

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-513379

(P2013-513379A)

(43) 公表日 平成25年4月22日(2013.4.22)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/48 (2006.01)	C 1 2 Q 1/48 Z	4 B O 6 3
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	
G O 1 N 33/533 (2006.01)	G O 1 N 33/533	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 56 頁)

(21) 出願番号 特願2012-542636 (P2012-542636)
 (86) (22) 出願日 平成22年12月8日 (2010.12.8)
 (85) 翻訳文提出日 平成24年7月18日 (2012.7.18)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2010/003397
 (87) 国際公開番号 W02011/070441
 (87) 国際公開日 平成23年6月16日 (2011.6.16)
 (31) 優先権主張番号 61/306,201
 (32) 優先日 平成22年2月19日 (2010.2.19)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/325,977
 (32) 優先日 平成22年4月20日 (2010.4.20)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/285,758
 (32) 優先日 平成21年12月11日 (2009.12.11)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 512271240
 ニュークレイックス
 イスラエル国 46710 ヘルツリーア
 シュロモ ハメレハ ストリート 5
 (74) 代理人 100123788
 弁理士 宮崎 昭夫
 (74) 代理人 100106138
 弁理士 石橋 政幸
 (74) 代理人 100127454
 弁理士 緒方 雅昭
 (72) 発明者 ワッセルストロム、 アダム
 イスラエル国 74100 ネスージオナ
 エーピーティー、 14 ハオゲン エ
 スティー、 1

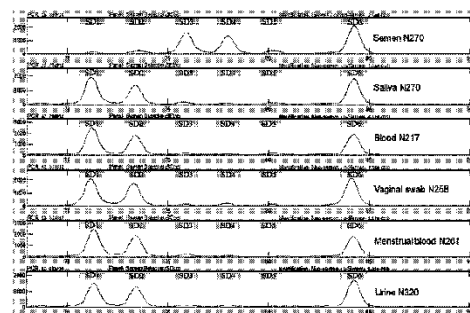
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 DNA 試料の分類

(57) 【要約】

本発明は、DNA 試料を正確かつ費用効果的に、種々の型のインピトロで生成した DNA 又は種々の型の天然の DNA、例えば、種々の組織及び/又は生理学的/病的状態由来のものに分類する方法を開示する。本発明は、特定の遺伝子座におけるメチル化レベルの比と関連づけられた「シグナル比」を比較することにより分類を達成し、任意の遺伝子座における実際のメチル化レベルの計算に依存するものではない。従って、開示された本発明の方法は、外部 DNA 及び対照を必要とせず、その結果、アッセイを簡略化し、精度を向上させる。開示された本発明の技術は、同じ反応において、DNA の分類を DNA プロファイリングと一緒に実施することができ、その結果、試料の同時分類及び同一性の判定を可能にする。

Figure 12



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(A) 少なくとも 1 つのメチル化感受性制限エンドヌクレアーゼ及びメチル化依存性制限エンドヌクレアーゼにより DNA 試料を消化すること；

(B) 前記消化された DNA から少なくとも 2 つのゲノム遺伝子座を増幅することであって、少なくとも 1 つの遺伝子座が制限遺伝子座であり；

(C) 各増幅産物のシグナル強度を測定すること；

(D) 前記増幅産物のシグナル強度間のシグナル比を計算すること；及び

(E) 種々の DNA 区分の基準比の値に対するシグナル比を比較すること、を含む、DNA 試料を分類する方法であって、

特定の DNA 区分の基準比の値に対するシグナル比の値の近似値が、DNA 試料の分類上の起源を示す、方法。

10

【請求項 2】

前記シグナル比を比較する基準値が、組織型、細胞型、生理学的状態、病的状態、年齢、民族性、性別、メチル化レベル、種、細胞系、天然の DNA 及び人工的に合成した DNA、病的状態の発症の危険性、胎児の状態、病気の予後、治療効果を示す傾向、細胞系継代培養の影響、薬剤に対する反応からなる群から選択される少なくとも 1 つの DNA 区分由来である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記組織型又は前記細胞型が、血液、唾液、精液、表皮、尿、血漿、毛髪、月経血、膣細胞及び / 又は分泌物、汗、大便、脳、食道、肺、胃、心臓、十二指腸、肝臓、胆のう、腸、腎臓、副腎、膀胱、尿道、結腸、睾丸、卵巣、子宮、膣、筋肉、腱、靭帯、脂肪、軟骨、骨、内皮細胞、子宮頸部、リンパ、甲状腺、下垂体、小脳及び胸部からなる群から選択される、請求項 2 に記載の方法。

20

【請求項 4】

前記組織型又は前記細胞型が、血液、唾液、精液又は表皮である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記病的状態が、癌、炎症、自己免疫疾患、代謝異常、感染症、変性疾患、ホルモン不均衡、異常な DNA メチル化により特徴づけられる疾患、ICF の神経発達障害（免疫不全、動原体不安定及び顔面異常）、レット症候群及び脆弱性 X 症候群である、請求項 2 に記載の方法

30

【請求項 6】

前記胎児の状態が、プラダー - ウィリ症候群、アンジェルマン症候群、ベックウィズ・ブイーデマン症候群、脆弱 X 症候群、ラッセルシルバー症候群、新生児一過性糖尿病、アルブライト遺伝性骨ジストロフィー、マクーン - オルブライト症候群、遺伝性非クロム親和型パラガングリオーマ、母親性及び父親性 UPD 14 症候群である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 7】

前記シグナル比を比較する基準値が、他の区分の混合物である区分を表す、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 8】

前記シグナル比を比較する基準値が、種々の比における精液及び非精液の混合物由来である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記メチル化感受性制限エンドヌクレアーゼが、A a t I I、A c c 6 5 I、A c c I、A c i I、A C l I、A f e I、A g e I、A p a I、A p a L I、A s c I、A s i S I、A v a I、A v a I I、B a e I、B a n I、B b e I、B c e A I、B c g I、B f u C I、B g l I、B m g B I、B s a A I、B s a B I、B s a H I、B s a I、B s e Y I、B s i E I、B s i W I、B s l I、B s m A I、B s m B I、B s m F I、

50

BspDI、BsrBI、BsrFI、BssHII、BssKI、BstAPI、BstBI、BstUI、BstZ17I、Cac8I、ClaI、DpnI、DrdI、EaeI、EagI、EagI-HF、EciI、EcoRI、EcoRI-HF、FauI、Fnu4HI、FseI、FspI、HaeII、HgaI、HhaI、HincII、HincII、HinfI、Hinp1I、HpaI、HpaII、Hpy166ii、Hpy188iii、Hpy99I、HpyCH4IV、KasI、MluI、MmeI、MspA1I、MwoI、NaeI、NarI、NgoNIV、Nhe-HFI、NheI、NlaIV、NotI、NotI-HF、NruI、Nt.BbvCI、Nt.BsmAI、Nt.CviPII、PaeR7I、PleI、PmeI、PmlI、PshAI、PspOMI、PvuI、RsaI、RsrII、SacII、SalI、SalI-HF、Sau3AI、Sau96I、ScrFI、SfiI、SfoI、SgrAI、SmaI、SnaBI、TfiI、TscI、TseI、TspMI及びZraIからなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

10

【請求項10】

前記メチル化感受性制限エンドヌクレアーゼがHhaIである、請求項1に記載の方法。

【請求項11】

前記メチル化依存性制限エンドヌクレアーゼが、McrBC、McrA及びMrrAからなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項12】

前記基準DNA区分が、天然のDNA又は人工的に合成したDNAであって、前記天然のDNA又は人工的に合成したDNA中の少なくとも1つの遺伝子座が、DNAプロファイリングに用いられる、コアショートタンデムリピート(STR)遺伝子座を含む、請求項2に記載の方法。

20

【請求項13】

前記遺伝子座が、D16S539(配列番号1)、D7S820(配列番号2)、D13S317(配列番号3)、D5S818(配列番号4)、CSF1PO(配列番号5)、TPOX(配列番号6)、TH01(配列番号7)、vWA(配列番号8)、FGA(配列番号9)、D21S11(配列番号10)、D8S1179(配列番号11)、D18S51(配列番号12)、及びD3S1358(配列番号13)、PentaD(配列番号14)、PentaE(配列番号15)、及びアメロゲニン(配列番号16及び17)、D2S1338(配列番号18)、D19S433(配列番号19)、ACTBP2SE33(配列番号20)、D10S1248(配列番号21)、D1S1656(配列番号22)、D22S1045(配列番号23)、D2S441(配列番号24)、及びD12S391(配列番号25)からなる群から選択されるヒト遺伝子座を含む、請求項12に記載の方法。

30

【請求項14】

前記少なくとも1つの遺伝子座の増幅のためのプライマーが、

(1) PowerPlex(登録商標)16 HS(カタログ番号DC2100、DC2101)、PowerPlex(登録商標)16(カタログ番号DC6530、DC6531)、PowerPlex(登録商標)2.1(カタログ番号DC6470、DC6471)、PowerPlex(登録商標)16 BIO(カタログ番号DC6540、DC6541)及びPowerPlex(登録商標)ES Systems(カタログ番号DC6730、DC6731)からなる群から選択されるPromega Corporationの市販キット；

40

(2) SGM、SGM+、AmpFlSTR Identifier、AmpFlSTR Profiler、AmpFlSTR Profiler Plus、AmpFlSTR Profiler Plus ID、AmpFlSTR SEfiler、AmpFlSTR SEfiler Plus、AmpFlSTR Cofiler、AmpFlSTR Identifier Direct、AmpFlSTR Identifier Plus、AmpFlSTR NGM、AmpFlSTR Y-filer、及びA

50

mpFLSTR Minifiler からなる群から選択される、Applied Biosystems の市販キット；又は

(3) Investigator ESSplex、Investigator ESSplex SE、Investigator Nonaplex ESSplex、Investigator Hexaplex ESSplex、Investigator Triplex AFS QS、Investigator Triplex DSF、Investigator IDplex、Investigator Decaplex SE、Investigator HDplex、Investigator Argus X-12、Investigator Y-12 QS、Investigator DIPlex により入手できる、請求項 12 に記載の方法。

10

【請求項 15】

1 つの遺伝子座が、天然の DNA の全ての組織においてメチル化されていないことが知られている、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 16】

1 つの遺伝子座が、Hypo23、Hypo28 及び Hypo33 からなる群から選択される、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

以下の比の少なくとも 1 つを計算することを更に含む、請求項 12 に記載の方法。

- (1) D3S1358 / D18S51、
- (2) D3S1358 / D7S820、
- (3) D3S1358 / Penta__D、
- (4) D3S1358 / TPOX、
- (5) D3S1358 / FGA、
- (6) TH01 / Penta__D、
- (7) D21S11 / D18S51、
- (8) D21S11 / D7S820、
- (9) D21S11 / Penta__D、
- (10) D21S11 / AMEL、
- (11) D21S11 / TPOX、
- (12) D21S11 / FGA、
- (13) D5S818 / D18S51、
- (14) vWA / D18S51、
- (15) D5S818 / Penta__E、
- (16) vWA / Penta__E、
- (17) D5S818 / D7S820、
- (18) D5S818 / Penta__D、
- (19) D5S818 / TPOX、
- (20) D5S818 / FGA、
- (21) D13S317 / D7S820、
- (22) D13S317 / Penta__D、
- (23) D13S317 / TPOX、
- (24) D13S317 / FGA、
- (25) D16S539 / D7S820、
- (26) CSF1PO / D7S820、
- (27) vWA / D7S820、
- (28) D8S1179 / D7S820、
- (29) D16S539 / TPOX、
- (30) D16S539 / FGA、
- (31) CSF1PO / Penta__D、
- (32) CSF1PO / TPOX、

20

30

40

50

- (3 3) v W A / P e n t a _ _ D、
- (3 4) A M E L / T P O X、
- (3 5) A M E L / F G A、
- (3 6) v W A / D 8 S 1 1 7 9、
- (3 7) v W A / T P O X、
- (3 8) v W A / F G A、
- (3 9) D 8 S 1 1 7 9 / T P O X、及び
- (4 0) D 8 S 1 1 7 9 / F G A。

【請求項 1 8】

少なくとも 1 つの遺伝子座が T P O X (配列番号 6) 又は F G A (配列番号 9) である、請求項 1 2 に記載の方法。

10

【請求項 1 9】

前記増幅した遺伝子座が 9 0 塩基対以下のサイズである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 0】

シグナル強度が、キャピラリー電気泳動の際に測定される、増幅産物の蛍光レベルである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 1】

工程 (B) 及び (C) がリアルタイム P C T より実施される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 2】

蛍光標識されたプローブを用いて消化された D N A の選択された遺伝子座を P C R 増幅し、各増幅産物のシグナル強度が、各増幅産物の蛍光レベルである、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 2 3】

蛍光標識されたプローブを増幅産物とハイブリダイズすることを更に含み、前記増幅産物のシグナル強度が、前記産物のプローブのハイブリダイゼーション後に測定する蛍光レベルである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 4】

D N A 試料の潜在的な区分に対する信頼水準を割り当てることを更に含み、前記信頼水準が、特定の D N A 区分が D N A 試料の分類別起源を示す可能性を示し、前記可能性が、

(A) 前記基準値に対するシグナル比のそれぞれの比較に対する確率スコアを割り当て (ここで、前記確率スコアは、(i) 各潜在的区分の基準値に対するガンマ確率分布関数を割り当てることにより得られ；(i i) 前記確率スコアは、観察されるシグナル比において工程 (A) で割り当てられるガンマ確率分布関数の値と等しい)；

30

(B) 各区分について、工程 (A) で得られる確率スコアの結果である区分尤度スコアを計算し；及び

(C) 各潜在的区分の区分尤度スコアを全ての区分尤度スコアの合計で割ることにより、尤度スコアを正規化することによって計算され、

各区分の信頼水準が、規格化された区分の尤度スコアである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 5】

D N A の分類により、D N A プロファイリングを同時に実施することを更に含む、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 2 6】

D N A 消化及びポリメラーゼ連鎖反応の工程を、1 つの試験管内で同時に実施する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記遺伝子座を増幅及び選択し、種々の潜在的区分についての特徴のあるシグナル比を作成する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 8】

(1) 特定の遺伝子座の増幅のためのプライマー；及び

(2) 反応バッファ、(3) 対照 D N A、(4) メチル化感受性制限エンドヌクレアーゼ

50

及び/又はメチル化依存性制限エンドヌクレアーゼ、(5)分類を実施するための書面によるプロトコルからなる群から選択される、少なくとも1つ以上の試薬を含む、DNA試料を少なくとも2種の所定の区分に分類し、関連する分類信頼水準を得るためのキット。

【請求項29】

分類分析を実施するための分析ソフトウェアを更に含む、請求項28に記載のキット。

【請求項30】

以下を含む、精液又は非精液としてのDNA試料を分類し、関連する分類信頼水準を得るためのキット：

(a)以下のプライマーを含むプライマー混合物；

SD1f (AAGAGCCCATCAGGCAGGTC)；

SD1r (GTTTCTTGTCGAGCAGCACGTGGATGATG)；

SD2f (CTCCAGAACTGGAACTTCCTG)；

SD2r (GTTTCTTAACCTTGGAGACGACGGGCATC)；

SD3f (TGGAGGACAATGCCCTGGTG)；

SD3r (GTTTCTTGGCCTTCACTGCGACCGTCTC)；

SD4f (CCCTCCGAGTGGCCAGCAG)；

SD4r (GTTTCTGACCACTGCCGTGGGAATG)；

SD5f (CTTCTCAGCCAATGGGAAGAG)；

SD5r (ACGTAGAAGGACCCGAGGAC)；

SD6f (TACAGACA AATCACTCAGCAGC)；及び

SD6r (GTTTCTTGTCCTGACACTCGGTTGTAGGTATT)

(b)反応バッファ；

(c)HhaI制限エンドヌクレアーゼ；

(d)DNAポリメラーゼ；

(d)分類を実施するための書面によるプロトコル。

【請求項31】

対照DNA試料を更に含む、請求項30に記載のキット。

【請求項32】

(1)SD1f (AAGAGCCCATCAGGCAGGTC)及びSD1r (GTTTCTTGTCGAGCAGCACGTGGATGATG)；

(2)SD2f (CTCCAGAACTGGAACTTCCTG)及びSD2r (GTTTCTTAACCTTGGAGACGACGGGCATC)；

(3)SD3f (TGGAGGACAATGCCCTGGTG)及びSD3r (GTTTCTTGGCCTTCACTGCGACCGTCTC)；

(4)SD4f (CCCTCCGAGTGGCCAGCAG)及びSD4r (GTTTCTGACCACTGCCGTGGGAATG)；

(5)SD5f (CTTCTCAGCCAATGGGAAGAG)及びSD5r (ACGTAGAAGGACCCGAGGAC)；

(6)SD6f (TACAGACA AATCACTCAGCAGC)及びSD6r (GTTTCTTGTCCTGACACTCGGTTGTAGGTATT)からなる群から選択される、少なくとも1つの順方向(f)及び逆方向(r)プライマー対の組合せを含む、精液又は非精液としてのDNA試料を分類し、関連する分類信頼水準を得るためのキット。

【請求項33】

前記プライマー混合物中のプライマーの濃度が、0.6µM SD1f、0.6µM SD1r、1.75µM SD2f、1.75µM SD2r、1.25µM SD3f、1.25µM SD3r、1.75µM SD4f、1.75µM SD4r、1.75µM SD5f、1.75µM SD5r、0.9µM SD6f、及び0.9µM SD6rである、請求項30に記載のキット。

【請求項34】

10

20

30

40

50

前記反応バッファが、150 mM Tris-HCl、15 mM MgCl₂、0.2 mM 各 dntp、及び0.1 µg/µLのBSAを含む、請求項30に記載のキット。

【請求項35】

DNAラダーを更に含む、請求項30に記載のキット。

【請求項36】

分類分析を実施するための分析ソフトウェアを更に含む、請求項30に記載のキット。

【請求項37】

(a) 少なくとも1つの精子特異的遺伝子座を増幅するためのプライマー；
 (b) DNAプロファイリングに用いられる少なくとも1つの遺伝子座を増幅するためのプライマー；
 (c) 反応バッファ；
 (d) HhaI制限エンドヌクラーゼ；
 (e) DNAポリメラーゼ；
 (f) 分類を実施するための書面によるプロトコルを含む、精液又は非精液としてのDNA試料をプロファイリングし、分類し、関連する分類信頼水準を得るためのキット。

10

【請求項38】

対照DNA試料を更に含む、請求項37に記載のキット。

【請求項39】

(a) 少なくとも1つの精子特異的遺伝子座を増幅するためのプライマー；及び
 (b) DNAプロファイリングに用いられる少なくとも1つの遺伝子座を増幅するためのプライマーを含む、精液又は非精液としてのDNA試料をプロファイリングし、分類し、関連する分類信頼水準を得るためのキット。

20

【請求項40】

少なくとも1つの精子特異的遺伝子座がL68346遺伝子座である、請求項37に記載のキット。

【請求項41】

L68346から、70塩基対の精子特異的増幅産物を増幅するためのプライマーが、CAGCAACAGCACCCAGCTTGの配列を含む順方向プライマー(FAM)、及びCACAGGCTCAGTCGCGGATCの配列を含む逆方向プライマーである。請求項40に記載のキット。

30

【請求項42】

少なくとも1つの精子特異的遺伝子座がL16264遺伝子座である、請求項37に記載のキット。

【請求項43】

L16264から、95塩基対の精子特異的増幅産物を増幅するためのプライマーが、GACGAGTTAACTTCCTTAATTTTCの配列を含む順方向プライマー(FAM)、及びGTTTCTTCGCGGAACCTGGTTTAACCTTCの配列を含む逆方向プライマーである、請求項42に記載のキット。

【請求項44】

前記反応バッファが、150 mM Tris-HCl、15 mM MgCl₂、0.2 mM 各 dntp、及び0.1 µg/µLのBSAを含む、請求項37に記載のキット。

40

【請求項45】

(a) DNAラダー、(b) 化学物質安全性データシート(MSDS)、及び(c) 分類分析を実施するための分析ソフトウェアの少なくとも1つを更に含む、請求項37に記載のキット。

【請求項46】

(a) 以下に示す遺伝子座を増幅するための順方向及び逆方向プライマーを含むプライマー混合物：
 1. L91762 (順方向 GCAGCAGGCCGCGGAGAAAG (FAM)；逆方向 AGCAGCTGTGCCGCGCCAG)

50

2 . L 6 8 3 4 6 (順方向 C A G C A A C A G C A C C C A G C T T G (J O E) ;
逆方向 C A C A G G C T C A G T C G C G G A T C)

3 . L 5 0 4 6 8 (順方向 A G G A A A C C T C A G T A G C A A A A T T G (J
O E) ; 逆方向 G C G A G A C T T T A G G T G T G C A T C)

4 . L 1 4 4 3 2 (順方向 C G T A G G C T G C G G T G A G C T C (F A M) ; 逆
方向 G A T C C A T G C C C G C T G G G A T G)

5 . L 4 6 4 8 (順方向 C A G C C T A G A C G T C A A G T T A C A G (J O E)
; 逆方向 A C G A C C T C C G G A T C C A A C T G)

6 . L 3 9 6 6 4 (順方向 C C C A G C T G G T T G G A C A T G T T G (F A M)
; 逆方向 C A C T T C C T T C G T G G A C G C C)

7 . L 3 0 1 3 9 (順方向 G A G A A G C G G G A G G A T G A G A C (F A M) ;
逆方向 C C G C A T C T C C T C C G T C C T G)

8 . L 5 5 4 2 9 (順方向 G C C T T C A G C A G G A A G T C C A C (J O E) ;
逆方向 C C T G T G C C T C A C A C A G A C T C)

9 . L 6 2 0 8 6 (順方向 G T G C A T G G T G T C T G G T A C T T C (F A M)
; 逆方向 G A A G C T C T C G T G G A C T A C T T G)

10 . L 7 6 1 3 8 (順方向 C A G C C T G C T C T T C A C T G C A G (J O E)
; 逆方向 A G A G G C C G A T G A A G C C G T A G)

11 . L 1 5 9 5 2 (順方向 C T C C C T G A T T T A C G A C A A G T T C (F
A M) ; 逆方向 G A C A G T A T G C T G A T G C T T C T T G)

12 . L 3 6 5 9 9 (順方向 A A G G G C A G A G T T C C G C T G T C (F A M)
; 逆方向 C G G A T G C A G G A G G A T C C T A G)

13 . L 2 6 6 8 8 (順方向 C G G A C C A G A T T G C T G G T C A C (J O E)
; 逆方向 C G A C C T T G C C A G A T G T T T G A C)

14 . L 8 1 5 2 8 (順方向 A G C C T C A T C C A C A C T G A C C A G (J O E
) ; 逆方向 T C A G A G C T C T C C T A T C T G G A C)

15 . L 3 6 5 5 6 (順方向 G C C A G G C C G T T G A T G A T G A C (J O E)
; 逆方向 G A A T A T G G A G C C C T G G G C A G) ;

