

【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31年4月11日(2019.4.11)

【公表番号】特表2018-512880(P2018-512880A)

【公表日】平成30年5月24日(2018.5.24)

【年通号数】公開・登録公報2018-019

【出願番号】特願2017-555324(P2017-555324)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/68 (2018.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/68 A

【手続補正書】

【提出日】平成31年2月28日(2019.2.28)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1 つまたは複数の少量核酸種と 1 つまたは複数の大量核酸種の混合物を含む核酸集団において前記 1 つまたは複数の少量核酸種の存在または非存在を同定するマルチプレックス方法であって、それぞれの少量核酸種が対応する大量核酸種の変種であり、その対応する大量核酸種のコピー数より少ないコピー数で存在し、前記方法が、

(a) d N T P を含む増幅条件下で増幅プライマー対を用いて前記混合物の標的領域を同時に増幅し、それによって大量および少量核酸種を含む核酸の増幅混合物を産生するステップと、

(b) 鎖停止試薬を含む伸長条件下で前記増幅混合物に伸長プライマーを接触させるステップであって、

(i) 前記 1 つまたは複数の大量核酸種が、前記大量核酸種に対して特異的であるが、前記少量核酸種に対して特異的でない共通の鎖停止試薬を共有し、

(i i) 前記 1 つまたは複数の少量核酸種のそれぞれが、前記少量核酸種に対して特異的であるが、前記大量核酸種に対して特異的でない鎖停止試薬を有し、前記少量核酸種に対して特異的である前記鎖停止試薬が、(A) 前記増幅混合物中の特定の少量核酸種に独自のものであり、前記増幅混合物中の他の少量核酸種によって共有されないか、または(B) 前記 1 つもしくは複数の少量核酸種のうちの少なくとも 1 つが、前記増幅混合物中の少なくとも 1 つの他の少量核酸種と共通の鎖停止試薬を共有し、

それによって前記プライマーが、前記大量核酸種と比較して前記少量核酸種において異なるヌクレオチド位置まで伸長し、それによって、前記少量核酸種および前記大量核酸種にそれぞれ対応する鎖停止伸長産物が生成され、前記大量核酸種に対して特異的な前記鎖停止試薬の濃度が、前記 1 つまたは複数の少量核酸種に対して特異的な前記鎖停止試薬のそれぞれの濃度より低い、ステップと、

(c) (b) の伸長産物を分析し、それによって、前記 1 つまたは複数の少量核酸種の存在または非存在を同定するステップとを含む、マルチプレックス方法。

【請求項 2】

前記核酸集団が、単一の大量核酸種の変種である複数の少量核酸種を含み、前記複数の少量核酸種が、単一のマルチプレックス反応において同定される、請求項 1 に記載の方法

。

【請求項 3】

(b) が少なくとも 2 つの反応槽または区画の組において実施され、

第 1 の槽または区画が、前記大量核酸種に対して特異的である前記鎖停止試薬を含むが、前記 1 つまたは複数の少量核酸種に対して特異的である鎖停止試薬を含まない伸長条件を含み、

残りの槽または区画のそれぞれが、1 つまたは複数の少量核酸種に対して特異的かつ共通である単一の鎖停止試薬を含むが、前記大量核酸種に対して特異的または共通の単一の鎖停止試薬を共有しない少量核酸種に対して特異的な鎖停止試薬を含まない伸長条件を含む、

請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記鎖停止試薬のそれぞれの濃度が既知である、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

1 つまたは複数の少量核酸種と大量核酸種との混合物を含む核酸集団において前記 1 つまたは複数の少量核酸種を定量する方法であって、前記少量核酸種が同じ大量核酸種の変種であり、それぞれ前記大量核酸種のコピー数より少ないコピー数で存在し、前記方法が、

(a) d N T P を含む増幅条件下で増幅プライマー対を用いて前記混合物の標的領域を同時に増幅し、それによって大量および少量核酸種を含む核酸の増幅混合物を産生するステップと、

