

【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 12 Q 1/68 (2018.01)

【F I】

C 12 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) 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产生するステップと、

(b) 鎮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鎮停止試薬を共有し、

(ii) 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鎮停止試薬を有し、前記少量核酸種に対して特異的である前記鎮停止試薬が、(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鎮停止試薬を共有し、

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鎮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鎮停止試薬の濃度が、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鎮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单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单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 を含む增幅条件下で增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增幅し、それによって大量および少量核酸種を含む核酸の增幅混合物を產生するステップと、

(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、前記增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 を含む增幅条件下で增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增幅し、それによって大量および少量核酸種を含む核酸の增幅混合物を產生するステップと、

(b) 鎖停止試薬を含む伸長条件下で前記增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、

(ii) 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 )前記增幅混合物中の特定の少量核酸種に独自のものであり、前記增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 つが前記增幅混合物中の少なくとも 1 つの他の少量核酸種と共に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、異なっている前記单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ント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 . 0 1 % ~ 約 1 0 % の間である、請求項 1 から 1 1 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 1 2 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 1 3 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 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、請求項 1 4 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 1 4 または 1 5 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18】

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19】

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20】

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21】

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22】

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23】

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、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】0029

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0029】

上記のこれらの方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產生するステップと、

(b) 鎮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鎮停止試薬を共有し、

(ii) 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鎮停止試薬を有し、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)前記增幅混合物中の特定の少量核酸種に独自のものであり、前記增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、前記增幅混合物中の少なくとも1つの他の少量核酸種と共に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、

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を含む增幅条件下で增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增幅し、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产生するステップと、

(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) 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产生するステップと、

(b) 鎮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鎮停止試薬を共有し、

(ii) 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鎮停止試薬を有し、前記少量核酸種に対して特異的である前記鎮停止試薬が(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鎮停止試薬を共有し、

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鎮停止伸長産物が生成され、(1)前記鎮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鎮停止試薬の濃度が、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鎮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鎮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鎮停止試薬の濃度(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、单一塩基だけ異なり、プライマーが、異な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10)

前記1つまたは複数の少量核酸種が、前記大量核酸種の单一ヌクレオチド多型(SNP)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11)

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ントおよび野生型対立遺伝子である、項目1から10のいずれか一項に記載の方法。

(項目12)

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11のいずれか一項に記載の方法。

(項目13)

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10%未満であるコピー数で存在する、項目1から12のいずれか一項に記載の方法。

(項目14)

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、項目13に記載の方法。

(項目15)

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%~10%未満の間であるコピー数で存在する、項目14に記載の方法。

(項目16)

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14に記載の方法。

(項目17)

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16に記載の方法。

(項目18)

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20%の間である、項目1から17のいずれか一項に記載の方法。

(項目19)

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10%の間である、項目1から17のいずれか一項に記載の方法。

(項目20)

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19に記載の方法。

(項目21)

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、項目1から17のいずれか一項に記載の方法。

(項目22)

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4%の間である、項目21に記載の方法。

(項目23)

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22のいずれか一項に記載の方法。

(項目24)

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23のいずれか一項に記載の方法。

(項目25)

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24に記載の方法。

(項目26)

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24または25に記載の方法。

(項目27)

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24または25に記載の方法。

(項目28)

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24または25に記載の方法。

(項目29)

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28のいずれか一項に記載の方法。

(項目30)

(a)において約30～約45の間のPCR増幅サイクルを含む、項目1から29のいずれか一項に記載の方法。

(項目31)

(b)の前記伸長条件が、約20～約300の間のサイクルを含む、項目1から30のいずれか一項に記載の方法。

(項目32)

(b)の前記伸長条件が少なくとも50サイクルを含む、項目31に記載の方法。

(項目33)

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32のいずれか一項に記載の方法。

(項目34)

前記標識が蛍光標識または色素である、項目33に記載の方法。

(項目35)

前記標識が質量標識である、項目33に記載の方法。

(項目36)

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33から35のいずれか一項に記載の方法。

(項目37)

前記標識が質量標識であり、検出が質量分析による、項目36に記載の方法。

(項目38)

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、項目36に記載の方法。

(項目39)

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14および16から38のいずれか一項に記載の方法。

。