心対象の染色体が、13番染色体、18番染色体、X染色体およびY染色体から成る群から選択される、本発明1027の方法。

[本発明1031]

異数性がトリソミーまたはモノソミーである、本発明1027の方法。

[本発明1032]

以下を含む21トリソミーの出生前診断キット：

a) 21番染色体上の複数の特異的メチル化領域（ D M R ）のレベルを決定するための、1種または複数種の核酸組成物；および

b) 21トリソミーの出生前診断のための核酸組成物の利用ガイド。

[本発明1033]

21番染色体上の複数の D M R が、添付 A ~ E に示されたリストから選択される、本発明1032のキット。

[本発明1034]

21番染色体上の複数の D M R が、塩基対39279856 - 39280004 (S E Q I D N O : 33) 、塩基対44161178 - 44161323 (S E Q I D N O : 34) 、塩基対44161239 - 44161371 (S E Q I D N O : 35) 、塩基対33320735 - 33320829 (S E Q I D N O : 36) 、塩基対42189557 - 42189683 (S E Q I D N O : 37) 、塩基対42355712 - 42355815 (S E Q I D N O : 38) 、塩基対42357215 - 42357341 (S E Q I D N O : 39) 、塩基対22403649 - 22403792 (S E Q I D N O : 40) 、塩基対29136735 - 29136844 (S E Q I D N O : 41) 、塩基対32268843 - 32268943 (S E Q I D N O : 42) 、塩基対44079235 - 44079322 (S E Q I D N O : 43) 、塩基対37841284 - 37841411 (S E Q I D N O : 44) 、およびそれらの組み合わせから成る群から選択される3個またはそれ以上の領域を含む、本発明1032のキット。

[本発明1035]

染色体21上の複数の D M R が、塩基対39279856 - 39280004 (S E Q I D N O : 33) 、塩基対44161178 - 44161323 (S E Q I D N O : 34) 、塩基対44161239 - 44161371 (S E Q I D N O : 35) 、塩基対33320735 - 33320829 (S E Q I D N O : 36) 、塩基対42189557 - 42189683 (S E Q I D N O : 37) 、塩基対42355712 - 42355815 (S E Q I D N O : 38) 、塩基対42357215 - 42357341 (S E Q I D N O : 39) 、塩基対22403649 - 22403792 (S E Q I D N O : 40) 、塩基対29136735 - 29136844 (S E Q I D N O : 41) 、塩基対32268843 - 32268943 (S E Q I D N O : 42) 、塩基対44079235 - 44079322 (S E Q I D N O : 43) 、塩基対37841284 - 37841411 (S E Q I D N O : 44) 、およびそれらの組み合わせから成る群から選択される8個またはそれ以上の領域を含む、本発明1032のキット。

[本発明1036]

21番染色体上の複数の D M R が、塩基対33320735 - 33320829 (S E Q I D N O : 36) 、塩基対42189557 - 42189683 (S E Q I D N O : 37) 、塩基対42355712 - 42355815 (S E Q I D N O : 38) 、塩基対42357215 - 42357341 (S E Q I D N O : 39) 、塩基対22403649 - 22403792 (S E Q I D N O : 40) 、塩基対32268843 - 32268943 (S E Q I D N O : 42) 、塩基対44079235 - 44079322 (S E Q I D N O : 43) 、お

および塩基対37841284 - 37841411 (SEQ ID NO: 44) のヌクレオチド配列を有する8個の領域から成る、本発明1032のキット。

[本発明1037]