(b) (i) 前記 1 つまたは複数の少量核酸種のそれぞれ、および (i i) 前記大量核酸種に対して特異的な鎖停止試薬を含む伸長条件下で、前記増幅混合物に伸長プライマーを接触させるステップであって、それによって前記プライマーが、前記大量核酸種と比較して前記少量核酸種において異なるヌクレオチド位置まで伸長し、それによって前記少量核酸種および前記大量核酸種にそれぞれ対応する鎖停止伸長産物が生成され、(1) 前記鎖停止試薬のそれぞれの濃度が既知であり、かつ (2) 前記大量核酸種に対して特異的な前記鎖停止試薬の濃度が、前記 1 つまたは複数の少量核酸種に対して特異的な前記鎖停止試薬の濃度より低い、ステップと、

(c) 前記大量核酸種に対応する伸長産物の量に対する、前記 1 つまたは複数の少量核酸種のそれぞれに対応する伸長産物の量の比率を決定するステップと、

(d) (c) の比率に基づいて、および前記大量核酸種に対して特異的な前記鎖停止試薬の濃度と比較した、前記 1 つまたは複数の少量核酸種に対して特異的な前記鎖停止試薬の濃度に基づいて、前記大量核酸種の量と比較した少量核酸種の量を定量するステップとを含む、方法。

【請求項 6】

1 つまたは複数の少量核酸種と大量核酸種との混合物を含む核酸集団において前記 1 つまたは複数の少量核酸種を定量するマルチプレックス方法であって、それぞれの少量核酸種が対応する大量核酸種の変種であり、その対応する大量核酸種のコピー数より少ないコピー数で存在し、前記方法が、

(a) d N T P を含む増幅条件下で増幅プライマー対を用いて前記混合物の標的領域を同時に増幅し、それによって大量および少量核酸種を含む核酸の増幅混合物を産生するステップと、

(b) 鎖停止試薬を含む伸長条件下で前記増幅混合物に伸長プライマーを接触させるステップであって、

(i) 前記 1 つまたは複数の大量核酸種が、前記大量核酸種に対して特異的であるが、前記少量核酸種に対して特異的でない共通の鎖停止試薬を共有し、

(i i) 前記 1 つまたは複数の少量核酸種のそれぞれが、前記少量核酸種に対して特異的であるが、前記大量核酸種に対して特異的でない鎖停止試薬を有し、前記少量核酸種

に対して特異的である前記鎖停止試薬が（Ａ）前記増幅混合物中の特定の少量核酸種に独自のものであり、前記増幅混合物中の他の少量核酸種によって共有されないか、または（Ｂ）前記１つもしくは複数の少量核酸種のうちの少なくとも１つが前記増幅混合物中の少なくとも１つの他の少量核酸種と共通の鎖停止試薬を共有し、

それによって前記プライマーが、前記大量核酸種と比較して前記少量核酸種において異なるヌクレオチド位置まで伸長し、それによって前記少量核酸種および前記大量核酸種にそれぞれ対応する鎖停止伸長産物が生成され、（１）前記鎖停止試薬のそれぞれの濃度が既知であり、（２）前記大量核酸種に対して特異的な鎖停止試薬の濃度が、前記１つまたは複数の少量核酸種に対して特異的な前記鎖停止試薬の濃度より低い、ステップと、

（ｃ）前記大量核酸種に対応する伸長産物の量に対する、前記１つまたは複数の少量核酸種のそれぞれに対応する伸長産物の量（複数）の比率を決定するステップと、

（ｄ）（ｃ）の比率に基づいて、および前記大量核酸種に対して特異的な前記鎖停止試薬の濃度と比較した、前記１つまたは複数の少量核酸種に対して特異的な前記鎖停止試薬の濃度（複数）に基づいて、前記大量核酸種の量と比較した少量核酸種の量を定量するステップと

