

(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2005-519634
(P2005-519634A)

(43) 公表日 平成17年7月7日(2005.7.7)

(51) Int.Cl.⁷

C12N 15/09
C12M 1/00
C12Q 1/68
G01N 33/53
G01N 33/566

F I

C12N 15/00
C12M 1/00
C12Q 1/68
G01N 33/53
G01N 33/566

Z C C A
A
A
M

テーマコード(参考)

4 B 0 2 4
4 B 0 2 9
4 B 0 6 3

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 116 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-587960 (P2003-587960)	(71) 出願人	503409827 スペクトラル ジェノミクス、インク。 アメリカ合衆国、テキサス州 77054 、ヒューストン、スイート 2200、エ ヌ、スタジアム ドライブ 8080
(86) (22) 出願日	平成14年10月15日 (2002.10.15)	(74) 代理人	100071010 弁理士 山崎 行造
(85) 翻訳文提出日	平成16年6月14日 (2004.6.14)	(74) 代理人	100121762 弁理士 杉山 直人
(86) 國際出願番号	PCT/US2002/033044	(74) 代理人	100126767 弁理士 白銀 博
(87) 國際公開番号	WO2003/091426	(74) 代理人	100122839 弁理士 星 貴子
(87) 國際公開日	平成15年11月6日 (2003.11.6)	(74) 代理人	100118647 弁理士 赤松 利昭
(31) 優先権主張番号	60/329,030		
(32) 優先日	平成13年10月12日 (2001.10.12)		
(33) 優先権主張國	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】核酸組成物及びアレイ及びそれらを用いる方法

(57) 【要約】

1の側面において、本発明は例えば、染色体異数性、欠失及び増幅等の染色体異常の検出、及び隣接遺伝子異常に関する症候群の診断または予後診断のための核酸の編集物、例えばアレイなどの工業製品及び方法を提供する。キットも提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

染色体異常の検出または隣接遺伝子異常に関する症候群の診断に用いるアレイであって、核酸アレイを形成するために、各核酸断片がそれぞれ公知の基質表面上のスポットに固定化された複数の核酸断片を含み、及び各スポットが染色体異常、隣接遺伝子異常、遺伝関連の病気または症候群と関連するゲノム核酸の断片を含む。

【請求項 2】

ゲノム核酸断片が染色体 1、染色体座 1 p ; 3 6 を含み、検出する症候群が 1 p 欠失症候群である、請求項 1 のアレイ。

【請求項 3】

ゲノム核酸断片が染色体 1、染色体座 7 p 1 1 . 2 を含み、検出する症候群がスミス・メイジェニス症候群 (S M S) である、請求項 1 のアレイ。 10

【請求項 4】

ゲノム核酸断片が染色体 3、染色体座 3 p 2 5 - p t e r を含み、検出する症候群が 3 p 欠失症候群である、請求項 1 のアレイ。

【請求項 5】

ゲノム核酸断片が染色体 3、染色体座 3 p 2 1 - p t e r を含み、検出する症候群が 3 p 重複症候群である、請求項 1 のアレイ。 20

【請求項 6】

ゲノム核酸断片が染色体 4、染色体座 4 p 1 6 . 3 を含み、検出する症候群がウォルフ・ヒルシュホーン症候群である、請求項 1 のアレイ。 20

【請求項 7】

ゲノム核酸断片が染色体 4、染色体座 4 p 1 5 . 2 - 1 6 . 1 を含み、検出する症候群が 4 p 重複症候群である、請求項 1 のアレイ。

【請求項 8】

ゲノム核酸断片が染色体 5、染色体座 5 p 1 5 . 2 - p t e r を含み、検出する症候群がネコなき (C r i d u C h a t) 症候群である、請求項 1 のアレイ。

【請求項 9】

ゲノム核酸断片が染色体 7、染色体座 7 p 1 3 . 3 を含み、検出する症候群がミラー・デイツカー (M i l l e r - D i e k e r) 症候群である、請求項 1 のアレイ。 30

【請求項 10】

ゲノム核酸断片が染色体 7、染色体座 7 p 1 1 . 2 3 を含み、検出する症候群がウィリアムズ症候群である、請求項 1 のアレイ。

【請求項 11】

ゲノム核酸断片が染色体 8、染色体座 8 q 2 4 . 1 を含み、検出する症候群がランガー・ギデオン症候群 (L G S) である、請求項 1 のアレイ。

【請求項 12】

ゲノム核酸断片が 1 の側面において、本発明の核酸またはアレイの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物は染色体 8、染色体座 8 q 2 4 . 1 を含むゲノム核酸断片を含み、検出する症候群がランガー・ギデオン症候群 (L G S) または毛髪鼻指節骨症候群 2 型 (T R P S I I) である。を含み、検出する症候群が毛髪鼻指節骨症候群 (T R P S) である、請求項 1 のアレイ。 40

【請求項 13】

ゲノム核酸断片が染色体 8、染色体座 8 q 1 3 . 3 を含み、検出する症候群が鰓弓耳腎 (b r a n c h i o - o t o - r e n a l) 症候群 (B O R) である、請求項 1 のアレイ。

【請求項 14】

ゲノム核酸断片が染色体 9、染色体座 9 p を含み、検出する症候群が 9 p 欠失症候群である、請求項 1 のアレイ。

【請求項 15】

9 p 染色体座が染色体座 9 p 2 2 - p t e r を含む、請求項 14 のアレイ。 50

【請求項 16】

ゲノム核酸断片が、染色体10、染色体座10p13 - p14を含み、検出する症候群がディジヨージ(DiGeorge)症候群IIである、請求項1のアレイ。

【請求項 17】

ゲノム核酸断片が染色体11、染色体座11p13を含み、検出する症候群がWAGR症候群である、請求項1のアレイ。

【請求項 18】

ゲノム核酸断片が染色体11、染色体座11p15.5を含み、検出する症候群がベックウィズ・ヴィードマン症候群である、請求項1のアレイ。

【請求項 19】

ゲノム核酸断片が染色体11、染色体座11p11.2を含み、検出する症候群がPocki-Shaffeer症候群(多発性外骨腫性IIILocus)である、請求項1のアレイ。 10

【請求項 20】

ゲノム核酸断片が染色体13、染色体座13q22を含み、検出する症候群がヒルシュスブルング(Hirschsprung)病及びワルデンブルグ(Waardenburg)症候群である、請求項1のアレイ。

【請求項 21】

ゲノム核酸断片が染色体15、染色体座15q12を含み、検出する症候群がアンジェルマン症候群である、請求項1のアレイ。 20

【請求項 22】

ゲノム核酸断片が染色体15、染色体座15q12を含み、検出する症候群がプラダー・ウィリー症候群である、請求項1のアレイ。

【請求項 23】

ゲノム核酸断片が染色体16、染色体座末端16p13.3を含み、検出する症候群がルビンスタイン・ティビ症候群である、請求項1のアレイ。

【請求項 24】

ゲノム核酸断片が染色体16、ペリセントロメリックな(pericentromeric)領域を含み、検出する症候群が特発性てんかん(idiopathic epilepsy)及び発作性ジスキネジア(paroxysmal dyskinesia)である、請求項1のアレイ。 30

【請求項 25】

ゲノム核酸断片が染色体17、染色体座17p12を含み、検出する症候群がシャルコー・マリー・トゥース病1A型(CMT-1A)である、請求項1のアレイ。

【請求項 26】

ゲノム核酸断片が染色体17、染色体座17p12を含み、検出する症候群が圧迫性麻痺の遺伝性ニューロパチーである、請求項1のアレイ。

【請求項 27】

ゲノム核酸断片が染色体17、染色体座17p13.3を含み、検出する症候群がミラー・ディッカー症候群/分離(isolated)滑脳症である、請求項1のアレイ。 40

【請求項 28】

ゲノム核酸断片が染色体17、染色体座17p11.2を含み、検出する症候群がスミス・メイジエニス症候群である、請求項1のアレイ。

【請求項 29】

ゲノム核酸断片が染色体20、染色体座20p11.2-p12を含み、検出する症候群がアラジル症候群である、請求項1のアレイ。

【請求項 30】

ゲノム核酸断片が染色体22、染色体座22q11.2を含み、検出する症候群がディジヨージ/Velocardiofacial症候群である、請求項1のアレイ。

【請求項 31】

10

20

40

50

ゲノム核酸断片が染色体 X、染色体座 X p 2 1 を含み、検出する症候群が先天性副腎過形成症（A H C）である、請求項 1 のアレイ。

【請求項 3 2】

ゲノム核酸断片が染色体 X、染色体座 X p 2 1 を含み、検出する症候群がデュシェンヌ／ベッカーリンジストロフィーである、請求項 1 のアレイ。

【請求項 3 3】

ゲノム核酸断片が染色体 X、染色体座 X p 2 1 を含み、検出する症候群がグリセロールキナーゼ欠損症である、請求項 1 のアレイ。

【請求項 3 4】

ゲノム核酸断片が染色体 X、染色体座 X p 2 2 を含み、検出する症候群がペリツェウス・メルツバッハ病である、請求項 1 のアレイ。 10

【請求項 3 5】

ゲノム核酸断片が染色体 X、染色体座 X p 2 2 . 3 を含み、検出する症候群がステロイドスルファターゼ欠損症を含む、請求項 1 のアレイ。

【請求項 3 6】

ゲノム核酸断片が染色体 X、染色体座 X p 2 2 . 3 を含み、検出する症候群が L e r i - W e i l 症候群である、請求項 1 のアレイ。

【請求項 3 7】

ゲノム核酸断片が染色体 Y、染色体座 S R Y 染色体座 / Y p を含み、検出する症候群が S R Y 遺伝子座異常を含む、請求項 1 のアレイ。 20

【請求項 3 8】

ゲノム核酸断片が染色体 X、染色体座 X p 2 2 . 3 を含み、検出する症候群がカールマン症候群である、請求項 1 のアレイ。

【請求項 3 9】

ゲノム核酸断片が染色体 X、染色体座 X p 2 1 を含み、検出する症候群が逆性（D S S）である、請求項 1 のアレイ。

【請求項 4 0】

ゲノム核酸断片が染色体 1 7、染色体座 1 7 p 1 1 . 2 を含み、検出する症候群が 1 7 p 1 1 . 2 重複症候群である、請求項 1 のアレイ。

【請求項 4 1】

ゲノム核酸断片が染色体 1 7、染色体座 1 7 p 1 1 . 2 を含み、検出する症候群がスミス・マイジェニス症候群（S M S）である、請求項 1 のアレイ。 30

