

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3907201号

(P3907201)

(45) 発行日 平成19年4月18日(2007.4.18)

(24) 登録日 平成19年1月26日(2007.1.26)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A
G O 1 N 33/566 (2006.01)	G O 1 N 33/566
G O 1 N 33/569 (2006.01)	G O 1 N 33/569 H

請求項の数 11 (全 57 頁)

(21) 出願番号	特願平5-511873	(73) 特許権者	591076811
(86) (22) 出願日	平成4年12月22日(1992.12.22)		カイロン コーポレーション
(65) 公表番号	特表平7-502654		アメリカ合衆国, カリフォルニア 946
(43) 公表日	平成7年3月23日(1995.3.23)		08, エミリービル, ホートン ストリー
(86) 国際出願番号	PCT/US1992/011168		ト 4560
(87) 国際公開番号	W01993/013223	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開日	平成5年7月8日(1993.7.8)		弁理士 山本 秀策
審査請求日	平成8年12月19日(1996.12.19)	(72) 発明者	アーヴィン, ブルース ディー.
審判番号	不服2000-9994(P2000-9994/J1)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 945
審判請求日	平成12年7月3日(2000.7.3)		19, コンコード, エル モンテ ドライ
(31) 優先権主張番号	813, 583		ブ 3401
(32) 優先日	平成3年12月23日(1991.12.23)	(72) 発明者	コルバーグ, ジャニス エイ.
(33) 優先権主張国	米国(US)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 945
			47, ヘラクレス, スコッツ バレー ロ
			ード 131
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 溶液相サンドイッチハイブリダイゼーションアッセイに用いるためのH I Vプローブ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

H I V に対するサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイにおける増幅プローブとして有用な合成オリゴヌクレオチドのセットであって、ここで該サンドイッチハイブリダイゼーションアッセイは、増幅プローブおよび捕獲プローブを使用し、そして該セットの各メンバーは、第一の核酸セグメントおよび第二の核酸セグメントを含み、
ここで、該第一の核酸セグメントは、最小33ヌクレオチドから最大約100ヌクレオチドの長さを有し、ここで該第一の核酸セグメントおよび該第一の核酸セグメントが結合するH I V 核酸のセグメントの各塩基の少なくとも90%が正確に対応し、ここで該第一の核酸セグメントは、以下：

【化1】

CATCTGCTCCTGTRTCTAATAGAGCTTCYTTTA (配列番号	45),	
TTCCTGGCAAAYYATKTCTYCTAMTACTGTAT (配列番号	5),	
CTCCAATTCCYCCTATCATTTTTGGYTTCCATY (配列番号	6),	
KTATYTGATCRTAYTGTCYYACTTTGATAAAAC (配列番号	7),	
GTTGACAGGYGTAGGTCCTACYAATAYTGTAAC (配列番号	8),	
YTCAATAGGRCTAATKGGRAAATTTAAAGTRCA (配列番号	9),	
ATCCATYCCTGGCTTTAATTTTACTGGTACAGT (配列番号	46),	
YTCTGTCAATGGCCATTGYTTRACYTTGGGCC (配列番号	10),	10
TKTACAWATYTCTRYTAATGCTTTTATTTTYTC (配列番号	11),	
AAITYTTGAAATYTTYCCTTCCATHTC (配列番号	12),	
AAATAYKGGAGTATTRTATGGATTYTCAGGCC (配列番号	13),	
CATGTATTGATADATRAYYATKTCTGGATTTTG (配列番号	17),	
TATYTCTAARTCAGAYCCTACATACAAATCATC (配列番号	18),	
TCTYARYTCCTCTATTTTGYTCTATGCTGYC (配列番号	19),	
AAGRAATGGRGGTTCTTCTGATGYTTYTRTC (配列番号	20),	
CCATTTTRTCAGGRTGGAGTTCATAMCCCATCCA (配列番号	49),	
CTAYTATGGGKTCYKTYTCTAACTGGTACCAYA (配列番号	50),	20
TRGCTGCYCCATCTACATAGA AVGTTTCTGCWC (配列番号	21),	
GACAACYTTYTGCTTCCAYTGTYAGTWASATA (配列番号	22),	
YGAATCCTGYAAVGCTARRTDAATTGCTTGTA (配列番号	23),	
YTGTGARTCTGTYACTATRTTTACTTCTRRTCC (配列番号	24),	
ATCTGGTTGTGCTTGAATRAYCCYARTGCATA (配列番号	51),	
TATTATTTGAYTRACWAWCTCTGATTCACYTK (配列番号	25),	
CAGRTARACYTTTTCTTTTTTATTARYTYGTC (配列番号	26),	
TCCTCCAATYCCTTTRTGCTGGTACCCATGM (配列番号	27),	
TCCHBBACTGACTAATYATCTACTTGTTTATT (配列番号	28),	30
ATCTATTCATYAAAAATAGYAYTTYCTGAT (配列番号	29),	
GTGGYAGRTTAAARTCAYTAGCCATTGCTYTCC (配列番号	30),	
CACAGCTRGCTACTATTCYTTYGCTACYAYRG (配列番号	31),	
CATGCATGGCTTCYCTTTTAGYTGRCATTTAT (配列番号	52),	
RYTGCCATATYCCKGGRCTACARTCTACTTGTC (配列番号	32),	
DGATWAYTTTTCTTCYARATGTGTACAATCTA (配列番号	33),	
CTATRTAKCCACTRGCYACATGRACTGCTACYA (配列番号	34),	
CYTGCCCTGTYTCTGCTGGRATDACTTCTGCTT (配列番号	35),	40
TGSKGCCATTGTCTGTATGTAYTRYKTTACTG (配列番号	36),	
AACAGGCDGCYTAAACYGYAGYACTGGTGAAT (配列番号	53),	
GAATKCCAAATTCCTGYTTRATHCCHGCCACC (配列番号	37),	
ATTCYAYTACYCCTTGACTTTGGGGRTTGTAAG (配列番号	38),	
GBCCTATRATTTKCTTTAATTCHTTATTCATAG (配列番号	39),	および
CTSTCTTAAGRTGYTCAGCYTGMTCTCTTACYT (配列番号	40);	

からなる群から選択される第一ヌクレオチド配列を含み、

ここで、該群の全ての該第一ヌクレオチド配列は、該セット内に示され、そして、該第二セグメントは、第二ヌクレオチド配列を含み、ここで該ヌクレオチド配列および増幅マル

チマーのバックボーンオリゴヌクレオチドセグメントの各塩基の少なくとも90%が正確に対応し、該増幅マルチマーのバックボーンオリゴヌクレオチドセグメントは、該増幅プロープの該第二の核酸セグメントにハイブリダイズし、かつ標識オリゴヌクレオチドに相補的でなく、ここで該第二の核酸セグメントは、HIVゲノムに相補的でなく、そして、該第二の核酸配列が、

【化2】
AGGCATAGGACCCGTGTCTT (配列番号 55)

を含む、合成オリゴヌクレオチドのセット。

【請求項2】

請求項1に記載の合成増幅プロープオリゴヌクレオチドのセットであって、該セットの第一核酸セグメントが、配列番号5~13、17~40、45、46および49~53からなる群から選択される第一ヌクレオチド配列からなり、ここで、該群の全ての該第一ヌクレオチド配列は、該セット内に示される、オリゴヌクレオチドのセット。

【請求項3】

HIVに対するサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイにおける捕獲プロープとして有用な合成オリゴヌクレオチドのセットであって、ここで該サンドイッチハイブリダイゼーションアッセイは、増幅プロープおよび捕獲プロープを使用し、そして該セットの各メンバーは、第一の核酸セグメントおよび第二の核酸セグメントを含み、ここで、該第一の核酸セグメントは、最小33ヌクレオチドから最大約100ヌクレオチドの長さを有し、ここで該第一の核酸セグメントおよび該第一の核酸セグメントが結合するHIV核酸のセグメントの各塩基の少なくとも90%が正確に対応し、ここで該第一の核酸セグメントは、以下：

【化3】
TCTCCAYTTRGTRCTGTCYTTTTTCTTTATRGC (配列番号 14),
TYTYTATTAAGYTCYCTGAAATCTACTARTTT (配列番号 15),
TATTCCTAAYTGRACTTCCCARAARTCYTGAGT (配列番号 47),
ACWYTGGAATATYGCYGGTGATCCTTTCCAYCC (配列番号 48),
TKTTYTAAARGGYTCYAAGATTTTTGTCATRCT (配列番号 16),
TAAAATTGTGRATRAAYACTGCCATTTGTACWG (配列番号 41),
CTGCACTGTAYCCCCCAATCCCCCYTYTTCTTT (配列番号 42),
TGTCTGTWGCTATYATRYCTAYTATTCTYTCCC (配列番号 43),
TRRTRATTTGYTTTTGTARTTCTYTARTTTGTA (配列番号 44), および
TGTCYCTGTAATAAACCCGAAAATTTGAATTT (配列番号 54);

からなる群から選択される第一ヌクレオチド配列を含み、ここで、該群の全ての該第一ヌクレオチド配列は、該セット内に示され、そして、該第二セグメントは、第二ヌクレオチド配列を含み、ここで該ヌクレオチド配列および固相に結合したオリゴヌクレオチドの各塩基の少なくとも90%が正確に対応し、ここで該第二のヌクレオチド配列は、HIV核酸に相補的でなく、そして、該第二のヌクレオチド配列が、

【化4】
CTTCTTTGGAGAAAGTGGTG (配列番号 56)

を含む、合成オリゴヌクレオチドのセット。

【請求項4】

請求項3に記載の合成捕獲プロープオリゴヌクレオチドのセットであって、該セットの第一核酸セグメントが、配列番号14~16、41~44、47、48および54からなる群から選択される第一ヌクレオチド配列からなり、ここで、該群の全ての該第一ヌクレオ

10

20

30

40

50

チド配列は、該セット内に示される、オリゴヌクレオチドのセット。

【請求項 5】

H I V に対するサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイにおける増幅プローブとして有用な合成オリゴヌクレオチドのセットであって、ここで該サンドイッチハイブリダイゼーションアッセイは、増幅プローブおよび捕獲プローブを使用し、そして該セットの各メンバーは、第一の核酸セグメントおよび第二の核酸セグメントを含み、

ここで、該第一の核酸セグメントは、最小 33 ヌクレオチドから最大約 100 ヌクレオチドの長さを有し、ここで該第一の核酸セグメントおよび該第一の核酸セグメントが結合する H I V 核酸のセグメントの各塩基の少なくとも 90 % が正確に対応し、ここで該第一の核酸セグメントは、以下：

【化5】

TTCCTGGCAAAYYYATKCTCTYCTAMTACTGTAT (配列番号	5),	
CTCCAATTCCYCTATCATTGTTGGYTTCCATY (配列番号	6),	
KTATYTGATCRTAYTGTCYACTTTGATAAAAC (配列番号	7),	
GTTGACAGGYGTAGGTCCTACYAATAYTGTACC (配列番号	8),	
YTCAATAGGRCTAATKGGRAAATTTAAAGTRCA (配列番号	9),	
YTCTGTCAATGGCCATTGYTTRACYTTGGGCC (配列番号	10),	
TKTACAWATYTCTRYTAATGCTTTTATTTTYTC (配列番号	11)	
AAAYTTTCAAATYTTYCCTTCCTTTTCCATHC (配列番号	12),	10
AAATAYKGGAGTATTRTATGGATTYTCAGGCC (配列番号	13),	
TCTCCAYTTRGTRCTGTCYTTTTCTTTATRGC (配列番号	14),	
TYTYTATTAAGYTCYCTGAAATCTACTARTTT (配列番号	15),	
TKTTYTAAARGGYTCYAAGATTTTTGTCATRCT (配列番号	16);	
CATGTATTGATADATRAYATKCTGGATTTTG (配列番号	17),	
TATYTCTAARTCAGAYCCTACATACAAATCATC (配列番号	18),	
TCTYARYTCTCTATTTTTGYTCTATGCTGYC (配列番号	19),	
AAGRAATGGRGGTTCTTTCTGATGYTTYTTRTC (配列番号	20),	
TRGCTGCYCCATCTACATAGAAVGTCTGCWC (配列番号	21),	20
GACAACYTTYTGCTTCCAYTGYAGTWASATA (配列番号	22),	
YGAATCCTGYAAVGCTARRTDAATTGCTTGTA (配列番号	23),	
YTGTGARTCTGTYACTARTRTTACTTCTRRTCC (配列番号	24),	
TATTATTTGAYTRACWAWCTCTGATTCCTYTK (配列番号	25),	
CAGRTARACYTTTTCTTTTATTARYTGYTC (配列番号	26),	
TCCTCCAATYCCTTTRTGCTGGTACCCATGM (配列番号	27),	
TCCHBBACTGACTAATYATCTACTTGTTTATT (配列番号	28),	
ATCTATTCCATYAAAAATAGYAYTTYCTGAT (配列番号	29),	
GTGGYAGRTTAAARTCAYTAGCCATTGCTYTCC (配列番号	30),	30
CACAGCTRGCTACTATTTCTYTYGCTACYAYRG (配列番号	31),	
RYTGCCATATYCKGGRCTACARTCTACTTGTC (配列番号	32),	
DGATWAYTTTTCTTCYARATGTGTACAATCTA (配列番号	33),	
CTATRTAKCCACTRGCYACATGRACTGCTACYA (配列番号	34),	
CYTGYCCTGTYTCTGCTGGRATDACTTCTGCTT (配列番号	35),	
TGSKGCCATTGTCTGTATGTAYTRYTKTTACTG (配列番号	36),	
GAATKCCAAATTCCTGYTTRATHCCHGCCACC (配列番号	37),	
ATTCYAYTACYCCTTGACTTTGGGGRTTGTAGG (配列番号	38),	40
GBCCTATRATTKCTTTAATTCHTTATTCATAG (配列番号	39),	
CTSTCTTAAGRTGYTCAGCYTGMTCTCTTACYT (配列番号	40),	
TAAAATTGTGRATRAAYACTGCCATTTGTACWG (配列番号	41),	
CTGCACTGTAYCCCCCAATCCCCCYTYTTCTTT (配列番号	42),	
TGTCTGTWGCTATYATRYCTAYTATTCTYTCCC (配列番号	43),	および
TTRTRATTTGYTTTTGTARTTCTYTARTTTGTA (配列番号	44);	