10

20

(b) 反応バッファ

(c) H h a I 制限エンドヌクレアーゼ ;

(d) D N A ポリメラーゼ ;

30

(e) 分類を実施するための書面によるプロトコルを含む、血液、唾液、精子、又は表皮としての D N A 試料を分類し、関連する信頼水準を得るためのキット。

【請求項 4 7】

対照 D N A 試料を更に含む、請求項 4 6 に記載のキット。

【請求項 4 8】

前記反応バッファが、150mM T r i s - H C l、15mM M g C l 2、0.2mM 各 d n t p、及び0.1μg/μLのB S Aを含む、請求項 4 6 に記載のキット。

【請求項 4 9】

(a) D N A ラダー、(b) 化学物質安全性データシート (M S D S)、及び(c) 分類分析を実施するための分析ソフトウェアの少なくとも1つを更に含む、請求項 4 6 に記載のキット。

40

【請求項 5 0】

前記 D N A 試料が、D N A 試料の混合物を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5 1】

(A) メチル化感受性及び/又はメチル化依存性制限エンドヌクレアーゼにより各 D N A 試料を消化する工程 ;

(B) 少なくとも1つが制限遺伝子座である、少なくとも2つのゲノム遺伝子座を増幅する、各消化された D N A 上で P C R を実施する工程 ;

(C) 各 D N A 試料について、各増幅産物のシグナル強度を測定する工程 ;

50

(D) 各DNA試料について、遺伝子座により生成されたシグナル強度間の「シグナル比」を計算する工程；

(E) 対応するシグナル比の定量比較を実施することにより、DNA試料間の異なるメチル化の度合いを計算する工程を含む、DNA試料間の異なったメチル化の距離測度を計算する方法。

【請求項52】

前記距離測度が、前記DNA試料のシグナル比間の絶対差の合計である、請求項51に記載の方法。

【請求項53】

前記距離測度が、前記DNA試料のシグナル比間の差の二乗の合計の平方根である、請求項51に記載の方法。

10

【請求項54】

被験者の試料と基準の健常者の試料との間の距離測度が、病的状態を治療するのに必要な薬物の量を示す、請求項51に記載の方法。

【請求項55】

培養細胞から得られたDNA試料と基準試料との間の距離測度が、細胞が受けた継代培養手順の数を示す、請求項51に記載の方法。

【請求項56】

1 . G C A G C A G G C C G C G G A G A A G ;
 2 . A G C A G C T G T G C C G G G C C A G ;
 3 . C A G C A A C A G C A C C C A G C T T G ;
 4 . C A C A G G C T C A G T C G C G G A T C ;
 5 . A G G A A A C C T C A G T A G C A A A A T T G ;
 6 . G C G A G A C T T T A G G T G T G C A T C ;
 7 . C G T A G G C T G C G G T G A G C T C ;
 8 . G A T C C A T G C C C G C T G G G A T G ;
 9 . C A G C C T A G A C G T C A A G T T A C A G ;
 10 . A C G A C C T C C G G A T C C A A C T G ;
 11 . C C C A G C T G G T T G G A C A T G T T G ;
 12 . C A C T T C C T T C G T G G A C G C C ;
 13 . G A G A A G C G G G A G G A T G A G A C ;
 14 . C C G C A T C T C C T C C G T C C T G ;
 15 . G C C T T C A G C A G G A A G T C C A C ;
 16 . C C T G T G C C T C A C A C A G A C T C ;
 17 . G T G C A T G G T G T C T G G T A C T T C ;
 18 . G A A G C T C T C G T G G A C T A C T T G ;
 19 . C A G C C T G C T C T T C A C T G C A G ;
 20 . A G A G G C C G A T G A A G C C G T A G ;
 21 . C T C C C T G A T T T A C G A C A A G T T C ;
 22 . G A C A G T A T G C T G A T G C T T C T T G ;
 23 . A A G G G C A G A G T T C C G C T G T C ;
 24 . C G G A T G C A G G A G G A T C C T A G ;
 25 . C G G A C C A G A T T G C T G G T C A C ;
 26 . C G A C C T T G C C A G A T G T T T G A C ;
 27 . A G C C T C A T C C A C A C T G A C C A G ;
 28 . T C A G A G C T C T C C T A T C T G G A C ;
 29 . G C C A G G C C G T T G A T G A T G A C ; 及び
 30 . G A A T A T G G A G C C C T G G G C A G
 31 . A A G A G C C C A T C A G G C A G G T C
 32 . G T T T C T T G T C G A G C A G C A C G T G G A T G A T G

20

30

40

50

- 33 . CTCCAGAACTGGAACTTCCTG
- 34 . GTTTCCTTA ACTTTGGAGACGACGGCATC
- 35 . TGGAGGACAATGCCCTGGTG
- 36 . GTTTCCTTGGCTTCACTGCGACCGTCTC
- 37 . CCCTCCGAGTGGCCAGCAG
- 38 . GTTTCCTGACCACTGCCGTGGGAATG
- 39 . CTTCTCAGCCAATGGGAAGAG
- 40 . ACGTAGAAGGACCCGAGGAC
- 41 . TACAGACA AATCACTCAGCAGC
- 42 . GTTTCCTTGTCTGACACTCGGTTGTAGGTATT
- 43 . GGACGAGTTAACTTCCTTAATTTTC
- 44 . GTTTCCTTCGCGGAACCTGGTTTAACTTTC

10

44 . GTTTCCTTCGCGGAACCTGGTTTAACTTTCからなる群から選
択されるプライマー。

【請求項57】

- 1 . L91762 (順方向 GCAGCAGGCCGCGGAGAAAG (FAM) ;
逆方向 AGCAGCTGTGCCGGGCCAG) ;
- 2 . L68346 (順方向 CAGCAACAGCACCCAGCTTG (JOE) ;
逆方向 CACAGGCTCAGTCGCGGATC) ;
- 3 . L50468 (順方向 AGGAAACCTCAGTAGCAAAATTG (JO
E) ; 逆方向 GCGAGACTTTAGGTGTGCATC) ;
- 4 . L14432 (順方向 CGTAGGCTGCGGTGAGCTC (FAM) ; 逆
方向 GATCCATGCCCGCTGGGATG) ;
- 5 . L4648 (順方向 CAGCCTAGACGTCAAGTTACAG (JOE)
; 逆方向 ACGACCTCCGGATCCA ACTG) ;
- 6 . L39664 (順方向 CCCAGCTGGTTGGACATGTTG (FAM)
; 逆方向 CACTTCCTTCGTGGACGCC) ;
- 7 . L30139 (順方向 GAGAAAGCGGGAGGATGAGAC (FAM) ;
逆方向 CCGCATCTCCTCCGTCCTG) ;
- 8 . L55429 (順方向 GCCTTCAGCAGGAAGTCCAC (JOE) ;
逆方向 CCTGTGCCTCACACAGACTC) ;
- 9 . L62086 (順方向 GTGCATGGTGTCTGGTACTTTC (FAM)
; 逆方向 GAAGCTCTCGTGGACTACTTG) ;
- 10 . L76138 (順方向 CAGCCTGCTCTTCACTGCAG (JOE)
; 逆方向 AGAGGCCGATGAAGCCGTAG) ;
- 11 . L15952 (順方向 CTCCTGATTTACGACAAGTTTC (FA
M) ; 逆方向 GACAGTATGCTGATGCTTCTTG) ;
- 12 . L36599 (順方向 AAGGGCAGAGTTCCGCTGTGC (FAM)
; 逆方向 CGGATGCAGGAGGATCCTAG) ;
- 13 . L26688 (順方向 CGGACCAGATTGCTGGTCCAC (JOE)
; 逆方向 CGACCTTGCCAGATGTTTGAC) ;
- 14 . L81528 (順方向 AGCCTCATCCACACTGACCAG (JOE)
) ; 逆方向 TCAGAGCTCTCCTATCTGGAC) ;
- 15 . L36556 (順方向 GCCAGGCCGTTGATGATGAC (JOE)
; 逆方向 GAATATGGAGCCCTGGGCAG) ;
- 16 . SD1 (順方向 AAGAGCCCATCAGGCCAGGTC (FAM) ; 逆
方向 GTTTCCTTGTGCGAGCAGCACGTTGGATGATG) ;
- 17 . SD2 (順方向 CTC CAGAACTGGAACTTCCTG (FAM) ; 逆
方向 GTTTCCTTA ACTTTGGAGACGACGGCATC) ;
- 18 . SD3 (順方向 TGGAGGACA AATGCCCTGGTG (FAM) ; 逆方
向 GTTTCCTTGGCTTCACTGCGACCGTCTC) ;

20

30

40

50

19. SD4 (順方向 C C C T C C G A G T G G C C A G C A G (F A M) ; 逆方向 G T T T C T G A C C A C T G C C G T G G G A A T G) ;

20. SD5 (順方向 C T T C T C A G C C A A T G G G A A G A G (F A M) ; 逆方向 A C G T A G A A G G A C C C G A G G A C) ;

21. SD6 (順方向 T A C A G A C A A A T C A C T C A G C A G C (F A M) ; 逆方向 G T T T C T T G T C T G A C A C T C G G T T G T A G G T A T T) ; 及び

22. L16264 (順方向 G G A C G A G T T A A C T T C C T T A A T T T C (F A M) ; 逆方向 G T T T C T T C G C G G A A C C T G G T T T A A C T T C) からなる群から選択される、特定のヒトゲノム遺伝子座を増幅するためのプライマー対。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本国際出願は、2009年12月11日に出願された米国特許仮出願第61/285,758号、2010年2月19日に出願された同第61/306,201号、2010年4月20日に出願した同第61/325,977号に基づく優先権を主張するものであり、これらの出願のそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明の技術は、DNA試料又は混合DNA試料の由来源及び同一性を同定するために、正確かつ費用対効果のある分類及びプロファイリングのための方法に関する。

【発明の概要】

20

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

本発明は、DNA試料を正確かつ費用効果的に、種々の型のインビトロで生成したDNA又は種々の型の天然のDNA、例えば、種々の組織及び/又は生理学的/病的状態由来のものに分類する方法に関する。本発明は、特定の遺伝子座におけるメチル化レベルの比と関連づけられた「シグナル比」を比較することにより分類を達成し、任意の遺伝子座における実際のメチル化レベルの計算に依存するものではない。従って、本発明の手順には、外部DNA種及び/又は対照を必要とせず、その結果、アッセイを簡略化し、精度を向上させる。本発明の技術は、同じ反応において、DNAの分類をDNAプロファイリングと一緒に実施することができ、その結果、試料の同時分類及び同一性の判定を可能にする。

30

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明の一態様は、

(A)メチル化感受性制限エンドヌクレアーゼ及び/又はメチル化依存性制限エンドヌクレアーゼによりDNA試料を消化すること；

(B)少なくとも1つが制限遺伝子座である、少なくとも2つのゲノム遺伝子座を増幅する、消化されたDNA上でPCRを実施すること；

(C)各増幅産物のシグナル強度を測定すること；

(D)前記遺伝子座により生成されたシグナル強度間の「シグナル比」を計算すること

40

；

(E)種々のDNA区分に対応する基準値に対するシグナル比を比較すること、を含む、DNA試料を分類する方法であって、ここで、基準値が前記シグナル比に最も対応する区分が、DNA試料の区分であると判定される。すなわち、例えば、特定のDNA区分の基準値の値に対するシグナル比の値の近似値は、DNA試料の分類上の区分を示す。従って、シグナル比が基準区分の値に近い値を有する場合、シグナル比及び基準値の間の値における類似性に基づいて、試験を行ったDNA試料が、特定の型の区分由来である可能性が高い。従って、特定のDNA区分についての特定の基準値に最も対応し、又は最も近いシグナル比は、そのDNA試料が特定のDNAの分類上の起源由来であると期待させる。例えば、シグナル比及び区分基準値を比較する方法については、例えば、試験D

50

NA 試料を 1 つ以上の基準区分に分類し得る確率分布及び尤度確率の計算方法を説明する、アルゴリズム及びソフトウェアと標題の付いた項を参照されたい。

【0005】

一実施形態においては、DNA 鑄型、消化及び増幅酵素、バッファ、プライマー及び補助成分と一緒に試験管に入れ、次いで、この試験管を閉じサーマルサイクラー中に配置し、ここで反応を実施する、単一の生化学反応において、DNA 消化及び PCR が実施される。

【0006】

一実施形態においては、メチル化感受性制限エンドヌクレアーゼは、その認識配列がメチル化されている場合には、DNA を切断又は消化することができない。一実施形態においては、メチル化感受性制限エンドヌクレアーゼは、AatII、Acc65I、AccI、AciI、AclI、AfeI、AgeI、ApaI、ApaLI、AscI、AsiSI、AvaI、AvaII、BaeI、BanI、BbeI、BceAI、BcgI、BfuCI、BglI、BmgBI、BsaAI、BsaBI、BsaHI、BsaI、BseYI、BsiEI、BsiWI、BslI、BsmAI、BsmBI、BsmFI、BspDI、BsrBI、BsrFI、BsshII、BssKI、BstAPI、BstBI、BstUI、BstZ17I、Cac8I、ClaI、DpnI、DrdI、EaeI、EagI、EagI-HF、EciI、EcoRI、EcoRI-HF、FauI、Fnu4HI、FseI、FspI、HaeII、HgaI、HhaI、HincII、HincII、HinfI、Hinp1I、HpaI、HpaII、Hpy166ii、Hpy188iii、Hpy99I、HpyCH4IV、KasI、MluI、MmeI、MspA1I、MwoI、NaeI、NarI、NgonIV、Nhe-HFI、NheI、NlaIV、NotI、NotI-HF、NruI、Nt.BbvCI、Nt.BsmAI、Nt.CviPII、PaeR7I、PleI、PmeI、PmlI、PshAI、PspOMI、PvuI、RsaI、RsrII、SacII、SalI、SalI-HF、Sau3AI、Sau96I、ScrFI、SfiI、SfoI、SgrAI、SmaI、SnaBI、TfiI、TscI、TseI、TspMI 及び ZraI からなる群から選択される。

【0007】

他の実施形態においては、メチル化依存性制限酵素は、DNA 試料を消化するために用いることができる。メチル依存性制限エンドヌクレアーゼは、メチル化された DNA のみを消化する。このような制限酵素の例には、McrBC、McrA 及び MrmA が含まれるが、これらに限定されない。

【0008】

一実施形態においては、少なくとも 1 つの制限遺伝子座は、天然の DNA 中でメチル化されていることが知られている。

【0009】

他の実施形態においては、少なくとも 1 つの制限遺伝子座は、天然の DNA 中でメチル化されていないことが知られている。

【0010】

特定の実施形態においては、少なくとも 2 つの制限遺伝子座は、天然の DNA 中で別個にメチル化されていることが知られている。

【0011】

他の実施形態においては、少なくとも 2 つの遺伝子座間のシグナル比は、少なくとも 2 つの潜在的な区分によって異なることが知られている。

【0012】

他の実施形態においては、遺伝子座を増幅するために用いられるプライマー対は、統合 DNA インデックスシステム (CODIS) において同定された、コアショートタンデムリピート (STR) 遺伝子座を増幅するために選択される。

【0013】

10

20

30

40

50

一実施形態においては、CODIS 遺伝子座は、D16S539 (配列番号1)、D7S820 (配列番号2)、D13S317 (配列番号3)、D5S818 (配列番号4)、CSF1PO (配列番号5)、TPOX (配列番号6)、TH01 (配列番号7)、vWA (配列番号8)、FGA (配列番号9)、D21S11 (配列番号10)、D8S1179 (配列番号11)、D18S51 (配列番号12)、及びD3S1358 (配列番号13) からなる群から選択される、ヒトの遺伝子座である。

【0014】

特定の実施形態においては、制限及び/又はプロファイル遺伝子座の順方向及び逆方向プライマーは、配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24又は25とアニ

10

【0015】

一実施形態においては、遺伝子座の順方向及び逆方向プライマーは、PowerPlex (登録商標) 16 HS (カタログ番号DC2100、DC2101)、PowerPlex (登録商標) 16 (カタログ番号DC6530、DC6531)、PowerPlex (登録商標) 2.1 (カタログ番号DC6470、DC6471)、PowerPlex (登録商標) 16 BIO (カタログ番号DC6540、DC6541) 及びPowerPlex (登録商標) ES Systems (カタログ番号DC6730、DC6731) からなる群から選択される Promega Corporation の市販キットにより入手できる。

20

【0016】

一実施形態においては、遺伝子座の順方向及び逆方向プライマーは、SGM、SGM+、AmpFLSTR Identifier、AmpFLSTR Profiler、AmpFLSTR Profiler Plus、AmpFLSTR Profiler Plus ID、AmpFLSTR SEfiler、AmpFLSTR SEfiler Plus、AmpFLSTR Cofiler、AmpFLSTR Identifier Direct、AmpFLSTR Identifier Plus、AmpFLSTR NGM、AmpFLSTR Y-filer、AmpFLSTR Minifiler からなる群から選択される、Applied Biosystems / Life の市販キットにより入手できる。

30

【0017】

一実施形態においては、遺伝子座の順方向及び逆方向プライマーは、Investigator ESSplex、Investigator ESSplex SE、Investigator Nonaplex ESSplex、Investigator Hexaplex ESSplex、Investigator Triplex AFSSQS、Investigator Triplex DSF、Investigator IDplex、Investigator Decaplex SE、Investigator HDplex、Investigator Argus X-12、Investigator Y-12 QS、Investigator DIPplex からなる群から選択される Qiagen の市販キットにより入手できる。

40

【0018】

他の実施形態においては、制限遺伝子座はHpaII 認識配列を含み、ADD6、ADD10、ADD17 (配列番号26~28) 及びHypo23、Hypo28、Hypo33 (配列番号29~31) からなる群から選択される。一実施形態においては、DNA 試料は哺乳動物DNA又は植物DNAである。一実施形態においては、哺乳動物DNAは、ヒト、類人猿、サル、ラット、マウス、ウサギ、ウシ、ブタ、ヒツジ及びウマからなる群から選択される哺乳動物由来である。特定の実施形態においては、哺乳動物DNAはヒトDNAである。一実施形態においては、ヒトDNAは男性由来である。他の実施形態においては、ヒトDNAは女性由来である。

【0019】

50

一実施形態においては、ヒトDNA試料は、異常なDNAメチル化により特徴付けられる疾患を患っている男性又は女性から得られる。一実施形態においては、疾患は、ICFの神経発達障害（免疫不全、動原体不安定及び顔面異常）、レット症候群及び脆弱性X症候群である。

【0020】

一実施形態においては、植物DNAは植物由来のDNAである。一実施形態においては、植物は、コムギ、芝草、穀物、トウモロコシ、米、オート麦、大麦、ソルガム、ラン、アヤメ、ユリ、タマネギ、バナナ、サトウキビ、ソルガム及びヤシからなる群から選択される単子葉植物である。他の実施形態においては、前記植物は、アボカド、ジャガイモ、タバコ、トマト、サトウダイコン、ブロッコリー、カサバ、カンショ、こしょう、ワタ、ポインセチア、マメ、アルファルファ、大豆、ニンジン、イチゴ、レタス、オーク、カエデ、クルミ、バラ、ハッカ、カボチャ、ヒナギク及びサボテンからなる群から選択される双子葉植物である。

10

【0021】

本発明の一実施形態においては、少なくとも2つの遺伝子座が、蛍光標識されたプライマーを用いてPCRによって増幅され、遺伝子座の各対のシグナル比を計算するために、前記遺伝子座に対応する蛍光シグナルの強度の対比較が実施される。

【0022】

一実施形態においては、D3S1358/D18S51、D3S1358/D7S820、D3S1358/Penta__D、D3S1358/TPOX、D3S1358/FGA、TH01/Penta__D、D21S11/D18S51、D21S11/D7S820、D21S11/Penta__D、D21S11/AMEL、D21S11/TPOX、D21S11/FGA、D5S818/D18S51、vWA/D18S51、D5S818/Penta__E、vWA/Penta__E、D5S818/D7S820、D5S818/Penta__D、D5S818/TPOX、D5S818/FGA、D13S317/D7S820、D13S317/Penta__D、D13S317/TPOX、D13S317/FGA、D16S539/D7S820、CSF1PO/D7S820、vWA/D7S820、D8S1179/D7S820、D16S539/TPOX、D16S539/FGA、CSF1PO/Penta__D、CSF1PO/TPOX、vWA/Penta__D、AMEL/TPOX、AMEL/FGA、vWA/D8S1179、vWA/TPOX、vWA/FGA、D8S1179/TPOX、D8S1179/FGAからなる対の群から選択される遺伝子座の対を増幅するためにプライマー対が用いられる。

20

30

【0023】

他の実施形態においては、制限遺伝子座のアンプリコンは、DNAプリファイリングに用いられる最も小さいアンプリコンよりも小さく、約100塩基対のサイズである。

【0024】

本発明の技術の一態様においては、アンプリコンシグナルの定量が実施され、DNA鋳型の量の定量は必ずしも必要でない。アンプリコンシグナルの比を計算することにより、実際のDNAの濃度を計算する必要がないので、標準曲線又は基準DNAは必要でない。この実施形態においては、アンプリコンシグナルの比を計算する。シグナルは、PCR増幅産物を検出するために用いられる、臭化エチジウム染色、サイバークリーン染色、銀染色又は蛍光のような標識（しかし、これらに限定されない）の任意の種類の標識から検出されるシグナルであってもよい。

40

【0025】

後者に関し、一実施形態においては、PCR反応を蛍光標識したプライマーで実施し、増幅産物のシグナル強度の測定は、キャピラリー電気泳動による増幅産物の分離及び蛍光シグナルの定量により実施する。

【0026】

他の実施形態においては、PCRはリアルタイムPCRであり、増幅産物のシグナル強

50

度の測定は、蛍光シグナルの定量により実施する。

【0027】

特定の実施形態においては、メチル化感受性制限エンドヌクレアーゼはHhaIである。

【0028】

特定の実施形態においては、メチル化感受性制限エンドヌクレアーゼはHhaIであり、第一の制限遺伝子座はTPOX遺伝子座である。

【0029】

特定の実施形態においては、メチル化感受性制限エンドヌクレアーゼはHhaIであり、第一の制限遺伝子座はFGA遺伝子座である。

10

【0030】

分類が精液又は非精液による特定の実施形態においては、メチル化感受性制限エンドヌクレアーゼはHhaIであり、制限遺伝子座はSD1、SD2、SD3及びSD4（配列番号33～36）であり、消化された制御遺伝子座はSD5（配列番号37）であり、消化されていない制御遺伝子座はSD6（配列番号38）である。

【0031】

分類が血液、唾液、精液又は表皮による特定の実施形態においては、メチル化感受性制限エンドヌクレアーゼはHhaIであり、制限遺伝子座は配列番号39～53である。

【0032】

分類をDNAプロファイリングと一緒に実施し、精液又は非精液による特定の実施形態においては、メチル化感受性制限エンドヌクレアーゼはHhaIであり、制限遺伝子座は配列番号40及び配列番号54である。