を含む、マルチプレックス方法。

【請求項 7】

前記核酸集団が、単一の大量核酸種の変種である複数の少量核酸種を含み、前記複数の少量核酸種が単一のマルチプレックス反応において同定される、請求項 5 または請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記少量および前記大量核酸種の配列が、単一塩基だけ異なり、プライマーが、異なっている前記単一塩基まで伸長する、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記少量核酸種の配列が、前記大量核酸種の配列と比較して挿入または欠失を含む、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記少量および前記大量核酸種がそれぞれ、同じ遺伝子のバリエーションおよび野生型対立遺伝子である、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記１つまたは複数の少量核酸種がそれぞれ、前記大量核酸種のコピー数の約 1 % ~ 10 % 未満の間であるコピー数で存在する、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記大量核酸種に対して特異的な前記鎖停止試薬の濃度が、前記少量核酸種に対して特異的な前記鎖停止試薬のそれぞれの濃度の約 0 . 01 % ~ 約 10 % の間である、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記大量核酸種に対する前記鎖停止試薬の濃度が、特定の大量種 / 少量種トランジションに基づいて変化する、請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

前記鎖停止試薬が鎖停止ヌクレオチドである、請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記鎖停止ヌクレオチドが、独立して ddATP、ddGTP、ddCTP、ddTTP、および ddUTP から選択される、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

１つまたは複数の前記少量核酸種に対して特異的な前記鎖停止ヌクレオチドが１つの鎖停止ヌクレオチドからなる、請求項 14 または 15 に記載の方法。

【請求項 17】

1つまたは複数の前記少量核酸種に対して特異的な前記鎖停止ヌクレオチドが2つの鎖停止ヌクレオチドからなる、請求項1 4または1 5に記載の方法。

【請求項 1 8】

1つまたは複数の前記少量核酸種に対して特異的な前記鎖停止ヌクレオチドが3つの鎖停止ヌクレオチドからなる、請求項1 4または1 5に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記鎖停止試薬が、1つまたは複数の非環式停止剤を含む、請求項 1 から 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 0】

1つまたは複数の前記鎖停止試薬が検出可能な標識を含む、請求項 1 から 1 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記標識の検出をさらに含み、それによって前記 1つまたは複数の少量核酸種が同定または定量される、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記標識が質量標識であり、検出が質量分析による、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記標識が蛍光標識または色素であり、検出が電気泳動またはリアルタイムPCRによる、請求項 2 1 に記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 2 9

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 2 9】

上記のこれらの方法のそれぞれのある特定の実施形態では、配列タグを、それぞれの増幅プライマー対のいずれか1つまたは両方のプライマーの5'末端に結合させる。一部の実施形態では、本明細書において提供される増幅反応条件は、7個またはそれ超の核酸標的領域の60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%超、最大100%から選択される百分率の7個またはそれ超の核酸標的領域の増幅を可能にする。本明細書において提供される条件は、多様な増幅プライマー対ならびに大量および少量核酸種の多様な混合物を使用する7重またはそれ超の増幅反応の多数のマルチプレックス反応に当てはまる。

特定の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

(項目 1)

1つまたは複数の少量核酸種と1つまたは複数の大量核酸種の混合物を含む核酸集団において前記1つまたは複数の少量核酸種の存在または非存在を同定するマルチプレックス方法であって、それぞれの少量核酸種が対応する大量核酸種の変種であり、その対応する大量核酸種のコピー数より少ないコピー数で存在し、前記方法が、

(a) dNTPを含む増幅条件下で増幅プライマー対を用いて前記混合物の標的領域を同時に増幅し、それによって大量および少量核酸種を含む核酸の増幅混合物を産生するステップと、

(b) 鎖停止試薬を含む伸長条件下で前記増幅混合物に伸長プライマーを接触させるステップであって、

(i) 前記1つまたは複数の大量核酸種が、前記大量核酸種に対して特異的であるが、前記少量核酸種に対して特異的でない共通の鎖停止試薬を共有し、

(i i) 前記1つまたは複数の少量核酸種のそれぞれが、前記少量核酸種に対して特異的であるが、前記大量核酸種に対して特異的でない鎖停止試薬を有し、前記少量核酸種

に対して特異的である前記鎖停止試薬が、(A)前記増幅混合物中の特定の少量核酸種に独自のものであり、前記増幅混合物中の他の少量核酸種によって共有されないか、または(B)前記1つもしくは複数の少量核酸種のうちの少なくとも1つが、前記増幅混合物中の少なくとも1つの他の少量核酸種と共通の鎖停止試薬を共有し、