【請求項 4 2】

さらに、陽性対照として働く核酸断片を含む少なくとも 1 のスポットを含む、請求項 1 のアレイ。

【請求項 4 3】

さらに、陰性対照として働く核酸断片を含む少なくとも 1 のスポットを含む、請求項 1 のアレイ。

【請求項 4 4】

約 7 5 % のスポットが、遺伝子に関連した病気または症候群である染色体異常、隣接遺伝子異常に関するゲノム核酸断片を含む、請求項 1 のアレイ。 40

【請求項 4 5】

約 8 0 % のスポットが、遺伝子に関連した病気または症候群である染色体異常、隣接遺伝子異常に関するゲノム核酸断片を含む、請求項 4 4 のアレイ。

【請求項 4 6】

約 8 5 % のスポットが、遺伝子に関連した病気または症候群である染色体異常、隣接遺伝子異常に関するゲノム核酸断片を含む、請求項 4 5 のアレイ。

【請求項 4 7】

約 9 0 % のスポットが、遺伝子に関連した病気または症候群である染色体異常、隣接遺伝子異常に関するゲノム核酸断片を含む、請求項 4 6 のアレイ。 50

【請求項 4 8】

約 95 % のスポットが、遺伝子に関連した病気または症候群である染色体異常、隣接遺伝子異常にに関するゲノム核酸断片を含む、請求項 4 7 のアレイ。

【請求項 4 9】

約 98 % のスポットが、遺伝子に関連した病気または症候群である染色体異常、隣接遺伝子異常にに関するゲノム核酸断片を含む、請求項 4 8 のアレイ。

【請求項 5 0】

約 100 % のスポットが、遺伝子に関連した病気または症候群である染色体異常、隣接遺伝子異常にに関するゲノム核酸断片を含む、請求項 4 9 のアレイ。

【請求項 5 1】

第 1 のスポット中のアレイ固定化ゲノム核酸断片が第 2 のスポット中のアレイ固定化ゲノム核酸断片と比較して配列の重複がない、請求項 1 のアレイ。 10

【請求項 5 2】

1 のスポット中のアレイ固定化ゲノム核酸断片がアレイ上のその他全てのゲノム核酸含有スポットのアレイ固定化ゲノム核酸断片と比較して配列の重複がない、請求項 1 のアレイ。

【請求項 5 3】

少なくとも 1 のクローンゲノム核酸断片がアレイ上で 2 重、または 3 重にスポットされる、請求項 1 のアレイ。

【請求項 5 4】

2 重スポットまたは 3 重スポットが固定化された核酸断片を異なる量含む、請求項 5 3 のアレイ。 20

【請求項 5 5】

全部のクローンゲノム核酸断片が 2 重または 3 重にアレイ上にスポットされる、請求項 5 3 のアレイ。

【請求項 5 6】

アレイ固定化ゲノム核酸の約 95 % が検出ラベルを含む、請求項 1 のアレイ。

【請求項 5 7】

アレイ固定化ゲノム核酸の約 95 % が検出ラベルを含む、請求項 5 6 のアレイ。

【請求項 5 8】

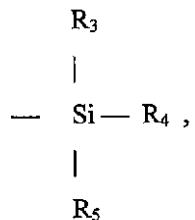
アレイ固定化ゲノム核酸の約 100 % が検出ラベルを含む、請求項 5 7 のアレイ。 30

【請求項 5 9】

アレイ固定化ゲノム核酸が基質表面に共有結合する、請求項 1 のアレイ。

【請求項 6 0】

請求項 5 9 のアレイであって、アレイ固定化ゲノム核酸が一般式： $R_1 - X - R_2$ を有する化合物に共有結合し、ここで R_1 は環状エーテル、アルデヒドまたはクロロメチルフェニル成分であり； X は R_1 部分と R_2 部分を結合するのに化学的に適した成分であり、 R_2 部分は以下の一般式を有する

【化 1】

40

ここで、 R_3 、 R_4 及び R_5 は同一または異なるアルコキシ基またはクロロ基を含む。

【請求項 6 1】

アレイ固定化ゲノム核酸が一般式： $R_1 - X - R_2$ を有する化合物に共有結合し、ここで R_1 はアミノ基、 R_2 はアルコキシラン基または塩化ハロゲン（chlorohalide）

50

d e) 基であり；及び X は R₁ 基と R₂ 基を結合するのに化学的に適した成分である、請求項 5 9 のアレイ。

【請求項 6 2】

アレイ固定化ゲノム核酸が一般式： R₁ - X - Si (O R₂)_m (C l)_n (R)_k を有する化合物に共有結合でき、ここで、m + k は整数の 3 であり、n はもし m が 0 より大きい場合、0 であってもよく、または n + k は整数の 3 であり、m はもし n が 0 より大きい場合、0 であってもよい；X は不活性リンカーであり；R₁ は生体分子に反応性を有する基を含み；R はアルキル基；及び R₂ はアルキル基である、請求項 5 9 のアレイ。

【請求項 6 3】

クローン核酸断が人工染色体を含む構築体内でクローンされる、請求項 1 のアレイ。 10

【請求項 6 4】

人工染色体が細菌性人工染色体 (BAC) を含む、請求項 6 3 のアレイ。

【請求項 6 5】

人工染色体がヒト人工染色体 (HAC)、酵母人工染色体 (YAC)、形質転換 (transformation - competent) 人工染色体 (TAC) 及びバクテリオファージ P 1 由来人工染色体 (PAC) からなる群より選択される、請求項 6 3 のアレイ。

【請求項 6 6】

クローン核酸断片がコスミドベクター、プラスミドベクター及びウイルスベクターからなる群より選択されるベクターを含む構築体内でクローンされる、請求項 1 のアレイ。

【請求項 6 7】

クローン核酸断片が約 50 キロ塩基 (0.5 メガ塩基) ~ 約 500 キロ塩基 (5 メガ塩基) 長である、請求項 1 のアレイ。 20

【請求項 6 8】

クローン核酸断片が約 100 キロ塩基 (1 メガ塩基) ~ 約 400 キロ塩基 (4 メガ塩基) 長である、請求項 6 7 のアレイ。

【請求項 6 9】

クローン核酸断片が約 300 キロ塩基 (3 メガ塩基) 長である、請求項 6 8 のアレイ。

【請求項 7 0】

染色体異常の検出または隣接遺伝子異常に関する症候群の診断に用いるためのアレイであって、複数の核酸断片を含み、核酸アレイを形成するために、各核酸がそれぞれ公知の基質表面上のスポットに固定化され、及び各スポットが染色体異常、隣接遺伝子異常、遺伝関連の病気または症候群と関連するゲノム核酸の断片を含み、及び複数の核酸断片が以下を含むアレイ：

- 染色体 1、染色体座 1 p ; 3 6 であって、検出する症候群が 1 p 欠失症候群；
- 染色体 3、染色体座 3 p 2 5 - p t e r であって、検出する症候群が 3 p 欠失症候群；
- 染色体 3、染色体座 3 p 2 1 - p t e r であって、検出する症候群が 3 p 重複症候群；
- 染色体 4、染色体座 4 p 1 6 . 3 であって、検出する症候群がウォルフ・ヒルシュホーン症候群；
- 染色体 4、染色体座 4 p 1 5 . 2 - 1 6 . 1 であって、検出する症候群が 4 p 重複症候群；
- 染色体 5、染色体座 5 p 1 5 . 2 - p t e r であって、検出する症候群がネコなき (C r i d u C h a t) 症候群；
- 染色体 7、染色体座 7 p 1 3 . 3 であって、検出する症候群がミラー・ディッカー (M i l l e r - D i e k e r) 症候群；
- 染色体 7、染色体座 7 p 1 1 . 2 3 であって、検出する症候群がウィリアムズ症候群；
- 染色体 8、染色体座 8 p 2 4 . 1 であって、検出する症候群がランガー・ギデオン症候群 (L G S) ；
- 染色体 8、染色体座 8 p 2 4 . 1 であって、検出する症候群が毛髪鼻指節骨症候群 (T R P S) ；
- 染色体 9、染色体座 9 p であって、検出する症候群が 9 p 欠失症候群；

20

30

40

50

染色体 10、染色体座 10 p 13 - p 14 であって、検出する症候群がディジョージ (D i G e o r g e) 症候群 II ;

染色体 11、染色体座 11 p 13 であって、検出する症候群が W A G R 症候群；

染色体 11、染色体座 11 p 15 . 5 であって、検出する症候群がベックウィズ・ヴィードマン症候群；

染色体 11、染色体座 11 p 11 . 2 であって、検出する症候群が P o t o c k i - S h a f f e r 症候群 (多発性外骨腫性 II L o c u s) ；

染色体 15、染色体座 15 p 12 であって、検出する症候群がアンジェルマン症候群；

染色体 15、染色体座 15 p 12 であって、検出する症候群がプラダー・ウィリー症候群；

染色体 16、染色体末端 16 p 13 . 3 であって、検出する症候群がルビンスタイン・ティビ症候群；

染色体 17、染色体座 17 p 12 であって、検出する症候群がシャルコー・マリー・トゥース病 1A 型 (C M T - 1 A) ；

染色体 17、染色体座 17 p 12 であって、検出する症候群が圧迫性麻痺の遺伝性ニューロパチー；

染色体 17、染色体座 17 p 13 . 3 であって、検出する症候群がミラー・ディッカー症候群 / 分離 (I s o l a t e d) 滑脳症；

染色体 17、染色体座 17 p 11 . 2 であって、検出する症候群がスミス・メイジェニス症候群；

染色体 20、染色体座 20 p 11 . 2 - p 12 であって、検出する症候群がアラジル症候群；

染色体 22、染色体座 22 p 11 . 2 であって、検出する症候群がディジョージ / V e l o c a r d i o f a c i a l 症候群；

染色体 X、染色体座 X p 21 であって、検出する症候群が先天性副腎過形成症 (A H C) ；

染色体 X、染色体座 X p 21 であって、検出する症候群がデュシェンヌ / ベッカー筋ジストロフィー；

染色体 X、染色体座 X p 21 であって、検出する症候群がグリセロールキナーゼ欠損症；

染色体 X、染色体座 X p 22 であって、検出する症候群がペリツェウス・メルツバッハ病；

染色体 X、染色体座 X p 22 . 3 であって、検出する症候群がステロイドスルファターゼ欠損症；

染色体 Y、染色体座 S R Y 染色体座 / Y p であって、検出する症候群が S R Y 遺伝子座異常；

染色体 X、染色体座 X p 22 . 3 、及び検出する症候群がカールマン症候群；

染色体 X、染色体座 X p 21 であって、検出する症候群が逆性 (D S S) ；及び

染色体 17、染色体座 17 p 11 . 2 であって、検出する症候群が 17 p 11 . 2 重複症候群。

【請求項 7 1】

染色体異常の検出または隣接遺伝子異常に関する症候群の診断に用いるためのアレイであって、複数の核酸断片を含み、核酸アレイを形成するために、各核酸がそれぞれ公知の基質表面上のスポットに固定化され、及び該核酸断片は染色体 1、染色体座 1 p ; 3 6 ; 染色体 3、染色体座 3 p 2 5 - p t e r ; 染色体 3、染色体座 3 p 2 1 - p t e r ; 染色体 4、染色体座 4 p 1 6 . 3 ; 染色体 4、染色体座 4 p 1 5 . 2 - 1 6 . 1 ; 染色体 5、染色体座 5 p 1 5 . 2 - p t e r ; 染色体 7、染色体座 7 p 1 3 . 3 ; 染色体 7、染色体座 7 q 1 1 . 2 3 ; 染色体 8、染色体座 8 q 2 4 . 1 ; 染色体 8、染色体座 8 q 2 4 . 1 ; 染色体 9、染色体座 9 p ; 染色体 10、染色体座 10 p 1 3 - p 1 4 ; 染色体 11、染色体座 11 p 1 3 ; 染色体 11、染色体座 11 p 1 5 . 5 ; 染色体 11、染色体座 11 p 1 1