20

【0033】

一実施形態においては、遺伝子座の対は、一对の遺伝子の一方が、他のものでなく、1つのDNA区分における対における第二の遺伝子座よりも高いメチル化レベルを有していることが知られているように、少なくとも2つのDNA区分における公知のメチル化レベルを有する遺伝子から選択される。

【0034】

他の実施形態においては、一对の遺伝子座は、以下のように、メチル化レベルについての知識がなくても選択される：ランダムな遺伝子座の対を選択；各遺伝子座の増幅のための蛍光標識されたプライマーの設計；種々の区分から得られるDNA試料における両方の遺伝子座の増幅；キャピラリー電気泳動によるアンプリコンの分離；種々のDNA試料におけるシグナル比の計算；少なくとも1つの区分に対応する試料から計算した比が、少なくとも1つの他の区分に対応する試料から得られた比と著しく異なる場合（例えば、コロモゴロフ-スミルノフの検定により決定するように、 $p = 0.05$ のしきい値）、アッセイにおける使用に、その対を選択する。一実施形態においては、計算した比を天然の試料から得られた比の一組、及び合成した試料から得られた比の一組と比較する。

30

【0035】

後者に関し、一実施形態において、本明細書で決定した遺伝子座の特定の対についてHhaIで消化した天然及び合成DNA試料の各平均シグナル比を以下に示す。

40

【0036】

【表1】

	天然のDNA	合成DNA
FGA(PowerPlex16)/Hypo12	10.3	0.89
FGA(PowerPlex16)/Hypo28	12.4	0.76
TPOX(PowerPlex16)/Hypo12	9.7	1.12

【0037】

50

他の実施形態においては、計算した比を種々の組織区分から抽出したDNA試料から得られた比の一組と比較する。遺伝子座配列、並びに本明細書に開示される本発明の分類方法に従って使用して得られた例示的なシグナル比及び結果の追加例について図7～10に示す表1～4を参照されたい。

【0038】

本発明の一実施形態、又は本明細書に開示される任意の方法においては、同時にDNA試料をプロファイリングし、DNAの区分であるかどうかを決定することを更に含む。一実施形態においては、DNA試料のプリファイリング工程は、市販のDNAプロファイリングキットにおいて提供される使用説明書に従って実施される。他の実施形態においては、市販のDNAプロファイリングキットは、PowerPlex（登録商標）16プロファイリングキット（Promega Corporation）である。

10

【0039】

一実施形態においては、後者に関し、DNAの分類は組織型による。任意の組織型、例えば、血液、唾液、精液、表皮、尿、血漿及び毛髪等を用いることができるが、これらに限定されない。

【0040】

従って、本発明の一態様は、

(A)メチル化感受性制限エンドヌクラーゼ及びメチル化依存性制限の少なくとも1つでDNA試料を消化すること；

(B)前記消化されたDNAから少なくとも2つの遺伝子を増幅することであって、少なくとも1つの遺伝子座が制限遺伝子座であり；

20

(C)各増幅産物のシグナル強度を測定すること；

(D)増幅産物間のシグナル強度間のシグナル比を計算すること；及び

(E)種々のDNA区分の基準値に対するシグナル比を比較すること、

を含むDNAの分類法であって、特定のDNA区分の基準比の値に対するシグナル比の値の近似値が、DNA試料の分類上の起源を示す方法である。

【0041】

一実施形態においては、シグナル比を比較する基準値は、組織型、細胞型、生理学的状態、病的状態、年齢、民族性、性別、メチル化レベル、種、細胞系、天然のDNA及び人工的に合成したDNA、病的状態の発症の危険性、胎児の状態、病気の予後、治療効果を示す傾向、細胞系継代培養の影響、薬剤に対する反応からなる群から選択される少なくとも1つのDNA区分由来である。

30

【0042】

他の実施形態においては、組織型又は細胞型は、血液、唾液、精液、表皮、尿、血漿、毛髪、月経血、腔細胞及び/又は分泌物、汗、大便、脳、食道、肺、胃、心臓、十二指腸、肝臓、胆のう、腸、腎臓、副腎、膀胱、尿道、結腸、睾丸、卵巣、子宮、腔、筋肉、腱、靭帯、脂肪、軟骨、骨、内皮細胞、子宮頸部、リンパ、甲状腺、下垂体、小脳及び胸部からなる群から選択される。

【0043】

特定の実施形態においては、組織型又は細胞型は、血液、唾液、精液又は表皮である。

40

【0044】

他の実施形態においては、病的状態は、癌、炎症、自己免疫疾患、代謝異常、感染症、変性疾患、ホルモン不均衡、異常なDNAメチル化により特徴づけられる疾患、ICFの神経発達障害（免疫不全、動原体不安定及び顔面異常）、レット症候群及び脆弱性X症候群である。

【0045】

一実施形態においては、胎児の状態は、プラダー-ウィリ症候群、アンジェルマン症候群、ベックウィズ・ブーデマン症候群、脆弱X症候群、ラッセルシルバー症候群、新生児一過性糖尿病、アルブライト遺伝性骨ジストロフィー、マクーン-オルブライト症候群、遺伝性非クロム親和型パラガングリオーマ、母親性及び父親性UPD14症候群であ

50

る。

【0046】

他の実施形態においては、シグナル比を比較する基準値は、他の区分の混合物である区分を表す。

【0047】

他の実施形態においては、前記シグナル比を比較する基準値は、種々の比における精液及び非精液の混合物由来である。

【0048】

一実施形態においては、メチル化感受性制限エンドヌクレアーゼは、AatII、Acc65I、AccI、AciI、ACLI、AfeI、AgeI、ApaI、ApalI、AscI、AsiSI、AvaI、AvaII、BaeI、BanI、BbeI、BceAI、BcgI、BfuCI、BglI、BmgBI、BsaAI、BsaBI、BsaHI、BsaI、BseYI、BsiEI、BsiWI、BslI、BsmAI、BsmBI、BsmFI、BspDI、BsrBI、BsrFI、BsshII、BssKI、BstAPI、BstBI、BstUI、BstZ17I、Cac8I、ClaI、DpnI、DrdI、EaeI、EagI、Eagl-HF、EciI、EcoRI、EcoRI-HF、FauI、Fnu4HI、FseI、FspI、HaeII、HgaI、HhaI、HincII、HincII、HinfI、Hinp1I、HpaI、HpaII、Hpy166ii、Hpy188iii、Hpy99I、HpyCH4IV、KasI、MluI、MmeI、MspA1I、MwoI、NaeI、NarI、NgonIV、Nhe-HFI、NheI、NlaIV、NotI、NotI-HF、NruI、Nt.BbvCI、Nt.BsmAI、Nt.CviPII、PaeR7I、PleI、PmeI、PmlI、PshAI、PspOMI、PvuI、RsaI、RsrII、SacII、SalI、SalI-HF、Sau3AI、Sau96I、ScrFI、SfiI、SfoI、SgrAI、SmaI、SnaBI、TfiI、TscI、TseI、TspMI及びZraIからなる群から選択される。

【0049】

特定の実施形態においては、メチル化感受性制限エンドヌクレアーゼはHhaIである。

【0050】

他の実施形態においては、メチル化依存性制限エンドヌクレアーゼは、McrBC、McrA及びMrrAからなる群から選択される。

【0051】

一実施形態においては、基準DNA区分は、天然のDNA又は人工的に合成したDNAであって、前記天然のDNA又は人工的に合成したDNA中の少なくとも1つの遺伝子座は、DNAプロファイリングに用いられる、コアショートタンDEMリピート(STR)遺伝子座を含む。

【0052】

他の実施形態においては、遺伝子座は、D16S539(配列番号1)、D7S820(配列番号2)、D13S317(配列番号3)、D5S818(配列番号4)、CSF1PO(配列番号5)、TPOX(配列番号6)、TH01(配列番号7)、vWA(配列番号8)、FGA(配列番号9)、D21S11(配列番号10)、D8S1179(配列番号11)、D18S51(配列番号12)、及びD3S1358(配列番号13)、PentaD(配列番号14)、PentaE(配列番号15)、及びアメロゲン(配列番号16及び17)、D2S1338(配列番号18)、D19S433(配列番号19)、ACTBP2SE33(配列番号20)、D10S1248(配列番号21)、D1S1656(配列番号22)、D22S1045(配列番号23)、D2S441(配列番号24)、及びD12S391(配列番号25)からなる群から選択されるヒト遺伝子座を含む。

【0053】

10

20

30

40

50

一実施形態においては、少なくとも1つの遺伝子座の増幅のためのプライマーは、

(1) PowerPlex (登録商標) 16 HS (カタログ番号DC2100、DC2101)、PowerPlex (登録商標) 16 (カタログ番号DC6530、DC6531)、PowerPlex (登録商標) 2.1 (カタログ番号DC6470、DC6471)、PowerPlex (登録商標) 16 BIO (カタログ番号DC6540、DC6541) 及びPowerPlex (登録商標) ES Systems (カタログ番号DC6730、DC6731) からなる群から選択される Promega Corporation の市販キット;

(2) SGM、SGM+、AmpFlSTR Identifier、AmpFlSTR Profiler、AmpFlSTR Profiler Plus、AmpFlSTR Profiler Plus ID、AmpFlSTR SEfiler、AmpFlSTR SEfiler Plus、AmpFlSTR Cofiler、AmpFlSTR Identifier Direct、AmpFlSTR Identifier Plus、AmpFlSTR NGM、AmpFlSTR Y-filer、及びAmpFlSTR Minifiler からなる群から選択される、Applied Biosystems の市販キット; 又は

(3) Investigator ESSplex、Investigator ESSplex SE、Investigator Nonaplex ESSplex、Investigator Hexaplex ESSplex、Investigator Triplex AFS QS、Investigator Triplex DSF、Investigator IDplex、Investigator Decaplex SE、Investigator HDplex、Investigator Argus X-12、Investigator Y-12 QS、Investigator DIPlex により入手できる。

【0054】

他の実施形態においては、1つの遺伝子座は、天然のDNAの全ての組織においてメチル化されていないことが知られている。一実施形態においては、1つの遺伝子座は、Hypo23、Hypo28 及びHypo33 からなる群から選択される。

【0055】

他の実施形態においては、本発明の方法は、以下の比の少なくとも1つを計算することを更に含む。

- (1) D3S1358 / D18S51、
- (2) D3S1358 / D7S820、
- (3) D3S1358 / Penta__D、
- (4) D3S1358 / TPOX、
- (5) D3S1358 / FGA、
- (6) TH01 / Penta__D、
- (7) D21S11 / D18S51、
- (8) D21S11 / D7S820、
- (9) D21S11 / Penta__D、
- (10) D21S11 / AMEL、
- (11) D21S11 / TPOX、
- (12) D21S11 / FGA、
- (13) D5S818 / D18S51、
- (14) vWA / D18S51、
- (15) D5S818 / Penta__E、
- (16) vWA / Penta__E、
- (17) D5S818 / D7S820、
- (18) D5S818 / Penta__D、
- (19) D5S818 / TPOX、

10

20

30

40

50

- (20) D5S818 / FGA、
 (21) D13S317 / D7S820、
 (22) D13S317 / Penta __ D、
 (23) D13S317 / TPOX、
 (24) D13S317 / FGA、
 (25) D16S539 / D7S820、
 (26) CSF1PO / D7S820、
 (27) vWA / D7S820、
 (28) D8S1179 / D7S820、
 (29) D16S539 / TPOX、
 (30) D16S539 / FGA、
 (31) CSF1PO / Penta __ D、
 (32) CSF1PO / TPOX、
 (33) vWA / Penta __ D、
 (34) AMEL / TPOX、
 (35) AMEL / FGA、
 (36) vWA / D8S1179、
 (37) vWA / TPOX、
 (38) vWA / FGA、
 (39) D8S1179 / TPOX、及び
 (40) D8S1179 / FGA。

10

20

【0056】

特定の実施形態においては、少なくとも1つの遺伝子座は、TPOX（配列番号6）又はFGA（配列番号9）である。

【0057】

他の実施形態においては、増幅した遺伝子座は90塩基対以下のサイズである。

【0058】

一実施形態においては、シグナル強度は、キャピラリー電気泳動の際に測定される、増幅産物の蛍光レベルである。

【0059】

一実施形態においては、上記に開示された方法の工程（B）及び（C）はリアルタイムPCRより実施される。すなわち、一実施形態においては、必要な全ての試薬、並びにDNA消化及びPCRによる増幅に必要なプライマー及び酵素は、同じ試験管又は容器内に一緒に存在する。

30

【0060】

一実施形態においては、消化されたDNAの選択された遺伝子座をPCR増幅するために蛍光標識されたプライマーが用いられ、各増幅産物のシグナル強度は、各増幅産物の蛍光レベルである。

【0061】

他の実施形態においては、前記方法は、蛍光標識されたプローブを増幅産物とハイブリダイズすることを更に含み、増幅産物のシグナル強度は、産物のプローブのハイブリダイゼーション後に測定する蛍光レベルである。

40

【0062】

別の実施形態では、本方法は、DNA試料の可能性のあるカテゴリに対する信頼性を割り当てることをさらに含む。この信頼性は、DNAの特定のカテゴリが、DNA試料のカテゴリとしての源を示している可能性を反映しており、その可能性は、以下によって算出される。

【0063】

（A）様々なDNAのカテゴリに対応する参照値に対するシグナル比を比較し、それぞれに対する確率スコアを割り当てる。確率スコアは、（i）可能な各カテゴリの参照値

50

に対するガンマ分布の確立関数を割り当て、ここで、(i i) 確率スコアは、観察されたシグナル比で、ステップ (A) において割り当てられたガンマ分布の確立関数の値と等しい；

(B) 分類毎に、ステップ (A) において得られた確率スコアの結果である、カテゴリ尤度スコアを計算する；及び

(C) 可能性のあるカテゴリ毎のカテゴリ尤度スコアを、全てのカテゴリ尤度スコアの合計値で除算し、尤度スコアを正規化する；

ここで、各カテゴリの信頼性は、正規化されたカテゴリの尤度スコアである。

【 0 0 6 4 】

別の実施形態では、本方法は、DNAプロファイリングとDNA分類を同時に行うことをさらに含む。

10

【 0 0 6 5 】

1つの実施形態では、DNA消化及びポリメラーゼ連鎖反応のステップは、単一のチューブで一緒に行われる。

【 0 0 6 6 】

1つの実施形態では、増幅されたゲノム遺伝子座が、可能性のある異なるカテゴリに対し明確なシグナル比を生成するために選ばれる。

【 0 0 6 7 】

本発明の別の態様は、(1) 特定のゲノム遺伝子座を増幅するためのプライマー；及び、(2) 反応バッファ(3) 制御DNA、(4) メチル化感受性制限エンドヌクレアーゼ及び/又はメチル化依存性制限エンドヌクレアーゼ、(5) 分類実施のためのプロトコルを記載した文書からなる群から選択される少なくとも1つ以上の試薬を含む、DNA試料を少なくとも2つの予め定められた分類に分け、関連する分類信頼性を得るためのキットである。本発明の1つの実施形態では、プロトコルを記載した文書には、DNAプロファイリング法に加え、DNA消化パラメータ、PCRサイクリングパラメータ、シグナル比解析、及び分類解析、並びに増幅された遺伝子座を含むがこれに限定されない、本明細書に開示の任意の方法を行うための指示書が含まれてもよい。

20

【 0 0 6 8 】

別の実施形態では、キットには、分類解析を行うための解析ソフトウェアがさらに含まれる。

30

【 0 0 6 9 】

本発明の別の態様は、DNA試料を精液又は非精液に分類し、関連する分類信頼性を得るためのキットであり、以下が含まれる。

【 0 0 7 0 】

(a) 以下のプライマーを含むプライマーミックス：

SD 1 f (A A G A G C C C A T C A G G C A G G T C) ；

SD 1 r (G T T T C T T G T C G A G C A G C A C G T G G A T G A T G) ；

SD 2 f (C T C C A G A A C T G G A A C T T C C T G) ；

SD 2 r (G T T T C T T A A C T T G G A G A C G A C G G C A T C) ；

SD 3 f (T G G A G G A C A A T G C C C T G G T G) ；

SD 3 r (G T T T C T T G G C T T C A C C T G C G A C C G T C T C) ；

SD 4 f (C C C T C C G A G T G G C C A G C A G) ；

SD 4 r (G T T T C T G A C C A C T G C C G T G G G A A T G) ；

SD 5 f (C T T C T C A G C C A A T G G G A A G A G) ；

SD 5 r (A C G T A G A A G G A C C C G A G G A C) ；

SD 6 f (T A C A G A C A A A T C A C T C A G C A G C) ； 及び

SD 6 r (G T T T C T T G T C T G A C A C T C G G T T G T A G G T A T T) ；

(b) 反応バッファ；

(c) H h a 1 制限エンドヌクレアーゼ；

(d) DNAポリメラーゼ

40

50

(d) 分類作業のためのプロトコルを記載した書類
別の実施形態では、キットには制御DNA試料がさらに含まれる。

【0071】

本発明の別の態様は、DNA試料を精液又は非精液として分類し、関連する分類信頼性を得るためのキットであり、以下からなる群から選択される少なくとも1対の順方向(f)及び逆方向(r)を含む

(1) SD1f (AAGAGCCCATCAGGCAGGTC) 及び SD1r (GTTCTTGTCGAGCAGCACGTGGATGATG);

(2) SD2f (CTCCAGA AACTGGAACTTCCCTG) 及び SD2r (GTTTCTTA AACTTGGAGACGACGGC ATC);

(3) SD3f (TGGAGGACA AATGCCCTGGTG) 及び SD3r (GTTCTTG GCTTCA CCTGCG ACCGTCTC);

(4) SD4f (CCCTCCGAGTGGCCAGCAG) 及び SD4r (GTTCTGACC ACTGCCGTGGGAATG);

(5) SD5f (CTTCTCAGCCA AATGGGAAGAG) 及び SD5r (ACGTAGAAGGACC CGAGGAC);

(6) SD6f (TACAGACA AATCACTCAGCAGC) 及び SD6r (GTTTCTTG TCTGACA CT CGGT TGTAGGTATT)。

【0072】

1つの実施形態では、プライマーミックスのプライマーの濃度は、0.6 µMのSD1f、0.6 µMのSD1r、1.75 µMのSD2f、1.75 µMのSD2r、1.25 µMのSD3f、1.25 µMのSD3r、1.75 µMのSD4f、1.75 µMのSD4r、1.75 µMのSD5f、1.75 µMのSD5r、0.9 µMのSD6f、及び0.9 µMのSD6rである。

【0073】

1つの実施形態では、反応バッファには、150 mMのTRIS-HCl、15 mMのMgCl₂、0.2 mMの各dntp、及び0.1 µg/µlのBSAが含まれる。

【0074】

1つの実施形態では、キットにはDNAラダーがさらに含まれる。

【0075】

1つの実施形態では、キットには分類解析を行うための解析ソフトウェアがさらに含まれる。

【0076】

本発明の別の態様は、DNA試料を精液又は非精液としてプロファイリングし、分類し、及び関連する分類信頼性を得るためのキットであり、以下を含む：

(a) 少なくとも1つの精液特異的遺伝子座を増幅するためのプライマー

(b) DNAプロファイリングに使用される少なくとも1つの遺伝子座を増殖するプライマー

(c) 反応バッファ

(d) Hha1制限エンドヌクレアーゼ

(e) DNAポリメラーゼ

(f) 分類実施のためのプロトコル文書。

【0077】

1つの実施形態では、キットには制御DNA試料がさらに含まれる。

【0078】

本発明の別の態様は、DNA試料をプロファイリングし、精液又は非精液として分類し、及び関連する分類信頼性を得るためのキットであり、以下を含む：

(a) 少なくとも1つの精液特異的遺伝子座を増幅するためのプライマー

(b) DNAプロファイリングに使用される少なくとも1つの遺伝子座を増幅するためのプライマー。

10

20

30

40

50

【0079】

1つの実施形態では、本明細書で開示されるキットにより増幅される精液特異的遺伝子座の少なくとも1つは、L68346遺伝子座である。1つの実施形態では、L68346由来の70bp精液特異的増幅産物を増幅するためのプライマーは、CAGCAACA G C A C C C A G C T T G (F A M) 配列を含む順方向プライマー及びC A C A G G C T C A G T C G C G G A T C 配列を含む逆方向プライマーである。

【0080】

1つの実施形態では、本明細書で開示されるキットにより増幅される精液特異的遺伝子座の少なくとも1つは、L16264遺伝子座である。1つの実施形態では、L16264由来の95bp精液特異的増幅産物を増幅するためのプライマーは、G G A C G A G T T A A C T T C C T T A A T T T C (F A M) 配列を含む順方向プライマー及びG T T T C T T C G C G G A A C C T G G T T T A A C T T C を含む逆方向プライマーである。

10

【0081】

別の実施形態では、反応バッファには、150mMのTRIS-HCl、15mMのMgCl₂、0.2mMの各dntp、及び0.1μg/μlのBSAが含まれる。

【0082】

別の実施形態では、キットには、(a)DNAラダー、(b)化学物質安全性データシート(MSDS)、及び(c)分類解析を行うための解析ソフトウェアのうち少なくとも1つがさらに含まれる。

20

【0083】

本発明の別の態様は、DNA試料を、血液、唾液、精液、又は皮膚表皮に分類し、関連する分類信頼性を得るためのキットであり、以下を含む：

(a)以下の通り表記された遺伝子座を増幅するための順方向プライマー及び逆方向プライマーを含むプライマーミックス

1. L91762 (順方向G C A G C A G G C C G C G G A G A A G (F A M) ; 逆方向A G C A G C T G T G C C G G G C C A G)

2. L68346 (順方向C A G C A A C A G C A C C C A G C T T G (J O E) ; 逆方向C A C A G G C T C A G T C G C G G A T C)

3. L50468 (順方向A G G A A A C C T C A G T A G C A A A A T T G (J O E) ; 逆方向G C G A G A C T T T A G G T G T G C A T C)

30

4. L14432 (順方向C G T A G G C T G C G G T G A G C T C (F A M) ; 逆方向G A T C C A T G C C C G C T G G G A T G)

5. L4648 (順方向C A G C C T A G A C G T C A A G T T A C A G (J O E) ; 逆方向A C G A C C T C C G G A T C C A A C T G)

6. L39664 (順方向C C C A G C T G G T T G G A C A T G T T G (F A M) ; 逆方向C A C T T C C T T C G T G G A C G C C)

7. L30139 (順方向G A G A A G C G G G A G G A T G A G A C (F A M) ; 逆方向C C G C A T C T C C T C C G T C C T G)

8. L55429 (順方向G C C T T C A G C A G G A A G T C C A C (J O E) ; 逆方向C C T G T G C C T C A C A C A G A C T C)

40

9. L62086 (順方向G T G C A T G G T G T C T G G T A C T T C (F A M) ; 逆方向G A A G C T C T C G T G G A C T A C T T G)

10. L76138 (順方向C A G C C T G C T C T T C A C T G C A G (J O E) ; 逆方向A G A G G C C G A T G A A G C C G T A G)

11. L15952 (順方向C T C C C T G A T T T A C G A C A A G T T C (F A M) ; 逆方向G A C A G T A T G C T G A T G C T T C T T G)

12. L36599 (順方向A A G G G C A G A G T T C C G C T G T C (F A M) ; 逆方向C G G A T G C A G G A G G A T C C T A G)

13. L26688 (順方向C G G A C C A G A T T G C T G G T C A C (J O E) ; 逆方向C G A C C T T G C C A G A T G T T T G A C)

50

14. L81528 (順方向AGCCTCATCCACACTGACCCAG (JOE)
); 逆方向TCAGAGCTCTCCTATCTGGAC)

15. L36556 (順方向GCCAGGCCGTTGATGATGAC (JOE)
); 逆方向GAATATGGAGCCCTGGGCAAG)

(b) 反応バッファ

(c) Hha1制限エンドヌクレアーゼ

(d) DNAポリメラーゼ

(e) 分類を行うためのプロトコル文書。

【0084】

別の実施形態では、キットは制御DNA試料をさらに含む。

10

【0085】

1つの実施形態では、反応バッファには、150mMのTRIS-HCl、15mMのMgCl₂、0.2mMの各dntp、及び0.1μg/μlのBSAが含まれる。

【0086】

別の実施形態では、キットには、(a) DNAラダー、(b) 化学物質安全性データシート(MSDS)、及び(c) 分類解析を行うための解析ソフトウェアのうち少なくとも1つがさらに含まれる。