それによって前記プライマーが、前記大量核酸種と比較して前記少量核酸種において異なるヌクレオチド位置まで伸長するかまたはそれを超えて伸長し、それによって、前記少量核酸種および前記大量核酸種にそれぞれ対応する鎖停止伸長産物が生成され、前記大量核酸種に対して特異的な前記鎖停止試薬の濃度が、前記1つまたは複数の少量核酸種に対して特異的な前記鎖停止試薬のそれぞれの濃度より低い、ステップと、

(c)(b)の伸長産物を分析し、それによって、前記1つまたは複数の少量核酸種の存在または非存在を同定するステップとを含む、マルチプレックス方法。

(項目2)

前記核酸集団が、単一の大量核酸種の変種である複数の少量核酸種を含み、前記複数の少量核酸種が、単一のマルチプレックス反応において同定される、項目1に記載の方法。

(項目3)

(b)が少なくとも2つの反応槽または区画の組において実施され、

第1の槽または区画が、前記大量核酸種に対して特異的である前記鎖停止試薬を含むが、前記1つまたは複数の少量核酸種に対して特異的である鎖停止試薬を含まない伸長条件を含む、

残りの槽または区画のそれぞれが、1つまたは複数の少量核酸種に対して特異的かつ共通である単一の鎖停止試薬を含むが、前記大量核酸種に対して特異的または共通の単一の鎖停止試薬を共有しない少量核酸種に対して特異的な鎖停止試薬を含まない伸長条件を含む、

項目1に記載の方法。

(項目4)

前記鎖停止試薬のそれぞれの濃度が既知である、項目1から3のいずれか一項に記載の方法。

(項目5)

1つまたは複数の少量核酸種と大量核酸種との混合物を含む核酸集団において前記1つまたは複数の少量核酸種を定量する方法であって、前記少量核酸種が同じ大量核酸種の変種であり、それぞれ前記大量核酸種のコピー数より少ないコピー数で存在し、前記方法が、

(a)dNTPを含む増幅条件下で増幅プライマー対を用いて前記混合物の標的領域を同時に増幅し、それによって大量および少量核酸種を含む核酸の増幅混合物を産生するステップと、

(b)(i)前記1つまたは複数の少量核酸種のそれぞれ、および(ii)前記大量核酸種に対して特異的な鎖停止試薬を含む伸長条件下で、前記増幅混合物に伸長プライマーを接触させるステップであって、それによって前記プライマーが、前記大量核酸種と比較して前記少量核酸種において異なるヌクレオチド位置まで伸長するかまたはそれを超えて伸長し、それによって前記少量核酸種および前記大量核酸種にそれぞれ対応する鎖停止伸長産物が生成され、(1)前記鎖停止試薬のそれぞれの濃度が既知であり、かつ(2)前記大量核酸種に対して特異的な前記鎖停止試薬の濃度が、前記1つまたは複数の少量核酸種に対して特異的な前記鎖停止試薬の濃度より低い、ステップと、

(c)前記大量核酸種に対応する伸長産物の量に対する、前記1つまたは複数の少量核酸種のそれぞれに対応する伸長産物の量の比率を決定するステップと、

(d)(c)の比率に基づいて、および前記大量核酸種に対して特異的な前記鎖停止試薬の濃度と比較した、前記1つまたは複数の少量核酸種に対して特異的な前記鎖停止試薬の濃度に基づいて、前記大量核酸種の量と比較した少量核酸種の量を定量するステップとを含む、方法。

(項目 6)

1 つまたは複数の少量核酸種と大量核酸種との混合物を含む核酸集団において前記 1 つまたは複数の少量核酸種を定量するマルチプレックス方法であって、それぞれの少量核酸種が対応する大量核酸種の変種であり、その対応する大量核酸種のコピー数より少ないコピー数で存在し、前記方法が、

(a) d N T P を含む増幅条件下で増幅プライマー対を用いて前記混合物の標的領域を同時に増幅し、それによって大量および少量核酸種を含む核酸の増幅混合物を産生するステップと、