核酸組成物が、

GCTGGACCAGAAAGTGTGAG (SEQ ID NO: 1), GTGTGCTGCTTGCAATGTG
(SEQ ID NO: 2), GGTCGAGTTTGGTGGTGT (SEQ ID NO: 3),
CCACCGTCACTGTTCTAGA (SEQ ID NO: 4), CCTCGTGCTCGTGTCTGTAT
(SEQ ID NO: 5), GAGGAAACAGCTTGGCTCTG (SEQ ID NO: 6),
CTGTTGCATGAGAGCAGAGG (SEQ ID NO: 7), CGTCCCCCTCGCTACTATCT
(SEQ ID NO: 8), TGCAGGATATTGGCAAGGT (SEQ ID NO: 9),
CTGTGCCGGTAGAAATGGTT (SEQ ID NO: 10), TGAATCAGTTCACCGACAGC
(SEQ ID NO: 11), GAAACAACCTGGCCATTCTC (SEQ ID NO: 12),
CCGTTATATGGATGCCTTGG (SEQ ID NO: 13), AAACCTGTTGGCTGAACCTGC
(SEQ ID NO: 14), CCAGGCAAGATGGCTTATGT (SEQ ID NO: 15),
ACCATGCTCAGCCAATTTC (SEQ ID NO: 16), GACCCAGACGATACTGGAA
(SEQ ID NO: 17), GCTGAACAAAACCGCTTC (SEQ ID NO: 18),
CCACATCCTGGCCATCTACT (SEQ ID NO: 19), TTCCACAGACAGCAGAGACG
(SEQ ID NO: 20), TGAGCTCACAGGTCTGGAAA (SEQ ID NO: 21),
CCCCACAGGGTCTGGTAAT (SEQ ID NO: 22), ATTCTCCACAGGGCAATGAG
(SEQ ID NO: 23), TTATGTGGCCTTCCTCCTG (SEQ ID NO: 24)

、およびそれらの組み合わせから成る群から選択される1種または複数種のオリゴヌクレオチドプライマーを含む、本発明1032のキット。

[本発明1038]

血液試料において、高メチル化DNAまたは低メチル化DNAを化学的に変性させることなく、または酵素的に消化されることなく、高メチル化DNAを低メチル化DNAから物理的に分離する手段をさらに含む、本発明1032のキット。

[本発明1039]

高メチル化DNAを低メチル化DNAから物理的に分離する手段が、メチル化DNAを免疫沈降させる抗体を含む、本発明1038のキット。

[本発明1040]

高メチル化DNAを增幅する手段をさらに含む、本発明1038のキット。

[本発明1041]

高メチル化DNAを增幅する手段が、ライゲーション仲介ポリメラーゼ連鎖反応(LEM-PCR)を行うためのオリゴヌクレオチドリンクーまたはオリゴヌクレオチドプライマーを含む、本発明1040のキット。

[本発明1042]

GCTGGACCAGAAAGTGTGAG (SEQ ID NO: 1), GTGTGCTGCTTGCAATGTG (SEQ ID NO: 2), GGTCGAGTTTGTTGGTGGTGT (SEQ ID NO: 3), CCACCGTCACTGTTCCCTAGA (SEQ ID NO: 4), CCTCGTGCTCGTGTCTGTAT (SEQ ID NO: 5), GAGGAAACAGCTTGGCTCTG (SEQ ID NO: 6), CTGTTGCATGAGAGCAGAGG (SEQ ID NO: 7), CGTCCCCCTCGCTACTATCT (SEQ ID NO: 8), TGCAGGATATTGGCAAGGT (SEQ ID NO: 9), CTGTGCCGGTAGAAATGGTT (SEQ ID NO: 10), TGAATCAGTTCACCGACAGC (SEQ ID NO: 11), GAAACAAACCTGGCCATTCTC (SEQ ID NO: 12), CCGTTATATGGATGCCTTGG (SEQ ID NO: 13), AAACTGTTGGGCTGAACTGC (SEQ ID NO: 14), CCAGGCAAGATGGCTTATGT (SEQ ID NO: 15), ACCATGCTCAGCCAATTTT (SEQ ID NO: 16), GACCCAGACGATACTGGAA (SEQ ID NO: 17), GCTGAACAAAACCTCGGCTTC (SEQ ID NO: 18), CCACATCCTGGCCATCTACT (SEQ ID NO: 19), TTCCACAGACAGCAGAGACG (SEQ ID NO: 20), TGAGCTCACAGGTCTGGAAA (SEQ ID NO: 21), CCCCACAGGGTTCTGGTAAT (SEQ ID NO: 22), ATTCTCCACAGGGCAATGAG (SEQ ID NO: 23), TTATGTGGCCTTCCTCCTG (SEQ ID NO: 24)

、およびそれらの組み合わせから成る群から選択される1種または複数種の単離オリゴヌクレオチドプライマーを含む、核酸組成物。