【0087】

本明細書で開示する任意の方法における1つの実施形態では、DNA試料には、複数のDNA試料の混合物が含まれる。

20

【0088】

本発明の別の態様は、DNA試料間で異なるメチル化の距離度を算出するための方法であり、以下が含まれる

(A) 各DNA試料をメチル化感受性及び/又はメチル化依存性制限エンドヌクレアーゼで消化する;

(B) 少なくとも1つが制限遺伝子座である、少なくとも2つのゲノム遺伝子座を増幅する、消化された各DNAに対しPCRを行う;

(C) DNA試料毎に、各増幅産物のシグナルの強度を決定する;

(D) DNA試料毎に、遺伝子座により生成されるシグナルの強度間の「シグナル比」を算出する;

30

(E) 対応するシグナル比の定量的比較を行うことによりDNA試料間の異なるメチル化度を算出する。

【0089】

本方法の1つの実施形態では、距離度は、複数のDNA試料間のシグナル比間の絶対差の合計である。

【0090】

本方法の別の実施形態では、距離度は、複数のDNA試料のシグナル比間の差の2乗の合計の平方根である。

【0091】

本方法の1つの実施形態では、対象試料と参照となる健常者の試料との間で測定された距離は、病的状態の治療に必要な医薬品の量を示している。

40

【0092】

本方法の別の実施形態では、培養細胞から取得したDNA試料と参照試料との間で測定された距離は、細胞に対する継代培養プロセスの数を示している。

【0093】

本発明の別の態様は、以下からなる群から選択されるプライマーである

1. GCAGCAGGCCCGCGGAGAGAAG;

2. AGCAGCTGTGCGCGGGCCAG;

3. CAGCAACAGCACCCAGCTTG;

4. CACAGGCTCAGTTCGCGGATC;

50

- 5 . A G G A A A C C T C A G T A G C A A A A T T G ;
- 6 . G C G A G A C T T T A G G T G T G C A T C ;
- 7 . C G T A G G C T G C G G T G A G C T C ;
- 8 . G A T C C A T G C C C G C T G G G A T G ;
- 9 . C A G C C T A G A C G T C A A G T T A C A G ;
- 10 . A C G A C C T C C G G A T C C A A C T G ;
- 11 . C C C A G C T G G T T G G A C A T G T T G ;
- 12 . C A C T T C C T T C G T G G A C G C C ;
- 13 . G A G A A G C G G G A G G A T G A G A C ;
- 14 . C C G C A T C T C C T C C G T C C T G ;
- 15 . G C C T T C A G C A G G A A G T C C A C ;
- 16 . C C T G T G C C T C A C A C A G A C T C ;
- 17 . G T G C A T G G T G T C T G G T A C T T C ;
- 18 . G A A G C T C T C G T G G A C T A C T T G ;
- 19 . C A G C C T G C T C T T C A C T G C A G ;
- 20 . A G A G G C C G A T G A A G C C G T A G ;
- 21 . C T C C C T G A T T T A C G A C A A G T T C ;
- 22 . G A C A G T A T G C T G A T G C T T C T T G ;
- 23 . A A G G G C A G A G T T C C G C T G T C ;
- 24 . C G G A T G C A G G A G G A T C C T A G ;
- 25 . C G G A C C A G A T T G C T G G T C A C ;
- 26 . C G A C C T T G C C A G A T G T T T G A C ;
- 27 . A G C C T C A T C C A C A C T G A C C A G ;
- 28 . T C A G A G C T C T C C T A T C T G G A C ;
- 29 . G C C A G G C C G T T G A T G A T G A C ; 及び
- 30 . G A A T A T G G A G C C C T G G G C A G
- 31 . A A G A G C C C A T C A G G C A G G T C
- 32 . G T T T C T T G T C G A G C A G C A C G T G G A T G A T G
- 33 . C T C C A G A A C T G G A A C T T C C T G
- 34 . G T T T C T T A A C T T G G A G A C G A C G G C A T C
- 35 . T G G A G G A C A A T G C C C T G G T G
- 36 . G T T T C T T G G C T T C A C C T G C G A C C G T C T C
- 37 . C C C T C C G A G T G G C C A G C A G
- 38 . G T T T C T G A C C A C T G C C G T G G G A A T G
- 39 . C T T C T C A G C C A A T G G G A A G A G
- 40 . A C G T A G A A G G A C C C G A G G A C
- 41 . T A C A G A C A A A T C A C T C A G C A G C
- 42 . G T T T C T T G T C T G A C A C T C G G T T G T A G G T A T T
- 43 . G G A C G A G T T A A C T T C C T T A A T T T C
- 44 . G T T T C T T C G C G G A A C C T G G T T T A A C T T C 。

10
20
30
40

【 0 0 9 4 】

本発明の別の態様は、以下からなる群から選択される、特定のヒトゲノム遺伝子座を増幅するための1対のプライマーである

- 1 . L 9 1 7 6 2 (順方向 G C A G C A G G C C G C G G A G A A G (F A M) ;
逆方向 A G C A G C T G T G C C G G G C C A G) ;
- 2 . L 6 8 3 4 6 (順方向 C A G C A A C A G C A C C C A G C T T G (J O E) ;
逆方向 C A C A G G C T C A G T C G C G G A T C) ;
- 3 . L 5 0 4 6 8 (順方向 A G G A A A C C T C A G T A G C A A A A T T G (J O
E) ; 逆方向 G C G A G A C T T T A G G T G T G C A T C) ;
- 4 . L 1 4 4 3 2 (順方向 C G T A G G C T G C G G T G A G C T C (F A M) ; 逆

50

方向 G A T C C A T G C C C G C T G G G A T G) ;
 5 . L 4 6 4 8 (順方向 C A G C C T A G A C G T C A A G T T A C A G (J O E)
 ; 逆方向 A C G A C C T C C G G A T C C A A C T G) ;
 6 . L 3 9 6 6 4 (順方向 C C C A G C T G G T T G G A C A T G T T G (F A M)
 ; 逆方向 C A C T T C C T T C G T G G A C G C C) ;
 7 . L 3 0 1 3 9 (順方向 G A G A A G C G G G A G G A T G A G A C (F A M) ;
 逆方向 C C G C A T C T C C T C C G T C C T G) ;
 8 . L 5 5 4 2 9 (順方向 G C C T T C A G C A G G A A G T C C A C (J O E) ;
 逆方向 C C T G T G C C T C A C A C A G A C T C) ;
 9 . L 6 2 0 8 6 (順方向 G T G C A T G G T G T C T G G T A C T T C (F A M) 10
 ; 逆方向 G A A G C T C T C G T G G A C T A C T T G) ;
 10 . L 7 6 1 3 8 (順方向 C A G C C T G C T C T T C A C T G C A G (J O E)
 ; 逆方向 A G A G G C C G A T G A A G C C G T A G) ;
 11 . L 1 5 9 5 2 (順方向 C T C C C T G A T T T A C G A C A A G T T C (F A
 M) ; 逆方向 G A C A G T A T G C T G A T G C T T C T T G) ;
 12 . L 3 6 5 9 9 (順方向 A A G G G C A G A G T T C C G C T G T C (F A M)
 ; 逆方向 C G G A T G C A G G A G G A T C C T A G) ;
 13 . L 2 6 6 8 8 (順方向 C G G A C C A G A T T G C T G G T C A C (J O E)
 ; 逆方向 C G A C C T T G C C A G A T G T T T G A C) ;
 14 . L 8 1 5 2 8 (順方向 A G C C T C A T C C A C A C T G A C C A G (J O E 20
) ; 逆方向 T C A G A G C T C T C C T A T C T G G A C) ;
 15 . L 3 6 5 5 6 (順方向 G C C A G G C C G T T G A T G A T G A C (J O E)
 ; 逆方向 G A A T A T G G A G C C C T G G G C A G) .
 16 . S D 1 (順方向 A A G A G C C C A T C A G G C A G G T C (F A M) ; 逆方
 向 G T T T C T T G T C G A G C A G C A C G T G G A T G A T G) ;
 17 . S D 2 (順方向 C T C C A G A A C T G G A A C T T C C T G (F A M) ; 逆
 方向 G T T T C T T A A C T T G G A G A C G A C G G C A T C) ;
 18 . S D 3 (順方向 T G G A G G A C A A T G C C C T G G T G (F A M) ; 逆方
 向 G T T T C T T G G C T T C A C C T G C G A C C G T C T C) ;
 19 . S D 4 (順方向 C C C T C C G A G T G G C C A G C A G (F A M) ; 逆方向 30
 G T T T C T G A C C A C T G C C G T G G G A A T G) ;
 20 . S D 5 (順方向 C T T C T C A G C C A A T G G G A A G A G (F A M) ; 逆
 方向 A C G T A G A A G G A C C C G A G G A C) ;
 21 . S D 6 (順方向 T A C A G A C A A A T C A C T C A G C A G C (F A M) ;
 逆方向 G T T T C T T G T C T G A C A C T C G G T T G T A G G T A T T) ; 及び
 22 . L 1 6 2 6 4 (順方向 G G A C G A G T T A A C T T C C T T A A T T T C (F A M) ; 逆方向 G T T T C T T C G C G G A A C C T G G T T T A A C T T C) .

【図面の簡単な説明】

【0095】

【図1】組織を同定するアッセイを示す。(A)アッセイの概略図。(B)生化学的手順 40
 :メチル化遺伝子は、消化中は未変化のままであり、その後、PCRで効率的に増幅され、強いシグナルを生成する(遺伝子座A)一方で、非メチル化遺伝子座は消化され、その後、PCRで非効率的に増幅され、弱いシグナルを生成する(遺伝子座B)。シグナル比(SR:遺伝子座Aのrfu/遺伝子座Bのrfu)は、遺伝子座Aと遺伝子座Bとの間の異なるメチル化度を反映している。(C)遺伝子座1と遺伝子座2との間シグナル比は、血液、唾液、皮膚、及び精液において異なり、これらの組織の異なるメチル化パターンを反映している。(D)血液と精液との間のシグナル比(すなわち、シグナル)において観察された差は、異なるPCR、及び異なる量のインプットDNA(すなわちノイズ)から取得されたシグナル比において観察された差よりも程度が大きい。

【図2】組織のタイプが異なる組織の同定を示す。8つの試料の電気泳動図(4つの異な 50

る各組織から2つの試料)は、各組織タイプの観察された明確な増幅パターンを示すよう記載されている。

【図3】精液検知及びDNAプロファイリングの組み合わせを示す。(A、B)同一人物由来の精液(A)及び尿(B)の試料に対し組み合わせアッセイを行った電気泳動図。試料のProfiler Plusによるプロファイルは相同であり、組織源の違いは、2つの精液遺伝子座(矢印)の異なる増幅により示されている。(C)異なる組織タイプ由来の試料に対し行われた組み合わせアッセイのFAMチャンネルデータ。精液検知遺伝子座(矢印)間のシグナル比は、精液試料で25.04であり、その他全ての組織タイプでは0.1未満である。上のパネルには、参考のため未消化DNAが含まれている。(D)様々な比率の精液と唾液(異なる個人由来)の混合物に対して行った組み合わせアッセイのFAMチャンネルデータ。シグナル比は、混合物の精液のパーセントに相関している。

【図4】Hha1消化の評価を示している。異なる源のDNA試料に対し、組織同定実験で使用される同じ単一の消化増幅反応を行った。本実験において、遺伝子座のパネルは2つの遺伝子座から成っていた。すなわち、Hha1部位が欠落している未消化の制御遺伝子座(L98328)、及びこれらの組織において非メチル化である消化済み制御遺伝子座(SW14)であった。全ての試料は、未消化の制御遺伝子座が存在し、消化済み制御遺伝子座は全く存在しないことを示しており、両遺伝子座の存在を示した未消化試料と対照的に、Hha1により完全に消化されたことを示していた。

【図5】加齢試料を示している。20ヶ月前の血液及び精液のシミから抽出されたDNA試料に対し、独立型組織同定アッセイを試験した。両試料とも順調に増幅し、それらの新鮮な対応物と類似し、それぞれの源は解析ソフトウェアにより正しく同定された。

【図6】分解された試料のシミュレーションを示している。血液(上部)及び精液(下部)の試料は、DNase Iを用いて部分的に消化し、組み合わせられた精液検知及びプロファイリングアッセイで解析した。両試料とも得られたのは部分的プロファイルであったが、より小さな組織同定遺伝子座(D3S1358の上部チャンネルから左にかけて2つの遺伝子座がある)は、期待通りのパターンで順調に増幅し、アルゴリズムにより、これらの試料における精液の有無が正確に同定された。

【図7】表1を示している。

【図8】表2を示している。

【図9】表3を示している。

【図10】表4を示している。

【図11】表5を示している。

【図12】独立型精液検知アッセイを示している。異なる組織タイプ由来の6つのDNA試料の試料プロットが記載されている。全試料に対し正しい分類(精液対非精液)が行われた。試料毎に最も可能性の低いカテゴリの信頼性が示されている(例えば、「精液」のカテゴリに関しては、非精液のp値が示されている)。

【発明を実施するための形態】

【0096】

1. 概説

本発明は、遺伝子座特異的プライマーを用いるDNA源と商業的に利用可能な酵素との区別を可能とする方法及びアッセイに関する。進歩的アッセイの根本的態様は、特定のDNA源から増幅された少なくとも2つの遺伝子座から生成されるシグナルを比較することであり、それにより、1つの実施形態においては、天然由来であるか又は人工的であるかを示す数的比率が最終的には得られる。本発明のアッセイはまた、例えば、DNAの生理学的又は病理学的に異なる源を区別するため、及び異なる組織を区別するために使用され得る。

【0097】

アッセイで使用されるシグナル比は、特異的ゲノム遺伝子座におけるメチル化度と相関するが、任意のゲノム遺伝子座における実際のメチル化度は示さない。よって、本発明の仕組みでは、外部DNA種及び/又は制御の要件を除き、よって、アッセイの精度を簡素

10

20

30

40

50

化しかつ向上させる。

【0098】

よって、本明細書に記載の進歩的DNA分類アッセイは、高性能、複合的、正確、及び低コストな技術であり、DNA試料の分類が求められる任意の場面で適用可能である。よって、進歩的アッセイは、例えば、科学捜査を行う警察による利用、医療産業による診断及び治療目的の利用、保険業界による、遺伝情報差別禁止法（H.R.493）等、遺伝に関する対差別法に適合する請求であるかどうかを確認するための利用、刑事裁判及び民事裁判及び控訴審において、検察及び弁護士による証拠目的のための利用、及び、農業及び食品産業における、肉、穀物、並びにブドウの木やコーヒー豆の原木等、植物の完全性を確認するための利用等が可能である。本発明は、これらの非排他的だが代表的な用途のリストに限定されない。

10

【0099】

よって、本明細書で開示される方法の根本原則は、増幅されたゲノム遺伝子座間のシグナル強度の測定であり、増幅された遺伝子座間のシグナル強度の比率を生成するために、その後互いに対して行われるペアワイズ比較ある。例えば、遺伝子座A、B、C、及びDを全て、本明細書に記載の技術に従って増幅すれば、A、B、C、及びDそれぞれのシグナル強度を測定し、記録する。次に、AとB、AとC、及びAとDのシグナル強度をそれぞれ比較し、 A/B 、 A/C 、 A/D の組み合わせでそれぞれのシグナル強度比を算出する。次に、 B/C 及び B/D のシグナル強度比を算出し、以後も同様に続ける。

【0100】

これらの各シグナル強度比の値は、その後、供給源が既知のDNAの、既知の参照シグナル強度比の値と比較する。よって、例えば、供給源がヒトの精液であると判明しているDNAの場合、A、B、C、及びDの図示的遺伝子座のペアワイズ比等、遺伝子座のシグナル強度比についてはすでに知られており、あるいは、試験DNA試料の解析時に新たに確立することも容易にできる。よって、DNAカテゴリは、「精液」であり、及び、それら遺伝子座のシグナル強度比はそれぞれ、試験DNA試料の比較対象となり得る参照値である。

20

【0101】

従って、DNA試料由来の遺伝子座A、B、C、及びDの様々なシグナル強度比を確立した後、各比率を、特定の既知のDNAカテゴリの1つ以上の参照値、例えば精液DNA比值と比較することができる。特定のDNAカテゴリのシグナル強度比参照値により厳密に近似する、DNA試料から取得された任意の遺伝子座組み合わせの比率は、試験されたDNA試料が、比較時により厳密に近似する又は最も厳密に近似する特定のDNAカテゴリを供給源とする可能性が非常に高いことを意味している。よって、精液由来の A/B 遺伝子座のシグナル強度比の値と同じ、又は近似である、 A/B 遺伝子座の試験されたDNA試料から生成されるシグナルの強度比は、試験されたDNA試料が精液を供給源とする可能性が高いことを示している。多数の異なる遺伝子座において、及び多くの異なる参照カテゴリに対し同じ比較解析を行うことにより、試験されたDNA試料が特定の生物供給源由来であった可能性、又は特定の生物供給源由来ではなかった可能性が増す。

30

【0102】

同様に、試料に、唾液と血液、又は、唾液、血液、表皮及び精液等、異なる源由来のDNAの混合物が含まれるかもしれない場合、本明細書で開示する方法を実施することにより、試料内の異なるDNAカテゴリの存在を同定することが可能である。よって、試料に存在する複数の並びに単一のDNA源の同定は、本明細書で開示する方法及び試薬を用いて達成可能である。

40

【0103】

従って、本発明の「分類」方法はまた、組織同定アッセイともみなされ得る。1つの実施形態では、以下の段落で説明するように、組織同定アッセイはDNA試料の最も可能性の高い源組織を決定するために、組織間でメチル化の異なる遺伝子座のパネルを用いる。表1（図7）を参照のこと。アッセイのスキームは、図1Aに表されている。法医学的試

50

料由来のDNAは、例えば、Hha1メチル化感受性制限酵素で消化され、それにより、メチル化されない場合のみ、GCGC配列を認識するとDNAが切断される（但し、メチル化標的は未処理のままである）

その後、組織を同定する遺伝子座のパネルを、蛍光で標識したプライマーを用いて消化されたDNAからPCRにより増幅し、増幅産物の一定分量をキャピラリー電気泳動により分離する。Hha1で消化したDNAを伴う状況において、メチル化レベルのより高い遺伝子座はより効率的に増幅される。その理由は、より多くのDNA分子が消化から保護され、電気泳動で比較的強いシグナルを生成するからである（図1B、遺伝子座A）。逆に、メチル化度のより低い遺伝子座は、低効率で増幅され、電気泳動で比較的弱いシグナルを生成する（図1B、遺伝子座B）。

10

【0104】

本明細書で開示する自動化シグナル解析ソフトウェアによれば、電気泳動出力の解析が可能であり、組織同定遺伝子座に対応するアンプリコンに（rfuで）高さを割り当てる。よって、単一の遺伝子座の高さは、そのメチル化度と相関する。そうすると、上記の一般的方法で、共増幅遺された遺伝子座間のメチル化度比率を算出することができる。遺伝子座のペア毎に、第1遺伝子座と第2遺伝子座の高さの比率としてシグナル比を算出し、この比率を、対応する遺伝子座のメチル化度間の比率に反映させる。

【0105】

その後、算出された全てのシグナル比を単一の数値と合わせる。例えば、15の遺伝子座のパネルから105ペアワイズ比を算出することができる（例えば、遺伝子座1と2、遺伝子座1と3として等）。その後、それらを既知の組織源の試料のデータセットから取得された参照値のデータベースと比較することができる。組織同定アルゴリズムは、可能性のある組織源毎に尤度スコアを算出し、DNA試料が組織由来であるという可能性を反映し、また、アルゴリズムのアウトプットが組織である可能性が最も高いことを反映する。これらの比率及び比較から導き出す尤度及び確率スコアのアルゴリズム及び特定の計算については、本明細書のいずれかの箇所で開示する。

20

【0106】

実施例1で示すように、例えば、組織同定アッセイは50の試料に対して行われた。血液試料が14、唾液試料が14、精液試料が11、及び皮膚表皮試料が11で、アンプリコンの大きさが66~150bpsの範囲である15の組織同定遺伝子座のパネルを用いた。図2は、これらの8つの試料、すなわち、各組織タイプから2つずつの電気泳動図を示している。各組織タイプは、明確なメチル化プロファイルを有していた。例えば、0.04~0.53の範囲の精液試料中のL91762/L68346の遺伝子座比率は、その他の全ての組織試料（2.15~18.28；図8の表2を参照のこと）よりも高かった。よって、L91762/L68346の比率の低いのは、精液試料の特性であることが判明した。しかし、L76138/L26688の遺伝子座比率は、血液及び唾液において低く（0.08~1.54）、精液及び皮膚表皮において高かった（2.04~19.56；図8の表2を参照のこと）。よって、L76138/L26688の高い比率に付随したL91762/L68346の高い比率は、皮膚表皮試料の特性であった。

30

【0107】

本明細書で開示される組織同定アルゴリズムは、50の全試料の真の組織源を正しく同定した。さらに、組織同定遺伝子座のサブセットを用いたデータのさらなる解析により、15の遺伝子座のフルセットには重複があり、15の遺伝子座のうちわずか7つの遺伝子座を用いて（L91762、L68346、L50468、L14432、L30139、L15952、及びL26688）100%同定を達成することが判明した。