10

20

30

40

50

1 . 2 ; 染色体 1 5 、染色体座 1 5 q 1 2 ; 染色体 1 6 、染色体座 1 6 p 1 3 . 3 ; 染色体 1 7 、染色体座 1 7 p 1 2 ; 染色体 1 7 、染色体座 1 7 p 1 3 . 3 ; 染色体 1 7 、染色体座 1 7 p 1 1 . 2 ; 染色体 2 0 、染色体座 2 0 p 1 1 . 2 - p 1 2 ; 染色体 2 2 、染色体座 2 2 q 1 1 . 2 ; 染色体 X 、染色体座 X p 2 1 ; 染色体 X 、染色体座 X p 2 2 ; 染色体 X 、染色体座 X p 2 2 . 3 ; 及び染色体 Y 、染色体座 S R Y 染色体座 / Y p からなる群より選択されるアレイ。

【請求項 7 2】

アレイが核酸断片グループの中から少なくとも 2 個の核酸を含む、請求項 7 1 のアレイ。

【請求項 7 3】

アレイが核酸断片グループの中から少なくとも 5 個の核酸を含む、請求項 7 2 のアレイ。

10

【請求項 7 4】

アレイが核酸断片グループの中から少なくとも 1 0 個の核酸を含む、請求項 7 3 のアレイ。

【請求項 7 5】

さらに陽性対照として働く核酸断片を含む少なくとも 1 のスポットを含む、請求項 7 0 または請求項 7 1 のアレイ。

【請求項 7 6】

さらに陰性対照として働く核酸断片を含む少なくとも 1 のスポットを含む、請求項 7 0 または請求項 7 1 のアレイ。

【請求項 7 7】

染色体異常を検出または個体の隣接遺伝子異常に関連する症候群を診断する方法であって、以下の工程を含む方法：

(a) 請求項 1 のアレイを提供する工程；

(b) 個体由来のゲノム D N A の実質的に十分な相補体を含むサンプルを提供する工程；

(c) 工程 (a) のアレイに固定化されたゲノム核酸断片にサンプル中の核酸が特異的にハイブリダイズできる条件下で工程 (b) のゲノム D N A または工程 (b) のゲノム D N A と同等の配列を含む核酸と該アレイを接触させる工程；

(g) アレイ上に固定化されたゲノム核酸断片に特異的にハイブリダイズしたゲノム D N A の位置及び量を測定し、それによって染色体異常を検出、または個体の隣接遺伝子異常に関連する症候群の診断をする工程。

30

【請求項 7 8】

個体の染色体異常の検出により個体の病気または健康状態または症候群を検出する、請求項 7 7 の方法。

【請求項 7 9】

個体がヒトである、請求項 7 7 の方法。

【請求項 8 0】

個体が胚である、請求項 7 7 の方法。

【請求項 8 1】

個体が染色体異常を有する疑いがある、請求項 7 7 の方法。

40

【請求項 8 2】

個体が核型異常に関連する病気または健康状態を有する疑いがある、請求項 7 7 の方法。

【請求項 8 3】

病気が癌を含む、請求項 7 7 の方法。

【請求項 8 4】

サンプルが体液サンプル、細胞サンプルまたは組織サンプルを含む、請求項 7 7 の方法。

【請求項 8 5】

サンプルが癌細胞または腫瘍細胞サンプルを含む、請求項 8 4 の方法。

【請求項 8 6】

サンプルが生検サンプルである、請求項 7 7 の方法。

50

【請求項 8 7】

サンプルが血液サンプルである、請求項 7 7 の方法。

【請求項 8 8】

サンプルが尿サンプルである、請求項 7 7 の方法。

【請求項 8 9】

サンプルが脳脊髄液（CSF）サンプルサンプルである、請求項 7 7 の方法。

【請求項 9 0】

サンプルが羊水サンプルである、請求項 7 7 の方法。

【請求項 9 1】

サンプルが絨毛膜サンプルである、請求項 7 7 の方法。 10

【請求項 9 2】

サンプルが胚細胞または胚組織サンプルである、請求項 7 7 の方法。

【請求項 9 3】

サンプル核酸またはアレイに固定化された核酸と検出ラベルを結合させる工程を含む、請求項 7 7 の方法。

【請求項 9 4】

検出ラベルが核酸と共有結合する、請求項 9 3 の方法。

【請求項 9 5】

検出ラベルが蛍光ラベルを含む、請求項 9 3 の方法。

【請求項 9 6】

検出ラベルが Cy 5（登録商標）または同等物を含む、請求項 9 5 の方法。 20

【請求項 9 7】

検出ラベルが Cy 3（登録商標）または同等物を含む、請求項 9 5 の方法。

【請求項 9 8】

検出ラベルがローダミン、フルオレセインまたはアリール置換 4,4'-ジフルオロ-4-ボラ-3a,4a-ジアザ-s-インドアセン染料または同等物を含む、請求項 9 5 の方法。

【請求項 9 9】

核酸断片の標識がランダムプライム標識を含む、請求項 9 3 の方法。

【請求項 1 0 0】

核酸断片の標識がニックトランスレーション標識を含む、請求項 9 3 の方法。 30

【請求項 1 0 1】

約 95% のアレイ固定化ゲノム核酸が検出ラベルを含む、請求項 9 3 の方法。

【請求項 1 0 2】

約 98% のアレイ固定化ゲノム核酸が検出ラベルを含む、請求項 1 0 1 の方法。

【請求項 1 0 3】

約 100% のアレイ固定化ゲノム核酸が検出ラベルを含む、請求項 1 0 2 の方法。

【請求項 1 0 4】

検出ラベルを検出できる装置の使用を含む、請求項 9 3 の方法。

【請求項 1 0 5】

装置が検出ラベルと結合した基質表面上のスポットを測定する、請求項 1 0 4 の方法。 40

【請求項 1 0 6】

装置が基質表面上のスポット上にある検出ラベルの量を測定する、請求項 1 0 4 の方法。

【請求項 1 0 7】

装置が電荷結合素子（CCD）を含む、請求項 1 0 4 の方法。

【請求項 1 0 8】

装置が多色蛍光イメージングできる、請求項 1 0 4 の方法。

【請求項 1 0 9】

多色蛍光イメージング・データを分析するためのコンピュータ・プロセッサの使用を含む、請求項 1 0 4 の方法。 50

【請求項 110】

さらにアレイからのイメージデータ及びディスプレイ結果を解釈するためのコンピュータ及びコンピュータ・プログラムアルゴリズムの使用を含む、請求項 104 の方法。

【請求項 111】

アレイ上に固定化されたゲノム核酸断片に特異的にハイブリダイズしないサンプル中の核酸を除去する洗浄工程をさらに含む、請求項 77 の方法。

【請求項 112】

洗浄工程が塩濃度が約 0.02 モル、pH 7 及び温度が少なくとも約 50 の溶液の使用を含む、請求項 111 の方法。

【請求項 113】

洗浄工程が塩濃度が約 0.15 M、温度が少なくとも約 72 の溶液の約 15 分間の使用を含む、請求項 111 の方法。

【請求項 114】

洗浄工程が塩濃度が約 0.2 X SSC、温度が少なくとも約 50 の溶液の少なくとも約 15 分間の使用を含む、請求項 111 の方法。

【請求項 115】

請求項 77 の方法であって、さらにコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーション (CGH) の工程を含み、該方法はさらに以下を含む：工程 (b) の第 1 のサンプル中の核酸と検出ラベルと結合させる工程；実質的に完全なゲノムに相補的な核酸を含む第 2 のサンプルを提供する工程であって、該核酸は第 1 のサンプルゲノム核酸に関する検出ラベルと区別ができる標識ラベルを含み、第 2 のサンプルのゲノムの核型は公知である；第 1 のサンプルの核酸と第 2 のサンプルの核酸を、該サンプルの核酸がアレイ固定化核酸に特異的にハイブリダイズできる条件下でアレイと接触させる工程；アレイ上に固定化されたゲノム核酸断片に特異的にハイブリダイズした第 1 及び第 2 のサンプル由来の核酸の位置及び量を測定し、それによってコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーションを行う工程。

【請求項 116】

第 1 及び第 2 のサンプル由来の核酸が同じ種由来である、請求項 115 の方法。

【請求項 117】

第 1 及び第 2 のサンプル由来の核酸がヒトサンプル由来である、請求項 116 の方法。

【請求項 118】

第 2 のサンプルの実質的に完全なゲノムが野生型ゲノムを含む、請求項 115 の方法。

【請求項 119】

以下の部品を含むキット：(a) 染色体異常の検出または隣接遺伝子異常に関する症候群の診断に用いるためのアレイであって、核酸アレイを形成するために、各核酸断片がそれぞれ公知の基質表面上のスポットに固定化された複数の核酸断片を含み、及び各スポットが染色体異常、隣接遺伝子異常、遺伝関連の病気または症候群と関連するゲノム核酸の断片を含む；及び (b) 該アレイを用いて染色体異常を検出するための使用説明書。

【請求項 120】

アレイに適用するためのゲノム核酸を含むサンプルを調製するための材料をさらに含む、請求項 119 のキット。

【請求項 121】

サンプルゲノム核酸を標識するための材料をさらに含む、請求項 119 のキット。

【請求項 122】

野生型ゲノム核酸のサンプルをさらに含む、請求項 119 のキット。

【請求項 123】

野生型ゲノム核酸が標識された、請求項 122 のキット。

【請求項 124】

野生型ゲノム核酸がサンプルゲノム核酸を標識するために用いるラベルと異なるラベルを含む、請求項 123 のキット。

【請求項 125】

野生型ゲノム核酸がヒト野生型ゲノム核酸を含む、請求項122のキット。

【請求項 126】

染色体異常の検出、または隣接遺伝子異常に関する症候群の診断のための核酸の編集物（compilation）であって、複数の核酸断片を含み、各核酸断片が染色体異常、隣接遺伝子異常、遺伝関連の病気または症候群と関連するゲノム核酸断片を含む核酸の編集物。