からなる群から選択される第一ヌクレオチド配列を含み、

ここで、該群の全ての該第一ヌクレオチド配列は、該セット内に示され、そして、

該第二セグメントは、第二ヌクレオチド配列を含み、ここで該ヌクレオチド配列および増

幅マルチマーのバックボーンオリゴヌクレオチドセグメントの各塩基の少なくとも90%が正確に対応し、該増幅マルチマーのバックボーンオリゴヌクレオチドセグメントは、該増幅プローブの該第二の核酸セグメントにハイブリダイズし、かつ標識オリゴヌクレオチドに相補的でなく、ここで該第二の核酸セグメントは、HIV核酸に相補的でなく、そして、

該第二の核酸配列が、

【化6】
AGGCATAGGACCCGTGTCTT (配列番号 55)

を含む、合成オリゴヌクレオチドのセット。

【請求項6】

請求項5に記載の合成増幅プローブオリゴヌクレオチドのセットであって、該セットの第一核酸セグメントが、配列番号5~44からなる群から選択される第一ヌクレオチド配列からなり、ここで、該群の全ての該第一ヌクレオチド配列は、該セット内に示される、オリゴヌクレオチドのセット。

【請求項7】

HIVに対するサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイにおける捕獲プローブとして有用な合成オリゴヌクレオチドのセットであって、ここで該サンドイッチハイブリダイゼーションアッセイは、増幅プローブおよび捕獲プローブを使用し、そして該セットの各メンバーは、第一の核酸セグメントおよび第二の核酸セグメントを含み、

ここで、該第一の核酸セグメントは、最小33ヌクレオチドから最大約100ヌクレオチドの長さを有し、ここで該第一の核酸セグメントおよび該第一の核酸セグメントが結合するHIV核酸のセグメントの各塩基の少なくとも90%が正確に対応し、ここで該第一の核酸セグメントは、以下：

【化7】
CATCTGCTCCTGTRTCTAATAGAGCTTCYTTTA (配列番号 45),
ATCCATYCCTGGCTTTAATTTTACTGGTACAGT (配列番号 46),
TATTCCTAAYTGRACTTCCCARAARTCYTGAGT (配列番号 47),
ACWYTGGAATATYGCYGGTGATCCTTTCCAYCC (配列番号 48),
CCATTTTRTCAGGRTGGAGTTCATAMCCCATCCA (配列番号 49),
CTAYTATGGGKTCYKTYTCTAACTGGTACCAYA (配列番号 50)
ATCTGGTTGTGCTTGAATRATYCCYARTGCATA (配列番号 51),
CATGCATGGCTTCYCCTTTTAGYTGRCATTTAT (配列番号 52),
AACAGGCDGCYTAAACYGYAGYACTGGTGAAAT (配列番号 53), および
TGTCYCTGTAATAAACCCGAAAATTTTGAATTT (配列番号 54);

からなる群から選択される第一ヌクレオチド配列を含み、

ここで、該群の全ての該第一ヌクレオチド配列は、該セット内に示され、そして、

該第二セグメントは、第二ヌクレオチド配列を含み、ここで該第二ヌクレオチド配列および固相に結合したオリゴヌクレオチドの各塩基の少なくとも90%が正確に対応し、ここで該第二のヌクレオチド配列は、HIV核酸に相補的でなく、そして、

該第二のヌクレオチド配列が、

【化8】
CTTCTTTGGAGAAAGTGGTG (配列番号 56)

を含む、合成オリゴヌクレオチドのセット。

【請求項8】

請求項7に記載の合成捕獲プローブオリゴヌクレオチドのセットであって、該セットの第一核酸セグメントが、配列番号45~54からなる群から選択される第一ヌクレオチド配

10

20

30

40

50

列からなり、ここで、該群の全ての該第一ヌクレオチド配列は、該セット内に示される、オリゴヌクレオチドのセット。

【請求項 9】

試料中の HIV の存在を検出するための溶液サンドイッチハイブリダイゼーションアッセイであって、以下の工程を包含する、アッセイ：

(a) 該試料を、ハイブリダイゼーション条件下で、(i) 請求項 1 または 2 に記載の増幅プローブオリゴヌクレオチドのセット、および、(i i) 請求項 3 または 4 に記載の捕獲プローブオリゴヌクレオチドのセットと接触させる工程であって、ここで、該試料中において分析物核酸よりモル過剰の増幅プローブおよび捕獲プローブが存在する、工程；

(b) 工程 (a) の生成物を、ハイブリダイゼーション条件下で、固相に結合した該オリゴヌクレオチドと接触させる工程であって、ここで、該オリゴヌクレオチドが、以下：

【化 9】

CTTCTTTGGAGAAAGTGGTG (配列番号 56)

を含む固相と結合する、工程；

(c) その後、該固相に結合していない物質を分離する工程；

(d) 工程 (c) の結合した生成物を、ハイブリダイゼーション条件下で、核酸増幅マルチマーと接触させる工程であって、該マルチマーが、少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドセグメント、ここで該オリゴヌクレオチドセグメントおよび該増幅プローブポリヌクレオチドの第二セグメントの各塩基の少なくとも 90 % が正確に対応する、および、多数の第二オリゴヌクレオチドセグメント、ここで該第二のオリゴヌクレオチドセグメントおよび標識オリゴヌクレオチドの各塩基の少なくとも 90 % が正確に対応する、を含む、工程；

(e) 非結合マルチマーを除去する工程；

(f) 工程 (e) の固相複合体生成物を、ハイブリダイゼーション条件下で、標識オリゴヌクレオチドと接触させる工程；

(g) 非結合標識オリゴヌクレオチドを除去する工程；および

(h) 工程 (g) の固相複合体生成物中の標識の存在を検出し、そしてそれにより該試料中のウイルスの存在を検出する工程。

【請求項 10】

試料中の HIV の存在を検出するための溶液サンドイッチハイブリダイゼーションアッセイであって、以下の工程を包含する、アッセイ：

(a) 該試料を、ハイブリダイゼーション条件下で、(i) 請求項 5 または 6 に記載の増幅プローブオリゴヌクレオチドのセット、および、(i i) 請求項 7 または 8 に記載の捕獲プローブオリゴヌクレオチドのセットと接触させる工程であって、ここで、該試料中において分析物核酸よりモル過剰の増幅プローブおよび捕獲プローブが存在する、工程；

(b) 工程 (a) の生成物を、ハイブリダイゼーション条件下で、固相に結合した該オリゴヌクレオチドと接触させる工程であって、ここで、該オリゴヌクレオチドが、以下：

【化 10】

CTTCTTTGGAGAAAGTGGTG (配列番号 56)

を含む固相と結合する、工程；

(c) その後、該固相に結合していない物質を分離する工程；

(d) 工程 (c) の結合した生成物を、ハイブリダイゼーション条件下で、核酸増幅マルチマーと接触させる工程であって、該マルチマーが、少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドセグメント、ここで該オリゴヌクレオチドセグメントおよび増幅プローブポリヌクレオチドの第二セグメントの各塩基の少なくとも 90 % が正確に対応する、および、多数の第二オリゴヌクレオチドセグメント、ここで該第二のオリゴヌクレオチドセグメントおよび標識オリゴヌクレオチドの各塩基の少なくとも 90 % が正確に対応する、を含む、工程；

10

20

30

40

50

- (e) 非結合マルチマーを除去する工程；
 (f) 工程(e)の固相複合体生成物を、ハイブリダイゼーション条件下で、標識オリゴヌクレオチドと接触させる工程；
 (g) 非結合標識オリゴヌクレオチドを除去する工程；および
 (h) 工程(g)の固相複合体生成物中の標識の存在を検出し、そしてそれにより該試料中のウイルスの存在を検出する工程。

【請求項11】

試料中のHIVの検出のためのキットであって、以下の組み合わせを含む、キット：

- (i) 請求項1または2に記載のオリゴヌクレオチドのセットを含む増幅プローブオリゴヌクレオチドのセット；
 (ii) 請求項3または4に記載のオリゴヌクレオチドのセットを含む捕獲プローブオリゴヌクレオチドのセット；
 (iii) 増幅マルチマーであって、該マルチマーが、少なくとも1つのオリゴヌクレオチドセグメント、ここで該オリゴヌクレオチドセグメントおよび該増幅プローブオリゴヌクレオチドの第二セグメントの各塩基の少なくとも90%が正確に対応する、および、多数の第二オリゴヌクレオチドセグメント、ここで該第二のオリゴヌクレオチドセグメントおよび標識オリゴヌクレオチドの各塩基の少なくとも90%が正確に対応する、を含む、増幅マルチマー；および
 (iv) 標識オリゴヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、核酸ハイブリダイゼーションアッセイの分野に属する。より詳細には、本発明は、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)を検出するための新規な核酸プローブに関する。

背景技術

AIDSおよびARCの病因物質は、LAV、HTLV-III、ARV、およびHIVとさまざまに呼ばれている。以下、これをHIVと称する。このウイルスのRNAまたはDNAの検出は、種々のプローブ配列およびハイブリダイゼーション形式により可能である。

1987年8月11日に出願されたPCT WO 88/01302には、HIVのDNAまたはRNAの検出にプローブとして用いられる13個のHIVオリゴヌクレオチドが開示されている。1987年6月22日に
 出願されたPCT WO 87/07906には、HIVウイルスの変異株およびそれらのDNAをAIDS診断に使用することが開示されている。1989年1月27日に
 出願されたEP 0 326 395 A2には、多発性硬化症に関連する配列を検出するための、ヌクレオチド2438~2457位の長さのHIV DNA
 プローブが開示されている。

ポリメラーゼ連鎖反応の出現により、主としてpol遺伝子およびgag遺伝子の領域に由来するプローブを用いるアッセイの範囲が刺激された。Spectorら(Clin. Chem.35/8:1581-1587, 1989)およびKellogら(Analytical Biochem 189:202-208, 1990)は、HIV gag遺伝子由来のプライマーでのポリメラーゼ連鎖反応を用いる、HIVプロウイルスDNAの定量アッセイを開示している。Lomellら(Clin. Chem.35/9:1826-1831)は、HIV pol遺伝子mRNAの保存領域に相補的な増幅可能RNAプローブを開示している。Coutleeら(Anal. Biochem.181:96-105, 1989)は、HIV polおよびgag遺伝子由来の配列に相補的なプライマーのセットを用いるポリメラーゼ連鎖反応によるHIV DNAの免疫検出を開示している。1987年12月15日に
 出願されたEP 0 272 098には、ヌクレオチド8538~8547位および8658~8677位の長さのオリゴヌクレオチドプローブを用いる、HIV RNA配列のPCR増幅および検出が開示されている。1987年1月9日に
 出願されたEP 0 229 701には、HIV gag領域由来のDNAの増幅によるHIVの検出が開示されている。PCT WO 89/10979には、捕獲プローブおよびリポータープローブを用いて固体支持体に固定する、増幅と溶液ハイブリダイゼーションとを組み合わせる核酸プローブアッセイが開示されている。HIVのgag p 17領域内の領域は、この技法によって増幅された。

他の方法は、「可逆的標的捕獲」と呼ばれる。例えば、Thompsonら(Clin. Chem.35/9:178-1881, 1989)は、HIV RNAの「可逆的標的捕獲」を開示しており、ここで市販の入手

10

20

30

40

50

可能なdAテイル化合物オリゴヌクレオチドは、分析される核酸の選択的精製を提供し、そしてHIV pol遺伝子に相補的な標識アンチセンスRNAプローブはシグナルを提供している。Gillespieら (Molecular and Cellular Probes3:37-86, 1989) は、HIV RNAの可逆的標的捕獲のためのプローブを開示しており、ここでこのプローブは、HIV pol遺伝子のヌクレオチド2094~4682位に相捕的である。

Kumarらは、HIV DNAの「プローブシフト」アッセイを開示している。これは、HIVのgagおよびpol遺伝子に相補的なDNA配列を用いる。プローブシフトアッセイは、標識オリゴヌクレオチドのPCR増幅セグメントへの、溶液中でのハイブリダイゼーションに依存する。そこで形成されるヘミ二重鎖は、非変性ゲル上で分画を行った後検出される。

Kellerら (Anal. Biochem.177:27-32, 1989) は、gagコーディング領域のPstI部位に広がるHIV DNAを検出するための、マイクロタイターベースのサンドイッチアッセイを開示している。

10

Viscidiら (J. Clin. Micro.27:120-125, 1989) は、固相抗ビオチン抗体およびDNA-RNAハイブリッドに特異的な酵素標識モノクローナル抗体を用いる、HIV RNAのハイブリダイゼーションアッセイを開示しており、ここでプローブは、ポリメラーゼ遺伝子のほぼ全域およびgag遺伝子の3'末端に広がる。

1989年11月16日に出願された欧州特許出願 (EPA) 第89311862号には、核酸を検出するための固体捕獲法を用いる診断キットおよび方法が開示されており、HIV DNAの検出のために、HIV gag遺伝子に相補的なDNA配列を使用することが記載されている。

同一人に譲渡された米国特許第4,868,105号には、溶液相核酸サンドイッチハイブリダイゼーションアッセイが開示されている。このアッセイでは、分析される核酸は、まず第一の容器中で、溶液中で、標識化プローブのセットとハイブリダイズされ、そして捕獲プローブのセットとハイブリダイズされる。次いで、プローブ-分析物複合体は、捕獲プローブのセグメントに相補的である固相固定化プローブを含む第二の容器に移される。このセグメントは固定化プローブにハイブリダイズするので、溶液から複合体は除去される。固定化複合体の形態で分析物を有することにより、アッセイにおける続く分離工程が容易になる。最終的に、標識化プローブのセットの一本鎖セグメントは標識プローブにハイブリダイズされるので、分析物含有複合体は、標識から直接または間接的に生じたシグナルによって検出され得る。

20

同一人に譲渡された欧州特許出願 (EPA) 第883096976号には、米国特許第4,868,105号に記載のアッセイの変形が開示されており、ここでは、標識プローブにより生じるシグナルが増幅される。この増幅は、核酸マルチマーの使用を包含する。これらのマルチマーは、分枝ポリヌクレオチドであって、分析される核酸にまたは分析物に結合した核酸 (分枝または直鎖状) に特異的にハイブリダイズするセグメント、ならびに、標識プローブに特異的にハイブリダイズする第二のセグメントの反復を有するように構築されている。マルチマーを用いるアッセイでは、分析物を、標識または増幅プローブのセットおよび捕獲プローブのセットと、第一の容器内でハイブリダイズさせ、そして複合体を、捕獲プローブのセグメントとハイブリダイズする固定化核酸を含む他の容器に移すという開始工程が行われる。次いで、マルチマーは固定化複合体にハイブリダイズされ、さらに、標識プローブはマルチマーの第二のセグメントの反復にハイブリダイズされる。マルチマーは、標識プローブが付着する多数の部位を提供するので、シグナルが増幅される。増幅および捕獲プローブ配列は、B型肝炎ウイルス、Neisseria gonorrhoeae、N. gonorrhoeaeのペニシリンおよびテトラサイクリン耐性、およびChlamydia trachomatisについて開示されている。