(b) 鎖停止試薬を含む伸長条件下で前記増幅混合物に伸長プライマーを接触させるステップであって、

(i) 前記 1 つまたは複数の大量核酸種が、前記大量核酸種に対して特異的であるが、前記少量核酸種に対して特異的でない共通の鎖停止試薬を共有し、

(i i) 前記 1 つまたは複数の少量核酸種のそれぞれが、前記少量核酸種に対して特異的であるが、前記大量核酸種に対して特異的でない鎖停止試薬を有し、前記少量核酸種に対して特異的である前記鎖停止試薬が (A) 前記増幅混合物中の特定の少量核酸種に独自のものであり、前記増幅混合物中の他の少量核酸種によって共有されないか、または (B) 前記 1 つもしくは複数の少量核酸種のうちの少なくとも 1 つが前記増幅混合物中の少なくとも 1 つの他の少量核酸種と共通の鎖停止試薬を共有し、

それによって前記プライマーが、前記大量核酸種と比較して前記少量核酸種において異なるヌクレオチド位置まで伸長するかまたはそれを超えて伸長し、それによって前記少量核酸種および前記大量核酸種にそれぞれ対応する鎖停止伸長産物が生成され、(1) 前記鎖停止試薬のそれぞれの濃度が既知であり、(2) 前記大量核酸種に対して特異的な鎖停止試薬の濃度が、前記 1 つまたは複数の少量核酸種に対して特異的な前記鎖停止試薬の濃度より低い、ステップと、

(c) 前記大量核酸種に対応する伸長産物の量に対する、前記 1 つまたは複数の少量核酸種のそれぞれに対応する伸長産物の量 (複数) の比率を決定するステップと、

(d) (c) の比率に基づいて、および前記大量核酸種に対して特異的な前記鎖停止試薬の濃度と比較した、前記 1 つまたは複数の少量核酸種に対して特異的な前記鎖停止試薬の濃度 (複数) に基づいて、前記大量核酸種の量と比較した少量核酸種の量を定量するステップと

を含む、マルチプレックス方法。

(項目 7)

前記核酸集団が、単一の大量核酸種の変種である複数の少量核酸種を含み、前記複数の少量核酸種が単一のマルチプレックス反応において同定される、項目 5 または項目 6 に記載の方法。

(項目 8)

前記少量および前記大量核酸種の配列が、単一塩基だけ異なり、プライマーが、異なっている前記単一塩基までまたはそれを超えて伸長する、項目 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 9)

前記少量核酸種の配列が、前記大量核酸種の配列と比較して挿入または欠失を含む、項目 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 0)

前記 1 つまたは複数の少量核酸種が、前記大量核酸種の単一ヌクレオチド多型 (S N P) 変種である、項目 1 から 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 1)

前記少量および前記大量核酸種がそれぞれ、同じ遺伝子のバリエーションおよび野生型対立遺伝子である、項目 1 から 1 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 2)

前記大量核酸種が宿主対象に由来し、そして前記少量核酸種が前記宿主以外の対象に由

来するか、または、前記少量核酸種が宿主対象に由来し、そして前記大量核酸種が前記宿主以外の対象に由来する、項目 1 から 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 3)

前記 1 つまたは複数の少量核酸種がそれぞれ、前記大量核酸種のコピー数の約 1 0 % 未満であるコピー数で存在する、項目 1 から 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 4)

前記 1 つまたは複数の少量核酸種がそれぞれ、前記大量核酸種のコピー数の約 1 % ~ 1 0 % 未満の間であるコピー数で存在する、項目 1 3 に記載の方法。

(項目 1 5)

前記 1 つまたは複数の少量核酸種がそれぞれ、前記大量核酸種のコピー数の約 2 % ~ 1 0 % 未満の間であるコピー数で存在する、項目 1 4 に記載の方法。

(項目 1 6)

前記 1 つまたは複数の少量核酸種がそれぞれ、前記大量核酸種のコピー数の約 5 % またはそれ未満であるコピー数で存在する、項目 1 4 に記載の方法。

(項目 1 7)