【請求項 127】

ゲノム核酸断片が、染色体1、染色体座1p；36を含み、検出する症候群が1p欠失症候群である、請求項126の核酸の編集物。 10

【請求項 128】

ゲノム核酸断片が、染色体1、染色体座7p11.2を含み、検出する症候群がスミス・メイジエニス症候群(SMS)である、請求項126の核酸の編集物。

【請求項 129】

ゲノム核酸断片が、染色体3、染色体座3p25-pterを含み、検出する症候群が3p欠失症候群である、請求項126の核酸の編集物。

【請求項 130】

ゲノム核酸断片が、染色体3、染色体座3p21-pterを含み、検出する症候群が3p重複症候群である、請求項126の核酸の編集物。

【請求項 131】

ゲノム核酸断片が、染色体4、染色体座4p16.3を含み、検出する症候群がウォルフ・ヒルシュホーン症候群である、請求項126の核酸の編集物。 20

【請求項 132】

ゲノム核酸断片が、染色体4、染色体座4p15.2-16.1を含み、検出する症候群が4p重複症候群である、請求項126の核酸の編集物。

【請求項 133】

ゲノム核酸断片が、染色体5、染色体座5p15.2-pterを含み、検出する症候群がネコなき(Cridu Chat)症候群である、請求項126の核酸の編集物。

【請求項 134】

ゲノム核酸断片が、染色体7、染色体座7p13.3を含み、検出する症候群がミラー・ディッカー(Miller-Dieker)症候群である、請求項126の核酸の編集物。 30

【請求項 135】

ゲノム核酸断片が、染色体7、染色体座7p11.23を含み、検出する症候群がウィリアムズ症候群である、請求項126の核酸の編集物。

【請求項 136】

ゲノム核酸断片が、染色体8、染色体座8p24.1を含み、検出する症候群がランガー・ギデオン症候群(LGS)である、請求項126の核酸の編集物。

【請求項 137】

ゲノム核酸断片が、染色体8、染色体座8p24.1を含み、検出する症候群が毛髪鼻指節骨症候群(TRPS)である、請求項126の核酸の編集物。 40

【請求項 138】

ゲノム核酸断片が、染色体8、染色体座8p13.3を含み、検出する症候群が鰓弓耳腎(brachio-oto-renal)症候群(BOR)である、請求項126の核酸の編集物。

【請求項 139】

ゲノム核酸断片が、染色体9、染色体座9pを含み、検出する症候群が9p欠失症候群である、請求項126の核酸の編集物。

【請求項 140】

9p染色体座が染色体座9p22-pterを含む、請求項126の核酸の編集物。 50

【請求項 141】

ゲノム核酸断片が、染色体10、染色体座10p13-p14を含み、検出する症候群がディジヨージ(DiGeorge)症候群IIである、請求項126の核酸の編集物。

【請求項 142】

ゲノム核酸断片が、染色体11、染色体座11p13を含み、検出する症候群がWAGR症候群である、請求項126の核酸の編集物。

【請求項 143】

ゲノム核酸断片が、染色体11、染色体座11p15.5を含み、検出する症候群がベックウィズ・ヴィードマン症候群である、請求項126の核酸の編集物。

【請求項 144】

ゲノム核酸断片が、染色体11、染色体座11p11.2を含み、検出する症候群がPocki-Shaffer症候群(多発性外骨腫性II Locus)である、請求項126の核酸の編集物。10

【請求項 145】

ゲノム核酸断片が、染色体13、染色体座13q22を含み、検出する症候群がヒルシュスブルング(Hirschsprung)病及びワルデンブルグ(Waardenburg)症候群である、請求項126の核酸の編集物。

【請求項 146】

ゲノム核酸断片が、染色体15、染色体座15q12を含み、検出する症候群がアンジェルマン症候群である、請求項126の核酸の編集物。20

【請求項 147】

ゲノム核酸断片が、染色体7、染色体15、染色体座15q12を含み、検出する症候群がプラダー・ウィリー症候群である、請求項126の核酸の編集物。

【請求項 148】

ゲノム核酸断片が、染色体16、染色体座末端16p13.3を含み、検出する症候群がルビンスタイン・テイビ症候群である、請求項126の核酸の編集物。

【請求項 149】

ゲノム核酸断片が、染色体16、ペリセントロメリックな(pericentromeric)領域を含み、検出する症候群が特発性てんかん(idiopathic episy)及び発作性ジスキネジア(paroxysmal dyskinesia)である、請求項126の核酸の編集物。30

【請求項 150】

ゲノム核酸断片が、染色体17、染色体座17p12を含み、検出する症候群がシャルコー・マリー・トゥース病1A型(CMT-1A)である、請求項126の核酸の編集物。

【請求項 151】

ゲノム核酸断片が、染色体17、染色体座17p12を含み、検出する症候群が圧迫性麻痺の遺伝性ニューロパシーである、請求項126の核酸の編集物。

【請求項 152】

ゲノム核酸断片が、染色体17、染色体座17p13.3を含み、検出する症候群がミラー・ディッカー症候群/分離(isolated)滑脳症である、請求項126の核酸の編集物。40

【請求項 153】

ゲノム核酸断片が、染色体17、染色体座17p11.2を含み、検出する症候群がスミス・メイジエニス症候群である、請求項126の核酸の編集物。

【請求項 154】

ゲノム核酸断片が、染色体20、染色体座20p11.2-p12を含み、検出する症候群がアラジル症候群である、請求項126の核酸の編集物。

【請求項 155】

ゲノム核酸断片が、染色体22、染色体座22q11.2を含み、検出する症候群がディジヨージ/Velocardiofacial症候群である、請求項126の核酸の編集集50

物。

【請求項 156】

ゲノム核酸断片が、染色体X、染色体座X p 2 1を含み、検出する症候群が先天性副腎過形成症(A H C)である、請求項126の核酸の編集物。

【請求項 157】

ゲノム核酸断片が、染色体X、染色体座X p 2 1を含み、検出する症候群がデュシェンヌ/ベッカーラジストロフィーである、請求項126の核酸の編集物。

【請求項 158】

ゲノム核酸断片が、染色体X、染色体座X p 2 1を含み、検出する症候群がグリセロールキナーゼ欠損症である、請求項126の核酸の編集物。

【請求項 159】

ゲノム核酸断片が、染色体X、染色体座X p 2 2を含み、検出する症候群がペリツェウス・メルツバッハ病である、請求項126の核酸の編集物。

【請求項 160】

ゲノム核酸断片が、染色体X、染色体座X p 2 2 . 3を含み、検出する症候群がステロイドスルファターゼ欠損症である、請求項126の核酸の編集物。

【請求項 161】

ゲノム核酸断片が、染色体X、染色体座X p 2 2 . 3を含み、検出する症候群がL e r i - W e i l l 症候群である、請求項126の核酸の編集物。

【請求項 162】

ゲノム核酸断片が、染色体Y、染色体座S R Y 染色体座 / Y p を含み、検出する症候群がS R Y 遺伝子座異常である、請求項126の核酸の編集物。

【請求項 163】

ゲノム核酸断片が、染色体X、染色体座X p 2 2 . 3を含み、検出する症候群がカールマン症候群である、請求項126の核酸の編集物。

【請求項 164】

ゲノム核酸断片が、染色体X、染色体座X p 2 1を含み、検出する症候群が逆性(D S S)である、請求項126の核酸の編集物。

【請求項 165】

ゲノム核酸断片が、染色体17、染色体座17 p 1 1 . 2を含み、検出する症候群が17 p 1 1 . 2重複症候群である、請求項126の核酸の編集物。

【請求項 166】

ゲノム核酸断片が、染色体17、染色体座17 p 1 1 . 2を含み、検出する症候群がスミス・マイジェニス症候群(S M S)である、請求項126の核酸の編集物。

【請求項 167】

核酸断片がさらにクローニング輸送手段(v e h i c l e)を含む、請求項126の核酸の編集物。

【請求項 168】

約75%の核酸断片が染色体異常、隣接遺伝子異常、遺伝関連の病気または症候群と関連するゲノム核酸断片を含む、請求項126の核酸の編集物。

【請求項 169】

約80%の核酸断片が染色体異常、隣接遺伝子異常、遺伝関連の病気または症候群と関連するゲノム核酸断片を含む、請求項168の核酸の編集物。

【請求項 170】

約85%の核酸断片が染色体異常、隣接遺伝子異常、遺伝関連の病気または症候群と関連するゲノム核酸断片を含む、請求項169の核酸の編集物。

【請求項 171】

約90%の核酸断片が染色体異常、隣接遺伝子異常、遺伝関連の病気または症候群と関連するゲノム核酸断片を含む、請求項170の核酸の編集物。

【請求項 172】

10

20

30

40

50

約 95 % の核酸断片が染色体異常、隣接遺伝子異常、遺伝関連の病気または症候群と関連するゲノム核酸断片を含む、請求項 171 の核酸の編集物。

【請求項 173】

約 98 % の核酸断片が染色体異常、隣接遺伝子異常、遺伝関連の病気または症候群と関連するゲノム核酸断片を含む、請求項 172 の核酸の編集物。

【請求項 174】

約 100 % の核酸断片が染色体異常、隣接遺伝子異常、遺伝関連の病気または症候群と関連するゲノム核酸断片を含む、請求項 173 の核酸の編集物。

【請求項 175】

核酸断片が表面上に固定化される、請求項 126 の核酸の編集物。 10

【請求項 176】

核酸断片がアレイの表面上に固定される、請求項 175 の核酸の編集物。

【請求項 177】

約 95 % の核酸断片が標識ラベルを含む、請求項 126 の核酸の編集物。

【請求項 178】

約 98 % の核酸断片が標識ラベルを含む、請求項 177 の核酸の編集物。

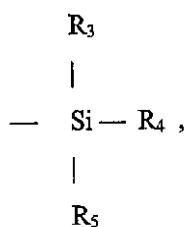
【請求項 179】

100 % の核酸断片が標識ラベルを含む、請求項 178 の核酸の編集物。

【請求項 180】

請求項 126 の核酸の編集物であって、核酸断片が一般式 : $R_1 - X - R_2$ を有する化合物をさらに含有し、ここで R_1 は環状エーテル、アルデヒドまたはクロロメチルフェニル成分であり； X は R_1 部分と R_2 部分を結合するのに化学的に適した成分であり、 R_2 部分は以下の一般式を有する 20

【化 2】



20

30

ここで、 R_3 、 R_4 及び R_5 は同一または異なるアルコキシ基またはクロロ基を含む。

【請求項 181】

核酸断片が一般式 : $R_1 - X - R_2$ を有する化合物をさらに含有し、ここで R_1 はアミノ基、 R_2 はアルコキシラン基または塩化ハロゲン基であり；及び X は R_1 基と R_2 基を結合するのに化学的に適した成分である、請求項 126 の核酸の編集物。