30

40

1990年7月27日に出願された同一人に譲渡された同時係属出願第558,897号には、上記溶液相アッセイに用いられる、大きなコーム型分枝ポリヌクレオチドマルチマーの調製が記載されている。このコームは、より小さいマルチマーよりも強くシグナルを増強する。

1987年11月24日に出願された米国特許第5,030,557号には、プローブの標的への結合を促進するために、分析される核酸に結合して、標的に異なる二次および三次構造を与えるように選択された、「ヘルパー」オリゴヌクレオチドが開示されている。

50

発明の開示

本発明の1つの局面は、HIV核酸のセグメントに実質的に相補的なヌクレオチド配列を含む第一セグメント；および核酸マルチマーのオリゴヌクレオチド単位に実質的に相補的なヌクレオチド配列を含む第二セグメントを含む、HIVに対するサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイにおける増幅プローブとして有用な合成オリゴヌクレオチドである。本発明の別の局面は、HIV核酸のセグメントに実質的に相補的なヌクレオチド配列を含む第一セグメント；および固相に結合したオリゴヌクレオチドに実質的に相補的なヌクレオチド配列を含む第二セグメントを含む、HIVに対するサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイにおける捕獲プローブとして有用な合成オリゴヌクレオチドである。

本発明の別の局面は、HIVを検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションに用いるためのスパーサーオリゴヌクレオチドである。 10

本発明の別の局面は、試料中のHIVの存在を検出するための溶液サンドイッチハイブリダイゼーションアッセイであって、このアッセイは以下の工程を包含する：

(a) 該試料を、過剰の(i)HIV核酸のセグメントに実質的に相補的なヌクレオチド配列を含む第一セグメント、および、核酸マルチマーのオリゴヌクレオチド単位に実質的に相補的なヌクレオチド配列を含む第二セグメントを含む、増幅プローブオリゴヌクレオチド、および、(ii)HIV核酸のセグメントに実質的に相補的なヌクレオチド配列を含む第一セグメント、および、固相に結合したオリゴヌクレオチドに実質的に相補的なヌクレオチド配列を含む第二セグメントを含む、捕獲プローブオリゴヌクレオチドと、ハイブリダイズする条件下で接触させる工程； 20

(b) 工程(a)の生成物を、固相に結合した該オリゴヌクレオチドと、ハイブリダイズする条件下で接触させる工程；

(c) その後、固相に結合していない物質を分離する工程；

(d) 工程(c)の結合した生成物を、核酸マルチマーと、ハイブリダイゼーション条件下で接触させる工程であって、該マルチマーが、増幅プローブポリヌクレオチドの第二セグメントに実質的に相補的である少なくとも1つのオリゴヌクレオチド単位、および、標識オリゴヌクレオチドに実質的に相補的である多数の第二オリゴヌクレオチド単位を含む、工程；

(e) 非結合マルチマーを除去する工程；

(f) 工程(e)の固相複合体生成物を、該標識オリゴヌクレオチドと、ハイブリダイズする条件下で接触させる工程； 30

(g) 非結合標識オリゴヌクレオチドを除去する工程；および

(h) 工程(g)の固相複合体生成物中の標識の存在を検出する工程。

本発明の別の局面は、試料中のHIVの検出のためのキットであって、このキットは以下の組み合わせを含む：

(i) 増幅プローブオリゴヌクレオチドのセットであって、ここで該増幅プローブオリゴヌクレオチドが、HIV核酸のセグメントに実質的に相補的なヌクレオチド配列を含む第一セグメントと、核酸マルチマーのオリゴヌクレオチド単位に実質的に相補的なヌクレオチド配列を含む第二セグメントとを含む、セット；

(ii) 捕獲プローブオリゴヌクレオチドのセットであって、ここで該捕獲プローブオリゴヌクレオチドが、HIV核酸のセグメントに実質的に相補的なヌクレオチド配列を含む第一セグメント、および、固相に結合したオリゴヌクレオチドに実質的に相補的である第二セグメントを含む、セット； 40

(iii) 核酸マルチマーであって、該マルチマーが、増幅プローブポリヌクレオチドの第二セグメントに実質的に相補的である少なくとも1つのオリゴヌクレオチド単位、および、標識オリゴヌクレオチドに実質的に相補的である多数の第二オリゴヌクレオチド単位を含む、マルチマー；および

(iv) 標識オリゴヌクレオチド。

発明を実施するための形態

定義

「溶液相核酸ハイブリダイゼーションアッセイ」とは、同一人に譲渡された米国特許第4,868,105号、EPA第883096976号、および米国特許出願第558,897号に記載およびクレームされているアッセイ法を意味する。

「改変ヌクレオチド」とは、ポリヌクレオチドに安定して取り込まれ得て、付加的な官能基を有するヌクレオチドモノマーを意味する。好ましくは、改変ヌクレオチドは、そのN⁴位が機能的ヒドロキシ基を提供するように改変されている5'-シチジンである。

「増幅マルチマー」とは、分析される核酸と、多数のポリヌクレオチド反復（すなわち、他のマルチマーの反復または標識プローブの反復のいずれか）とに、同時に直接または間接的にハイブリダイズし得る分枝ポリヌクレオチドを意味する。マルチマーの分枝は共有結合によりつくられ、マルチマーは、2つの型のオリゴヌクレオチド単位から構成されている。これらのオリゴヌクレオチド単位は、それぞれ、分析される核酸または分析される核酸にハイブリダイズした核酸に、および多数の標識プローブにハイブリダイズし得る。このようなマルチマーの組成物および調製は、EPA第883096976号、および1990年7月27日に出版された米国特許出願第558,897号に記載されており、その開示内容は、本明細書中に参考として援用されている。

「スパーサーオリゴヌクレオチド」は、分析されるRNAに結合するが、固相に付着するためのいかなる配列をも含まず、そして増幅プローブによるいかなる検出手段をも含まないオリゴヌクレオチドとして意図される。

用語「増幅プローブ」は、分析される核酸に特異的にハイブリダイズするセグメントと、増幅マルチマーに特異的にハイブリダイズするセグメントまたはセグメントの反復とを有するように構築された、分枝または直鎖状のポリヌクレオチドとして意図される。

用語「捕獲プローブ」は、分析される核酸のヌクレオチド配列に実質的に相補的なセグメントと、固相固定化プローブのヌクレオチド配列に実質的に相補的なセグメントを有するオリゴヌクレオチドとして意図される。

本明細書中で本発明のコーム型分枝ポリヌクレオチドに記載するのに用いられる「大きな(Large)」とは、少なくとも約15個の分枝部位と、標識プローブ結合配列の少なくとも約20個の反復とを有する分子を意味する。

本明細書中で本発明の分枝ポリヌクレオチドの構造を記載するのに用いられる「コーム型」とは、バックボーンから伸長している多数の側鎖を有する直鎖状のバックボーンを有するポリヌクレオチドを意味する。

「切断可能なリンカー分子」とは、ポリヌクレオチド鎖に安定して取り込まれ得て、化学的処理または物理的処理（例えば、放射線照射）により破壊または切断され得る共有結合を含む分子を意味する。

本明細書中に開示された全ての核酸配列は、5'から3'への方向に記載されている。ヌクレオチドは、IUPAC-IUB生化学命名委員会によって推奨されたヌクレオチド記号に従って示す。

溶液相ハイブリダイゼーションアッセイ

溶液相サンドイッチハイブリダイゼーションの一般的なプロトコルを以下に示す。分析される核酸を、過剰量の以下に示す2つの一本鎖核酸プローブセットを入れたマイクロタイターウェル中に入れる：(1)捕獲プローブのセット、それぞれ、分析物に実質的に相補的な第一結合配列、および、固体支持体（例えばウェル表面またはビーズ）に結合した核酸に実質的に相補的な第二結合配列を有する、および(2)増幅プローブ（分枝または直鎖状）のセット、それぞれ、分析物に特異的に結合し得る第一結合配列、および、マルチマーのセグメントに特異的に結合し得る第二結合配列を有する。得られた生成物は、それぞれの第一結合配列により分析物にハイブリダイズした2つのプローブからなる3成分の核酸複合体である。プローブの第二結合配列は、分析物と実質的に相補的ではないので、一本鎖セグメントのまま残っている。この複合体は、固体表面上の固定化プローブに、捕獲プローブの第二結合配列によってハイブリダイズする。得られた生成物は、固体表面に結合したオリゴヌクレオチドと、捕獲プローブの第二結合配列とにより形成された二重鎖によって、固体表面に結合した複合体を含む。次いで、非結合物質を、例えば洗浄により表

10

20

30

40

50

面から除去する。

次いで、増幅マルチマーを、ハイブリダイゼーション条件下で結合複合体に加え、マルチマーを複合体の増幅プローブの結合可能な第二結合配列にハイブリダイズさせる。次いで、得られた複合体を、洗浄によりいずれの非結合マルチマーからも分離する。次いで、標識オリゴヌクレオチドを、マルチマーの実質的に相補的なオリゴヌクレオチド単位にハイブリダイズさせるような条件下に加える。次いで、得られた固定化標識核酸複合体を洗浄して、非結合標識オリゴヌクレオチドを除去し、読み取る。

分析される核酸は、種々の供給源（例えば、生物学的液体または固体）由来であり得、種々の手段（例えば、プロテイナーゼK/SDS、カオトロピック塩など）によりハイブリダイゼーション分析のために調製され得る。また、酵素的、物理的、または化学的手段（例えば、制限酵素、音波処理、化学分解（例えば、金属イオン）など）によって、分析される核酸の平均サイズを小さくすることが有利であり得る。フラグメントは、0.1kb程に小さくあり得、通常少なくとも約0.5kbであり、そして1 kbまたはそれ以上であり得る。分析される配列は、分析のため一本鎖形態で提供される。配列が天然に一本鎖形態で存在する場合、変性は必要とされない。しかし、配列が二本鎖形態で存在し得る場合、配列を変性すべきである。変性は種々の技法（例えば、アルカリ、一般的には約0.05~0.2Mの水酸化物、ホルムアミド、塩類、熱、酵素、またはそれらの組合せ）により行われ得る。

分析される配列に実質的に相補的である、捕獲プローブおよび増幅プローブの第一結合配列は、それぞれ少なくとも15ヌクレオチド、通常少なくとも25ヌクレオチド、そして約5 kb以下、通常約1 kb以下、好ましくは約100ヌクレオチド以下のヌクレオチドからなる。それらは、典型的には約30ヌクレオチドである。それらは、通例、分析物の異なる配列に結合するように選択される。第一結合配列は、種々の考察に基づいて選択され得る。分析物の性質に依存して、コンセンサス配列、多型性に関連した配列、特定の表現型または遺伝子型、特定の株などに関連し得る。

用いられる種々の増幅プローブおよび捕獲プローブの数は、アッセイの感度に影響する。なぜなら、これは用いられるプローブ配列が多いほど、アッセイ系で提供されるシグナルが強くなるからである。さらに、プローブ配列を多く用いるほど、よりストリンジェントなハイブリダイゼーション条件が用いられるようになり、それによって偽陽性結果の発生率が減少する。従って、セット中のプローブ数は、少なくとも1つの捕獲プローブおよび少なくとも1つの増幅プローブ、より好ましくは2つの捕獲プローブおよび2つの増幅プローブ、そして最も好ましくは5~100個の捕獲プローブおよび5~100個の増幅プローブである。

HIVのオリゴヌクレオチドプローブ配列は、GenBank由来の18個のHIV株のDNA配列を並べることにより設計した。pol遺伝子内の相同性が最も高い領域を捕獲プローブとして選択し、一方、より相同性の低い領域を増幅プローブとして選択した。非常に異質の領域をスペーサープローブとして選択した。従って、HIVのより多くの株が同定され配列決定されるのに伴って、さらなるプローブが設計され得るか、または現存の好ましいセットのプローブが改変され得る。これは、新規の株または単離株の配列と、上記で用いられた18株の配列とを並べ、同様に相同性の最も高い領域およびより低い領域を同定することによって行われ得る。

スペーサーオリゴヌクレオチドは、起こり得る分解からRNAを保護するために、ハイブリダイゼーション反応混液に加えられるように設計した。捕獲プローブ配列および標識プローブ配列は、捕獲プローブ配列に標識プローブ配列が散在するように、または捕獲プローブ配列が、標識プローブ配列に関して共にクラスター形成されるように設計した。

HIV核酸に特異的にハイブリダイズする、現存の好ましいセットのプローブおよびそれらの捕獲領域または増幅領域を、実施例2に挙げる。

捕獲プローブおよび増幅プローブの第二結合配列は、それぞれ、固体表面に結合したオリゴヌクレオチドに、およびマルチマーのセグメントに、実質的に相補的であるように、そして試料/分析物の内在性配列に遭遇することのないように選択される。第二結合配列は、第一結合配列に連続し得るか、または中間の非相補的配列によってそこから一定の間隔

10

20

30

40

50

をとって配置され得る。プローブは、所望であれば他の非相補的配列を含み得る。これらの非相補的配列は、結合配列の結合を妨げないか、または非特異的結合を生じさせないものでなければならない。

捕獲プローブおよび増幅プローブは、オリゴヌクレオチド合成法またはクローニングにより調製され得るが、前者が好ましい。

結合配列は、完全に相補的であって、ホモ二本鎖を提供する必要はない。多くの場合では、5個またはそれ以上のヌクレオチドのループを無視して、約10%未満の塩基がミスマッチであるヘテロ二本鎖で十分である。従って、本明細書中で用いられる用語「相補的」とは、結合領域内の各塩基が正確に対応するような正確な相補性を意味し、「実質的に相補的」とは、90%またはそれ以上の相同性を有することを意味する。

標識オリゴヌクレオチドは、マルチマーの繰り返しオリゴヌクレオチド単位に実質的に相補的な配列を含む。標識オリゴヌクレオチドは、1つまたはそれ以上の分子（「標識」）を含み、これは検出し得るシグナルを直接または間接的に提供する。標識は、実質的に相補的な配列の個々のメンバーに結合され得るか、または複数の標識を有する末端メンバーまたは末端テイルとして存在し得る。オリゴヌクレオチド配列に結合した標識を提供するための種々の手段が、文献に報告されている。例えば、Learyら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1983) 80:4045; RenzおよびKurz、*Nucl. Acids Res.* (1984) 12:3435; Richards