40

【0108】

従って、例証的な本実施例は、本発明の一般的な進歩的態様を裏付ける。すなわち、シグナル強度比の比較解析により、厳密かつ正確なDNA試料の同定及び分類を提供する。

【0109】

さらに、本発明の別の重要な態様は、特定の対象DNAのプロファイルリング以上のこ

50

とを行うよう、既存の商用DNAプロファイリングキットの有益性を容易に補充及び拡大し得ることである。本明細書で開示する進歩的アッセイを組み合わせ、例えば、下記に詳細を記すシグナル比アッセイをPromega社のPowerPlex（登録商標）16キットと組み合わせることで、一個人のDNA組成物をプロファイリングするだけでなく、プロファイルされたDNAが天然由来か又は人工的に合成されたものであるかを判断することも可能となる。別の実施形態では、DNAプロファイリングをDNA分類と組み合わせることで、DNAのプロファイリングとDNA試料の組織源の判断の両方が可能となる。

【0110】

例えば、本明細書に記載の1つのアッセイは、例えばPowerPlex16キット（Promega社）で、DNA試料プルに対し従来のプロファイリングを行うことと、DNAを天然由来か人工合成かに分類することもできる。例えば、以下の実施例6を参照のこと。

10

【0111】

本明細書に開示するように、分類とプロファイリングの組み合わせがいかに作用するのかを例証するという目的に限定し、DNAの2つの試料を解析する。すなわち、（1）対象Aの血液から抽出された天然DNA試料、及び（2）対象Aの实在のDNAをテンプレートとして、商用キット用いて、その少量から*in vitro*で複数の置換増幅により合成した人工的DNA試料である。

【0112】

さらに、本例証により、本発明の方法が既存の任意の方法よりもはるかに優れていることが示される。その理由は、従来のプロファイリングキットでは、天然由来DNAも人工的DNAも共に対象Aから採取したものである故に互いに同一であると同定していたが、本発明では、人工的DNA試料と天然DNA試料を区別することができるからである。従って、プロファイリングキットにより両試料の同一性が同定されるという事実にもかかわらず、本発明の進歩的シグナル強度比解析により、両試料を容易に分別し、一方を人工的DNA由来とし、他方を自然なDNA由来であるとプロファイリングする。

20

【0113】

さらに説明するために、最初に2つの試料をPowerPlex16でプロファイリングし、GeneMapperID-X等の従来のプロファイリングソフトウェアを用いて解析した。本手順のスキームを簡単に記述すると、（1）PowerPlex16プライマーミックスを用いて、DNA試料に対し複合的PCRを行い、（2）キャピラリー電気泳動装置で増幅産物を分離し、その後（3）アウトプットデータを、例えば、GeneMapperID-Xソフトウェアで解析する。本アッセイの最終産物が各試料のプロファイルとなる。2つの試料のプロファイルは同一である。図9A～Bを参照のこと。

30

【0114】

さらに、GeneMapperID-Xソフトウェアは、両試料が、変異を有しない、単一の供給源（すなわち、同一人物由来である）のプロファイルであると判断した。これは、人工的DNA由来のプロファイルが、天然DNA由来のプロファイルと同一であり得ることを示している。D. Frumkin, et al., *Authentication of forensic DNA samples, Forensic Sci. Int. Genet.* (2009), doi: 10.1016/j.fsigen.2009.06.009を参照のこと。これは、本明細書に参照により組み込まれる。

40

【0115】

その後また、DNAの両試料を、以下のスキームに基づき、プロファイリングと分類アッセイの組み合わせにより解析した。すなわち、DNA試料をHha1で消化させ、PowerPlex16プライマーミックスを用いて、Hyp23等の追加遺伝子座を増幅するためのプライマーを追加し、複合的PCRを行った。キャピラリー電気泳動装置で増幅産物を分離し、本明細書に開示のソフトウェアアルゴリズム等、キャピラリー解析用ソフトウェアでアウトプットデータを解析した。

50

【0116】

本アッセイの最終産物が各試料のプロファイルとなり、分類が割り当てられる。図9C及びDに見られるように、天然のDNAは、「天然」と割り当てられ、一方、人工的試料は「人工的」と割り当てられた。

【0117】

この特定の実施例においては、カテゴリの割り当ては3つのパラメータの解析により行われた。すなわち、(1)SR1(TOPX/D8S1179のシグナル比)、(2)SR2(D3S1358/Hyp023のシグナル比)、及び(3)RR(OCA2/D3S1358の代表的な比率)である。

【0118】

これらのパラメータの閾値は、表6に記載されている。

【0119】

【表2】

表6

	SR1	SR2	RR
天然試料の閾値	≥ 0.9	≥ 10	≥ 2
人工的試料の閾値	< 0.9	< 10	< 2

10

【0120】

これらのパラメータの観察された値、及び割り当てられたカテゴリは、表7に記載されている(天然DNAの閾値を超える値には色付けをした)

【0121】

【表3】

表7

	SR1	SR2	RR	カテゴリ
天然DNA試料	1.23	17.54	3.31	天然
人工的DNA試料	0.06	2.06	2.47	人工的

20

30

【0122】

カテゴリの割り当ては、以下のルールに従って行われた。

【0123】

観察されたパラメータ値が全て、天然DNAの各閾値を超えている場合、「天然」カテゴリに割り当て、そうでなければ「人工的」カテゴリに割り当てる。よって、本発明の進歩的シグナル強度比解析により、例えば、天然源対人工的源由来等、DNAの源を容易に同定することができ、DNAプロファイリング技術と合わせて、ゲノム試料の同定のための確実かつ洗練された方法を提供する。

【0124】

本明細書に記載される特定の組成物、方法、又は実施形態は、本明細書に開示される発明を例証することのみを意図している。当業者であれば、本明細書の教示を元に、これらの組成物、方法、又は実施形態の変形が存在することは容易に明らかとなり、よって、これらの変形も、本明細書で開示する本発明の一部として組み入れられることを意図している。

40

【0125】

本発明の実施において、分子生物分野における従来の多数の技術及びDNA組換えが使用される。これらの技術については、例えば、Current Protocols in Molecular Biology, Vols. I - III, Ausubel, E d. (1997); Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Ed. (Cold Sp

50

ring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989); DNA Cloning: A Practical Approach, Vols. I and II, Glover, Ed. (1985); Oligonucleotide Synthesis, Gait, Ed. (1984); Nucleic Acid Hybridization, Hames & Higgins, Eds. (1985); Transcription and Translation, Hames & Higgins, Eds. (1984); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning; the series, Meth. Enzymol., (Academic Press, Inc., 1984); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells, Miller & Calos, Eds. (Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1987); 及び Meth. Enzymol., Vols. 154 and 155, Wu & Grossman, and Wu, Eds. 等でそれぞれ説明されている。

10

20

30

40

50

【0126】

2. 定義

本発明の技術は、本明細書を通じて記載されるいくつかの定義を用いて本明細書に記載される。定義されないものに関しては、本明細書に記載される技術及び科学用語は全て、本発明の属する分野の当業者により一般的に理解されているのと同じ意味を概して有するものとする。本明細書で使用されているように、特に言及されない限りにおいて、単数形の「a」「an」及び「the」には、複数の言及が含まれる。よって、例えば、「1つの核酸(a nucleic acid)」は、「1つ以上の核酸」について述べている。

【0127】

本明細書で使用される「アレル(allele)」という用語は、DNAのセグメント、すなわち、同じ遺伝子座を占めるDNA配列の2つ以上の代替形態のうちの一つと関連する遺伝的変形であることを意図している。

【0128】

本明細書で使用される「人工的DNA」又は「人工的に合成されたDNA」又は「人工的核酸」という用語は、種々の *in vitro* 手法で合成される核酸のことを指している。本明細書には、*in vitro* でDNAを合成するための異なる方法の特性について開示される。*in vitro* で生成される核酸には、以下が含まれるがそれらに限定されない。

【0129】

1. 化学的に合成されたオリゴヌクレオチド
2. 標的配列のPCR増幅の産物
3. 標的の循環配列のローリングサークル増幅(RCA)の産物
4. 分子クローンの産物(例えば、大腸菌でクローン化されたプラスミド)
5. 1~4の任意の方法により、又はそれらの組み合わせにより生成された他のDNA断片から集めたDNA断片。係る集合体は、以下の任意の方法(又はそれらの組み合わせ)により達成される。すなわち、アニーリング、連結、重合である。集合化の方法にはまた、DNA分子の切断のステップ(例えば、制限エンドヌクレアーゼ、機械的せん断等)も含まれる
6. PCRによるゲノム全体の増幅(WGA)、及び/又は、プライマー伸長プレ増幅(PEP-PCR)、縮重オリゴヌクレオチドをプライマとするPCR(DOP-PCR)、T7ベースのDNA直線増幅(TLAD)、アダプター連結PCRを含む、連結仲介PCR(LMR)ベースのWGA法による産物
7. 複数の置換増幅(MDA)、及び制限並びに補助循環式ローリングサークル増幅(RCA-RCA)によるWGAの産物。Repli-G(Qigen社)及びGenoPhi(GE Healthcare社)の商用キットが本方法を採用している
8. 1~7の任意の方法による産物の混合物

9. 合成 (例えば、S s s lメチラーゼ) 後に、全産物又は一部産物が *in vitro* でメチル化される 1 ~ 8 の任意の方法による産物

10. 天然 DNA と混合される、1 ~ 8 の任意の方法による産物

11. 天然 DNA と混合される、9 の方法による産物。

【0130】

本明細書で使用される「生物試料」又は「試験試料」は、対象から抽出される、又は取得される任意の生物試料を指しているが、これに限定されない。試料には、DNA 又は RNA 等の核酸が含まれてもよい。ある実施形態では、試料は対象から直接回収するのではなく、例えば、犯罪現場又は性犯罪の被害者等、環境から回収される。係る試料の実施例には、体液、組織、細胞試料、臓器、バイオプシー等が含まれるが、これに限定されない。最適な試料には、血液、血漿、唾液、尿、精液、髪の毛等が含まれるが、これに限定されない。生物試料にはまた、血液の滴、乾燥した血痕、乾燥した唾液痕、乾燥した下着のシミ (例えば、下着、パッド、タンポン、おむつに残されたシミ)、衣服、デンタルフロス、耳ワックス、電気カミソリに残された髭、ガム、髪の毛、舌で舐めた封筒、爪、パラフィン包埋組織、死体組織、カミソリ、歯、歯ブラシ、つまようじ、乾燥したへその緒が含まれる。ゲノム DNA は、当業者に既知の方法により、係る試料から抽出され得る。(例えば、Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 に記載のプロトコルを使用して)。

10

20

【0131】

本明細書で使用される「キャピラリー電気泳動ヒストグラム」という用語は、蛍光プライマーでゲノム遺伝子座から増幅した PCR 産物のキャピラリー電気泳動から取得されるヒストグラムを指している。

【0132】

本明細書で使用される「メチル化」という用語は、血液、唾液、精液、皮膚表皮、鼻汁、口腔細胞、髪の毛、切り取った爪、月経性分泌物、腔細胞、尿、及び糞便等の組織の細胞の DNA において、少なくとも 80% のレベルでメチル化されている (すなわち、メチル化された DNA 分子が少なくとも 80% である) という意味である。

【0133】

本明細書で使用される「部分的にメチル化されている」という用語は、血液、唾液、精液、皮膚表皮、鼻汁、口腔細胞、髪の毛、切り取った爪、月経性分泌物、腔細胞、尿、及び糞便等の組織の細胞の DNA において、少なくとも 20 ~ 80% の間のレベルでメチル化されている (すなわち、メチル化された DNA 分子が 20 ~ 80% の間にある) という意味である。

30

【0134】

本明細書で使用される「非メチル化」という用語は、血液、唾液、精液、皮膚表皮、鼻汁、口腔細胞、髪の毛、切り取った爪、月経性分泌物、腔細胞、尿、骨及び糞便等の組織の細胞の DNA において、20% 未満のレベルでメチル化されている (すなわち、メチル化されている DNA 分子が 20% 未満である) という意味である。本明細書で提供される方法により、血液、唾液、精液、皮膚表皮、鼻汁、口腔細胞、髪の毛、切り取った爪、月経性分泌物、腔細胞、尿、骨及び糞便等の様々な組織及び細胞タイプにおける核酸遺伝子座のメチル化形態と非メチル化形態を区別されることが示された。

40

【0135】

「判断する」「測定する」「評価する (assessing)」「アッセイする」及び「評価する (evaluating)」は、量的又は質的測定の任意の形式を指すために、また特徴、特性、又は特長の存在の有無を判断することを含むために、同じ意味を表す用語として使用される。「存在を評価する」には、存在するか否かの判断に加えて、存在するものの量の判断も含まれている。

【0136】

50

本明細書で使用される「法医学」又は「法科学」という用語は、法制度の下、捜査対象となった人物への容疑に対し答えを出すための手法の広範な応用を指している。例えば、犯行現場に残された証拠とDNAが合致するかもしれない容疑者の特定、冤罪被害者の解放、犯罪及び大災害の犠牲者の特定、又は親子及びその他の家族との関係の鑑定等である。

【0137】

「遺伝子座 (locus)」(複数形: loci) という用語は、遺伝子又はその他の遺伝要素の染色体上の位置を指している。遺伝子座はまた、場所にあるDNAをも意味する。所与の遺伝子座におけるDNA配列の異型はアレルと称される。遺伝子座のアレルは、相同の染色体上の同一部位に存在する。制限遺伝子座は、アッセイで使用される制限酵素の認識配列を有する遺伝子座である。本明細書で使用される消化された制御遺伝子座という用語は、可能性のある全DNAカテゴリにおいて非メチル化であると判明しているゲノム遺伝子座のことを指している。本明細書で使用される未消化の制御遺伝子座という用語は、可能性のある全DNAカテゴリにおいてメチル化されていると判明しているか、又は、アッセイで使用されるエンドヌクレアーゼの認識配列が欠落しているゲノム遺伝子座のいずれかを指している。

10

【0138】

本明細書で使用される「天然DNA」又は「天然核酸」は、対象の細胞から直接抽出され、修飾も増殖もされていない核酸のことを指しているが、これに限定されない。

【0139】

本明細書で使用される「核酸」は、ゲノムDNA、cDNA、hnRNA、mRNA、rRNA、tRNA、切断された核酸、及び、ミトコンドリア等の細胞内の細胞小器官から取得された核酸を指しているが、これに限定されない。さらに、核酸には、合成された核酸又は *in vitro* で転写された産物も含まれるが、これに限定されない。

20

【0140】

本明細書で使用される「核酸ベースの解析手順」という用語は、DNAプロファイリング等、核酸の解析に基づく任意の同定手順のことを指している。

【0141】

本明細書で使用される「ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) スタッター (stutter)」という用語は、主要PCR産物と共に取得されるPCR副産物のことを指している。これらの「スタッター (stutter)」副産物は、STR配列のPCR増幅の間に生成される、複数の反復ユニットにより、通常はより短い。これらの人工産物が形成されるメカニズムは理解できるが、PCR技術の本質的限界を示しており、よって、これらの偽性産物を除去するための有効法はいまだ発見されていない (Olejniczak M, Krzyzosiak WJ., *Electrophoresis*, 2006 Oct; 27(19): 3724-34)。本明細書で使用される「-1スタッター」という用語は、その関連するアレルよりも小さな、1つの反復ユニットであるスタッター副産物を指している。同様に、「+1スタッター」は、その関連するアレルよりも大きい、1つの反復ユニットであるスタッター副産物を指している。「-1スタッター断片」という用語は、真のアレルピークの高さ(又は領域)で除算された-1スタッターピークの高さ(又は領域)を指している。同様に、「+1スタッター断片」は、真のアレルピークの高さ(又は領域)で除算された+1スタッターピークの高さ(又は領域)を指している。

30

40

【0142】

「制限並びに補助循環式ローリングサークル増幅 (RCA-RCA)」という用語は、ほぼ完全にゲノムを網羅しつつ、分解かつ増幅されたゲノム間のアレル的違いをも保持する、ゲノム全体の増殖手順を指している。RCA-RCAは、ローリングサークル増幅を受け入れられるゲノム配列を生成するために、制限消化及びゲノム全体の環状化を利用する。

【0143】

本明細書で使用されている「STRプライマー」という用語は、PCRによる生物試料

50

由来の標的核酸配列を増幅するために使用され得る、購入可能な、又はラボで生成された任意のヌクレオチドプライマーのことを指している。約150万個の非CODIS STR遺伝子座が存在する。上記の非制限的例として、以下のウェブサイトに記載されており (www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/str_ref.htm)、現在、化学、法医学及びそれ以外の分野で用いられているSTRには3156の参照が含まれている。公開されているプライマー配列に加えて、STRプライマーは、何百ものSTR遺伝子座の増幅のための商用キット(例えば、ABI Prism Linkage Mapping Set-MD10(Applied Biosystems社))、及び何千ものSNP遺伝子座の増幅のための商用キット(例えば、Illumina BeadArray linkage mapping panel)から取得してもよい。本明細書で使用されている「CODIS STRプライマー」という用語は、FBIの「Combined DNA Index System」により指定された13のコアSTR遺伝子座のうち任意のコアSTR遺伝子座、特に、TH01, TPOX, CSF1PO, VWA, FGA, D3S1358, D5S818, D7S820, D13S317, D16S539, D8S1179, D18S51, 並びにD21S11、及びアメロゲニン遺伝子座の反復配列を増幅するよう指定されているSTRプライマーのことを指している。

10

【0144】

本明細書で使用されている「シグナル比」という用語は、2つの遺伝子座の増幅から得られるシグナルの強度間の比率を指している。

20

【0145】

3. 天然DNA試料と人工DNA試料とを区別する方法

1つの態様では、本発明は、天然DNA試料と人工DNA試料とを区別する方法を提供する。本発明の一般的スキームは以下の通りである。本方法では、インプットとしてDNA試料を受理する。DNAに対し、1つ以上の生化学的ステップを含む手順を施し、その後シグナル検知を行う。手順の最後のステップにおいて、DNAが天然か人工的かを判断するために、シグナルを解析する。別の態様では、本発明は、DNAプロファイルが天然DNAのものであることを認証するための方法を提供する。本発明の一般的スキームは以下の通りである。本方法は、インプットとして、プロファイリング(例えば、Identifilerで)を経たDNA試料を受理する。DNA試料に対し、1つ以上の生化学ステップを含む認証手順を施し、その後シグナル検知を行う。手順の最後のステップで、DNA試料のプロファイリングと認証の双方から得たデータを解析する。シグナル解析により、DNA試料から得たプロファイルが、天然(*in vivo*)DNAを表しているか、又は人工的(*in vitro*)DNAを表しているかどうかを判断する。

30

【0146】

様々な態様において、本発明の方法は、DNAプロファイルが天然DNAを表していることを認証することに関する。本方法は、嫌疑のかかったDNA試料、例えば、犯罪現場で発見された血液試料から採取されたDNAに利用される。核酸(例えばDNA)の生物試料からの単離は、当業者に周知の様々な方法で達成可能である(例えば、Sambrook et al, (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, New Yorkを参照のこと)。天然DNAと人工的DNAの区別、又はDNAプロファイルが天然DNAを表しているかどうかの判断は、以下のセクションに記載されるのを含む、様々な戦略を用いて達成され得る。

40

【0147】

4. メチル化

ヒトゲノムのメチル化は、5-メチルシトシンの形で起こり、CG配列の一部であるシトシン残基に限定されている(他の配列の一部であるシトシン残基はメチル化されない)。

【0148】

50

ヒトゲノムのCGジヌクレオチドは一部メチル化されるが、メチル化されない部分もある。さらに、メチル化は、細胞及び組織特異的であり、その結果、特定のCGジヌクレオチドは、ある細胞においてメチル化するが、同時に異なる細胞においては非メチル化であり得、又は、ある組織においてメチル化するが、同時に異なる組織においては非メチル化であり得る。特定の遺伝子座におけるメチル化は細胞により異なるため、複数の細胞（例えば、法医学試料）から抽出されたDNAのメチル化状態を解析する時、シグナルが混合し、様々な比率でメチル化シグナル及び非メチル化シグナルの双方が示される可能性がある。本発明者は、あるゲノム領域においては、全てのCG遺伝子座が恒常的にメチル化することを発見した。これらの領域は表1及び本明細書で「配列」と題したセクションに提供されている。本発明者はまた、あるゲノム領域では、全てのCG遺伝子座は部分的にメチル化することを発見した。これらの領域は表1及び本明細書で「配列」と題したセクションに提供されている。本発明者はまた、ある領域では、全てのCG遺伝子座が恒常的に非メチル化であることを発見した。これらの領域は表1及び本明細書で「配列」と題したセクションに提供されている。本発明者はまた、恒常的にメチル化するCG遺伝子座、部分的にメチル化するCG遺伝子座、及び恒常的に非メチル化であるCG遺伝子座を含む、隣接するゲノム領域を発見した。これらの領域は表1及び本明細書で「配列」と題したセクションに提供されている。これらは、ゲノム遺伝子座のメチル化度を判断するための幾つかの異なる方法である。通常使用される方法の実施例は、バイサルファイトシーケンシング法、メチル化特異的PCR法、及びメチル化感受性エンドヌクレアーゼ消化である。さらに、DNAメチル化データの取得又は蓄積のために、様々なデータ源を利用でき、例えばMetDB(<http://www.metdb.net>)等により、これらのデータを容易に一般公開できる。

10

20

【0149】

核酸のメチル化度を判断するための代表的な方法には以下が含まれるが、これに限定されない。

【0150】

バイサルファイトシーケンシング法：バイサルファイトシーケンシング法は、メチル化のパターンを判断するためのバイサルファイト処理されたDNAのシーケンシングである。本方法は、ソジウムバイサルファイトでDNAを処理すると、非メチル化シトシン残基がウラシルに変換するが、メチル化シトシン残基には影響が及ばないという事実に基づいている。ソジウムバイサルファイトによる変換の後、DNAの特定の領域がPCRにより増幅され、PCR産物が配列する。ポリメラーゼ連鎖反応において、ウラシル残基は、あたかもチミン残基であるかのように増幅されるため、オリジナルDNAの非メチル化シトシン残基は、PCR産物配列においてチミン残基として発現し、オリジナルDNAのメチル化シトシン残基は、PCR産物配列においてシトシン残基として発現する。

30

【0151】

5. メチル化特異的PCR

メチル化特異的PCRは、重亜硫酸塩配列決定法と同じように、重亜硫酸塩処理したDNA上で実施されるが、所望のゲノム領域を配列する必要がないメチル化解析の方法である。代わりに、重亜硫酸塩処理したDNA中の選択領域が、同一のゲノム標的にアニールするよう設計された2セットのプライマーを使用したPCRによって増幅される。プライマー対は、未変換の5-メチルシトシンのみを補完する配列を含むことにより「メチル化特異的」であるよう、また逆に、メチル化されていないシトシンから転換されたチミンを補完して「非メチル化特異的」であるよう設計される。メチル化は、増幅達成における異なるプライマー対の相対的効率により決定される。

40

【0152】

本発明との関係において、メチル化特異的PCRが、PCRによって増幅されたゲノム領域全体ではなく、プライマー配列中のCGジヌクレオチドのみのメチル化レベルを決定するということを理解されるべきである。従って、増幅配列中には存在するが、プライマー配列中には存在しないCGジヌクレオチドは、CG遺伝子座の一部ではない。