【請求項 182】

請求項 126 の核酸の編集物であって、核酸断片が一般式 $R_1 - X - Si(O R_2)_m(C_1)_n(R)_k$ を有する化合物をさらに含有し、ここで、 $m + k$ は整数の 3 であり、 n はもし m が 0 より大きい場合、 0 であってもよく、または $n + k$ は整数の 3 であり、 m はもし n が 0 より大きい場合、 0 であってもよい； X は不活性リンカーであり； R_1 は生体分子に反応性を有する基を含み； R はアルキル基；及び R_2 はアルキル基である。 40

【請求項 183】

少なくとも 1 の核酸断片が人工染色体を含む構築体内にクローンされる、請求項 126 の核酸の編集物。

【請求項 184】

人工染色体が細菌性人工染色体 (BAC) を含む、請求項 183 の核酸の編集物。

【請求項 185】

人工染色体がヒト人工染色体 (HAC) 、酵母人工染色体 (YAC) 、形質転換 (transformation - competent) 人工染色体 (TAC) 及びバクテリオフ 50

アージ P 1 由来人工染色体 (P A C) からなる群より選択される、請求項 1 8 3 の核酸の編集物。

【請求項 1 8 6】

少なくとも 1 の核酸断片が、コスミドベクター、プラスミドベクター及びウイルスベクターからなる群より選択されるベクターを含む構築体内にクローンされる、請求項 1 2 6 の核酸の編集物。

【請求項 1 8 7】

核酸断片が約 50 キロ塩基 (0.5 メガ塩基) ~ 約 500 キロ塩基 (5 メガ塩基) 長である、請求項 1 2 6 の核酸の編集物。

【請求項 1 8 8】

核酸断片が約 100 キロ塩基 (1 メガ塩基) ~ 約 400 キロ塩基 (4 メガ塩基) 長である、請求項 1 8 7 の核酸の編集物。

【請求項 1 8 9】

核酸断片が約 150 キロ塩基 (1.5 メガ塩基) ~ 約 300 キロ塩基 (3 メガ塩基) 長である、請求項 1 8 8 の核酸の編集物。

【請求項 1 9 0】

染色体異常の検出、隣接遺伝子異常にに関する症候群の診断に用いる核酸の編集物であって、染色体異常、隣接遺伝子異常、遺伝関連の病気または症候群と関連する複数の核酸断片を含み、該複数の核酸断片は以下を含む：

- 染色体 1、染色体座 1 p 3 6 であって、検出する症候群が 1 p 欠失症候群；
- 染色体 3、染色体座 3 p 2 5 - p t e r であって、検出する症候群が 3 p 欠失症候群；
- 染色体 3、染色体座 3 p 2 1 - p t e r であって、検出する症候群が 3 p 重複症候群；
- 染色体 4、染色体座 4 p 1 6 . 3 であって、検出する症候群がウォルフ・ヒルシュホーン症候群；
- 染色体 4、染色体座 4 p 1 5 . 2 - 1 6 . 1 であって、検出する症候群が 4 p 重複症候群；
- 染色体 5、染色体座 5 p 1 5 . 2 - p t e r であって、検出する症候群がネコなき (C r i d u C h a t) 症候群；
- 染色体 7、染色体座 7 p 1 3 . 3 であって、検出する症候群がミラー・ディッカー (M i l l e r - D i e k e r) 症候群；
- 染色体 7、染色体座 7 q 1 1 . 2 3 であって、検出する症候群がウィリアムズ症候群；
- 染色体 8、染色体座 8 q 2 4 . 1 、及び検出する症候群がランガー・ギデオン症候群 (L G S) ；
- 染色体 8、染色体座 8 q 2 4 . 1 であって、検出する症候群が毛髪鼻指節骨症候群 (T R P S) ；
- 染色体 9、染色体座 9 p であって、検出する症候群が 9 p 欠失症候群；
- 染色体 1 0 、染色体座 1 0 p 1 3 - p 1 4 であって、検出する症候群がディジョージ (D i G e o r g e) 症候群 I I ；
- 染色体 1 1 、染色体座 1 1 p 1 3 であって、検出する症候群が W A G R 症候群；
- 染色体 1 1 、染色体座 1 1 p 1 5 . 5 であって、検出する症候群がベックウィズ・ヴィードマン症候群；
- 染色体 1 1 、染色体座 1 1 p 1 1 . 2 であって、検出する症候群が P o t o c k i - S h a f f e r 症候群 (多発性外骨腫性 I I L o c u s) ；
- 染色体 1 5 、染色体座 1 5 q 1 2 であって、検出する症候群がアンジェルマン症候群；
- 染色体 1 5 、染色体座 1 5 q 1 2 であって、検出する症候群がプラダー・ウィリー症候群；
- 染色体 1 6 、染色体座末端 1 6 p 1 3 . 3 であって、検出する症候群がルビンスタイン・ティビ症候群；
- 染色体 1 7 、染色体座 1 7 p 1 2 であって、検出する症候群がシャルコー・マリー・トゥース病 1 A 型 (C M T - 1 A) ；

10

20

30

40

50

染色体 17、染色体座 17 p 12 であって、検出する症候群が圧迫性麻痺の遺伝性ニューロパシー；

染色体 17、染色体座 17 p 13 . 3 であって、検出する症候群がミラー・ディッカー症候群 / 分離 (Isolated) 滑脳症；

染色体 17、染色体座 17 p 11 . 2 であって、検出する症候群がスミス・メイジェニス症候群；

染色体 20、染色体座 20 p 11 . 2 - p 12 であって、検出する症候群がアラジル症候群；

染色体 22、染色体座 22 q 11 . 2 であって、検出する症候群がディジョージ / Ve 10 locardia facial 症候群；

染色体 X、染色体座 X p 21 であって、検出する症候群が先天性副腎過形成症 (AHC)；

染色体 X、染色体座 X p 21 であって、検出する症候群がデュシェンヌ / ベッカー筋ジストロフィー；

染色体 X、染色体座 X p 21 であって、検出する症候群がグリセロールキナーゼ欠損症；

染色体 X、染色体座 X p 22 であって、検出する症候群がペリツェウス・メルツバッハ病；

染色体 X、染色体座 X p 22 . 3 であって、検出する症候群がステロイドスルファターゼ欠損症；

染色体 Y、染色体座 S R Y 染色体座 / Y p であって、検出する症候群が S R Y 遺伝子座異常；

染色体 X、染色体座 X p 22 . 3 であって、検出する症候群がカールマン症候群；

染色体 X、染色体座 X p 21 であって、検出する症候群が逆性 (DSS)；及び

染色体 17、染色体座 17 p 11 . 2 であって、検出する症候群が 17 p 11 . 2 重複症候群。

【請求項 191】

各核酸断片が染色体異常、隣接遺伝子異常、遺伝関連の病気または症候群と関連する、核酸の編集物、及び該核酸断片が以下からなる群より選択される：染色体 1、染色体座 1 p 36；染色体 3、染色体座 3 p 25 - pter；染色体 3、染色体座 3 p 21 - pter；染色体 4、染色体座 4 p 16 . 3；染色体 4、染色体座 4 p 15 . 2 - 16 . 1；染色体 5、染色体座 5 p 15 . 2 - pter；染色体 7、染色体座 7 p 13 . 3；染色体 7、染色体座 7 q 11 . 23；染色体 8、染色体座 8 q 24 . 1；染色体 8、染色体座 8 q 24 . 1；染色体 9、染色体座 9 p；染色体 10、染色体座 10 p 13 - p 14；染色体 11、染色体座 11 p 13；染色体 11、染色体座 11 p 15 . 5；染色体 11、染色体座 11 p 11 . 2；染色体 15、染色体座 15 q 12；染色体 16、染色体座末端 16 p 13 . 3；染色体 17、染色体座 17 p 12；染色体 17、染色体座 17 p 13 . 3；染色体 17、染色体座 17 p 11 . 2；染色体 20、染色体座 20 p 11 . 2 - p 12；染色体 22、染色体座 22 q 11 . 2；染色体 X、染色体座 X p 21；染色体 X、染色体座 X p 22；染色体 X、染色体座 X p 22 . 3；及び染色体 Y、染色体座 S R Y 染色体座 / Y p。

【請求項 192】

核酸断片が基質表面上に固定化される、請求項 191 の核酸の編集物。

【請求項 193】

核酸断片がアレイの基質表面上に固定化される、請求項 192 の核酸の編集物。

【請求項 194】

個体の染色体異常を検出または隣接遺伝子異常に関する症候群を診断する方法であって、以下の工程を含む：

(a) 請求項 126 または請求項 191 に記載する核酸の編集部を提供する工程；

(b) 該個体由来のゲノム DNA の実質的に完全なゲノムに相補的な核酸を含むサンプ

10

20

30

40

50

ルを提供する工程；

(c) 工程(a)の核酸の編集物にサンプル中の核酸が特異的にハイブリダイズできる条件下で工程(b)のゲノムDNAまたは工程(b)のゲノムDNAと同等の配列を含む核酸と該核酸の編集物を接触させる工程；

(g) 工程(a)の核酸の編集物に特異的にハイブリダイズしたゲノムDNAの位置及び量を測定し、それによって染色体異常を検出、または個体の隣接遺伝子異常に関連する症候群の診断をする工程。

【請求項195】

個体の染色体異常の検出により個体の病気または健康状態または症候群を検出する、請求項194の方法。
10

【請求項196】

個体がヒトである、請求項194の方法。

【請求項197】

個体が胚である、請求項194の方法。

【請求項198】

個体が染色体異常を有する疑いがある、請求項194の方法。

【請求項199】

個体が核型異常に関連する病気または健康状態を有する疑いがある、請求項194の方法。
。

【請求項200】

病気が癌を含む、請求項194の方法。
20

【請求項201】

サンプルが体液サンプル、細胞サンプルまたは組織サンプルを含む、請求項194の方法。
。

【請求項202】

サンプルが癌細胞または腫瘍細胞サンプルを含む、請求項201の方法。

【請求項203】

サンプルが生検サンプルである、請求項201の方法。

【請求項204】

サンプルが血液サンプルである、請求項201の方法。
30

【請求項205】

サンプルが尿サンプルである、請求項201の方法。

【請求項206】

サンプルが脳脊髄液(CSF)サンプルサンプルである、請求項201の方法。

【請求項207】

サンプルが羊水サンプルである、請求項201の方法。

【請求項208】

サンプルが絨毛膜サンプルである、請求項201の方法。

【請求項209】

サンプルが胚細胞または胚組織サンプルである、請求項201の方法。
40

【請求項210】

サンプル核酸または工程(a)の核酸の編集物と検出ラベルを結合させる工程を含む、請求項194の方法。

【請求項211】

検出ラベルが核酸と共有結合する、請求項210の方法。

【請求項212】

検出ラベルが蛍光ラベルを含む、請求項210の方法。

【請求項213】

検出ラベルがCyt5(登録商標)または同等物を含む、請求項212の方法。

【請求項214】

検出ラベルが C y 3 (登録商標) または同等物を含む、請求項 212 の方法。

【請求項 215】

検出ラベルがローダミン、フルオレセインまたはアリール置換 4 , 4 -ジフルオロ - 4 - ボラ - 3 a , 4 a -ジアザ - s - インドアセン染料または同等物を含む、請求項 212 の方法。