10

onおよびGumpert、*Nucl. Acids Res.* (1983) 11:6167; Smithら、*Nucl. Acids Res.* (1985) 13:2399; MeinkothおよびWahl、*Anal. Biochem.* (1984) 138:267を参照のこと。標識は、実質的に相補的な配列に、共有結合または非共有結合で結合され得る。用いられ得る標識には、放射性核種、蛍光物質、化学発光物質、染料、酵素、酵素基質、酵素補因子、酵素インヒビター、酵素サブユニット、金属イオンなどが包含される。例示の特定の標識には、フルオレセイン、ローダミン、テキサスレッド (Texas red)、フィコエリトリン、ウンベリフェロン、ルミノール、NADPH、 β -ガラクトシダーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼなどが包含される。

20

分析物の予測モルに対する捕獲プローブおよび増幅プローブの割合は、それぞれ少なくとも化学量論であり、好ましくは過剰量である。この割合は、好ましくは少なくとも約1.5 : 1であり、より好ましくは少なくとも2 : 1である。通例、2 : 1から10,000 : 1の範囲内である。各プローブの濃度は、一般的に約 10^{-5} ~ 10^{-9} Mの範囲であり、試料の核酸濃度は、 10^{-21} ~ 10^{-12} Mまでの種々の範囲をとる。アッセイのハイブリダイゼーション工程は、一般的に約10分から20時間までを要し、多くは約1時間で完了する。ハイブリダイゼーションは、やや高めの温度で、一般的には約20 から80 の範囲で、より通常には約35 から70 までで、特に65 で行われ得る。

30

ハイブリダイゼーション反応は、水性媒体中で、特に緩衝化水性媒体中で、通常行われる。媒体は種々の添加剤を含有し得る。用いられ得る添加剤には、低濃度のデタージェント (0.1 ~ 1%)、塩類 (例えば、クエン酸ナトリウム (0.017 ~ 0.17M))、フィコール、ポリビニルピロリドン、担体核酸、担体タンパク質などが包含される。非水性溶媒は、水性媒体に添加され得る。これは、例えばジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、アルコール、およびホルムアミドである。これらの他の溶媒は、一般的に2 ~ 50%の範囲内の量で存在する。

40

ハイブリダイゼーション媒体のストリンジェンシーは、温度、塩濃度、溶媒系などにより制御され得る。従って、目的とする配列の長さおよび性質に依存して、ストリンジェンシーを変化させる。

標識の存在を検出するためには、標識の性質に依存して、種々の技法が用いられ得る。蛍光物質に対しては、多くの種々の蛍光光度計が有用である。化学発光物質に対しては、ルミノメーターまたはフィルムが有用である。酵素を用いる場合は、蛍光産物、化学発光産物、または着色産物が提供され得、そして蛍光光度計、ルミノメーター、分光光度計により、または視覚的に測定され得る。イムノアッセイに用いられる種々の標識およびイムノアッセイに適用され得る方法が、本アッセイに用いられ得る。

以下の実施例は、本発明をさらに例示する。これらの実施例は、本発明をどのようにも限

50

定することを意図しない。

実施例

実施例 I

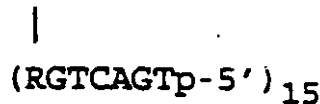
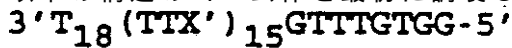
コーム型分枝ポリヌクレオチドの合成

本実施例は、15個の分枝部位と、3つの標識プローブ結合部位を有する側鎖伸長とを有する、コーム型分枝ポリヌクレオチドの合成を例示する。このポリヌクレオチドは、EPA第883096976号に記載の溶液相ハイブリダイゼーションに用いられるように設計した。

オリゴヌクレオチドの全ての化学的合成は、自動DNA合成機 (Applied Biosystems, Inc., (ABI) モデル380B) で行った。シアノエチル型のホスホルアミダイト化学を用いた。

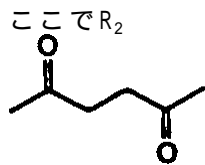
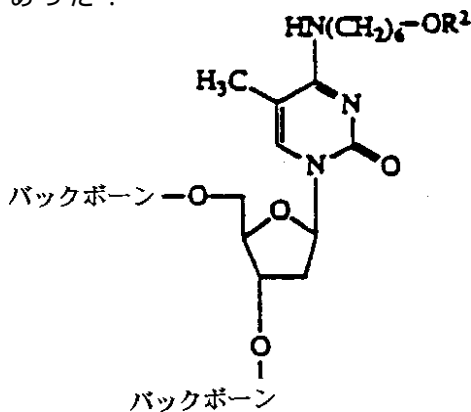
これには、PhostelTM 試薬 (ABN) を用いる5'リン酸化が包含される。示したこと以外は、標準的なABIプロトコルを用いた。複数のサイクルを用いた (例えば、1.2サイクル) と示されている場合、ABIにより推奨された複数の標準量のアミダイトが、特定のサイクルに用いられた。Applied Biosystems, Model 380B DNA合成機で行われる、サイクル1.2および6.4を実施するためのプログラムを本明細書中に添付する。

以下の構造のコーム体を最初に調製した：



ここで、X'は分枝モノマーであり、そしてRは過ヨウ素酸切断可能リンカーである。

15個の (TTX') 繰り返しによるコーム体の部分を、33.8mgのアミノプロピル誘導体化チミジンの調整孔ガラス (CPG) (2000、支持体1グラム当り7.4マイクロモルチミジン) を用いて、1.2サイクルプロトコルで、最初に合成する。分枝部位ヌクレオチドは、下式であった：



を表す。

コーム体 (側鎖を含まない) の合成に関して、シアノエチルホスホルアミダイトモノマーの濃度は、A、C、GおよびTが0.1M、分枝部位モノマーEが0.15M、およびPhostelTM 試薬が0.2Mであった。脱トリチル化は、脱保護期間中に階段フロースルー (stepped flowthrough) を用いて、塩化メチレン中の3%トリクロロ酢酸で行った。最終的に、5'DMTをアセチル基で置換した。

切断可能リンカーRおよび式3'-RGTCAGTp (配列番号：1) の6塩基の側鎖伸長は、以下のようにして各分枝モノマー部位で合成した。塩基保護基 (上式のR₂) の除去は、コーム体の合成に用いたのと同じカラム中にCPG支持体を保持している間に、手動的に行った。R₂ がレプリニルである場合、0.5Mヒドラジン水和物のピリジン / 氷酢酸 (1:1 v/v) 溶液を

加え、15分ごとに液体を取り替えながら90分間CPG支持体と接触させておき、続いてピリジン/氷酢酸(1:1 v/v)で、次いでアセトニトリルで十分に洗浄した。脱保護を行った後、切断可能リンカーRおよび6塩基側鎖伸長を、6.4サイクルを用いて加えた。

これらの合成において、ホスホルアミダイトの濃度は、0.1Mであった(0.2MのRおよびPhostel™試薬を除く; Rは、2-(4-(2-ジメトキシトリチルオキシ)エチル-)フェノキシ2,3-ジ(ベンゾイルオキシ)-ブチルオキシ)フェニル)エチル-2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピルホスホルアミダイトであった)。

脱トリチル化は、3%トリクロロ酢酸の塩化メチレン溶液で連続フロースルーを用いて行い、次いでトルエン/クロロメタン(1:1 v/v)の溶液でリンスする。分枝ポリヌクレオチド鎖は、固体支持体から、サイクル「CE NH₃」を用いて380Bで自動的に除去した。水酸化アンモニウム溶液を4mlのスクリーキャップWheatonバイアルに集め、60℃で12時間加熱して全ての塩基保護基を除去した。室温まで冷却した後、溶媒をSpeed-Vacエバポレーターで除去し、残渣を100μlの水に溶解した。

以下の構造の3'バックボーン伸長(セグメントA)、側鎖伸長、および連結反応テンプレート/リンカーもまた、自動合成機を用いて作成した。

3'バックボーン

伸長 3'-TCCGTATCCTGGGCACAGAGGTGCp-5' (配列番号:2)

側鎖伸長 3'-GATGCG(TTCATGCTGTGGTGTAG)₃-5' (配列番号:3)

3'バックボーン伸長

連結のための

連結反応テンプレート

3'-AAAAAAAAAAGCACCTp-5' (配列番号:4)

側鎖伸長連結の

ための連結反応

テンプレート

3'-CGCATCACTGAC-5' (配列番号:5)

粗製のコーム体を標準ポリアクリルアミドゲル法(7%、7M尿素および1X TBEランニング緩衝液を含む)により精製した。

3'バックボーン伸長および側鎖伸長を、以下のようにしてコーム体に連結した。コーム体(4 pmol/μl)、3'バックボーン伸長(6.25 pmol/μl)、側鎖伸長(93.75 pmol/μl)、および連結テンプレート(5 pmol/μl)を、1 mM ATP/5 mM DTT/50 mM トリスHCl、pH 8.0/10 mM MgCl₂/2 mM スペルミジン中で、0.5 単位/μl のT4ポリヌクレオチドキナーゼと合わせた。この混合物を37℃で2時間インキュベートし、次いで、水浴中で95℃に加熱し、次いで約1時間かけて35℃未満まで冷却した。2 mM ATP/10 mM DTT、14% ポリエチレングリコール、および0.21 単位/μl T4リガーゼを加え、そして混合物を23℃で16~24時間インキュベートした。DNAをNaCl/エタノール中で沈澱させ、水中に再懸濁し、そして以下のような2回目の連結反応にかけた。混合物を調整して、1 mM ATP、5 mM DTT、14% ポリエチレングリコール、50 mM トリスHCl、pH 7.5/10 mM MgCl₂/2 mM スペルミジン、0.5 単位/μl T4ポリヌクレオチドキナーゼ、および0.21 単位/μl T4リガーゼを加え、そして混合物を23℃で16~24時間インキュベートした。次いで、連結反応産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動により精製した。

連結反応および精製を行った後、生成物の一部を³²Pで標識し、R部位での切断を行い、これは、水性NaIO₄で1時間酸化することにより達成された。次いで、試料をPAGEにより分析して、取り込まれた側鎖伸長数を、ゲル上のバンドの放射性標識を定量することにより測定した。生成物は、全部で45個の標識プローブ結合部位を有していることが分かった。

実施例 2

10

20

30

40

50

マルチマーを用いるHIV DNAのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ

本実施例は、HIV DNAアッセイに本発明を使用することを例示する。

「15×3」増幅溶液相核酸サンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ形式を、本実施例で用いた。「15×3」の呼称は、この形式が2つのマルチマーを用いることに由来する：(1)増幅プローブは、HIV核酸に結合する第一セグメント(A)と、(2)増幅マルチマーにハイブリダイズする第二セグメント(B)とを有し、(2)増幅マルチマーは、セグメント(B)にハイブリダイズする第一セグメント(B*)と、セグメント(C)の15個の反復とを有し、ここでセグメントCは、3つの標識オリゴヌクレオチドにハイブリダイズする。本アッセイで用いた増幅プローブおよび捕獲プローブのHIV特異的セグメント、およびそれらの個々の名称は以下の通りであった。

HIV 増幅プローブ

HIV.104 (配列番号 :5)

TTCCTGGCAAAYYYATKTCTYCTAMTACTGTAT

HIV.105 (配列番号 :6)

CTCCAATTCYCCCTATCATTFTTGGYTTCCATY

HIV.106 (配列番号 :7)

KTATYTGATCRTAYTGTCYYACTTTGATAAAAC

HIV.108 (配列番号 :8)

GTTGACAGGYGTAGGTCCTACYAATAYTGTACC

HIV.110 (配列番号 :9)

YTCAATAGGRCTAATKGGRAAATTTAAAGTRCA

HIV.112 (配列番号 :10)

YTCTGTCAATGGCCATTGYTTRACYTTGGGCC

HIV.113 (配列番号 :11)

TKTACAWATYTC TRYTAATGCTTTTATTTTYTC

HIV.114 (配列番号 :12)

AAITYTTGAAATYTTYCCTTCCTTTTCCATHTC

HIV.115 (配列番号 :13)

10

20

30

- AAATAYKGGAGTATTRTATGGATTFTCAGGCC
- HIV.116 (配列番号 :14)
- TCTCCAYTTRGTRCTGTCYTTTTTCTTTATRGC
- HIV.117 (配列番号 :15)
- TYTYTATTAAGYTCYCTGAAATCTACTARTTT
- HIV.120 (配列番号 :16)
- TKTTYTAAARGGYTCYAAGATTTTTGTCA TRCT
- HIV.121 (配列番号 :17)
- CATGTATTGATADATRAYYATKTCTGGATTTTG
- HIV.122 (配列番号 :18)
- TATYTCTAARTCAGAYCCTACATACAAATCATC
- HIV.123 (配列番号 :19)
- TCTYARYTCCTCTATTTTTGYTCTATGCTGYC
- HIV.125 (配列番号 :20)
- AAGRAATGGRGGTTCTTTCTGATGYTTYTTRTC
- HIV.128 (配列番号 :21)
- TRGCTGCYCCATCTACATAGAAVGTTTCTGCWC
- HIV.130 (配列番号 :22)
- GACAACYTTYTGCTTCCAYTGTYAGTWASATA
- HIV.132 (配列番号 :23)
- YGAATCCTGYAAVGCTARRTDAATTGCTTGTA
- HIV.133 (配列番号 :24)
- YTGTGARTCTGTYACTATRTTTACTTCTRRTCC
- HIV.135 (配列番号 :25)
- TATTATTTGAYTRACWAWCTCTGATTCACTYTK
- HIV.136 (配列番号 :26)
- CAGR TARACYTTTTCCTTTTTTATTARYTGYTC
- HIV.137 (配列番号 :27)
- TCCTCCAATYCCTTTTRTGCTGGTACCCATGM
- HIV.138 (配列番号 :28)
- TCCHBBACTGACTAATYTATCTACTTGTTTATT
- HIV.139 (配列番号 :29)
- ATCTATTCCATYYAAAAATAGYAYTTYCTGAT