50

【 0 1 5 3 】

6. メチル化感受性エンドヌクレアーゼ消化

メチル化感受性エンドヌクレアーゼによるDNAの消化は、重亜硫酸塩転換を実施する必要なく、ゲノムDNAに直接応用し得るメチル化解析の方法である。この方法は、メチル化感受性エンドヌクレアーゼが、メチル化されたDNAを未変化のまま保ちつつ、メチル化されていないDNAのみを消化するという事実に基づいている。消化の後、メチル化レベル、ゲル電気泳動、及び特定の遺伝子座のPCR増幅を含む、多様な方法によってDNAのメチル化レベルを解析し得る。

【 0 1 5 4 】

メチル化感受性エンドヌクレアーゼ消化に基づく方法において、各CG遺伝子座は、方法に使用されたメチル化感受性制限エンドヌクレアーゼの認識配列の一部である、1又は複数のCGジヌクレオチドからなる。増幅されたゲノム領域中に存在するが、エンドヌクレアーゼの認識配列中には存在しないCGジヌクレオチドは、CG遺伝子座の一部ではない。

10

【 0 1 5 5 】

一実施形態において、検知された1又はつ以上のCG遺伝子座は、天然DNAにおいて部分的にメチル化されるが、人工DNAにおいてはメチル化されないだろう。部分的メチル化は、調査されている位置において、TとCの混合物中に起こることが期待されるだろう。ハイブリダイゼーションは、ヘテロ接合性のSNP検知と同様に、T特異的プローブ/プライマー、及びC特異的プローブ/プライマーの双方に観測されるだろう。相対量のハイブリダイゼーションを使用して、メチル化の相対量を決定してもよい。あるいは、CとT双方が、重亜硫酸塩配列決定法によって測定されるだろう。あるいは、メチル化された、又は部分的にメチル化された増幅産物に対応する蛍光シグナルを、検知することもできる。

20

【 0 1 5 6 】

7. 本シグナル比アッセイの概要

上述のとおり、本発明の1つの特定のアッセイは、制限消化されたDNAにポリメラーゼ連鎖反応を実施することで生成された、一組の遺伝子座特異的な増幅産物からのシグナル強度の定量的比較に關与する。図1A、B参照。強度の数的比率は、例えばDNA試料が精液又は非精液組織から採取されたかどうかなど、鑄型DNAのカテゴリに対応する。例えば、一実施形態において、遺伝子座1及び遺伝子座2は、蛍光標識したプライマーを使用して増幅し、電気泳動により分離することができ、シグナルの強度は、遺伝子座に対応するピークの相対蛍光単位(rfu)である。図1B、C参照。シグナルの強度は、ソースDNA鑄型から採取した遺伝子座1及び遺伝子座2の増幅の成功度に対応する。2つの増幅産物間のrfuを比較することにより、増幅産物量の比率を反映する比率である、シグナル比を算出することができる。

30

【 0 1 5 7 】

しかしさらに、本アッセイの1つの態様は、多様なDNAカテゴリからの、期待されるシグナル比の前決定を含む。従って、解析に付される鑄型DNAは、定量型PCR増幅プロトコルに繰り返し付す前に、まずメチル化感受性制限エンドヌクレアーゼで消化される。もし、多様なDNAカテゴリにおける2つの遺伝子座ペア中の制限認識配列部位でのメチル化レベルが既知であれば、当業者は、それぞれのカテゴリの遺伝子座ペアの増幅産物の期待されるシグナル比を予測し得る。あるいは、メチル化レベルが未知であっても、既知のカテゴリの試料にアッセイを実施することにより、当業者は経験的に、多様なDNAカテゴリにおけるゲノム遺伝子座ペア間のシグナル比を決定し得る。

40

【 0 1 5 8 】

この前提に基づき、本発明のアッセイは、メチル化感受性及び/又はメチル化依存性酵素でDNA試料を消化すること、消化されたDNAにPCR増幅反応を実施する事、及び遺伝子座特異的な増幅産物から得たシグナルの強度を決定する事を含む。前述のとおり、シグナルの強度は、蛍光PCRを使用することにより、定量化又は測定することすること

50

ができる。DNA試料のカテゴリ決定は、測定されたシグナル比を既知のカテゴリのDNA試料から得た参照比率と比較すること、及びどのカテゴリが測定された比率に最もよく対応するかを決定することにより実施される。

【0159】

この特定のシグナル比アッセイは、メチル化の絶対分率、又は選択された遺伝子座のレベルの測定値を、同定又は取得することに依存しない。さらに、この特定のシグナル比アッセイは、使用されたプライマー対の効率に依存せず、プライマー対の両方が同様の効率を有することを必要とせず、鋳型DNAの入力量に依存せず、特定のサーモサイクラー機器及び反応条件に依存しない。より適切には、前記アッセイは、異なる遺伝子座におけるメチル化レベルの比率に対応する、2つのシグナル間の比率を決定する。このようにして、試料中の出発DNA材料の量又は濃度は、解析には無関係であり、出力結果を歪めるものではない。すなわち、PCRにどれだけのDNAが鋳型として使用されたかにかかわらず、またサーモサイクラー上で実施する増幅サイクルの数にかかわらず、第1遺伝子座と第2遺伝子座間のシグナルレベルの比率は一定となる。例えば、遺伝子座1と2間のシグナル比10は、入力DNAが、0.9及び0.09（遺伝子座1においてメチル化90%、及び2において9%）のメチル化レベルを示しても、又は0.5及び0.05（遺伝子座1でメチル化50%、及び2で5%）のメチル化レベルを示しても、同一のままとなる。別の実施例においては、遺伝子座1と2の間のシグナル比10は、反応で使用されたDNA鋳型の量にかかわらず、同一のままとなる。

10

【0160】

本発明のアッセイが、いかなるゲノム遺伝子座でのメチル化レベルの決定にも依存せず、またいかなる外部制御も必要としないという事実により、アッセイは、より正確で、経費効率が良く、そして少量のDNA試料にも適用可能となり得る。

20

【0161】

法医学的組織同定との関係において、本発明のアッセイは、実施されている特定の組織同定の課題に関わらず同一な（パネル特異的なプライマーの使用を除く）、標準化された方法であり、標準的な法医学的方法及び機器のみを必要とし、従ってアッセイの自動化や、法医学研究施設への容易な統合が可能となる。

【0162】

さらに、本発明の構成は、組織同定とDNA型鑑定を単一のアッセイに複合することを可能にする。

30

【0163】

本発明のアッセイが、消化及び増幅を同一の反応で実施するという事実は、複雑性（必要とされるチューブ及びアッセイのピペット工程の数）を最小化し、それによって混入及び/エラーのリスクを最小化する。

【0164】

従って本発明のアッセイは、一例としては、天然DNAと、PCR、化学的合成、又は多置換増幅(MDA)などによって*in vitro*で合成された人工DNAを区別するために使用し得る数的比率の形で、有用な生学的マーカーを提供する。この例証的なアッセイのより具体的な詳細を以下に記す。

40

【0165】

8. 遺伝子座特異的増幅のためのプライマー特性

従って、本発明の1つの態様は、例えば、遺伝子座#1対遺伝子座#2；遺伝子座#1対遺伝子座#3；遺伝子座#1対遺伝子座#4；遺伝子座#2対遺伝子座#3、遺伝子座#2対遺伝子座#4、などの連続した遺伝子座ペア間の比率を算出するために、蛍光PCRによって生成された複数のDNA遺伝子座増幅産物の蛍光強度が互いに比較される「シグナル比」を得ることである。天然に対する人工の性質のDNA試料を検査するためにこの技術を使用する場合、シグナル比増幅反応で使用されるプライマーは、天然DNAにおいて異なってメチル化された遺伝子座ペアを増幅するように選択される（例えば、天然DNAにおいて、第1は90%メチル化され、第2は30%メチル化された、など）。

50

【 0 1 6 6 】

(1) と (2) の 2 つの 遺 伝 子 座 を 増 幅 す る た め に、 ど の 2 組 の プ ラ イ マー (第 1 ペア 及 び 第 2 ペア) を 使 用 す る か の 選 択 に 関 す る 1 つ の 考 慮 は、 *i n v i v o* D N A に お い て、 2 つ の 遺 伝 子 座 が 異 な っ て メ チ ル 化 さ れ た 程 度 で あ る。 従 っ て、 遺 伝 子 座 (1) が、 遺 伝 子 座 (2) に 比 較 し て よ り メ チ ル 化 さ れ て い る 遺 伝 子 座 ペア は、 シ グ ナ ル 比 増 幅 ア ッ セイ の た め の プ ラ イ マー を 設 計 す る た め に 使 用 し 得 る 遺 伝 子 座 の 例 で あ る。

【 0 1 6 7 】

9 . ゲ ノ ム 遺 伝 子 座 の 選 択

1 . 推 定 遺 伝 子 座 の 選 択 は、 3 つ の 様 式 の う ち い ず れ か に お い て 実 施 す る こ と が 可 能 である。 (i) 文 献 に お い て、 適 切 な カ テ ゴ リ (例 え ば 異 な る 組 織 な ど) に お い て 異 な っ て 発 現 さ れ る (m R N A デー タ) こ と が 示 さ れ た、 遺 伝 子 の 転 写 開 始 部 位 に 最 も 近 い 遺 伝 子 座 を 選 択 す る。

(i i) 文 献 に お い て、 異 な る カ テ ゴ リ 間 で (例 え ば 組 織 な ど) 異 な っ て メ チ ル 化 さ れ る こ と が 示 さ れ た 遺 伝 子 座 を 選 択 す る。

(i i i) ラ ン ダ ム な ゲ ノ ム 遺 伝 子 座 を 選 択 す る。

2 . 推 定 遺 伝 子 座 の た め の プ ラ イ マー を 設 計 す る。

3 . 推 定 遺 伝 子 座 の 「 情 報 性 」 を 経 験 的 に 試 験 す る。 そ れ ぞ れ の 推 定 遺 伝 子 座 に 対 し、 推 定 遺 伝 子 座 と も う 1 つ の 推 定 遺 伝 子 座 の 間、 あ る い は、 推 定 遺 伝 子 座 と 未 消 化 制 御 遺 伝 子 座 の 間 の シ グ ナ ル 比 を 算 出 す る。

4 . 前 記 ア ッ セイ で 使 用 す る た め に 「 情 報 価 値 の あ る 」 遺 伝 子 座 (例 え ば、 そ の シ グ ナ ル 比 が、 異 な る D N A カ テ ゴ リ に お い て、 有 意 に 異 な る 遺 伝 子 座) を 選 択 す る。

【 0 1 6 8 】

1 0 . メ チ ル 化 感 受 性 制 限 エ ン ド ヌ ク レ アー ゼ

本 発 明 の 方 法 の 第 2 の 考 慮 は、 メ チ ル 化 の 状 況 に よ っ て、 メ チ ル 化 感 受 性 及 び / 又 は メ チ ル 化 依 存 性 制 限 エ ン ド ヌ ク レ アー ゼ に よ っ て 切 断 又 は 消 化 さ れ て い な い 遺 伝 子 座 を 選 択 す る こ と で あ る。 例 え ば、 も し そ の 遺 伝 子 座 に お け る D N A の 認 識 配 列 が メ チ ル 化 さ れ て い て、 D N A 鎖 を 切 断 す る こ と が 可 能 な け れ ば、 エ ン ド ヌ ク レ アー ゼ が 選 択 さ れ る。 こ の よ う に、 メ チ ル 化 さ れ た 遺 伝 子 座 (1) と、 及 び メ チ ル 化 さ れ て い な い 遺 伝 子 座 (2) の 関 係 に お い て、 H h a I 又 は H p a I I の よ う な エ ン ド ヌ ク レ アー ゼ は、 遺 伝 子 座 (1) を 消 化 し な い が、 遺 伝 子 座 (2) は 消 化 す る。 従 っ て、 シ グ ナ ル 比 ア ッ セイ に お け る 増 幅 の た め の 遺 伝 子 座 の 選 択 は、 各 遺 伝 子 座 内 の メ チ ル 化 感 受 性 制 限 エ ン ド ヌ ク レ アー ゼ 認 識 配 列 の 存 在 も 考 慮 し て よ い。

【 0 1 6 9 】

次 い で 順 方 向 及 び 逆 方 向 プ ラ イ マー は、 遺 伝 子 座 の 認 識 配 列 に 隣 接 す る D N A 領 域 に ア ニー ル す る よ う 設 計 さ れ 得 る。

【 0 1 7 0 】

従 っ て、 メ チ ル 化 感 受 性 酵 素 の 場 合、 も し 遺 伝 子 座 が メ チ ル 化 さ れ て い れ ば、 遺 伝 子 座 は (A) 消 化 さ れ な い が、 (B) 増 幅 さ れ る。 逆 に、 も し 遺 伝 子 座 が メ チ ル 化 さ れ て い な い け れ ば、 遺 伝 子 座 は (A) 消 化 さ れ る が (B) 増 幅 さ れ な い。 メ チ ル 化 依 存 性 酵 素 の 場 合、 状 況 は こ の 逆 と な る。

【 0 1 7 1 】

1 1 . シ グ ナ ル 比 ア ッ セイ の 優 位 性

本 発 明 の シ グ ナ ル 比 ア ッ セイ は、 メ チ ル 化 解 析 の 他 の ア プ ロ ー チ と 比 べ て い く つ か の 優 位 性 と 利 点 を 有 し、 従 っ て 当 業 者 は、 こ の シ グ ナ ル 比 ア ッ セイ を 利 用 し 得 る、 多 様 で 有 利 な 使 用 方 法 を 認 識 す る だ ろ う。 例 え ば、 ア ッ セイ は、 鋳 型 D N A の 濃 度、 サ ー モ サ イ ク ラー の 製 造 元、 及 び P C R 条 件 に お け る 変 化、 及 び 阻 害 剤 の 存 在 の 結 果 と し て 変 動 す る ア ン プ リ コ ン シ グ ナ ル レ ベ ル の 絶 対 強 度 に 依 存 す る 場 合 に 固 有 の、 多 様 な 「 ノ イ ズ 」 因 子 に 対 し て 非 感 受 性 で あ る。 代 わ り に、 ア ッ セイ で 算 出 さ れ る メ チ ル 化 比 率 は、 そ の よ う な 因 子 に 依 存 し な い。 と い う の は、 解 析 さ れ る 2 つ の 遺 伝 子 座 が 同 一 の 反 応 に お い て 共 増 幅 さ れ、 従 っ て そ の よ う な 不 同 性 の 影 響 を 受 け や す い か ら である。 こ の よ う に、 本 発 明 の 方 法 は

、ゲノム標的又はアンプリコンの絶対的定量化を必要とせず、またアッセイは、検量線又はいかなる外部制御の必要もない、単一の独立型反応である。

【0172】

前記シグナル比アッセイは、単一の生化学反応においてごく少量のDNAで実施し得るため、例えば、試料が天然又は人工DNAを含有するかどうかなどを証明するための、安価で、迅速で、かつ強力な方法である。本発明の方法の意図の重要な1つの特徴は、DNA型鑑定のような、他のPCRベースの方法と、単一の生化学的反応において複合し得るということである。

【0173】

12. キャピラリー電気泳動及び多重化

前記解析の迅速性は、例えば、標的遺伝子座の複数ペアの増幅により生成された、多数の増幅産物を分離するためのキャピラリー電気泳動の使用などを考慮すると明白である。上記のとおり、本シグナル比アッセイは、複数の遺伝子座で実施し得る、そしてそれぞれの場合において、シグナル比は、各遺伝子座ペアに対して個別に算出される。例えば、もし4つの遺伝子座(A、B、C、D)が反応において共増幅された場合、例えば、A/B、A/C、A/D、B/C、B/D、C/Dなど、6つの異なるシグナル比が算出され得る。

【0174】

従って、もし「n」個の遺伝子座が共増幅された場合、 $(n^2 - n) / 2$ の異なる比率が算出され得る。それ故、本メチル化アッセイで提供される情報量は、解析された遺伝子座の数と指数関数的に上昇する。リアルタイムPCR増幅法に対して、キャピラリー電気泳動は、単一の実行で多数の遺伝子座を識別し得る。例えば、DNA型鑑定のために、特定のDNA試料から17のゲノム遺伝子座をルーチンの共増幅し、一緒に解析する。17の遺伝子座すべてに本シグナル比アッセイの実施することにより、136の独立したシグナル比を得る。リアルタイムPCRは、単一の反応において、136の比率を算出するのに必要なこれらの数の別々の増幅産物を、同時に識別することはできない。リアルタイムPCRでは、わずか6つの比率の算出に対応する、約4つの遺伝子座を識別し得る。

【0175】

対照的に、キャピラリー電気泳動は、17遺伝子座のすべてのペアになった順列から即座に増幅産物を分離し得、それ故、即座にデータを生成し、単一の反応においてすべての136のシグナル比を同時に算出することができる。理論的には、一回のキャピラリー電気泳動実行により、何百もの遺伝子座を一緒に処理し、分離することができる。複数の比率の解析を促進するため、これらの比率から、ここで「複合シグナルスコア」(CSS)と命名する単一のスコアを算出することは有利であり得る。次いでCSSは、例えば、ソースDNA試料が天然又は人工であるかどうかを確認するために使用することができる。

【0176】

13. 配列

多様なCODIS、PowerPlex(登録商標)16、及び鑑定で一般的に使用される他の遺伝子座のために本明細書で提供される配列、例えば、配列番号1~25は、STR鑑定で一般的に使用されるゲノム遺伝子座のものであり、本明細書において、(1)あらゆるシトシン-グアニン(CG)ジヌクレオチドの位置、(2)天然DNA中の遺伝子座におけるすべてのCGジヌクレオチドのメチル化レベル、及び(3)その特定の遺伝子座に対するメチル化感受性及びメチル化依存性制限酵素プロファイルを決定するために解析された。従って、本出願の本文中に含まれる配列表は、当業者に、本発明の比率を生成するアッセイ方法に基づいて使用し得る、特定のメチル化感受性及びメチル化依存性制限エンドヌクレアーゼの同定に関する指導を提供する。例えば、「vWA」CODIS及びPowerPlex(登録商標)16で増幅された遺伝子座のための751長のヌクレオチド配列である、配列番号8は、1つのみのCGジヌクレオチドを、位置571に含む。そのCG及びそのすぐ隣に接するヌクレオチドは、BssKI、HpaII、Nt.CviPII酵素の認識配列を提供し、配列番号26~32は、本発明者らによって、天然

10

20

30

40

50

及び人工DNA試料間で有意に異なる値を持つシグナル比を生成することが発見されたゲノム遺伝子座である。配列番号33～54は、異なる組織から採取されたDNA試料間で有意に異なる値を持つシグナル比 ($p = 0.05$ の閾値を使用したKolmogorov-Smirnov試験に基づく)を生成することが、本発明者によって発見されたゲノム遺伝子座である。

【0177】

本明細書において提供される配列情報は、また、当業者がCG及び制限部位に隣接する選択された遺伝子座領域にアニールする、順方向及び逆方向増幅プライマーを設計することを可能にする。このように、本発明の確証アッセイを実行する上で、市販されているプライマーの使用及び有効性は、より便利で価格効率よい選択肢であり得るが、本発明は、市販されているプライマーのみを使用した、例えばCODIS遺伝子座などの増幅に限定されない。

10

【0178】

14. アルゴリズム及びソフトウェア

一実施形態において、シグナル比及びノ又は表現率の算出(例えばDNAプロファイルが天然DNAを表すかどうかを決定するための)は、キャピラリー電気泳動装置上で実行される蛍光PCRの増幅産物のシグナル強度解析に基づいて実施される。キャピラリー電気泳動装置の出力は、二進法のコンピュータファイルである(例えば、アプライドバイオシステムズ社のキャピラリー電気泳動装置の場合はFSAファイル)。このファイルは、各サンプリング時点(データポイントと呼ぶ)の関数としての、各蛍光体の相対的蛍光単位(rfu)であるチャンネルデータを含む、キャピラリー電気泳動の実行に関する情報を含む。

20

【0179】

本発明はまた、入力としてキャピラリー電気泳動装置実行の出力であるファイルを受け入れ、その増幅産物がキャピラリー電気泳動機器にかけられる一組の遺伝子座の蛍光強度を算出するソフトウェアプログラムについても記載している。これらの強度に基づき、ソフトウェアは、その比率を算出するよう定義される前定義された遺伝子座ペア一組を基準として、シグナル比及びノ又は表現率(又はこれらの比率に基づく複合スコア)を算出する。最後にソフトウェアは、全定義された閾値と算出された比率の比較に基づいて決定を出力する。

30

【0180】

以下は、前記ソフトウェアプログラムによって実施されたこの解析のスキームである。

1. 各色チャンネルのシグナルから、400～500bpsの範囲でのそのチャンネルの平均rfuレベルとして定義されるベースラインレベルを差し引き、キャピラリー電気泳動装置の分光キャリブレーション法で得られたマトリックスに基づいて、蛍光体間の分光重複を除去する。

2. 期待される遺伝子座サイズ、 $-0.5bp \sim +0.5bp$ の範囲における最大rfuレベルとして定義される、解析される遺伝子座それぞれのrfuレベルを得る。

3. 遺伝子座ペア中の第1及び第2遺伝子座のrfuレベル間の比率として定義される、遺伝子座ペア一組の間のシグナル比を計算する。(ゼロ除算を回避するため、50未満のrfuレベルをもつすべての遺伝子座に対し、50rfuのレベルを割り当てる)。

40

4. 工程3で算出された各比率、及び各組織型に対して、測定された比率での参照確率関数の値(以下参照)として定義される確率スコアを算出する。

5. 各組織型に対し、工程4で得られたその組織に対する個別の確率スコアの積として定義される、複合確率スコアを算出する。(nは、シグナル比の数を表す)。

6. 各組織型に対し、その組織の複合確率スコアと、すべての組織の複合確率スコアの合計との間の比率として定義される、尤度スコア(DNA試料がその組織に由来する尤度を表す)を算出する。最も高い尤度スコアを持つ組織が、その試料の源と考えられる。

【0181】

15. 参照確率関数

50

ある特定の組織中のある特定の遺伝子座ペアの参照確率関数とは、その組織型の天然DNA試料中で測定されたシグナル比のセットに当てはめたガンマ分布関数である。

【0182】

16. 不完全消化の補正

鋳型DNAの不完全消化は、試料中の阻害因子の存在の結果発生しうるため、実際の消化レベルの解析をアッセイに組み込むことは有用である。これは、少なくとも1つの「消化された制御遺伝子座」と、少なくとも1つの「未消化の制御遺伝子座」を組み込むことにより達成し得る。消化された制御遺伝子座とは、すべての可能性のある組織中の天然DNAにおいて、メチル化されていないことが知られているゲノム遺伝子座である。未消化の制御遺伝子座とは、すべての可能性のある組織中の天然DNAにおいて、メチル化されていることが知られている遺伝子座か、又はアッセイに使用されるエンドヌクレアーゼの認識配列を欠く遺伝子座かの、どちらかである。消化された制御遺伝子座と、未消化の制御遺伝子座間のシグナル比は、アッセイにおける実際の消化レベルと相関している。適切な消化が発生したかどうかを調べることにより（もしそうでない場合は、解析を中止する）、また、遺伝子座の実際のrfuレベルを、完全な消化が起こった場合に得られたであろうrfu値を表す値に変更することにより、前記アルゴリズムはこのような遺伝子座を利用することができる。もし、この変更を実施する場合、シグナル比は、変更されたrfu値から算出する。