【請求項 216】

核酸断片の標識がランダムプライム標識を含む、請求項 210 の方法。

【請求項 217】

核酸断片の標識がニックトランスレーション標識を含む、請求項 210 の方法。

【請求項 218】

約 95 % の工程 (a) の核酸の編集物が検出ラベルを含む、請求項 210 の方法。

【請求項 219】

約 98 % の工程 (a) の核酸の編集物が検出ラベルを含む、請求項 218 の方法。

【請求項 220】

約 100 % の工程 (a) の核酸の編集物が検出ラベルを含む、請求項 219 の方法。

【請求項 221】

検出ラベルを検出できる装置の使用をさらに含む、請求項 210 の方法。

【請求項 222】

装置が電荷結合素子 (CCD) を含む、請求項 221 の方法。

【請求項 223】

装置が多色蛍光イメージングできる、請求項 212 の方法。

【請求項 224】

多色蛍光イメージング・データを分析するためのコンピュータ・プロセッサの使用をさらに含む、請求項 223 の方法。

【請求項 225】

さらにイメージデータ及びディスプレイ結果を解釈するためのコンピュータ及びコンピュータ・プログラムアルゴリズムの使用を含む、請求項 224 の方法。

【請求項 226】

工程 (a) の核酸の編集物に特異的にハイブリダイズしないサンプル中の核酸を除去する洗浄工程をさらに含む、請求項 194 の方法。

【請求項 227】

洗浄工程が塩濃度が約 0 . 02 モル、pH 7 及び温度が少なくとも約 50 の溶液の使用を含む、請求項 226 の方法。

【請求項 228】

洗浄工程が塩濃度が約 0 . 15 M 、温度が少なくとも約 72 の溶液の約 15 分間の使用を含む、請求項 226 の方法。

【請求項 229】

洗浄工程が塩濃度が約 0 . 2 X SSC 、温度が少なくとも約 50 の溶液の少なくとも約 15 分間の使用を含む、請求項 226 の方法。

【請求項 230】

さらに、第 1 のサンプル中の核酸と検出ラベルと結合させる工程；実質的に完全なゲノムに相補的な核酸を含む第 2 のサンプルを提供する工程であって、該核酸は第 1 のサンプルゲノム核酸に関連する検出ラベルと区別ができる標識ラベルを含み、第 2 のサンプルのゲノムの核型が公知である；第 1 のサンプルの核酸と第 2 のサンプルの核酸を、該サンプルの核酸が核酸の編集物に特異的にハイブリダイズできる条件下で核酸の編集物と接触させる工程；核酸の編集物に特異的にハイブリダイズした第 1 及び第 2 のサンプル由来の核酸の位置及び量を測定する工程をさらに含む、請求項 194 の方法。

【請求項 231】

第 1 及び第 2 のサンプル由来の核酸が同じ種由来である、請求項 230 の方法。

【請求項 232】

10

20

30

40

50

第1及び第2のサンプル由来の核酸がヒトサンプル由来である、請求項231の方法。

【請求項233】

第2のサンプルの実質的に完全なゲノムが野生型ゲノムを含む、請求項230の方法。

【請求項234】

以下の部品を含むキット：

(a) 複数の核酸断片を含んだ核酸の編集物であって、各核酸が染色体異常、隣接遺伝子異常、遺伝関連の病気または症候群と関連し；及び

(b) 該核酸の編集物を用いて染色体異常を検出するための使用説明書。

【請求項235】

核酸の編集物に適用するためのゲノム核酸を含むサンプルを調製するための材料をさらに 10 含む、請求項234のキット。

【請求項236】

サンプルゲノム核酸を標識するための材料をさらに含む、請求項234のキット。

【請求項237】

野生型ゲノム核酸のサンプルをさらに含む、請求項234のキット。

【請求項238】

野生型ゲノム核酸が標識された、請求項237のキット。

【請求項239】

野生型ゲノム核酸がサンプルゲノム核酸を標識するために用いるラベルと異なるラベルを 20 含む、請求項237のキット。

【請求項240】

野生型ゲノム核酸がヒト野生型ゲノム核酸を含む、請求項237のキット。

【請求項241】

染色体異数性の検出のために、コンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーション(CGH)反応においてハイブリダイゼーション標的として用いるゲノム核酸断片を選択する方法であって、以下を含む

(a) ストリンジエントな条件下で单一の遺伝子座にハイブリダイズする染色体断片を選択する工程であって、該遺伝子座は検出される異数性を含む染色体断片を含む；

(b) X染色体またはY染色体由来の染色体断片以外の染色体断片内の少なくとも75%～85%の配列が反復配列となり、X染色体またはY染色体由来の染色体断片は90%～95%までの反復配列を有することができるよう、他のゲノム領域には存在しない少なくとも約15%～25%の固有配列を有する染色体断片を選択する工程；及び

(c) 工程(a)及び工程(b)の両方で選択されたクローニングを選択し、それによって、染色体異数性の検出のためのコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーション(CGH)反応におけるハイブリダイゼーション標的として使用されるゲノム核酸断片を選択する工程。

【請求項242】

他のゲノム領域には存在しない少なくとも約15%の固有配列を有する染色体断片を選択する工程を含む、請求項241の方法。

【請求項243】

複数の核酸断片を含む工業製品であって、各核酸断片が以下の特徴を有する：

(a) 各核酸断片はストリンジエントな条件下で单一の遺伝子座にハイブリダイズするゲノム核酸配列を含み；及び

(b) X染色体またはY染色体由来の染色体断片以外の染色体断片内の少なくとも75%～85%の配列が反復配列となり、X染色体またはY染色体由来の染色体断片は90%～95%までの反復配列を有することができるよう、各核酸断片は他のゲノム領域には存在しない少なくとも約15%～25%の固有配列を有する。

【請求項244】

工業製品がアレイである、請求項243の方法。

【請求項245】

10

20

30

40

50

核酸断片のライブラリーであって、該ライブラリーの各構成要素は以下の特徴を有する：

(a) ライブラリーの各構成要素はストリンジエントな条件下で単一の遺伝子座にハイブリダイズするゲノム核酸配列を含み；及び

(b) X染色体またはY染色体由来の染色体断片以外の染色体断片内の少なくとも75%～85%の配列が自然に反復配列となり、X染色体またはY染色体由来の染色体断片は90%～95%までの反復配列を有することができるよう、各ライブラリーの各構成要素はその他のゲノム領域には存在しない少なくとも約15%～25%の固有配列を有する。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

技術分野

本発明は分子生物学、遺伝診療学及びアレイ、または“バイオチップ”技術に関するものである。1の側面において、本発明は核酸、工業製品、例えばアレイの編集物を提供し、及び染色体異数性、増幅、欠失等などの染色体異常の検出、及び隣接遺伝子異常に関する症候群の診断または予後診断のための方法を提供する。

【0002】

背景

ゲノムDNAマイクロアレイに基づくコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーション(CGH)法は、個々の分裂中期染色体についてのコンパラティブ・ハイブリダイゼーションに依存する、従来のCGH法よりも速く、より効率的かつより安く実行できる可能性を有する。アレイベースのCGHはバイオチップまたはマイクロアレイ・プラットフォーム上のアレイとして配置した固定化核酸を用いる。いわゆるアレイまたはチップCGH法は、單一で、タイムリーな、費用効率のよい、慎重な手順でゲノム全体にわたるDNA配列コピー数情報を提供することができる。チップCGHの分解はアレイ内のDNA要素の数、大きさ及び地図位置に主に依存する。一般に、平均約150キロ塩基(kb)のクローニングノムDNAに各々適合できる、細菌性人工染色体またはBACはアレイの生成において使用される。

【0003】

アレイCGH法の原理は簡単である。試験サンプル及び参考サンプル(例えば、染色体異常のないことが公知の細胞由来サンプル)の細胞由来の全ゲノムDNAの衡平量を異なる条件で蛍光染料で標識し、該細胞ゲノムを集合的にカバーするクローニングノムDNA断片を含むBACのアレイにコハイブリダイズする。最終的なコハイブリダイゼーションは蛍光的に標識されたアレイを生成し、その着色は試験及び参考ゲノムDNA内の配列の対比ハイブリダイゼーションをアレイBAC内の相同配列に反映する。理論上、ゲノムDNAの試験及び参考サンプルの相同配列のコピー数比率は、アレイ内の個別BACでのそれぞれの蛍光シグナル強度に正比例すべきである。該方法の多能性は、羊膜サンプル、絨毛膜サンプル(CVS)、血液サンプル及び組織生検などの臨床細胞遺伝学サンプルにおけるDNAコピー数の構成上変化の検出を可能にする。また、発癌性変質細胞において、骨髄、血液または固体癌サンプルなど体細胞で獲得されるゲノム変化の検出も可能にする。

【0004】

概要

本発明は核酸及び工業製品、例えばアレイの新規な編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物を提供し、それらの製造及び使用方法を提供する。核酸及びアレイのこれらの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物は、染色体異数性などの染色体異常の検出、または隣接遺伝子異常に関する症候群の診断または予後診断に用いることができる。