10

20

30

40

- HIV.141 (配列番号 :30)
GTGGYAGRTTAAARTCAYTAGCCATTGCTYTCC
- HIV.142 (配列番号 :31)
CACAGCTRGCTACTATTTCTTYGCTACYAYRG
- HIV.144 (配列番号 :32)
RYTGCCATATYCCKGGRCTACARTCTACTTGTC
- HIV.145 (配列番号 :33)
DGATWAYTTTTCTTTCYARATGTGTACAATCTA
- HIV.146 (配列番号 :34)
CTATRTAKCCACTRGCYACATGRACTGCTACYA
- HIV.147 (配列番号 :35)
CYTGYCCTGTYTCTGCTGGRATDACTTCTGCTT
- HIV.149 (配列番号 :36)
TGSKGCCATTGTCTGTATGTAYTRYTKTTACTG
- HIV.151 (配列番号 :37)
GAATKCCAAATTCCTGYTTRATHCCHGCCACC
- HIV.152 (配列番号 :38)
ATTCYAYTACYCCTTGACTTTGGGGRTTGTAGG
- HIV.153 (配列番号 :39)
GBCCTATRATTTKCTTTAATTCHTTATTCATAG
- HIV.154 (配列番号 :40)
CTSTCTTAAGRTGYTCAGCYTGMTCTCTTACYT
- HIV.155 (配列番号 :41)
TAAAATTGTGRATRAAYACTGCCATTTGTACWG
- HIV.156 (配列番号 :42)
CTGCACTGTAYCCCCCAATCCCCCYTYTTCTTT
- HIV.157 (配列番号 :43)
TGTCTGTWGCTATYATRYCTAYTATTCTYTCCC
- HIV.158 (配列番号 :44)
TTRTRATTTGYTTTTGTARTTCTYTARTTTGTA

10

20

30

40

HIV 捕獲プローブ

- HIV.103 (配列番号 :45)
CATCTGCTCCTGTRTCTAATAGAGCTTCYTTTA
- HIV.111 (配列番号 :46)
ATCCATYCCTGGCTTTAATTTTACTGGTACAGT
- HIV.118 (配列番号 :47)
TATTCCTAAYTGRACTTCCCARAARTCYTGAGT
- HIV.119 (配列番号 :48) 10
ACWYTGGAATATYGCYGGTGATCCTTTCCAYCC
- HIV.126 (配列番号 :49)
CCATTTTRTCAGGRTGGAGTTCATAMCCCATCCA
- HIV.127 (配列番号 :50)
CTAYTATGGGKTCYKTYTCTAACTGGTACCAYA
- HIV.134 (配列番号 :51)
ATCTGGTTGTGCTTGAATRATYCCYARTGCATA 20
- HIV.143 (配列番号 :52)
CATGCATGGCTTCYCCTTTTAGYTGRCATTTAT
- HIV.150 (配列番号 :53)
AACAGGCDGCTTAACYGYAGYACTGGTGAAAT
- HIV.159 (配列番号 :54)
TGTCYCTGTAATAAACCCGAAAATTTTGAATTT

各増幅プローブは、HIV配列に対して実質的に相補的な配列に加えて、増幅マルチマーの 30
セグメントに相補的な以下の5'伸長を含んでいた：
AGGCATAGGACCCGTGTCTT (配列番号 :55)。

各捕獲プローブは、HIV DNAに対して実質的に相補的な配列に加えて、固相に結合したDNA
に対して相補的な以下の下流配列 (XT1*)を含んでいた：
CTTCTTTGGAGAAAGTGGTG (配列番号 :56)。

増幅プローブおよび捕獲プローブに加えて、以下のHIVスペーサーオリゴヌクレオチドの
セットをハイブリダイゼーション混合物中に含有した。

HIV スペーサーオリゴヌクレオチド

HIV.NOX107 (配列番号 :57)

TATAGCTTTHTDTCRCAGATTTCTAYRR,

HIV.NOX109 (配列番号 :58)

VCCAACKCTGRGTCAACADATTTCKTCCRATTAT,

HIV.NOX124 (配列番号 :59)

TGGTGTGGTAARYCCCCACYTYAAYAGATGYYS,

HIV.NOX129 (配列番号 :60)

TCCTGCTTTTCCYWDTYTAGTYTCYCTRY,

HIV.NOX131 (配列番号 :61)

YTCAGTYTTCTGATTTGTYGTDTBHKTNADRGD,

HIV.NOX140 (配列番号 :62)

AATTRYTGATATTTTYTCATGDTCHTCTTGRGCCTT,

HIV.NOX148 (配列番号 :63)

GCCATCTKCCTGCTAATTTTARDAKRAARTATGCTGTYT。

10

20

マイクロタイタープレートを以下のようにして調製した。

White Microlite 1 Removawellストリップ(ポリスチレンマイクロタイタープレート、96ウェル/プレート)を、Dynatech Inc.から購入した。各ウェルに200 μ lの1N HClを満たし、室温で15~20分間インキュベートした。次いで、このプレートを1X PBSで4回洗浄し、ウェルをアスピレートし液体を除去した。次いでウェルに200 μ lの1N NaOHを満たし、室温で15~20分間インキュベートした。プレートを再び1X PBSで4回洗浄し、ウェルをアスピレートし液体を除去した。

ポリ(phe-lys)をSigma Chemicals, Inc.から購入した。このポリペプチドは、phe:lysを1:1のモル比で有しており、平均分子量は47,900mg/molである。平均長さは309アミノ酸であり、155アミン/molを含む。ポリペプチドの1mg/ml溶液を、2M NaCl/1X PBSと混合し、最終濃度0.1mg/ml(pH6.0)にした。各ウェルに、この溶液を200 μ Lずつ加えた。プレートをプラスチックで包んで乾燥を防ぎ、30 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。次いで、プレートを1X PBSで4回洗浄し、ウェルをアスピレートし液体を除去した。

30

プレートにオリゴヌクレオチドXT1*をカップリングするのに、以下の手順を用いた。XT1*の合成は、EPA第883096976号に記載された。20mgのジスクシンイミジルスベレート(30 μ l)のジメチルホルムアミド(DMF)に溶解した。XT1*の26 OD₂₆₀単位を、100 μ lカップリング緩衝液(50mMリン酸ナトリウム、pH7.8)に加えた。次いで、カップリング混合物をDSS-DMF溶液に加え、マグネチックスターラーで30分間攪拌した。NAP-25カラムを10mMリン酸ナトリウム、pH6.5で平衡化した。カップリング混合物DSS-DMF溶液を2mlの10mMリン酸ナトリウム、pH6.5に4 $^{\circ}$ Cで加えた。この混合物をボルテックスにかけて混合し、平衡化したNAP-25カラムにかけた。DSS活性化XT1* DNAを、3.5mlの10mMリン酸ナトリウム、pH6.5でカラムから溶出した。溶出したDSS活性化XT1* DNAの5.6 OD₂₆₀単位を、1500mlの50mMリン酸ナトリウム、pH7.8に加えた。各ウェルに、この溶液を50 μ lずつ加え、プレートを一晩インキュベートした。次いで、プレートを1X PBSで4回洗浄し、ウェルをアスピレートして液体を除去した。

40

プレートの最終的なストリッピングは、以下のようにして行った。0.5% (w/v) SDSを含有する200 μ lの0.2N NaOHを各ウェルに加えた。プレートをプラスチックで包み、65 $^{\circ}$ Cで60分間インキュベートした。次いで、プレートを1X PBSで4回洗浄し、ウェルをアスピレートし液体を除去した。ストリッピングしたプレートを、2~8 $^{\circ}$ Cで乾燥剤ビーズと共に貯

50

蔵した。

HIV DNAの標準曲線は、HIV陰性ヒト血清でクローン化HIV DNAを希釈し、 $10 \sim 200$ t mol ($1 \text{ t mol} = 602$ 分子または 10^{-21} mol)の範囲に相当する希釈液のアリコートをし、上記のように調製したマイクロタイター皿のウェルに配付することにより調製した。

試料の調製は、 $12.5 \mu\text{l}$ のP-K緩衝液 (10mM トリスHCl、 $\text{pH}8.0$ 中の 2mg/ml のプロテイナーゼK / 0.15M NaCl / 10mM EDTA、 $\text{pH}8.0$ / 1% SDS / $40 \mu\text{g/ml}$ の音波処理サケ精子DNA)を各ウェルに配付することから成り立った。プレートを覆い、攪拌して試料を混合し、 65°C でインキュベートし、核酸を遊離させ、次いでベンチトップ5分間冷却した。

上記に挙げたHIV特異的増幅プローブおよび捕獲プローブの反応混液を各ウェルに加えた (ウェル当り捕獲プローブ 50fmol 、増幅プローブ 50fmol)。プレートを覆い、穏やかに攪拌して試薬を混合し、次いで 65°C で30分間インキュベートした。

次いで、中和緩衝液を各ウェルに加えた (0.77M 3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸 / 1.845M NaCl / 0.185M クエン酸ナトリウム)。プレートを覆い、 65°C で $12 \sim 18$ 時間インキュベートした。

各ウェルの内容物をアスピレートして、全ての流体を除去し、そしてウェルを洗浄緩衝液 (0.1% SDS / 0.015M NaCl / 0.0015M クエン酸ナトリウム)で2回洗浄した。

次いで、増幅マルチマーを各ウェルに加えた (50% ウマ血清中 $2.5\text{fmol}/\mu\text{l}$ の溶液 $40 \mu\text{l}$ / 0.06M NaCl / 0.06M クエン酸ナトリウム / $4\times$ SSCと $1:1$ で混合した 0.1% SDS / 0.1% SDS / 0.5% 「ブロッキング試薬」 (Boehringer Mannheim, カタログ番号1096 176))。プレートを覆い、攪拌してウェル中の内容物を混合した後、 55°C で15分間インキュベートした。

室温でさらに5分間おいた後、ウェルを上記のように洗浄した。

次いで、アルカリホスファターゼ標識プローブ (EP第883096976号に開示されている)を、各ウェルに加えた ($2.5\text{fmol}/\mu\text{l}$ を $40 \mu\text{l}$ /ウェル)。 55°C で15分間インキュベートした後、室温で5分間おき、ウェルを、上記のように2回洗浄し、次いで 0.015M NaCl / 0.015M クエン酸ナトリウムで3回洗浄した。

酵素のトリガーとなるジオキセタン (Schaapら、Tet. Lett. (1987) 28:1159-1162およびEPA公開第0254051号)をLumigen, Inc.から得、これを用いた。 $20 \mu\text{l}$ のLumiphos 530 (Lumigen)を各ウェルに加えた。ウェルを軽く叩いて試薬を底まで落とし、緩やかに回転させて試薬を底まで均等に分散させた。ウェルを覆い、 37°C で40分間インキュベートした。

次いで、プレートをDynatech ML 1000ルミノメーターで読み取った。出力を、反応の間に生じた光の総積分として示した。

結果を以下の表に示す。各標識試料に対する結果は、陰性コントロールの平均値プラス2倍の標準偏差値と、試料の平均値マイナス2倍の標準偏差値との差 (デルタ)として表す。デルタが0より大きい場合、試料は陽性であるとみなされる。

HIVプローブの標準曲線から得られる結果を表Iに示す。これらの結果より、これらのプローブの能力は、 50t mol のHIV DNA標準から検出し始めることが分かった。

表 I

分析される HIV fmol / ウェル	デルタ
0	---
10	-0.56
20	-0.51
50	0.39
100	1.93
200	5.48

10

実施例 3

HIVウイルスRNAの検出

HIV RNAを、上記と本質的に同じ手順を用いて、以下の改変を行って検出した。

HIV RNAの標準曲線を、HIVウイルス貯蔵品を正常ヒト血清で125~5000TCID₅₀/mlの範囲に連続的に希釈することにより調製した(TCID₅₀は、50%の組織培養物が感染する用量の終点である)。10mgのプロテイナーゼKを、-20℃で貯蔵したホルムアミド中で7%にした5mlのHIV捕獲希釈剤(53mMトリスHCl、pH8/10.6mM EDTA/1.3% SDS/16µg/ml音波処理サケ精子DNA/5.3X SSC/1mg/mlプロテイナーゼK)に加えることにより、プロテイナーゼK溶液を調製した。捕獲プローブ、標識プローブ、およびスペーサーオリゴヌクレオチドの等モル混合物を、各プローブの最終濃度が1670fmol/mlとなるようなプロテイナーゼK溶液に加えた。上記のように調製したマイクロタイタープレートの各ウェルに、プローブ/プロテイナーゼK溶液を30µlずつ加えた後、各ウェルに適当なウイルス希釈物を10µlずつ加えた。プレートを覆い、振盪して混合し、次いで65℃で16時間インキュベートした。

20

プレートをインキュベーターから取り出し、ベンチトップで10分間冷却した。ウェルを、上記実施例2に記載のようにして2回洗浄した。15×3マルチマーをAmp/Label希釈剤で1fmol/µlに希釈した(2.22ml DEPC処理H₂O(DEPCはジエチルピロカルボネート)、1.35mlの10% SDS、240µlの1MトリスpH8.0、20µlのウマ血清を混合することにより調製し、プロテイナーゼK中2mg/mlに調製して65℃で2時間加熱し、次いでこれを240µlの0.1M PMSFに加えて37℃で1時間加熱し、この後、4mlのDEPC処理H₂O、4mlの10% SDS、および8mlの20X SSCを加えた)。希釈した15×3マルチマーを40µl/ウェルで加え、プレートを封じ、振盪し、55℃で30分間インキュベートした。

30

次いでプレートを室温で10分間冷却し、上記のように洗浄した。アルカリホスファターゼ標識プローブをAmp/Label希釈剤で2.5fmol/µlに希釈し、各ウェルに40µlを加えた。プレートを覆い、振盪し、55℃で15分間インキュベートした。

40

プレートを室温で10分間冷却し、上記のように2回洗浄し、次いで0.15M NaCl/0.015Mクエン酸ナトリウムで3回洗浄した。基質を加え、発光を上記のようにして測定した。アッセイの感度は、以下の表に示したように約1.25 TCID₅₀であった。

表 II

TCID ₅₀	デルタ
0.00	--
1.25	0.11
2.50	2.60
5.00	6.37
10.00	14.10
50.00	90.70

10

実施例 4

クラスター形成プローブセットと散在プローブセットとの比較

HIV RNAを、以下の改変を行ったこと以外は、実施例 3 と本質的に同じ手順を用いて検出した。RNA標準は、T7 RNAポリメラーゼを用いて、プラスミドpBHBK10S (Chang, P.S.ら、*Clin. Biotech.* 2:23, 1990) からの9.0KBのHIV転写物の転写により調製した。このHIV RNAを、HAPクロマトグラフィーにより捕獲されたgagプローブおよびpolプローブとのハイブリダイゼーションにより定量した。RNA標準を、上記のプロテイナーゼK希釈剤で1ml当り2.5~100atomolの間の範囲に連続的に希釈し、捕獲プローブ、標識プローブ、およびスペーサーオリゴヌクレオチドの等モル混合物を加え、各プローブの最終濃度が1670fmol/mlとなるようにした。捕獲プローブと標識プローブとの2つの配置をテストした：分散 (scattered) 捕獲プローブ (捕獲プローブには標識プローブが散在している) およびクラスター形成捕獲プローブ (捕獲プローブは標識プローブに関して連続したクラスターの形で配置されている)。クラスター形成プローブのセットを、以下に示す。