10

【実施例】

【0183】

20

材料及び方法

A. 生体組織の採取

血液（静脈血/月経血）、唾液、精液、皮膚の表皮、尿、及び腔分泌物を志願者から採取した。実験に勧誘したすべての参加者からインフォームドコンセントを得た。

【0184】

B. DNA採取及び数量化

有機抽出を使用して、DNAをすべての試料から採取した。回収したDNA量をQuantifiler（商標登録）Human DNA定量キット（アプライドバイオシステムズ社）と、7300リアルタイムPCRシステム（アプライドバイオシステムズ社）を使用して決定した。

30

【0185】

C. 遺伝子座の選択及びプライマー設計

ランダムなCpG島（GCコンテンツ ≥ 0.5 であり、また少なくとも8CGsである、 ≥ 200 bpの領域として定義される；測定された/期待されるCpG比率 > 0.6 に対応する）を、この作業のために開発されたソフトウェアプログラムを使用して調査した。これらからHhaI認識配列を含むCpG島が、最初のスクリーニング用に選択された。HhaI認識配列に隣接するプライマー（18~28bps）を、温度64~66で、アンプリコンサイズ66~150bps用に設計した。蛍光標識した順方向プライマー（FAM又はJOE）を、インテグレートッドDNAテクノロジーズ社（Integrated DNA Technologies）から購入した。各遺伝子型のプールされたDNA試料（それぞれが10個体から採取されたDNAを含む）の増幅により得られたシグナルと比較することにより、遺伝子座の差次的メチル化をペアでスクリーニングした。有意な差次的増幅パターン（すべての組織型において測定された最大のシグナル比が、測定された最小比率の3倍より大きい、として定義される）を示した遺伝子座を、多重化のために選択した。合計で、205の遺伝子座をスクリーニングし、そのうち、38が有意な差次的増幅パターンを示した。これらから、16の遺伝子座を実験で使用した。独立型の組織同定アッセイには、有意なノイズ無く共増幅され得る15の遺伝子座を使用した。複合精液検出及び鑑定アッセイには、2つの遺伝子座（独立型アッセイにも使用したL68346と、L16264）を使用した。

40

【0186】

50

D. エンドヌクレアーゼ消化、PCR、及びキャピラリー電気泳動

独立型のアッセイ実験において、各DNA試料はHha Iにより消化され、同一の反応においてPCR増幅に付した。反応は、30U Hha I(ニューイングランドバイオラプス社(New England Biolabs))、2.5U AmpliTaq Gold(アプライドバイオシステムズ社)、2.5µg BSA(ニューイングランドバイオラプス社)、各0.2mMのdNTP、各0.1~0.3µMのプライマー、2.5µl反応緩衝液(150mM Tris-HCl、15mM MgCl₂)、及びDDWから成り、総容量25µlである。複合型組織同定-鑑定実験における反応化合物は、プライマーを除いて、独立型アッセイにおけるものと同じであり、プライマーは、それぞれの0.2µMの精液同定プライマーと、Profiler Plus(アプライドバイオシステムズ社)の5µlプライマーセットと合わせて使用した。反応(独立型及び複合型アッセイ双方のための)は、GeneAmp(R)PCRシステム9700(アプライドバイオシステムズ社)中で実施し、使用した熱サイクルプログラムは: 37 で15分間、95 で11分間、続いて94 で1分を28サイクル、59 で1分間、72 で1分間、続いて最終伸長工程の60 で45分であった。1.5µlの増幅産物、24.5µlのHiDi ホルムアミド(アプライドバイオシステムズ社)、及び0.5µlのROX size standard(アプライドバイオシステムズ社)を含む混合物を、変性させ、(95 で3分間、その後即座に3分間氷上で)、製造者の指示に従って、ABI 310 Genetic Analyzer(アプライドバイオシステムズ社)上で実行した。得られたすべての電気泳動図を、社内で開発されたソフトウェアで解析し、また複合型組織同定-鑑定実験で得られた電気泳動もまた、GeneMapper ID-X解析ソフトウェア(アプライドバイオシステムズ社)を使用して解析した。

10

20

【0187】

E. 組織同定アッセイ-データ解析

組織同定のためのデータ解析は、入力としてfsaファイルを受け入れ、最も可能性が高い源組織を出力する、社内で開発されたソフトウェアにより実施された。混合試料中の精液のパーセンテージの導出は、鑑定遺伝子座(profiling loci)と組織同定遺伝子座に基づいて実施された。鑑定遺伝子座(profiling loci)に基づく導出は、精液の寄与者に対応する対立遺伝子のrfu値の合計を、4つの遺伝子型付けされた対立遺伝子をもつSTR遺伝子座中のすべての対立遺伝子のrfu値の総計で割ることにより実施された。組織同定遺伝子座に基づく導出は、まず混合物のすべての可能なパーセンテージ(未消化のDNAのシグナル比に基づき、1%の増加量で0~100%)に対する期待されるシグナル比を計算することにより実施され、そして前記アルゴリズムにより、期待されるシグナル比が測定されたシグナル比に最も近い、精液のパーセンテージが提供される。

30

【0188】

F. 劣化した試料のシミュレーション

各試料20ナノグラムを、総反応容積20µl中の、0.01U DNase I(アンピオン社(Ambion))、2µl 10X DNase I緩衝液(アンピオン社)により37 で10分間消化し、続いて75 で10分間、熱失活した。それぞれの消化されたDNA試料1ナノグラムを、次いで複合型組織同定-鑑定アッセイに付した。

40

【0189】

実施例1

組織型によるDNA分類-独立型アッセイ

本実施例では、本分類方法を「組織同定アッセイ」と命名する。組織同定アッセイは、組織間で異なってメチル化された遺伝子座のパネルを使用し、表1(図7)に示されるように、DNA試料の最も可能性の高い源組織を特定する。アッセイのスキームのひとつを図1Aに示す。問題とする法医学的な試料から得たDNA1ナノグラムを、DNAを認識配列GCGCにおいて、それがメチル化されていない場合のみ切断する(メチル化された目標を未変化に保ったまま)Hha Iメチル化感受性制限酵素で消化する。次いで組織同

50

定遺伝子座のパネルを、蛍光標識したプライマーを使用して、消化されたDNAからPCRによって増幅し、一定分量の増幅生成物をキャピラリー電気泳動によって分離する。より高いメチル化レベルをもつ遺伝子座はより高い効率で増幅され（より多くのDNA分子が消化から保護されるからである。）、電気泳動図（図1B、遺伝子座A）において、比較的強力なシグナルを生成する。逆に、より低いメチル化レベルをもつ遺伝子座はより低い効率で増幅され、電気泳動図（図1B、遺伝子座B）において、比較的弱いシグナルを生成する。

【0190】

自動シグナル解析ソフトウェアは、電気泳動図の出力解析を可能にし、組織同定遺伝子座に対応するアンプリコンに高さ（rfuによる）を割り当てる。単一遺伝子座の高さは、そのメチル化レベルに対応しているが、実際のメチル化レベルを導き出すことはできない。なぜなら、そのレベルは正確な鋳型の濃度と特定のPCR条件にも依存するからである。代わりに、すべての遺伝子座は同一の鋳型濃度と特定の反応条件に付されているため、共増幅された遺伝子座間のメチル化レベルの比率は算出することができる。従って、遺伝子座の各ペアに対して、第1及び第2遺伝子座の高さ間の比率として定義されるシグナル比が算出され、この比率は、対応する遺伝子座のメチル化レベル間の比率を反映する。すべての算出されたシグナル比を、単一のベクターにまとめ（例えば、15 - 遺伝子座のパネルにおいてベクターは、遺伝子座1と2の間、遺伝子座1と3の間に、105比率を含むとすれば、など）、次いで既知の組織起源をもつ試料のデータセットから得た参照ベクターのデータベースと比較する。組織同定アルゴリズムは、可能性のあるそれぞれの組織起源に対して、DNA試料がその組織に由来する可能性を反映する、尤度スコアを算出する。そして前記アルゴリズムの出力が、最も可能性のある組織である。

【0191】

独立型の組織同定アッセイを、50の試料：血液14試料、唾液14試料、精液11試料、及び皮膚表皮11試料において、アンプリコンサイズ66～150bpsの範囲の、15の組織同定遺伝子座のパネルを使用して実施した。図2は、これらの試料のうち8つ - 各組織型の2つずつ、の電気泳動図を示す。異なる個体から得た同一組織型の試料は、完全に同一ではなかったが（メチル化レベルの自然な変異性及び確率的なPCR効果の結果として）、それにもかかわらず、各組織型が別個のメチル化特性を持つことは明白であった。例えば、精液試料中のL91762/L68346の比率は0.04～0.53の範囲であり、すべての他の組織試料においてはより高く（2.15～18.28；図8の表2）、従って、低いL91762/L68346の比率は、精液試料に特有であった。L76138/L26688の比率は、血液及び唾液（0.08～1.54）においては低く、精液及び皮膚の表皮においてはより高かった（2.04～19.56；図8中の表2）。従って、L91762/L68346の高比率とL76138/L26688の高比率が随伴する場合は、皮膚の表皮試料に特有であった。組織同定アルゴリズムは、50試料すべての真の組織起源を正確に同定した。さらに、組織同定遺伝子座のサブセットを使用したデータ解析では、15遺伝子座の全セットが重複しており、15遺伝子座のうち7つ（L91762、L68346、L50468、L14432、L30139、L15952、及びL26688）のみの使用により、100%の同定を達成したことが明らかになった。組織同定は、効率的な消化に依存するため、HhaIによる鋳型DNAの完全消化は、単一の消化増幅反応の構成において評価された。50のDNA試料を同一の方法に付したが、表3（図9）に示すとおり、2つの異なる遺伝子座のパネルを使用した。2つの異なる遺伝子座とは、HhaI部位を欠く制御遺伝子座（L98328）と、これらの組織の中で全くメチル化されていないことが先に示された遺伝子座（参照により本明細書に組み入れられた、SW14；D.Frumkinら、Authenticat ion of forensic DNA samples、Forensic Sci .Int.Genet.2009、doi:10.1016/j.fsigen.2009.06.009を参照のこと）である。すべての試料が、HhaIによる完全消化を示す、参照遺伝子座の存在と、SW14の完全な不存在を示し、対照的に、未消化の試料におい

10

20

30

40

50

ては、両遺伝子座の存在を示した(実施例を図4に示す)。

【0192】

実施例2

シグナル比に影響を及ぼすノイズ因子の解析

実施例1に記載されたアッセイは、組織間で異なってメチル化された遺伝子座の利用に基づいており、それに対するシグナル比の値は一般的に組織特異的である(図1C)。しかし、異なる個体間におけるメチル化レベルの自然な変異性、及び/又はDNA鋳型濃度の差などのPCRに関連する人為的現象の結果として(例えば、ピペット操作エラー及び確率的影響の結果として)、異なってメチル化された組織においても、測定されたシグナル比にはいくらかの重複がある可能性がある。これらの「ノイズ」因子それぞれの影響は、組織間の平均シグナル比の差である「シグナル」との関係において解析された。精液と血液間のシグナル比の値の差が平均10倍である2つの遺伝子座を選択した。1ng及び2ngのDNAを鋳型として用い、異なるPCRを同一の精液試料に実施した。これらの増幅により得られた比率を、互いに、及び異なる血液試料の増幅により得られた比率と比較した。異なるPCRと、異なる量の入力DNAを使用して得られた比率間の差は、異なる組織から得られた比率間の差よりも、一桁以上もより小さかった(図1D)。

10

【0193】

実施例3

複合精液検出及びDNA型鑑定

本実施例では、DNAは、精液及び非精液の2つのうちの1つに分類された。非精液とは精液以外のすべての組織を指す。分類は同一の反応において、DNA型鑑定と一緒に実施される。

20

【0194】

組織同定方法は、標準STR鑑定で使用されるものと同じのプラットフォーム(例えば、サーモサイクラー及びキャピラリー電気泳動装置など)を使用するため、単一の反応においてDNA型鑑定と容易に統合することができる。この可能性は、統合されたSTR鑑定及び精液検出アッセイを作り出すことによって実証された。STR鑑定キット(Profiler Plus)PCRに、2つの精液同定遺伝子座(図10中の表4)に特異的なプライマーを補った。これらの遺伝子座は、精液中でのみ効率的に増幅される70bpsアンプリコンと、精液以外のすべての組織中で効率的に増幅される95bpsアンプリコンからなる。アッセイでは、精液、尿(雄性の)、静脈血、月経血、膣分泌物、及び唾液の純粋な試料を検査した。精液同定増幅の正確なパターンが測定され、組織同定アルゴリズムが、すべての試料における精液の存在/不存在を正確に同定した。図3A及びBは精液及び尿試料(同一の個体から得られた)の完全な電気泳動図を示し、図3Cは、2つの精液同定遺伝子座と3つの鑑定遺伝子座(profiling loci)を含む、すべての試料から得たFAMチャンネルデータを示す。測定されたシグナル比は、精液試料中で25.04、そしてその他の試料中で0.04~0.089であった。さらに多様な比率の精液と唾液の混合物においても(図3D)、複合アッセイを実施した。これらの混合物のそれぞれに対して、試料中の精液のパーセンテージは精液同定遺伝子座のシグナル比から得、鑑定遺伝子座(profiling loci)から得られた対応するパーセンテージと比較した(精液及び唾液試料は、異なる個体から得、従ってSTR遺伝子座に基づいて識別し得る)。得られたパーセンテージは、最大差10%(図11中の表5)に匹敵する。さらに、精液の存在対不存在が、すべての試料で正確に決定された。(13%の精液のみを含有した試料も含む;図3D)。統合された精液検出-鑑定アッセイを使用して試料から得られたSTRプロファイルは、Profiler Plusを使用して同一の試料から得られたプロファイル(精液検出を除く)と同一であった。

30

40

【0195】

実施例4

経年及び劣化したDNA試料の分類

法医学型試料への応用に対する概念実証として、20ヶ月経過したステイン(コットン

50

上の血液及び精液)から抽出した2つのDNA試料において、独立型の組織同定アッセイ(実施例1に記載)を実施した。両試料は新鮮な試料と同様に良好に増幅し(図5)、前記アルゴリズムは、両試料の組織起源を正確に同定した。劣化したDNA試料をシミュレートするため、2つの追加のDNA試料(血液及び精液)を、部分消化をもたらす条件下において、DNAse Iによる消化に付した。これらの試料を次いで、複合型の精液検出及び鑑定アッセイで解析した。DNAse I消化により、両試料中のより大きなSTR中に、それらのプロファイルが部分的であるような、対立遺伝子の脱落が生じた。血液試料中、D3S1358とアメロゲニン対立遺伝子のみが型付けされ、精液試料においては、対立遺伝子の脱落はFGA、D21S11、D18S51、D13S317及びD7S820において測定された(図6)。より小さな組織同定遺伝子座は、期待されるパターンで首尾よく増幅し、前記アルゴリズムは、これらの試料中の精液の存在/不存在を正確に同定した。

10

【0196】

実施例5

複合型鑑定及びDNA分類

この特定のアッセイは、通常のDNA試料鑑定(Promega PowerPlex 16キット使用)、及び天然対人工DNAカテゴリへのDNA分類の、双方を使用する。

【0197】

従って本アッセイの一面は、DNAの天然の性質を、いくつか又はすべての人工DNA(定義のセクションを参照)と照らし合わせることであり、従っていくつかの異なる比率の解析を含む。そのため、比率を組み合わせることで、多様な方法で合成された、単一のパラメーターの多様なDNAを比較することが可能になる。単一のパラメーター、例えば表現率は、ゲノム全体を含む試料(天然DNAであるが、本実施例に示される通り、MDA合成されたDNAでもある)と、サブセットのみ(例えば、CODIS遺伝子座のみ)を含む試料とを識別することができる。

20

【0198】

対象Aの血液から採取された天然DNA試料、及び市販のキット(対象Aの微量の本物のDNAを鋳型として)を使用して、*in vitro*多置換増幅により合成された人工DNA試料、2つのDNA試料を解析した。

【0199】

2つの試料をまず通常のキット(PowerPlex 16)で鑑定し、通常の鑑定ソフトウェア(GeneMapper ID-X)を使用して解析した。本方法のスキームは簡潔に説明すると、PowerPlex 16プライマーミックスを使用してDNA試料にマルチプレックスPCRを実施し;キャピラリー電気泳動装置上で増幅産物を分離し;次いで出力データを、例えば、GeneMapper ID-Xソフトウェアなどで解析する。

30

【0200】

各試料に対して、本アッセイの最終産物はプロファイルである。図9A, Bからわかるように、2つの試料のプロファイルは同一である。さらに、GeneMapper ID-Xソフトウェアは、両試料のプロファイルを、例外なく、単一寄与体(例えば、単一の個人)のプロファイルであると決定した。これは、人工DNAから得たプロファイルが、天然DNAから得たプロファイルと同一であり得ることを示している。参照により本明細書に組み入れられた、D. Frumkin, et al., *Authentication of forensic DNA samples, Forensic Sci. Int. Genet.* (2009), doi: 10.1016/j.fsigen.2009.06.009を参照のこと。

40

【0201】

DNAの両試料を、その後、以下のスキームに基づいて、複合型鑑定及び分類アッセイによっても解析した。DNA試料をHha Iで消化し、Hypo23などの追加の遺伝子座を増幅するための追加のプライマーとともに、PowerPlex 16プライマーミックスを使用してマルチプレックスPCRを実施し;キャピラリー電気泳動装置上で増幅

50

産物を分離し；出力データを、本明細書で開示されたソフトウェアアルゴリズムなどの、キャピラリー解析ソフトウェアで解析する。

【0202】

各試料に対して、本アッセイの最終産物はプロファイル及びカテゴリの割り当てである。図9C及びDからわかるように、天然DNAは「天然」として、対して、人工の試料を「人工」として割り当てた。

【0203】

本実施例では、カテゴリの割り当ては以下の3つのパラメーターの解析により実施された。

SR1 (TPOX / D8S1179のシグナル比)、SR2 (D3S1358 / Hypo 23のシグナル比)、及びRR (OCA2 / D3S1358の表現率)。

これらのパラメーターの閾値を表6に示す。

【0204】

【表4】

表6

	SR1	SR2	RR
天然試料の閾値	≥ 0.9	≥ 10	≥ 2
人工試料の閾値	< 0.9	< 10	< 2

【0205】

これらのパラメーターの測定値、及び割り当てられたカテゴリを表7に示す。表7 (天然DNAの、閾値を超える値は、グレーで示す)。

【0206】

【表5】

表7

	SR1	SR2	RR	カテゴリ
天然DNA試料	1.23	17.54	3.31	天然
人工DNA試料	0.06	2.06	2.47	人工

【0207】

カテゴリの割り当ては、以下のルールにもとづいて実施した。

【0208】

もしすべてのパラメーター測定値が、天然DNAのそれぞれの閾値を超えていれば「天然」カテゴリに割り当て、それ以外であれば「人工」のカテゴリに割り当てる。

【0209】

実施例6

複合鑑定及びDNA分類 (MDA対非MDA)

この特定のアッセイはDNA試料の通常の鑑定 (Promega PowerPlex 16キットによる) と、MDAカテゴリ (多置換増幅対他の (非MDA) タイプのDNAによって合成された人工DNA) へのDNA分類、双方を使用する。

【0210】

対象Aの血液から採取された天然DNA試料、及び市販のキット (対象Aの微量の本物のDNAを鋳型として) を使用して、in vitro多置換増幅により合成された人工DNA試料、2つのDNA試料を解析した。

【0211】

2つの試料をまず通常のキット (PowerPlex 16) で鑑定し、通常の鑑定ソフトウェア (GeneMapper ID-X) を使用して解析した。本方法のスキームは以下のとおりである。

10

20

30

40

50

DNA PowerPlex 16 プライマーミックスを使用したマルチプレックスPCR 増幅産物のキャピラリー電気泳動装置上での分離 Gene Mapper ID - X ソフトウェアでのデータ解析。

【0212】

各試料に対して、本アッセイの最終産物はプロファイルである。図15A - Bからわかるように、2つの試料のプロファイルは同一である。さらに、Gene Mapper ID - Xソフトウェアは、両試料のプロファイルを、例外なく、単一寄与体（例えば、単一の個人）のプロファイルであると決定した。

【0213】

DNAの両試料を、その後さらに、キャピラリー解析ソフトウェアを使用して解析した。各試料に対して、本アッセイの最終産物はプロファイル及びカテゴリの割り当てである。図15C - Dからわかるとおり、天然DNAは「非MDA」として、対してMDA試料は「MDA」として割り当てた。

【0214】

本実施例では、カテゴリの割り当ては以下の3つのパラメーターの解析によって実施された。

RR1 (vWA / D18S51の表現率)、RR2 (CSF1PO / Penta __Dの表現率)、及びRR3 (D21S11 / D7S820の表現率)。

複合表現スコアを、以下の通り、これらの3つの比率に基づいて算出した。

$$CRS = 3 \cdot R1 \cdot R2 \cdot R3$$

複数のMDA試料、及び非MDA試料の解析に基づいて決定された閾値は1.5であり、それゆえ1.5以上のCRS値を有する未知の試料は、「MDA」として分類し、一方、1.5未満のCRS値を有する未知の試料は「非MDA」として分類される。

【0215】

MDA試料及び非MDA試料のCRS値を、算出し、結果は以下のとおりである

MDA試料のCRS値 = 2.04

非MDA試料のCRS値 = 0.91

閾値に基づき、両試料を正確に分類した。

【0216】

実施例7

独立型精液検知キット

キットで使用されたアッセイは、入力としてDNA試料を受け入れ、次いで生化学的手順を経て、さらに専用ソフトウェアによってシグナル解析される。アッセイの出力は、DNA試料（精液又は非精液）のカテゴリ、及び、出力されたカテゴリがDNA試料の真のカテゴリである可能性を表す、統計的信頼水準である。

【0217】

本発明の精液検出キットは、1又はつ以上の以下の構成要素を含み得る。

【0218】

1. 1又はつ以上の以下の構成要素を含み得る箱

0.6 μM SD1 f (AAGAGCCCATCAGGCAGGTC);

0.6 μM SD1 r (GTTTCTTGTCGAGCAGCACGTGGATGATG);

1.75 μM SD2 f (CTCCAGAACTGGAACTTCCTG);

1.75 μM SD2 r (GTTTCTTA ACTTGGAGACGACGGC ATC);

1.25 μM SD3 f (TGGAGGACAATGCCCTGGTG);

1.25 μM SD3 r (GTTTCTTG GCTTCA CCTGCGACCGTCTC);