前記 1 つまたは複数の少量核酸種がそれぞれ、前記大量核酸種のコピー数の約 2 % またはそれ未満であるコピー数で存在する、項目 1 6 に記載の方法。

(項目 1 8)

前記大量核酸種に対して特異的な前記鎖停止試薬の濃度が、前記少量核酸種に対して特異的な前記鎖停止試薬のそれぞれの濃度の約 1 % ~ 約 2 0 % の間である、項目 1 から 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 9)

前記大量核酸種に対して特異的な前記鎖停止試薬の濃度が、前記少量核酸種に対して特異的な前記鎖停止試薬のそれぞれの濃度の約 0 . 1 % ~ 約 1 0 % の間である、項目 1 から 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 0)

前記大量核酸種に対して特異的な前記鎖停止試薬の濃度が、前記少量核酸種に対して特異的な前記鎖停止試薬のそれぞれの濃度の約 0 . 1 % ~ 約 4 % の間である、項目 1 9 に記載の方法。

(項目 2 1)

前記大量核酸種に対して特異的な前記鎖停止試薬の濃度が、前記少量核酸種に対して特異的な前記鎖停止試薬のそれぞれの濃度の約 0 . 0 1 % ~ 約 1 0 % の間である、項目 1 から 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 2)

前記大量核酸種に対して特異的な前記鎖停止試薬の濃度が、前記少量核酸種に対して特異的な前記鎖停止試薬のそれぞれの濃度の約 0 . 0 1 % ~ 約 4 % の間である、項目 2 1 に記載の方法。

(項目 2 3)

前記大量核酸種に対する前記鎖停止試薬の濃度が、特定の大量種 / 少量種トランジションに基づいて変化する、項目 1 から 2 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 4)

前記鎖停止試薬が鎖停止ヌクレオチドである、項目 1 から 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 5)

前記鎖停止ヌクレオチドが、独立して d d A T P、d d G T P、d d C T P、d d T T P、および d d U T P から選択される、項目 2 4 に記載の方法。

(項目 2 6)

1 つまたは複数の前記少量核酸種に対して特異的な前記鎖停止ヌクレオチドが 1 つの鎖停止ヌクレオチドからなる、項目 2 4 または 2 5 に記載の方法。

(項目 2 7)

1 つまたは複数の前記少量核酸種に対して特異的な前記鎖停止ヌクレオチドが 2 つの鎖停止ヌクレオチドからなる、項目 2 4 または 2 5 に記載の方法。

(項目 2 8)

1 つまたは複数の前記少量核酸種に対して特異的な前記鎖停止ヌクレオチドが 3 つの鎖停止ヌクレオチドからなる、項目 2 4 または 2 5 に記載の方法。

(項目 2 9)

前記鎖停止試薬が、1 つまたは複数の非環式停止剤を含む、項目 1 から 2 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 0)

(a) において約 3 0 ~ 約 4 5 の間の P C R 増幅サイクルを含む、項目 1 から 2 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 1)

(b) の前記伸長条件が、約 2 0 ~ 約 3 0 0 の間のサイクルを含む、項目 1 から 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 2)

(b) の前記伸長条件が少なくとも 5 0 サイクルを含む、項目 3 1 に記載の方法。

(項目 3 3)

1 つまたは複数の前記鎖停止試薬が検出可能な標識を含む、項目 1 から 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 4)

前記標識が蛍光標識または色素である、項目 3 3 に記載の方法。

(項目 3 5)

前記標識が質量標識である、項目 3 3 に記載の方法。

(項目 3 6)

前記標識の検出をさらに含み、それによって前記 1 つまたは複数の少量核酸種が同定または定量される、項目 3 3 から 3 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 7)

前記標識が質量標識であり、検出が質量分析による、項目 3 6 に記載の方法。

(項目 3 8)

前記標識が蛍光標識または色素であり、検出が電気泳動またはリアルタイム P C R による、項目 3 6 に記載の方法。

(項目 3 9)

前記 1 つまたは複数の少量核酸種がそれぞれ、前記大量核酸種のコピー数の約 1 % であるコピー数で存在する、項目 1 から 1 4 および 1 6 から 3 8 のいずれか一項に記載の方法

。