20

クラスター形成 HIV 捕獲プローブ

- HIV.116 (配列番号 :14)
TCTCCAYTTRGTRCTGTCYTTTTTCTTTATRGC
- HIV.117 (配列番号 :15)
TYTYYTATTAAGYTCYCTGAAATCTACTARTTT
- HIV.118 (配列番号 :47)
TATTCCTAAYTGRACCTCCCARAARTCYTGAGT
- HIV.119 (配列番号 :48) 10
ACWYTGGAATATYGCYGGTGATCCTTTCCAYCC
- HIV.120 (配列番号 :16)
TKTTYTAAARGGYTCYAAGATTTTTGTCATRCT
- HIV.155 (配列番号 :41)
TAAAATTGTGRATRAAYACTGCCATTTGTACWG
- HIV.156 (配列番号 :42)
CTGCACTGTAYCCCCCAATCCCCCYTYTTCTTT 20
- HIV.157 (配列番号 :43)
TGTCGTWGCTATYATRYCTAYTATTCTYTCCC
- HIV.158 (配列番号 :44)
TTRTRATTTGYTTTTGTARTTCTYTARTTTGTA
- HIV.159 (配列番号 :54)
TGTCYCTGTAATAAACCCGAAAATTTTGAATTT

クラスター形成 HIV 増幅プローブ

- HIV.103 (配列番号 :45)
CATCTGCTCCTGTRTCTAATAGAGCTTCYTTTA
- HIV.104 (配列番号 :5)
TTCCTGGCAAAYYYATKTCTYCTAMTACTGTAT

10

20

30

- HIV.105 (配列番号 :6)
CTCCAATTCCYCCTATCATTMTTGGYTTCCATY
- HIV.106 (配列番号 :7)
KTATYTGATCRTAYTGTCYYACTTTGATAAAAC
- HIV.108 (配列番号 :8)
GTTGACAGGYGTAGGTCCTACYAATAYTGTACC
- HIV.110 (配列番号 :9)
YTCAATAGGRCTAATKGGRAAATTTAAAGTRCA
- HIV.111 (配列番号 :46)
ATCCATYCCTGGCTTTAATTTTACTGGTACAGT
- HIV.112 (配列番号 :10)
YTCTGTCAATGGCCATTGYTTRACYTTGGGCC
- HIV.113 (配列番号 :11)
TKTACAWATYTC TRYTAATGCTTTTATTTTYTC
- HIV.114 (配列番号 :12)
AAYTYTTGAAATYTTYCCTTCCTTTTCCATHTC
- HIV.115 (配列番号 :13)
AAATAYKGGAGTATTRTATGGATTYTCAGGCC
- HIV.121 (配列番号 :17)
CATGTATTGATADATRAYYATKTCTGGATTTTG
- HIV.122 (配列番号 :18)
TATYTCTAARTCAGAYCCTACATACAAATCATC
- HIV.123 (配列番号 :19)
TCTYARYTCCTCTATTTTGYTCTATGCTGYTC
- HIV.125 (配列番号 :20)
AAGRAATGGRGGTTCTTTCTGATGYTTYTTRTC
- HIV.126 (配列番号 :49)
CCATTTTRTCAGGRTGGAGTTCATAMCCCATCCA
- HIV.127 (配列番号 :50)
CTAYTATGGGKTCYKTYTCTAACTGGTACCAYA
- HIV.128 (配列番号 :21)
TRGCTGCYCCATCTACATAGAAVGTTCCTGCWC

10

20

30

40

- HIV.130 (配列番号 :22)
GACAACYTTYTGTCCTTCCAYTGTYAGTWASATA
- HIV.132 (配列番号 :23)
YGAATCCTGYAAVGCTARRTDAATTGCTTGTA
- HIV.133 (配列番号 :24)
YTGTGARTCTGTACTATRTTTACTTCTRRTCC
- HIV.134 (配列番号 :51)
ATCTGGTTGTGCTTGAATRATYCCYARTGCATA
- HIV.135 (配列番号 :25)
TATTATTTGAYTRACWAWCTCTGATTCACCTYTK
- HIV.136 (配列番号 :26)
CAGRTARACYTTTTCTTTTTTTATTARYTGYTC
- HIV.137 (配列番号 :27)
TCCTCCAATYCCTTTRTGTGCTGGTACCCATGM
- HIV.138 (配列番号 :28)
TCCHBBACTGACTAATYTATCTACTTGTTTCATT
- HIV.139 (配列番号 :29)
ATCTATTCCATYYAAAAATAGYAYTTYCTGAT
- HIV.141 (配列番号 :30)
GTGGYAGRTTAAARTCAYTAGCCATTGCTYTCC
- HIV.142 (配列番号 :31)
CACAGCTRGCTACTATTTTCYTTYGCTACYAYRG
- HIV.143 (配列番号 :52)
CATGCATGGCTTCYCCTTTTAGYTGRCATTTAT
- HIV.144 (配列番号 :32)
RYTGCCATATYCKGGRCTACARTCTACTTGTC

10

20

30

- HIV.145 (配列番号 :33)
 DGATWAYTTTTTCCTTCYARATGTGTACAATCTA
- HIV.146 (配列番号 :34)
 CTATRTAKCCACTRGCYACATGRACCTGCTACYA
- HIV.147 (配列番号 :35)
 CYTGYCCTGTYTCTGCTGGRATDACTTCTGCTT
- HIV.149 (配列番号 :36)
 TGSKGCCATTGTCTGTATGTAYTRYTKTTACTG
- HIV.150 (配列番号 :53)
 AACAGGCDGICYTTAACYGYAGYACTGGTGAAT
- HIV.151 (配列番号 :37)
 GAATKCCAAATTCCTGYTTRATHCCHGCCACC
- HIV.152 (配列番号 :38)
 ATTCYAYTACYCCTTGACTTTGGGGRTTGTAGG
- HIV.153 (配列番号 :39)
 GBCCTATRATTTKCTTTAATTCHTTATTCATAG
- HIV.154 (配列番号 :40)
 CTSTCTTAAGRTGYTCAGCYTGMTCTCTTACYT

10

20

30 μ l の分析物 / プローブ / プロテイナーゼ K 溶液を各ウェルに加えた後、10 μ l の正常ヒト血清を加え、実施例 3 に記載のようにアッセイを行った。表 III に示すように、分散捕獲配置に対するクラスター形成捕獲配置を用いるアッセイの感度は、類似していた。クラスター形成捕獲伸長物を用いると、感度は 50 ~ 100 fmol であるが、分散捕獲伸長物を用いると、感度は 100 ~ 500 fmol であった。

表 3

プローブ配置	分析物 μmol	デルタ	
クラスター形成型	0	---	
	25	-0.16	
	50	0.36	10
	100	0.65	
	500	4.45	
	1000	6.24	
分散型	0	---	
	25	-0.24	
	50	0.25	
	100	-0.11	20
	500	2.52	
	1000	4.79	

上記の本発明を実施するための態様について、生化学、核酸ハイブリダイゼーションアッセイ、および関連分野における当業者に明らかな変化は、以下の請求の範囲の範囲内に含まれることが意図される。

配列表

(1) 一般的情報:

(i) 出願人: アーヴィン, ブルース ディー.

ホーン, トーマス

チャン, チュー - アン

(ii) 発明の名称: 溶液相サンドイッチハイブリダイゼーションアッセイに用いるための HIV プローブ

(iii) 配列数: 63

(iv) 連絡住所:

(A) 住所人: モリソン アンド フォースター

(B) 番地: ページ ミル ロード 755

(C) 市: パロ アルト

(D) 州: カリフォルニア

(E) 国: アメリカ合衆国

(F) 郵便番号: 94304-1018

(V) コンピューター読み出し形態:

(A) 媒体型: フロッピーディスク

(B) コンピューター: IBM PC 互換用

(C) 操作システム: PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア: パテントインリリース #1.0、バージョン #1.25

(vi) 現在の出願データ:

(A) 出願番号: 07/813,583

30

40

50

(B)出願日：1991年12月23日

(C)分類：

(viii)代理人/事務所情報：

(A)氏名：トーマス イー.シオッティ

(B)登録番号：21,013

(C)照会/記録番号：22300-20150

(ix)電話回線情報：

(A)電話：415-813-5600

(B)テレファックス：415-494-0792

(C)テレックス：706141

10

(2)配列番号:1の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：24塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号:1：

CGTGGAGACA CCGGTCCTAT GCCT

24

(2)配列番号:2の情報：

(i)配列の特色：

20

(A)長さ：60塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号:2：

GATGTGGTTG TCGTACTTGA TGTGGTTGTC GTACTTGATG TGGTGTTCGT ACTTGCGTAG

60

(2)配列番号:3の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：16塩基対

(B)型：核酸

30

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号:3：

TCCACGAAAA AAAAAA

16

(2)配列番号:4の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：12塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

40

(xi)配列：配列番号:4：

CAGTCACTAC GC

12

(2)配列番号:5の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：33塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号:5：

TTCTGGCAA AYYYATKTCT YCTAMTACTG TAT

33

50

(2) 配列番号:6の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 長さ: 33塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号:6:

CTCCAATGCC YCCTATCATT TTTGGYTTCC ATY

33

(2) 配列番号:7の情報:

10

(i) 配列の特色:

(A) 長さ: 33塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号:7:

KTATYTGATC RTAYTGTCYY ACTTTGATAA AAC

33

(2) 配列番号:8の情報:

20

(i) 配列の特色:

(A) 長さ: 33塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号:8:

GTTGACAGGY GTAGGTCCTA CYAATAYTGT ACC

33

(2) 配列番号:9の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 長さ: 33塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号:9:

YTCAATAGGR CTAATKGGRA AATTTAAAGT RCA

33

(2) 配列番号:10の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 長さ: 33塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号:10:

YTCTGTCAAT GGCCATIGYT TRACYTTGG GCC

33

(2) 配列番号:11の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 長さ: 33塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

50

- (xi)配列：配列番号:11：
TKTACAWATY TCTRYTAATG CTTTTATTTT YTC 33
- (2)配列番号:12の情報：
 (i)配列の特色：
 (A)長さ：33塩基対
 (B)型：核酸
 (C)鎖の数：一本鎖
 (D)トポロジー：直鎖状
- (xi)配列：配列番号:12：
AAATYTTGAA ATYTTYCCTT CCTTTTCCAT HTC 33 10
- (2)配列番号:13の情報：
 (i)配列の特色：
 (A)長さ：33塩基対
 (B)型：核酸
 (C)鎖の数：一本鎖
 (D)トポロジー：直鎖状
- (xi)配列：配列番号:13：
AAATAYKGG A GTATTRTATG GATTYTCAGG CCC 33
- (2)配列番号:14の情報：
 (i)配列の特色：
 (A)長さ：33塩基対
 (B)型：核酸
 (C)鎖の数：一本鎖
 (D)トポロジー：直鎖状
- (xi)配列：配列番号:14：
TCTCCAYTTR GTRCTGTCYT TTTTCTTTAT RGC 33
- (2)配列番号:15の情報：
 (i)配列の特色：
 (A)長さ：33塩基対
 (B)型：核酸
 (C)鎖の数：一本鎖
 (D)トポロジー：直鎖状
- (xi)配列：配列番号:15：
TYTYTATTA AGYTCYCTGA AATCTACTAR TTT 33 30
- (2)配列番号:16の情報：
 (i)配列の特色：
 (A)長さ：33塩基対
 (B)型：核酸
 (C)鎖の数：一本鎖
 (D)トポロジー：直鎖状
- (xi)配列：配列番号:16：
TKTTYTAAAR GGYTCYAAGA TTTTGTGCAT RCT 33 40
- (2)配列番号:17の情報：
 (i)配列の特色：
 (A)長さ：33塩基対
 (B)型：核酸
 (C)鎖の数：一本鎖
 (D)トポロジー：直鎖状
- (xi)配列：配列番号:17：
CATGTATTGA TADATRAYYA TKTCTGGATT TTG 33 50

(2) 配列番号:18の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 長さ: 33塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号:18:

TATYTC~~TAAR~~ TCAGAYCCTA CATA~~CA~~AATC ATC

33

(2) 配列番号:19の情報:

10

(i) 配列の特色:

(A) 長さ: 33塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号:19:

TCTYARYTCC TCTAT~~TTTT~~IG YTCTATGCTG YYC

33

(2) 配列番号:20の情報:

(i) 配列の特色:

20

(A) 長さ: 33塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号:20:

AAGRAATGGR GGTTC~~TTT~~CT GATGY~~TTTT~~TT RTC

33

(2) 配列番号:21の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 長さ: 33塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

30

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号:21:

TRGCTG~~CYCC~~ ATCTACATAG AAVG~~TTTT~~CTG CWC

33

(2) 配列番号:22の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 長さ: 33塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号:22:

GACAAC~~YTTY~~ TGTC~~TTCC~~AY TGT~~YAG~~TWAS ATA

33

40

(2) 配列番号:23の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 長さ: 33塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号:23:

YGAATC~~CTGY~~ AAVG~~CTARR~~T DAAT~~TGCT~~TTG TAA

33

(2) 配列番号:24の情報:

50

(i)配列の特色：

(A)長さ：33塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号:24：

YTGAGARTCT GYACTATRT TTACTTCTRR TCC

33

(2)配列番号:25の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：33塩基対

10

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：SEQ ID NO:25：

TATTATTGA YTRACWAWCT CTGATTCACT YTK

33

(2)配列番号:26の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：33塩基対

20

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号:26：

CAGRTARACY TTTTCCTTTT TTATTARYTG YTC

33

(2)配列番号:27の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：33塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

30

(xi)配列：配列番号:27：

TCCTCCAATY CCTTTRIGTG CTGGTACCCA TGM

33

(2)配列番号:28の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：33塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号:28：

TCCHBACTG ACTAATYTAT CTACTTGTTT ATT

33

40

(2)配列番号:29の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：33塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号:29：