【0005】

本発明は、染色体異常の検出または隣接遺伝子異常に関する症候群の診断に用いるための工業製品(例えば、アレイ)を提供するものであって、核酸アレイを形成するために、

各核酸断片がそれぞれ公知の基質表面上のスポットに固定化された複数の核酸断片を含み、及び各スポットが染色体異常、隣接遺伝子異常、遺伝関連の病気または症候群と関連するゲノム核酸の断片を含む。他の側面において、ゲノム核酸断片は以下を含む：染色体1、染色体座1 p ; 3 6、及び検出する症候群が1 p 欠失症候群；染色体1、染色体座7 p 1 1 . 2、及び検出する症候群がスミス・メイジエニス症候群(S M S)；染色体3、染色体座3 p 2 5 - p t e r、及び検出する症候群が3 p 欠失症候群；染色体3、染色体座3 p 2 1 - p t e r、及び検出する症候群が3 p 重複症候群；染色体4、染色体座4 p 1 6 . 3、及び検出する症候群がウォルフ・ヒルシュホーン症候群；染色体4、染色体座4 p 1 5 . 2 - 1 6 . 1、及び検出する症候群が4 p 重複症候群；染色体5、染色体座5 p 1 5 . 2 - p t e r、及び検出する症候群がネコなき(C r i d u C h a t)症候群；染色体7、染色体座7 p 1 3 . 3、及び検出する症候群がミラー・ディッカー(M i l l e r - D i e k e r)症候群；染色体7、染色体座7 q 1 1 . 2 3、及び検出する症候群がウィリアムズ症候群；染色体8、染色体座8 q 2 4 . 1、及び検出する症候群がランガー・ギデオン症候群(L G S)；染色体8、染色体座8 q 2 4 . 1、及び検出する症候群が毛髪鼻指節骨症候群(T R P S)；染色体8、染色体座8 q 1 3 . 3、及び検出する症候群が鰓弓耳腎(b r a n c h i o - o t o - r e n a l)症候群(B O R)；染色体9、染色体座9 p、例えは染色体座9 p 2 2 - p t e r及び検出する症候群が9 p 欠失症候群；染色体10、染色体座1 0 p 1 3 - p 1 4、及び検出する症候群がディジョージ(D i G e o r g e)症候群I I；染色体1 1、染色体座1 1 p 1 3、及び検出する症候群がW A G R症候群；染色体1 1、染色体座1 1 p 1 5 . 5、及び検出する症候群がベックウィズ・ヴィードマン症候群；染色体1 1、染色体座1 1 p 1 1 . 2、及び検出する症候群がP o t o c k i - S h a f f e r症候群(多発性外骨腫性I I L o c u s)；染色体1 3、染色体座1 3 q 2 2、及び検出する症候群がヒルシュスブルング(H i r s c h s p r u n g)病及びワルデンブルグ(W a a r d e n b u r g)症候群；染色体1 5、染色体座1 5 q 1 2、及び検出する症候群がアンジェルマン症候群；染色体1 5、染色体座1 5 q 1 2、及び検出する症候群がプラダー・ウェリー症候群；染色体1 6、染色体座末端1 6 p 1 3 . 3、及び検出する症候群がガルビンスタイン・テイビ症候群；染色体1 6、ペリセントロメリックな(p e r i c e n t r o m e r i c)領域、及び検出する症候群が特発性てんかん(i d i o p a t h i c e p i l e p s y)及び発作性ジスキネジア(p a r o x y s m a l d y s k i n e s i a)；染色体1 7、染色体座1 7 p 1 2、及び検出する症候群がシャルコー・マリー・トゥース病1 A型(C M T - 1 A)；染色体1 7、染色体座1 7 p 1 2、及び検出する症候群が圧迫性麻痺の遺伝性ニューロパチー；染色体1 7、染色体座1 7 p 1 3 . 3、及び検出する症候群がミラー・ディッカー症候群/分離(I s o l a t e d)滑脳症；染色体1 7、染色体座1 7 p 1 1 . 2、及び検出する症候群がスミス・メイジエニス症候群；染色体2 0、染色体座2 0 p 1 1 . 2 - p 1 2、及び検出する症候群がアラジル症候群；染色体2 2、染色体座2 2 q 1 1 . 2、及び検出する症候群がディジョージ/V e l o c a r d i o f a c i a l症候群；染色体X、染色体座X p 2 1、及び検出する症候群が先天性副腎過形成症(A H C)；染色体X、染色体座X p 2 1、及び検出する症候群がデュシェンヌ/ベッカー筋ジストロフィー；染色体X、染色体座X p 2 1、及び検出する症候群がグリセロールキナーゼ欠損症；染色体X、染色体座X p 2 2、及び検出する症候群がペリツェウス・メルツバッハ病；染色体X、染色体座X p 2 2 . 3、及び検出する症候群がステロイドスルファターゼ欠損症；染色体X、染色体座X p 2 2 . 3、及び検出する症候群がL e r i - W e i l l症候群；染色体Y、染色体座S R Y染色体座/Y p、及び検出する症候群がS R Y遺伝子座異常；染色体X、染色体座X p 2 2 . 3、及び検出する症候群がカールマン症候群；染色体X、染色体座X p 2 1、及び検出する症候群が逆性(D S S)；染色体1 7、染色体座1 7 p 1 1 . 2、及び検出する症候群が1 7 p 1 1 . 2重複症候群；及び染色体1 7、染色体座1 7 p 1 1 . 2、及び検出する症候群がスミス・メイジエニス症候群(S M S)。

【0 0 0 6】

他の側面において、アレイはさらに、陽性対照として働く核酸断片を含む少なくとも1

10

20

30

40

50

のスポット、陰性対照として働く核酸断片を含む少なくとも1のスポット、またはこれらの組み合わせを含む。

【0007】

アレイの他の側面において、約25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%以上または100%のスポットは、遺伝子に関連した病気または症候群である染色体異常、隣接遺伝子異常にに関するゲノム核酸断片を含む。

【0008】

1の側面において、第1のスポット中のアレイ固定化ゲノム核酸断片は第2のスポット中のアレイ固定化ゲノム核酸断片と比較して実質的にまたは完全に配列の重複がない。1のスポット中のアレイ固定化ゲノム核酸断片はアレイ上のその他全てのゲノム核酸含有スポットのアレイ固定化ゲノム核酸断片と比較して約25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%以上または全部と配列の重複がない。

【0009】

1の側面において、少なくとも1のクローニングノム核酸断片はアレイ上で2重、または3重にスポットする。全ての2重スポットまたは3重スポットは固定化された核酸断片を異なる量含むことができる。他の側面において、約25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%以上または全部のクローニングノム核酸断片は2重または3重にアレイ上にスポットする。

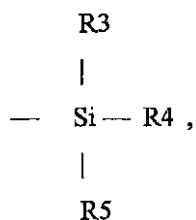
【0010】

他の側面において、アレイ固定化ゲノム核酸の約25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%以上または全部は検出ラベルを含む。

【0011】

1の側面において、アレイ固定化ゲノム核酸は基質表面に共有結合する。アレイ固定化ゲノム核酸は一般式R₁-X-R₂を有する化合物に共有結合でき、ここでR₁は環状エーテル、アルデヒドまたはクロロメチルフェニル成分であり；XはR₁部分とR₂部分を結合するのに化学的に適した成分であり、R₂部分は以下の一般式を有する。

【化1】

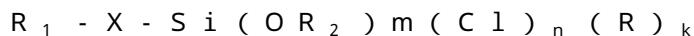


ここで、R₃、R₄及びR₅は同一または異なるアルコキシ基またはクロロ基を含む。

【0012】

アレイ固定化ゲノム核酸は以下の一般式：R₁-X-R₂を有する化合物に共有結合できる、ここでR₁はアミノ基、R₂はアルコキシラン基または塩化ハロゲン（chlorohalide）基であり；及びXはR₁基とR₂基を結合するのに化学的に適した成分である。アレイ固定化ゲノム核酸は以下の一般式を有する化合物に共有結合できる。

【0013】



ここで、m+kは整数の3であり、nはもし mが0より大きい場合、0であってもよく、またはn+kは整数の3であり、mはもし nが0より大きい場合、0であってもよい；Xは不活性リンカーであり；R₁は生体分子に反応性を有する基を含み；Rはアルキル基；及びR₂はアルキル基である。

10

20

30

40

50

【0014】

1の側面において、クローン核酸断片は人工染色体を含む構築体内にクローンし、ここで人工染色体は細菌性人工染色体（BAC）、ヒト人工染色体（HAC）、酵母人工染色体（YAC）、形質転換（transformation - competent）人工染色体またはバクテリオファージP1由来人工染色体（PAC）を含む。他の側面において、該クローン核酸断片はコスミドベクター、プラスミドベクター及びウイルスベクターからなる群より選択されるベクターを含む構築体内にクローンする。

【0015】

他の側面において、クローン核酸断片は約50キロ塩基（0.5メガ塩基）～約500キロ塩基（5メガ塩基）長、約100キロ塩基（1メガ塩基）～約400キロ塩基（4メガ塩基）長であり、及び約0.5、約1、約2、約5、約10、約15、約25、約50、約100、約200、約300、約400、約500、または約600キロ塩基長である。10

【0016】

本発明は、染色体異常の検出または隣接遺伝子異常に關する症候群の診断に用いるための工業製品（例えば、アレイ）を提供するものであって、複数の核酸断片を含み、核酸アレイを形成するために、各核酸がそれぞれ公知の基質表面上のスポットに固定化され、及び各スポットが染色体異常、隣接遺伝子異常、遺伝関連の病気または症候群と関連するゲノム核酸の断片を含み、及び複数の核酸断片は以下を含む：染色体1、染色体座1p；36であって、検出する症候群が1p欠失症候群；染色体3、染色体座3p25-pter20
であって、検出する症候群が3p欠失症候群；染色体3、染色体座3p21-pterであって、検出する症候群が3p重複症候群；染色体4、染色体座4p16.3であって、検出する症候群がウォルフ・ヒルシュホーン症候群；染色体4、染色体座4p15.2-16.1であって、検出する症候群が4p重複症候群；染色体5、染色体座5p15.2-pt20
erであって、検出する症候群がネコなき（Cri du Chat）症候群；染色体7、染色体座7p13.3であって、検出する症候群がミラー・ディッカー（Miller-Dieker）症候群；染色体7、染色体座7q11.23であって、検出する症候群がウィリアムズ症候群；染色体8、染色体座8q24.1であって、検出する症候群がランガー・ギデオン症候群（LGS）；染色体8、染色体座8q24.1であって、検出する症候群が毛髪鼻指節骨症候群（TRPS）；染色体9、染色体座9pであって、検出する症候群が9p欠失症候群；染色体10、染色体座10p13-p14であって、検出する症候群がディジョージ（DiGeorge）症候群II；染色体11、染色体座11p13であって、検出する症候群がWAGR症候群；染色体11、染色体座11p15.5であって、検出する症候群がベックウィズ・ヴィードマン症候群；染色体11、染色体座11p11.2であって、検出する症候群がPotocki-Shaffer症候群（多発性外骨腫性II Locus）；染色体15、染色体座15q12であって、検出する症候群がアンジェルマン症候群；染色体15、染色体座15q12であって、検出する症候群がプラダー・ウィリー症候群；染色体16、染色体座末端16p13.3であって、検出する症候群がルビンスタイン・ティビ症候群；染色体17、染色体座17p12であって、検出する症候群がシャルコー・マリー・トゥース病1A型（CMT-1A）；染色体17、染色体座17p12であって、検出する症候群が圧迫性麻痺の遺伝性ニューロパチー；染色体17、染色体座17p13.3であって、検出する症候群がミラー・ディッカー症候群／分離（Isolated）滑脳症；染色体17、染色体座17p11.2であって、検出する症候群がスミス・メイジエニス症候群；染色体20、染色体座20p11.2-p12であって、検出する症候群がアラジル症候群；染色体22、染色体座22q11.2であって、検出する症候群がディジョージ/Velocardiofacial症候群；染色体X、染色体座Xp21であって、検出する症候群が先天性副腎過形成症（AHC）；染色体X、染色体座Xp21であって、検出する症候群がデュシェンヌ／ベッカーフィー；染色体X、染色体座Xp21であって、検出する症候群がグリセロールキナーゼ欠損症；染色体X、染色体座Xp22であって、検出する症候群40
50