1.75 μM SD4 f (CCCTCCGAGTGGCCAGCAG);

1.75 μM SD4 r (GTTTCTGACCACTGCCGTGGGAATG);

10

20

30

40

50

1.75 μ M SD5f (CTTCTCAGCCCAATGGGAAGAG);
 1.75 μ M SD5r (ACGTAGAAAGGACCCGAGGAC);
 0.9 μ M SD6f (TACAGACAAATCACTCAGCAGC); 及び
 0.9 μ M SD6r (GTTTCTTGTCTGACACTCGGTTGTAGG
 TATT) の5Xプライマーミックスを含むチューブ1;
 順方向プライマー(例えば、SD__fなど)は蛍光で標識した
 10X反応緩衝液(150mM TRIS-HCl、15mM MgCl₂、各0.2
 mMのdntp、2.5 μ g BSA)を含むチューブ2;
 HhaI制限エンドヌクレアーゼを含むチューブ3;
 対照精液DNA試料を含むチューブ4;
 対照非精液DNA試料を含むチューブ5;
 DNAラダーを含むチューブ6; 及び
 化学物質安全性データシート(MSDS)。

10

【0219】

2. 以下のプロトコル、又は同様の指示を詳述した文書

(a) 各反応に対して、0.2mlチューブ(提供されていない)中で、以下の成分
 : 5 μ l 5Xプライマーミックス、2.5 μ l 10X反応ミックス、0.5 μ l H
 haIエンドヌクレアーゼ、0.5 μ l DNAポリメラーゼ、0.5ng DNA、及
 びDDW(蒸留水)を、総容積25 μ lに混合する

(b) さらに、検査済みのDNAに、供給された精液DNAを使用した陽性対照精液
 反応、供給された血液DNAを使用した陽性対照非精液反応、DNAの代わりにDDWを
 使用した陰性対照反応、及び、HhaIの代わりにDDWを使用した消化制御反応を構成
 する

20

(c) サーマルサイクラー中に反応チューブを置き、以下のプログラム: 37 で1
 5分間、95 で11分間、続いて94 30サイクルで1分間、59 で1分間、72
 で1分間、続いて、最終伸長工程の、60 で45分間、及び25 での保持を実行す
 る

(d) それぞれの増幅後反応に対して、1.5 μ lの生成物を、24.5 μ lのホル
 ムアミド、及び0.5 μ lのfluorescent size standardと、
 新しい0.2mlチューブ中で混合する

30

(e) 試料を95 で3分間変性させ、次いで即座に氷上で3分間冷却する

(f) 変性した試料を、以下のパラメーターを使用して、キャピラリー電気泳動装置
 にかける

モジュール = GS STR POP4 (1mL) F;

Inj. secs = 5;

Inj. kV = 15;

Run kV = 15;

Run C = 60;

実行時間 = 24分

(g) Tissue Identifier解析ソフトウェアで、出力の.fsaファイルを
 を解析する。

40

【0220】

3. 「アリゴリズム及びソフトウェア」セクションに記載された、組織同定アルゴ
 リズムを実装した「Tissue Identifier」解析ソフトウェアに以下の改変を
 加えたもの。

【0221】

前記アルゴリズムの工程3において、使用された遺伝子座ペアのセットは{SD1、S
 D6}、{SD2、SD6}、{SD3、SD6}、{SD4、SD6}、及び{SD5
 、SD6}である。

【0222】

50

不完全消化の補正は { S D 5、S D 6 } のシグナル比を使用して実施した。S D 5 は、消化された制御遺伝子座として作用し、S D 6 は、未消化の制御遺伝子座として作用した。

【 0 2 2 3 】

27の異なる個体から得た27の参照精液試料及び異なる個体から得た86の参照非精液試料(血液、唾液、尿、膣スワブ、月経血)を使用して、{ S D 1、S D 6 }、{ S D 2、S D 6 }、{ S D 3、S D 6 }、{ S D 4、S D 6 }に対する精液及び非精液の参照確率関数を得た。

【 0 2 2 4 】

前記アッセイは6つのゲノム遺伝子座の解析に基づく。これらのうち、4つの遺伝子座が、精液対非精液組織において異なってメチル化されていることが、発明者らにより発見された。これらの4つのうち2つの遺伝子座が、精液を除くすべての組織においてメチル化されており、他の2つの遺伝子座は、精液を除くすべての組織においてメチル化されていなかった。前記アッセイはさらに、H h a I 認識配列を含まず、従って組織型にかかわらず首尾よく増幅されることが期待される未消化の制御遺伝子座(S D 6)と、すべての可能性のある組織においてメチル化されていないことが本発明者らによって発見された、消化された制御遺伝子座(S D 5)を含む。

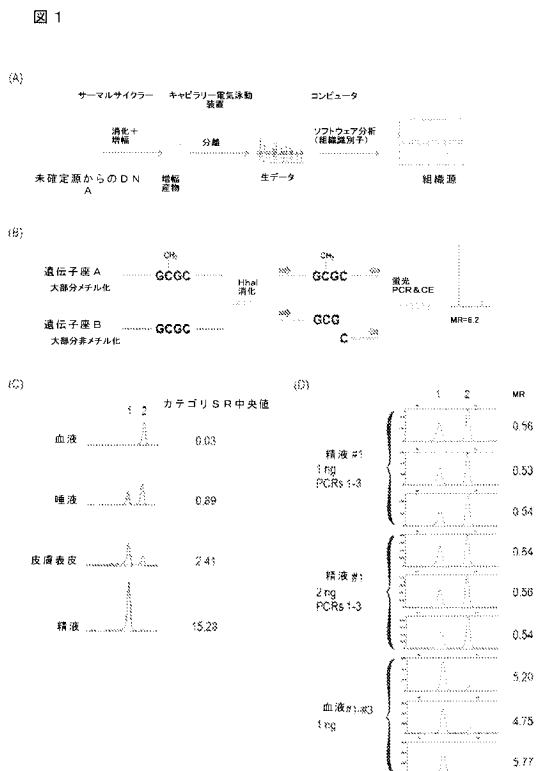
10

【 0 2 2 5 】

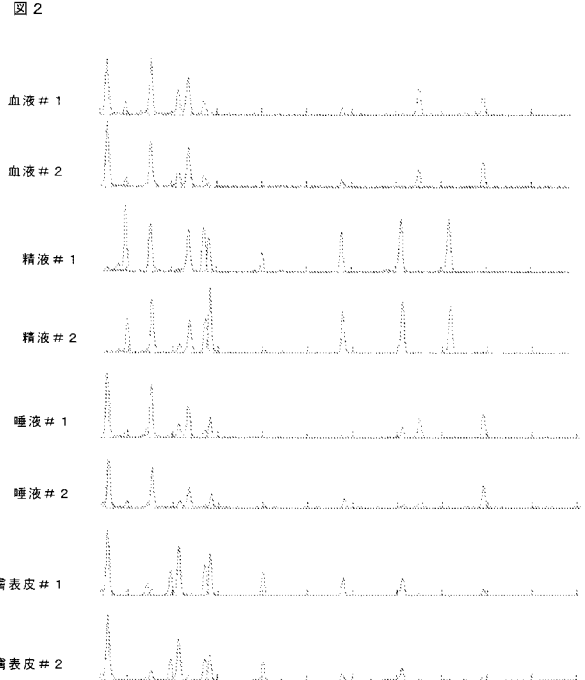
キットでは、異なる性別、年齢、及び民族の、95の異なる提供者から採取した、27の精液及び86の非精液(血液、唾液、尿、膣スワブ、月経血)DNA試料を検査した。前記アルゴリズムは、典型的な信頼水準>99.999999%で、すべての試料の源を正確に同定した。図12は6試料の標準地を示す。検査した試料は、参照確率関数を得るために使用した試料と同一の試料であった。しかし、偏り(b i a s)を避けるため、各特定の解析において、解析された試料は、参照確率関数を得るためには使用しなかった。

20

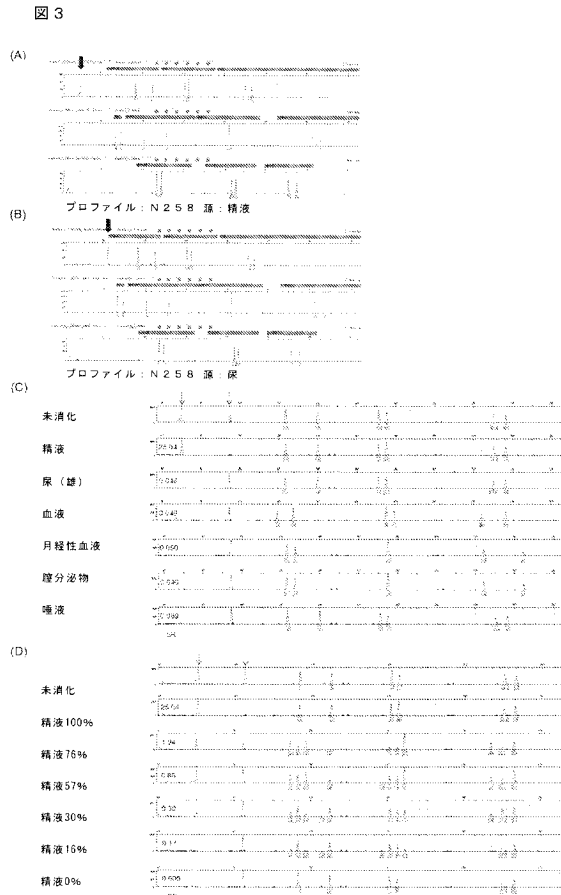
【 図 1 】



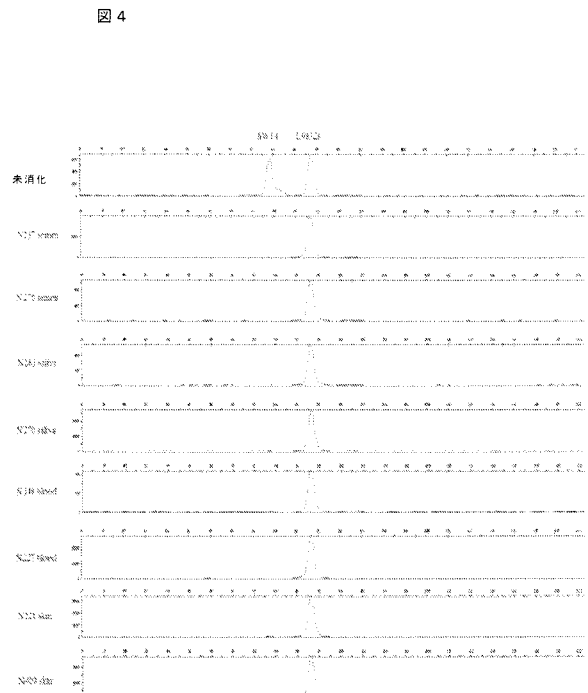
【 図 2 】



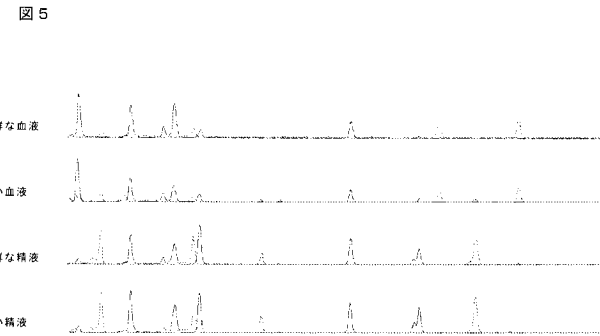
【 図 3 】



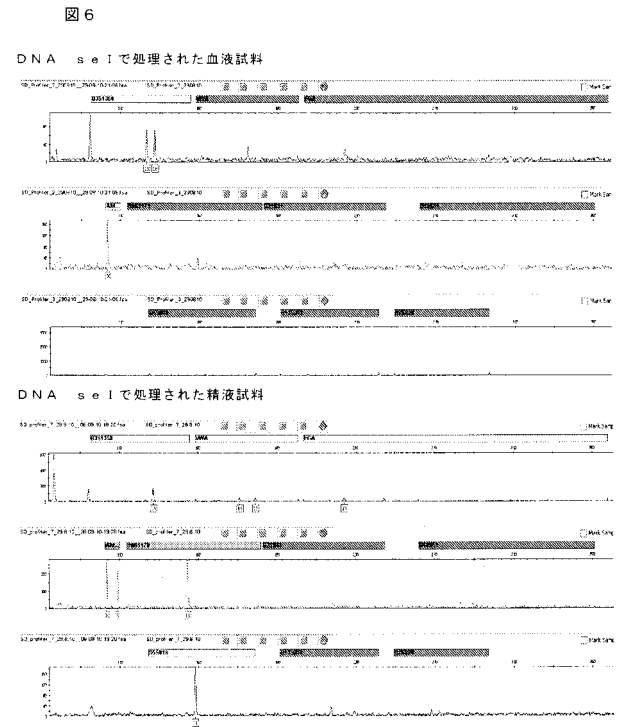
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】

表 1 詳細同定アッセイで利用される遺伝子座のパネル

#	遺伝子座	場所	順方向プライマー	逆方向プライマー	長さ (bp)	長さ ^a	精度 ^b
1	L91762	染色体12(73985697)	GCAGCAGGCGCCGGGAAAG(FAM)	AGCAGCTGTGCTCCGGGCAG	66	0.20M	0.20M
2	L68346	染色体13(12175317)	CAGCAACAGCACCCAGCTTG(DOE)	CACAGGCTCAGTCCGGGATC	70	0.20M	0.20M
3	L59468	染色体13(5492965)	AGGAAACCTCAGTAGCAAAATGG(DOE)	CGGAGACTTAAAGTGGGATC	75	0.20M	0.20M
4	L14432	染色体13(29866149)	CGTAGGCTGGGTCAGGTC(FAM)	GATCCATGCCCTGGGATG	80	0.20M	0.20M
5	L4648	染色体13(35815311)	CAGCTTAGAGTCAGGTCAG(DOE)	ACGACCTCCGGATCCAACTG	80	0.20M	0.20M
6	L39664	染色体17(53710330)	CCAGCTGGGTGGGACATGTTG(FAM)	CACCTCTCTCCGTCCTG	82	0.20M	0.20M
7	L30139	染色体17(16994489)	GAGAAAGCGGAGGAGATGAGAC(FAM)	CCGCACTCTCCGTCCTG	84	0.20M	0.20M
8	L55429	染色体15(1548043)	GGCTTCAGCAGGAAAGTCCAC(DOE)	CGTGGCTCCAGCAGACTC	88	0.20M	0.20M
9	L62086	染色体19(40478338)	GTGCACTGGTGTCTGGTACTTC(FAM)	GAGGCTCTGGGGACACTCTG	89	0.10M	0.10M
10	L76138	染色体19(3130317)	CAGCTCTCTCTCACTCCAGTTC(DOE)	AGAGGCTGAGGAGGCTGAG	100	0.20M	0.20M
11	L15952	染色体17(2241305)	CTCTCTGATTACAGCAAGTTC(FAM)	GACAGTACTGACTGACTCTG	117	0.20M	0.20M
12	L36599	染色体17(4867642)	AAGGACAGAGTTCCTGCTGTC(FAM)	CGGATCCAGGAGGAGTCTGAC	130	0.20M	0.20M
13	L26688	染色体17(77849836)	CGGAGCAGATGCTGGTCCAC(DOE)	TCAGACTCTCTATCTGAC	134	0.20M	0.20M
14	L81528	染色体19(4705603)	AGCTTACTCCAGCTCCAG(DOE)	TCAGACTCTCTATCTGAC	141	0.20M	0.20M
15	L36256	染色体19(50923118)	GCACAGGCTCTTGTGATGATGAC(DOE)	GAAATATGGAGGCTCTGGGCGAG	149	0.30M	0.30M

^a UGSC番号181に基づいて検索されたCGのゲノム位置は、染色体番号の後の () に記載されている

^b bpsにおいて

^c 精度は、順方向プライマー及び逆方向プライマーの両方を指している。

【 図 8 】

表 2 L91762/L68346及びL76138/L26688のシグナル比

L91762/L68346		L76138/L26688	
中央値±標準差	範囲	中央値±標準差	範囲
0.16±0.14	0.04-0.53	6.50±5.80	2.04-19.00
4.36±1.69	2.15-7.73	0.30±0.20	0.08-0.76
7.10±3.30	3.36-15.38	0.56±0.41	0.16-1.54
11.40±4.20	4.60-18.28	8.41±5.58	2.1-19.56

図 7

図 8

【 図 9 】

表 3 HhaI消化の詳細に使用される遺伝子座

位置	順方向プライマー	逆方向プライマー	長さ (bp)
染色体17(141084738)	GCGAAGGAAAGTCTGGAGTC(FAM)	GTTTCTTGAAGGGCCAGACAC	94
染色体11(86241803)	CAAAAGTACTGGGTTACAGGTG(FAM)	GGATGAACCTTAAAGACATCATC	97

^a UGSC番号181に基づいて検索されたCGのゲノム位置は、染色体番号の後の () に記載されている (遺伝子座L98328には、HhaIの認識部位はないが、フォワードプライマーの開始点である。

図 9

【 図 10 】

表 4 精液検知に利用される遺伝子座のパネル

遺伝子座	場所	順方向プライマー	逆方向プライマー	長さ	精度 ^c
L68346	染色体13(12175317)	CAGCAACAGCACCCAGCTTG(FAM)	CACAGGCTCAGTCCGGGATC	70	0.20M
L16264	1 Chr2(273406)	GGACGAGTTAACTTCCTTAACTTC(FAM)	GTTTCTCCGGAACCTGGTTAACTTC	95	0.30M

^a UGSC番号181に基づいて検索されたCGのゲノム位置は、染色体番号の後の () に記載されている (遺伝子座L98328には、HhaIの認識部位はないが、フォワードプライマーの開始点である。

^b bpsにおいて

^c 精度は、順方向プライマー及び逆方向プライマーの両方を指している。

図 10

【 図 1 1 】

表5 精液と唾液の混合物における精液成分の検知及び定量化

試料番号	試料中の精液濃度 (STRタイピングによる)	試料中の精液濃度 (本発明のアッセイによる)	精液検知
1	100	100	あり
2	100	100	あり
3	100	100	あり
4	76	66	あり
5	57	47	あり
6	30	23	あり
7	16	15	あり
8	0	0	なし
9	0	0	なし
10	0	0	なし

図 1 1

各行は、単一の反応を示している

【 図 1 2 】

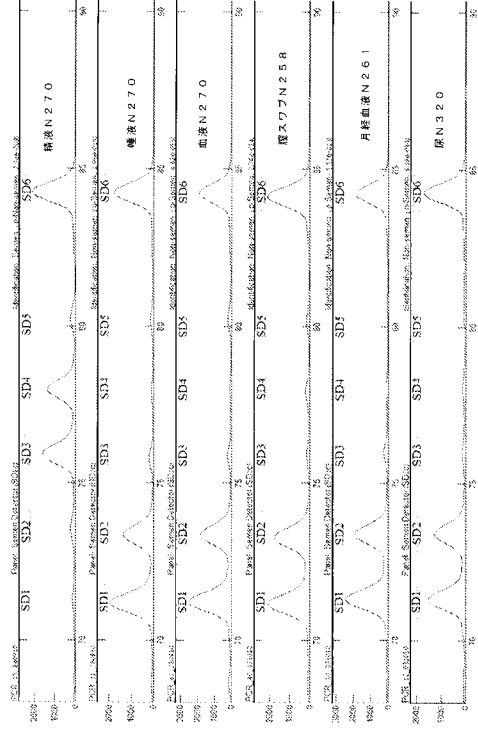


図 1 2

【 国際調査報告 】

61300010006



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No
 PCT/IB2010/003397

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPQ-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 2009/083989 A1 (NUCLEIX LTD [IL]; FRUMKIN DAN [IL]) 9 July 2009 (2009-07-09) claim 33 page 22, line 4 - line 8 abstract the whole document	28-50, 56,57 1-27, 51-55
X A	EP 1 748 080 A2 (EPIONTIS GMBH [DE]) 31 January 2007 (2007-01-31) paragraphs [0027], [0057] abstract the whole document	28-50, 56,57 1-27, 51-55
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "B" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 3 September 2012		Date of mailing of the international search report 11/09/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Helliot, Bertrand 28.12.2012

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2010/003397

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	D. FRUMKIN ET AL.: "Authentication of forensic DNA samples", FORENSIC SCI. INT. GENET., 20 September 2001 (2001-09-20), XP26829808, abstract the whole document	1-57
A,P	DAN FRUMKIN ET AL: "DNA methylation-based forensic tissue identification", FORENSIC SCIENCE INTERNATIONAL: GENETICS, ELSEVIER BV, NETHERLANDS, vol. 5, no. 5, 6 December 2010 (2010-12-06), pages 517-524, XP028275689, ISSN: 1872-4973, DOI: 10.1016/J.FSIGEN.2010.12.001 [retrieved on 2010-12-13] table 1 abstract the whole document	1-57

3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/IB2010/003397

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009083989	A1	09-07-2009	NONE
EP 1748080	A2	31-01-2007	NONE

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 フルムキン、 ダン
イスラエル国 6 1 9 9 9 テル - アヴィヴ エーピーティー . 1 3 レイネス エスティー .
4

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA04 CA20 HA12
4B063 QA01 QA05 QQ03 QQ34 QQ42 QR32 QR62 QS16 QS34 QX02

专利名称(译)	DNA样本的分类		
公开(公告)号	JP2013513379A	公开(公告)日	2013-04-22
申请号	JP2012542636	申请日	2010-12-08
[标]申请(专利权)人(译)	新克莱津市箱		
申请(专利权)人(译)	新克莱津市箱		
[标]发明人	ワッセルストロムアダム フルムキンダン		
发明人	ワッセルストロム、アダム フルムキン、ダン		
IPC分类号	C12Q1/68 C12Q1/48 G01N33/53 G01N33/533 C12N15/09		
CPC分类号	C12Q1/6858 C12Q1/6881 C12Q2600/154 C12Q2600/158 C12Q2521/331 C12Q2545/101 C12Q2565/102		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12Q1/48.Z G01N33/53.M G01N33/533 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA20 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QQ03 4B063/QQ34 4B063/QQ42 4B063/QR32 4B063/QR62 4B063/QS16 4B063/QS34 4B063/QX02		
代理人(译)	宫崎昭雄 绪方明		
优先权	61/306201 2010-02-19 US 61/325977 2010-04-20 US 61/285758 2009-12-11 US		
其他公开文献	JP5953235B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了用于在各种类型的体外产生的DNA或各种类型的天然DNA（例如来自各种组织和/或生理/病理学条件的那些）中精确且成本有效地制备DNA样品的方法公开了一种分类方法。本发明通过比较与特定基因座处甲基化水平比率相关的“信号比”来完成分类，并且不依赖于任何基因座处的实际甲基化水平的计算。因此，所公开的发明方法不需要外部DNA和对照，从而简化了测定并提高了准确性。所公开的本发明技术允许DNA在同一反应中与DNA分析一起分类，从而允许同时分类样品和确定同一性。