ATCTATTCCA TTYAAAAATA GYAYTTYCT GAT

33

(2)配列番号:30の情報：

50

(i)配列の特色：

(A)長さ：33塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号:30：

GTGGYAGRIT AAARTCAYTA GCCATTGCTY TCC

33

(2)配列番号:31の情報：

(i)配列の特色：

10

(A)長さ：33塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号:31：

CACAGCTRGC TACTATTTCTY TTYGCTACYA YRG

33

(2)配列番号:32の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：33塩基対

(B)型：核酸

20

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号:32：

RYTGCCATAT YCCKGGRCTA CARTCTACTT GTC

33

(2)配列番号:33の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：33塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

30

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号:33：

DGATWAYTTT TCCTTCYARA TGTGTACAAT CTA

33

(2)配列番号:34の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：33塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号:34：

CTATRTAKCC ACTRGCYACA TGRACTGCTA CYA

33

40

(2)配列番号:35の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：33塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号:35：

CYTGCCIGT YTCGCTGGR ATDACTTCTG CTT

33

(2)配列番号:36の情報：

50

(i)配列の特色：

(A)長さ：33塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号:36：

TGSKGCCATT GTCGTATGT AYTRYTKTTA CTG 33

(2)配列番号:37の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：33塩基対

10

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号:37：

GAATKCCAAA TCCTGYTTR ATHCCHGCCC ACC 33

(2)配列番号:38の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：33塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

20

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号:38：

ATTCTAYTAC YCCTGACTT TGGGGRTTGT AGG 33

(2)配列番号:39の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：33塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号:39：

GBCCTATRAT TTKCTTAAAT TCHTTATTCA TAG 30

33

(2)配列番号:40の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：33塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号:40：

CTSTCTTAAG RTGYTCAGCY TGMTCTCTTA CYT 33 40

33

(2)配列番号:41の情報：

(i)配列の特色：

(A)長さ：33塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号:41：

TAAAATTGTG RATRAAYACT GCCATTTGTA CWG 33

33

(2)配列番号:42の情報：

(i)配列の特色：

50

- (A)長さ：33塩基対
 (B)型：核酸
 (C)鎖の数：一本鎖
 (D)トポロジー：直鎖状
 (xi)配列：配列番号:42：
CTGCACTGTA YCCCCAATC CCCCYYTTC TTT 33
- (2)配列番号:43の情報：
 (i)配列の特色：
 (A)長さ：33塩基対
 (B)型：核酸 10
 (C)鎖の数：一本鎖
 (D)トポロジー：直鎖状
 (xi)配列：配列番号:43：
TGTCGTWGC TATYATRYCT AYTATTCTYT CCC 33
- (2)配列番号:44の情報：
 (i)配列の特色：
 (A)長さ：33塩基対
 (B)型：核酸
 (C)鎖の数：一本鎖
 (D)トポロジー：直鎖状 20
 (xi)配列：配列番号:44：
TTRTRATTG YTTTTGART TCTYARTTT GTA 33
- (2)配列番号:45の情報：
 (i)配列の特色：
 (A)長さ：33塩基対
 (B)型：核酸
 (C)鎖の数：一本鎖
 (D)トポロジー：直鎖状
 (xi)配列：配列番号:45：
CATCTGCTCC TGTCTTAAT AGAGCTTCYT TTA 33 30
- (2)配列番号:46の情報：
 (i)配列の特色：
 (A)長さ：33塩基対
 (B)型：核酸
 (C)鎖の数：一本鎖
 (D)トポロジー：直鎖状
 (xi)配列：配列番号:46：
ATCCATYCCT GGCTTTAATT TTACTGGTAC AGT 33
- (2)配列番号:47の情報：
 (i)配列の特色： 40
 (A)長さ：33塩基対
 (B)型：核酸
 (C)鎖の数：一本鎖
 (D)トポロジー：直鎖状
 (xi)配列：配列番号:47：
TATTCCTAAY TGRACITCCC ARAARTCYTG AGT 33
- (2)配列番号:48の情報：
 (i)配列の特色：
 (A)長さ：33塩基対
 (B)型：核酸 50

- (C)鎖の数：一本鎖
 (D)トポロジー：直鎖状
 (xi)配列：配列番号:48：
ACWYTGGAAT ATYGCYGGTG ATCCTTTCCA YCC 33
- (2)配列番号:49の情報：
 (i)配列の特色：
 (A)長さ：33塩基対
 (B)型：核酸
 (C)鎖の数：一本鎖
 (D)トポロジー：直鎖状 10
 (xi)配列：配列番号:49：
CCATTTTCA GGRTGGAGTT CATAMCCCAT CCA 33
- (2)配列番号:50の情報：
 (i)配列の特色：
 (A)長さ：33塩基対
 (B)型：核酸
 (C)鎖の数：一本鎖
 (D)トポロジー：直鎖状
 (xi)配列：配列番号:50：
CTATTATGGG KTCYKTYTCT AACTGGTACC AYA 33 20
- (2)配列番号:51の情報：
 (i)配列の特色：
 (A)長さ：33塩基対
 (B)型：核酸
 (C)鎖の数：一本鎖
 (D)トポロジー：直鎖状
 (xi)配列：配列番号:51：
ATCTGGTTGT GCTTGAATRA TYCCYARTGC ATA 33
- (2)配列番号:52の情報：
 (i)配列の特色：
 (A)長さ：33塩基対
 (B)型：核酸
 (C)鎖の数：一本鎖
 (D)トポロジー：直鎖状
 (xi)配列：配列番号:52：
CATGCATGGC TTCYCCTTTT AGYTGRCATT TAT 33 30
- (2)配列番号:53の情報：
 (i)配列の特色：
 (A)長さ：33塩基対
 (B)型：核酸
 (C)鎖の数：一本鎖
 (D)トポロジー：直鎖状 40
 (xi)配列：配列番号:53：
AACAGGCDGC YTTAACYGYA GYACTGGTGA AAT 33
- (2)配列番号:54の情報：
 (i)配列の特色：
 (A)長さ：33塩基対
 (B)型：核酸
 (C)鎖の数：一本鎖
 (D)トポロジー：直鎖状 50

(xi)配列：配列番号:54： TGTCYCTGTA ATAAACCCGA AAATTTTGAA TTT	33	
(2)配列番号:55の情報： (i)配列の特色： (A)長さ：20塩基対 (B)型：核酸 (C)鎖の数：一本鎖 (D)トポロジー：直鎖状		
(xi)配列：配列番号:55： AGGCATAGGA CCCGTGCTT	20	10
(2)配列番号:56の情報： (i)配列の特色： (A)長さ：20塩基対 (B)型：核酸 (C)鎖の数：一本鎖 (D)トポロジー：直鎖状		
(xi)配列：配列番号:56： CTTCTTTGGA GAAAGTGGT	20	
(2)配列番号:57の情報： (i)配列の特色： (A)長さ：29塩基対 (B)型：核酸 (C)鎖の数：一本鎖 (D)トポロジー：直鎖状		20
(xi)配列：配列番号:57： TATAGCTTTH TDTCCRCAGA TTTCTAYRR	29	
(2)配列番号:58の情報： (i)配列の特色： (A)長さ：33塩基対 (B)型：核酸 (C)鎖の数：一本鎖 (D)トポロジー：直鎖状		30
(xi)配列：配列番号:58： VCCAATCTGR GTCAACADAT TTCKTCCRAT TAT	33	
(2)配列番号:59の情報： (i)配列の特色： (A)長さ：33塩基対 (B)型：核酸 (C)鎖の数：一本鎖 (D)トポロジー：直鎖状		40
(xi)配列：配列番号:59： TGGTGTGGTA ARYCCCCACY TYAAYAGATG YYS	33	
(2)配列番号:60の情報： (i)配列の特色： (A)長さ：29塩基対 (B)型：核酸 (C)鎖の数：一本鎖 (D)トポロジー：直鎖状		
(xi)配列：配列番号:60： TCCTGCTTTT CCYWDTYTAG TYTCYCTRY	29	50

(2) 配列番号:61の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 長さ: 33塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号:61:

YTCAGTYTTC TGATTGTG YG TDTBHKTNAD RGD 33

(2) 配列番号:62の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 長さ: 37塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号:62:

AATTRYTGTG ATATTTTCA TGDTCCTT GRGCCTT 37

(2) 配列番号:63の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 長さ: 39塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号:63:

GCCATCTKCC TGCTAATTTT ARDAKRAART ATGCTGTYT 39

15X Combを合成するために用いた全てのサイクル、手順、および配列のリスト
380B DNA合成機用3・1/2"フロッピーディスクに収容されている

10

20

5'- 66T 6TT T66 TT6 TT6 TT6 TT6 TT6 TT6 TT6 TT6 TT6

TT6 TT6 TT6 TT6 TT6 TTT TTT TTT TTT TTT TT -3'

10

DNA 配列
バージョン 2.00

配列名 : 15X-2
配列の長さ : 10
日 : 199 8月 27日
時間 : 14:06
コメント :

20

5'- 77T 6AC T65 T -3'

ファイル名	最終アクセス	作成日	ファイル名	最終アクセス	作成日
ファイルのタイプ : 合成サイクル					
6.4XSC-5	08 27, 1991	08 27, 1991	6.4XS-5	08 27, 1991	08 27, 1991
1.2XD-6	08 27, 1991	08 27, 1991	1.2X-6	08 27, 1991	08 27, 1991
ssceaf3	01 07, 1990	01 07, 1990	ceaf3	01 07, 1990	01 07, 1990
10ceaf3	01 07, 1990	01 07, 1990	hpaf3	01 07, 1990	01 07, 1990
10hpaf3	01 07, 1990	01 07, 1990	rnaef3	01 07, 1990	01 07, 1990
10rnaef3	01 07, 1990	01 07, 1990	ssceaf3	01 07, 1990	01 07, 1990
cef3	01 07, 1990	01 07, 1990	10cef3	01 07, 1990	01 07, 1990
10hpaf3	01 07, 1990	01 07, 1990	rnaf3	01 07, 1990	01 07, 1990
10rnaef3	01 07, 1990	01 07, 1990	ssceaf1	01 07, 1990	01 07, 1990
ceaf1	01 07, 1990	01 07, 1990	10ceaf1	01 07, 1990	01 07, 1990
hpaf1	01 07, 1990	01 07, 1990	10hpaf1	01 07, 1990	01 07, 1990
rnaef1	01 07, 1990	01 07, 1990	10rnaef1	01 07, 1990	01 07, 1990
ssceaf1	01 07, 1990	01 07, 1990	cef1	01 07, 1990	01 07, 1990
10cef1	01 07, 1990	01 07, 1990	10hpaf1	01 07, 1990	01 07, 1990
rnaf1	01 07, 1990	01 07, 1990	10rnaef1	01 07, 1990	01 07, 1990

ファイルのタイプ : ボトル交換手順

bc 18	07 01, 1986	07 01, 1986	bc 17	07 01, 1986	07 01, 1986
bc 16	07 01, 1986	07 01, 1986	bc 15	07 01, 1986	07 01, 1986
bc 14	07 01, 1986	07 01, 1986	bc 13	07 01, 1986	07 01, 1986
bc 12	07 01, 1986	07 01, 1986	bc 11	07 01, 1986	07 01, 1986
bc 10	07 01, 1986	07 01, 1986	bc 9	07 01, 1986	07 01, 1986
bc 8a	07 01, 1986	07 01, 1986	bc 7	07 01, 1986	07 01, 1986
bc 6	07 01, 1986	07 01, 1986	bc 5	07 01, 1986	07 01, 1986
bc 4	07 01, 1986	07 01, 1986	bc 3	07 01, 1986	07 01, 1986
bc 2	07 01, 1986	07 01, 1986	bc 1	07 01, 1986	07 01, 1986

ファイルのタイプ : 終了 手順

CAP-PRIM	08 27, 1991	08 27, 1991	CE NH3	08 27, 1991	08 27, 1991
deprce	10 08, 1990	10 08, 1990	deprce10	10 08, 1990	10 08, 1990
deprhp	10 08, 1990	10 08, 1990	deprhp10	10 08, 1990	10 08, 1990
deprna	10 08, 1990	10 08, 1990	deprna10	10 08, 1990	10 08, 1990

ファイルのタイプ : 開始 手順

STD PREP	08 27, 1991	08 27, 1991	phos003	07 01, 1986	07 01, 1986
----------	-------------	-------------	---------	-------------	-------------

ファイルのタイプ : 閉鎖 手順

clean003	07 01, 1986	07 01, 1986
----------	-------------	-------------

ファイルのタイプ : DNA 配列

15X-2	08 27, 1991	08 27, 1991	15X-1	08 27, 1991	08 27, 1991
-------	-------------	-------------	-------	-------------	-------------

10

20

30

ステップ 番号	関数		ステップ 時間	塩基に対して活性なステップ							安全な ステップ	
	#	名前		A	G	C	T	5	6	7		
1	10	#18 To Waste	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
2	9	#18 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
3	2	Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
4	1	Block Flush	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
5	5	Advance FC	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
6	29	Phos Prep	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
7	+45	Group 1 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
8	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
9	19	B+TET To Col 1	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
10	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
11	-45	Group 1 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
12	+47	Group 2 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
13	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
14	20	B+TET To Col 2	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
15	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
16	-48	Group 2 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
17	+49	Group 3 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
18	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
19	21	B+TET To Col 3	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
20	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
21	-50	Group 3 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
22	4	Wait	15	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
23	+45	Group 1 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
24	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
25	19	B+TET To Col 1	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
26	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
27	-46	Group 1 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
28	+47	Group 2 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
29	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
30	20	B+TET To Col 2	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
31	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
32	-48	Group 2 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
33	+49	Group 3 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
34	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
35	21	B+TET To Col 3	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
36	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
37	-50	Group 3 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
38	4	Wait	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
39	+45	Group 1 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
40	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
41	19	B+TET To Col 1	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
42	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
43	-46	Group 1 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes

10

20

30

ステップ 番号	関数		ステップ 時間	塩基に対して活性なステップ							安全な ステップ	
	#	名前		A	G	C	T	5	6	7		
44	+47	Group 2 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
45	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
46	20	B+TET To Col 2	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
47	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
48	-48	Group 2 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
49	+49	Group 3 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
50	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
51	21	B+TET To Col 3	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
52	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
53	-50	Group 3 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
54	4	Wait	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
55	+45	Group 1 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
56	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
57	19	B+TET To Col 1	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
58	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
59	-46	Group 1 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
60	+47	Group 2 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
61	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
62	20	B+TET To Col 2	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
63	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
64	-48	Group 2 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
65	+49	Group 3 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
66	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
67	21	B+TET To Col 3	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
68	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
69	-50	Group 3 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
70	4	Wait	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
71	+45	Group 1 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
72	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
73	19	B+TET To Col 1	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
74	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
75	-46	Group 1 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
76	+47	Group 2 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
77	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
78	20	B+TET To Col 2	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
79	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
80	-48	Group 2 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
81	+49	Group 3 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
82	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
83	21	B+TET To Col 3	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
84	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
85	-50	Group 3 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
86	4	Wait	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
87	+45	Group 1 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
88	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes

10

20

30

ステップ 番号	関数		ステップ 時間	塩基に対して活性なステップ							安全な ステップ	
	#	名前		A	G	C	T	S	B	7		
89	19	B+TET To Col 1	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
90	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
91	-46	Group 1 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
92	+47	Group 2 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
93	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
94	20	B+TET To Col 2	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
95	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
96	-48	Group 2 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
97	+49	Group 3 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
98	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
99	21	B+TET To Col 3	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
100	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
101	-50	Group 3 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
102	4	Wait	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
103	+45	Group 1 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
104	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
105	19	B+TET To Col 1	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
106	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
107	-46	Group 1 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
108	+47	Group 2 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
109	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
110	20	B+TET To Col 2	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
111	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
112	-48	Group 2 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
113	+49	Group 3 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
114	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
115	21	B+TET To Col 3	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
116	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
117	-50	Group 3 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
118	4	Wait	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
119	+45	Group 1 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
120	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
121	19	B+TET To Col 1	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
122	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
123	-46	Group 1 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
124	+47	Group 2 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
125	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
126	20	B+TET To Col 2	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
127	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
128	-48	Group 2 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
129	+49	Group 3 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
130	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
131	21	B+TET To Col 3	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
132	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
133	-50	Group 3 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes

10

20

30

ステップ 番号	関数		ステップ 時間	塩基に対して活性なステップ							安全な ステップ	
	#	名前		A	G	C	T	S	6	7		
134	4	Wait	-30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
135	10	#18 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
136	2	Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
137	1	Block Flush	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
138	81	#15 To Waste	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
139	13	#15 To Column	22	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
140	10	#18 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
141	4	Wait	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
142	2	Reverse Flush	6	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
143	1	Block Flush	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
144	9	#18 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
145	34	Flush to Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
146	9	#18 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
147	2	Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
148	9	#18 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
149	2	Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
150	9	#18 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
151	2	Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
152	1	Block Flush	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
153	33	Cycle Entry	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
154	6	Waste-Port	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
155	37	Relay 3 Pulse	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
156	82	#14 To Waste	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
157	30	#17 To Waste	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
158	10	#18 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
159	9	#18 To Column	20	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
160	11	#17 To Column	60	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
161	14	#14 To Column	20	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
162	2	Reverse Flush	7	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
163	11	#17 To Column	15	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
164	34	Flush to Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
165	11	#17 To Column	15	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
166	2	Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
167	14	#14 To Column	20	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
168	34	Flush to Waste	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
169	7	Waste-Bottle	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
170	9	#18 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
171	2	Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
172	9	#18 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
173	2	Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
174	9	#18 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
175	2	Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
176	1	Block Flush	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes

10

20

30

ステップ 番号	関数		ステップ 時間	塩基に対して活性なステップ							安全な ステップ	
	#	名前		A	G	C	T	5	6	7		
1	10	\$18 To Waste	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
2	9	\$18 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
3	2	Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
4	1	Block Flush	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
5	5	Advance FC	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
6	28	Phos Prep	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
7	+45	Group 1 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
8	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
9	19	B+TET To Col 1	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
10	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
11	-46	Group 1 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
12	+47	Group 2 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
13	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
14	20	B+TET To Col 2	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
15	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
16	-48	Group 2 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
17	+49	Group 3 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
18	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
19	21	B+TET To Col 3	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
20	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
21	-50	Group 3 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
22	4	Wait	15	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
23	+45	Group 1 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
24	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
25	19	B+TET To Col 1	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
25	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
27	-46	Group 1 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
28	+47	Group 2 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
29	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
30	20	B+TET To Col 2	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
31	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
32	-48	Group 2 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
33	+49	Group 3 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
34	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
35	21	B+TET To Col 3	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
36	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
37	-50	Group 3 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
38	4	Wait	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
39	+45	Group 1 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
40	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
41	19	B+TET To Col 1	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
42	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
43	-46	Group 1 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes

10

20

30

ステップ 番号	関数		ステップ 時間	塩基に対して活性なステップ							安全な ステップ	
	#	名前		A	G	C	T	S	6	7		
44	+47	Group 2 On	- 1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
45	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
46	20	B+TET To Col 2	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
47	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
48	-48	Group 2 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
49	+49	Group 3 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
50	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
51	21	B+TET To Col 3	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
52	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
53	-50	Group 3 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
54	4	Wait	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
55	+45	Group 1 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
56	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
57	19	B+TET To Col 1	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
58	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
59	-46	Group 1 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
60	+47	Group 2 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
61	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
62	20	B+TET To Col 2	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
63	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
64	-48	Group 2 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
65	+49	Group 3 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
66	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
67	21	B+TET To Col 3	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
68	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
69	-50	Group 3 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
70	4	Wait	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
71	+45	Group 1 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
72	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
73	19	B+TET To Col 1	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
74	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
75	-46	Group 1 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
76	+47	Group 2 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
77	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
78	20	B+TET To Col 2	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
79	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
80	-48	Group 2 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
81	+49	Group 3 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
82	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
83	21	B+TET To Col 3	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
84	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
85	-50	Group 3 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
86	4	Wait	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
87	+45	Group 1 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
88	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes

10

20

30

ステップ 番号	関数		ステップ 時間	塩基に対して活性なステップ							安全な ステップ	
	#	名前		A	G	C	T	S	6	7		
89	19	B+TET To Col 1	- 8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
90	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
91	-46	Group 1 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
92	+47	Group 2 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
93	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
94	20	B+TET To Col 2	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
95	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
96	-48	Group 2 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
97	+49	Group 3 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
98	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
99	21	B+TET To Col 3	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
100	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
101	-50	Group 3 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
102	4	Wait	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
103	+45	Group 1 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
104	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
105	19	B+TET To Col 1	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
106	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
107	-46	Group 1 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
108	+47	Group 2 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
109	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
110	20	B+TET To Col 2	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
111	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
112	-48	Group 2 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
113	+49	Group 3 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
114	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
115	21	B+TET To Col 3	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
116	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
117	-50	Group 3 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
118	4	Wait	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
119	+45	Group 1 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
120	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
121	19	B+TET To Col 1	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
122	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
123	-46	Group 1 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
124	+47	Group 2 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
125	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
126	20	B+TET To Col 2	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
127	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
128	-48	Group 2 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
129	+49	Group 3 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
130	90	TET To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
131	21	B+TET To Col 3	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
132	90	TET To Column	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
133	-50	Group 3 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes

10

20

30

ステップ 番号	関数		ステップ 時間	塩基に対して活性なステップ							安全な ステップ	
	#	名前		A	G	C	T	S	B	7		
1	10	#18 To Waste	2	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
2	9	#18 To Column	9	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
3	2	Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
4	1	Block Flush	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
5	5	Advance FC	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
6	28	Phos Prep	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
7	+45	Group 1 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
8	90	TET To Column	6	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
9	19	B+TET To Col 1	6	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
10	90	TET To Column	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
11	19	B+TET To Col 1	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
12	90	TET To Column	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
13	19	B+TET To Col 1	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
14	9	#18 To Column	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
15	-46	Group 1 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
16	+47	Group 2 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
17	10	#18 To Waste	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
18	1	Block Flush	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
19	90	TET To Column	6	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
20	20	B+TET To Col 2	6	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
21	90	TET To Column	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
22	20	B+TET To Col 2	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
23	90	TET To Column	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
24	20	B+TET To Col 2	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
25	9	#18 To Column	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
26	-48	Group 2 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
27	+49	Group 3 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
28	10	#18 To Waste	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
29	1	Block Flush	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
30	90	TET To Column	6	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
31	21	B+TET To Col 3	6	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
32	90	TET To Column	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
33	21	B+TET To Col 3	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
34	90	TET To Column	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
35	21	B+TET To Col 3	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
36	9	#18 To Column	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
37	-50	Group 3 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
38	4	Wait	20	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
39	2	Reverse Flush	5						Yes			Yes
40	10	#18 To Waste	2						Yes			Yes
41	9	#18 To Column	9						Yes			Yes
42	2	Reverse Flush	5						Yes			Yes
43	10	#18 To Waste	3						Yes			Yes

10

20

30

ステップ 番号	関数		ステップ 時間	塩基に対して活性なステップ							安全な ステップ
	#	名前		A	G	C	T	S	G	7	
44	1	Block Flush	- 3							Yes	Yes
45	+45	Group 1 On	1							Yes	Yes
46	90	TET To Column	6							Yes	Yes
47	19	B+TET To Col 1	6							Yes	Yes
48	90	TET To Column	3							Yes	Yes
49	19	B+TET To Col 1	3							Yes	Yes
50	90	TET To Column	3							Yes	Yes
51	19	B+TET To Col 1	3							Yes	Yes
52	9	#18 To Column	1							Yes	Yes
53	-46	Group 1 Off	1							Yes	Yes
54	+47	Group 2 On	1							Yes	Yes
55	10	#18 To Waste	4							Yes	Yes
56	1	Block Flush	3							Yes	Yes
57	90	TET To Column	6							Yes	Yes
58	20	B+TET To Col 2	6							Yes	Yes
59	90	TET To Column	3							Yes	Yes
60	20	B+TET To Col 2	3							Yes	Yes
61	90	TET To Column	3							Yes	Yes
62	20	B+TET To Col 2	3							Yes	Yes
63	9	#18 To Column	1							Yes	Yes
64	-48	Group 2 Off	1							Yes	Yes
65	+49	Group 3 On	1							Yes	Yes
66	10	#18 To Waste	4							Yes	Yes
67	1	Block Flush	3							Yes	Yes
68	90	TET To Column	6							Yes	Yes
69	21	B+TET To Col 3	6							Yes	Yes
70	90	TET To Column	3							Yes	Yes
71	21	B+TET To Col 3	3							Yes	Yes
72	90	TET To Column	3							Yes	Yes
73	21	B+TET To Col 3	3							Yes	Yes
74	9	#18 To Column	1							Yes	Yes
75	-50	Group 3 Off	1							Yes	Yes
76	4	Wait	20							Yes	Yes
77	16	Cap Prep	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
78	2	Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
79	1	Block Flush	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
80	91	Cap To Column	12	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
81	10	#18 To Waste	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
82	4	Wait	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
83	2	Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
84	81	#15 To Waste	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
85	13	#15 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
86	10	#18 To Waste	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
87	4	Wait	15	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
88	2	Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes

10

20

30

ステップ 番号	関数		ステップ 時間	塩基に対して活性なステップ							安全な ステップ	
	#	名前		A	G	C	T	S	B	7		
89	9	#18 To Column	9	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
90	34	Flush to Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
91	9	#18 To Column	9	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
92	2	Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
93	9	#18 To Column	9	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
94	2	Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
95	1	Block Flush	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
96	33	Cycle Entry	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
97	9	#18 To Column	9	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
98	2	Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
99	6	Waste-Port	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
100	30	#17 To Waste	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
101	11	#17 To Column	7	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
102	34	Flush to Waste	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
103	11	#17 To Column	7	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
104	34	Flush to Waste	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
105	11	#17 To Column	7	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
106	34	Flush to Waste	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
107	11	#17 To Column	7	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
108	34	Flush to Waste	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
109	11	#17 To Column	7	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
110	34	Flush to Waste	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
111	11	#17 To Column	7	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
112	34	Flush to Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
113	9	#18 To Column	9	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
114	34	Flush to Waste	7	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
115	7	Waste-Bottle	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
116	9	#18 To Column	9	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
117	2	Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
118	9	#18 To Column	9	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
119	2	Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
120	1	Block Flush	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes

10

20

ステップ 番号	関数		ステップ 時間	塩基に対して活性なステップ							安全な ステップ	
	#	名前		A	G	C	T	S	B	7		
44	4	Wait	- 8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
45	2	Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
46	91	#15 To Waste	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
47	13	#15 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
48	10	#18 To Waste	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
49	4	Wait	15	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
50	2	Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
51	9	#18 To Column	9	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
52	34	Flush to Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
53	9	#18 To Column	9	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
54	2	Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
55	9	#18 To Column	9	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
56	2	Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
57	1	Block Flush	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
58	33	Cycle Entry	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
59	9	#18 To Column	9	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
60	2	Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
61	6	Waste-Port	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
62	30	#17 To Waste	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
63	11	#17 To Column	7	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
64	34	Flush to Waste	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
65	11	#17 To Column	7	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
66	34	Flush to Waste	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
67	11	#17 To Column	7	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
68	34	Flush to Waste	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
69	11	#17 To Column	7	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
70	34	Flush to Waste	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
71	11	#17 To Column	7	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
72	34	Flush to Waste	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
73	11	#17 To Column	7	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
74	34	Flush to Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
75	9	#18 To Column	9	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
76	34	Flush to Waste	7	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
77	7	Waste-Bottle	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
78	9	#18 To Column	9	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
79	2	Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
80	9	#18 To Column	9	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
81	2	Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
82	1	Block Flush	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes

10

20

30

ステップ 番号	関数		ステップ 時間	塩基に対して活性なステップ							安全な ステップ	
	#	名前		A	G	C	T	S	B	7		
1	28	Phos Prep	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
2	52	A To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
3	53	G To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
4	54	C To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
5	55	T To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
6	56	#5 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
7	57	#6 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
8	58	#7 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
9	61	TET To Waste	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
10	10	#18 To Waste	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
11	16	Cap Prep	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
12	59	Cap A To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
13	60	Cap B To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
14	81	#15 To Waste	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
15	82	#14 To Waste	8	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
16	30	#17 To Waste	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
17	10	#18 To Waste	15	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
18	1	Block Flush	15	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes

フロントページの続き

(72)発明者 アーデア, マイケル エス.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94507, アラモ, バンス メドウ ロード 100

合議体

審判長 種村 慈樹

審判官 富永 みどり

審判官 鵜飼 健

(56)参考文献 米国特許第5008182(US, A)
国際公開第90/15066(WO, A1)
特開平2-109999(JP, A)
Nature, Vol. 313, 1985, p. 277-284

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

BIOSIS/WPI(DIALOG)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

CA/REGISTRY(STN)

PubMed