がペリツェウス・メルツバッハ病；染色体X、染色体座X p 2 2 . 3 であって、検出する症候群がステロイドスルファターゼ欠損症；染色体Y、染色体座S R Y 染色体座 / Y p であって、検出する症候群がS R Y 遺伝子座異常；染色体X、染色体座X p 2 2 . 3 、及び検出する症候群がカールマン症候群；染色体X、染色体座X p 2 1 であって、検出する症候群が逆性(D S S)；及び染色体17、染色体座17 p 1 1 . 2 であって、検出する症候群が17 p 1 1 . 2 重複症候群。

【0017】

本発明は、染色体異常の検出または隣接遺伝子異常に関する症候群の診断に用いるための工業製品(例えば、アレイ)を提供するものであって、複数の核酸断片を含み、核酸アレイを形成するために、各核酸がそれぞれ公知の基質表面上のスポットに固定化され、及び該核酸断片は染色体1、染色体座1 p ; 3 6 ；染色体3、染色体座3 p 2 5 - p t e r ；染色体3、染色体座3 p 2 1 - p t e r ；染色体4、染色体座4 p 1 6 . 3 ；染色体4、染色体座4 p 1 5 . 2 - 1 6 . 1 ；染色体5、染色体座5 p 1 5 . 2 - p t e r ；染色体7、染色体座7 p 1 3 . 3 ；染色体7、染色体座7 q 1 1 . 2 3 ；染色体8、染色体座8 q 2 4 . 1 ；染色体8、染色体座8 q 2 4 . 1 ；染色体9、染色体座9 p ；染色体10、染色体座10 p 1 3 - p 1 4 ；染色体11、染色体座11 p 1 3 ；染色体11、染色体座11 p 1 5 . 5 ；染色体11、染色体座11 p 1 1 . 2 ；染色体15、染色体座15 q 1 2 ；染色体16、染色体座16 p 1 3 . 3 ；染色体17、染色体座17 p 1 2 ；染色体17、染色体座17 p 1 3 . 3 ；染色体17、染色体座17 p 1 1 . 2 ；染色体20、染色体座20 p 1 1 . 2 - p 1 2 ；染色体22、染色体座22 q 1 1 . 2 ；染色体X、染色体座X p 2 1 ；染色体X、染色体座X p 2 2 ；染色体X、染色体座X p 2 2 . 3 ；及び染色体Y、染色体座S R Y 染色体座 / Y p からなる群より選択される。他の側面において、本発明のアレイはこのグループの核酸断片の中から少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39及び40個の核酸を含む。

【0018】

他の側面において、本発明の工業製品(アレイ)はさらに陽性対照として働く核酸断片を含む少なくとも1のスポット、陰性対照として働く核酸断片を含む少なくとも1のスポットを含み、または該アレイは陽性対照及び陰性対照スポットを含む。

【0019】

本発明は染色体異常を検出する方法または個体の隣接遺伝子異常に関連する症候群を診断する方法を提供し、以下の工程を含む：(a)本発明の工業製品(アレイ)を提供する工程；(b)個体由来のゲノムDNAの実質的に十分な相補体を含むサンプルを提供する工程；(c)工業製品上に固定化されたゲノム核酸断片にサンプル中の核酸が特異的にハイブリダイズできる条件下で工程(b)のゲノムDNAまたは工程(b)のゲノムDNAと同等の配列を含む核酸と工業製品を接触させる工程；(g)工業製品上に固定化されたゲノム核酸断片に特異的にハイブリダイズしたゲノムDNAの位置及び量を測定し、それによって染色体異常を検出、または個体の隣接遺伝子異常に関連する症候群の診断をする工程。1の側面において、個体の染色体異常の検出により個体の病気または健康状態または症候群を検出することができる。他の側面において、個体はヒト、胚、胎児である。

【0020】

1の側面において、個体は染色体異常を有する疑いがある。個体は核型異常に関連する病気または健康状態を有する疑いがあつてもよい。該病気は癌を含む。サンプルは体液サンプル、細胞サンプルまたは組織サンプルを含む。サンプルは癌細胞または腫瘍細胞サンプルを含んでもよい。サンプルは生検サンプル、血液サンプル、尿サンプル、脳脊髄液(CSF)サンプル、羊水サンプル、絨毛膜サンプル、または胚細胞または胚組織サンプルであつてもよい。

【0021】

本方法はさらに、サンプル核酸または工業製品に固定化された核酸と検出ラベルを結合

10

20

30

40

50

させる工程を含む。検出ラベルは核酸と共有結合できる。検出ラベルは蛍光ラベルを含み、例えば C y 5 (登録商標) または同等物、C y 3 (登録商標) または同等物、ローダミン、フルオレセインまたはアリール置換 4 , 4 -ジフルオロ -4 -ボラ -3 a , 4 a -ジアザ -s -インドアセン染料または同等物などを含む。

【 0 0 2 2 】

本方法の他の側面において、核酸断片の標識はランダムプライム標識及びニックトランスレーション標識を含む。

【 0 0 2 3 】

本方法の他の側面において、約 25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99% または全部のアレイ固定化ゲノム核酸は検出ラベルを含む。

【 0 0 2 4 】

本方法は検出ラベルを検出できる装置の使用を含んでもよい。該装置はどの基質表面上のスポットが検出ラベルと結合したかを測定できる。該装置は基質表面上のスポット上にどのくらい検出ラベルがあるかを測定できる。該装置は電荷結合素子 (CCD) を含む。該装置は多色蛍光イメージングができるものであってもよい。

【 0 0 2 5 】

本発明の方法または本発明の工業製品 (アレイ) はさらに多色蛍光イメージング・データを分析するためのコンピュータ・プロセッサを含むことができる。本方法または本発明のアレイはさらにアレイからのイメージデータ及びディスプレイ結果を解釈するためのコンピュータ及びコンピュータ・プログラムアルゴリズムの使用を含んでもよい。

【 0 0 2 6 】

本発明の方法はさらに洗浄工程を含んでもよく、アレイ上に固定化されたゲノム核酸断片に特異的にハイブリダイズしないサンプル中の核酸を除去する。他の側面において、洗浄工程は塩濃度が約 0.02 モル、pH 7 及び温度が少なくとも約 50 の溶液の使用を含み；洗浄工程は塩濃度が約 0.15 M、温度が少なくとも約 72 の溶液の約 15 分間の使用を含み；及び洗浄工程は塩濃度が約 0.2 X SSC、温度が少なくとも約 50 の溶液の少なくとも約 15 分間の使用を含む。さらに典型的な方法は以下に示す。

【 0 0 2 7 】

本発明の方法はさらにコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーション (CGH) の工程を含んでもよく、該方法はさらに以下を含む：工程 (b) の第 1 のサンプル中の核酸と検出ラベルと結合させる工程；実質的に完全なゲノムに相補的な核酸を含む第 2 のサンプルを提供する工程であって、該核酸は第 1 のサンプルゲノム核酸に関連する検出ラベルと区別ができる標識ラベルを含み、第 2 のサンプルのゲノムの核型は公知である；第 1 のサンプルの核酸と第 2 のサンプルの核酸を、該サンプルの核酸がアレイ固定化核酸に特異的にハイブリダイズできる条件下でアレイと接触させる工程；アレイ上に固定化されたゲノム核酸断片に特異的にハイブリダイズした第 1 及び第 2 のサンプル由来の核酸の位置及び量を測定し、それによってコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーションを行う工程。第 1 及び第 2 のサンプル由来の核酸は同じ個体由来（例えば、異なる時間、または異なる組織または体液から取ったサンプル）、関連個体由来、同じ種由来、関連種または異なるまたは非関連種由来であってよい。第 1 及び第 2 のサンプル由来の核酸はヒトサンプル由来であってもよい。第 2 のサンプルの実質的に完全なゲノムは野生型ゲノムを含み、例えば、公知の隣接遺伝子異常が実質的にまたは完全にないゲノムである。

【 0 0 2 8 】

本発明は以下の部品を含むキットを提供する：(a) 染色体異常の検出または隣接遺伝子異常にに関する症候群の診断に用いるための工業製品（例えば、アレイ）であって、核酸アレイを形成するために、各核酸断片がそれぞれ公知の基質表面上のスポットに固定化された複数の核酸断片を含み、及び各スポットが染色体異常、隣接遺伝子異常、遺伝関連の病気または症候群と関連するゲノム核酸の断片を含む；及び (b) 該アレイを用いて染色体異常を検出するための使用説明書。

【0029】

他の側面において、キットはさらに、アレイに適用するためのゲノム核酸を含むサンプルを調製するための材料；サンプルゲノム核酸を標識するための材料；野生型ゲノム核酸のサンプルまたは公知のゲノム核酸またはこれらの組み合わせまたはこれら全部を含む。

【0030】

キットの1の側面において、野生型ゲノム核酸を標識する。野生型ゲノム核酸はサンプルゲノム核酸を標識するために用いるラベルと異なる（例えば、区別できる）ラベルを含む。野生型ゲノム核酸はヒト野生型ゲノム核酸を含む。

【0031】

本発明は染色体異常の検出、または隣接遺伝子異常に關する症候群の診断または予後診断のための核酸の編集物（すなわち、ライブラリー、セット（クローンセットなど）または収集物）を提供し、複数の核酸断片を含み、各核酸断片が染色体異常、隣接遺伝子異常、遺伝関連の病気または症候群と関連するゲノム核酸断片を含む。該ゲノム核酸断片はクローンゲノムコピー、増幅ゲノムコピー、単離ゲノムコピー、ゲノム配列の完全人工コピーから得られる。

【0032】

本発明の核酸の編集物（セット、ライブラリー、収集物）の他の側面において、ゲノム核酸断片は染色体1、染色体座1 p ; 3 6、及び検出する症候群が1 p 欠失症候群；染色体1、染色体座7 p 1 1 . 2、及び検出する症候群がスミス・メイジェニス症候群（S M S）；染色体3、染色体座3 p 2 5 - p t e r、及び検出する症候群が3 p 欠失症候群；染色体3、染色体座3 p 2 1 - p t e r、及び検出する症候群が3 p 重複症候群；染色体4、染色体座4 p 1 6 . 3、及び検出する症候群がウォルフ・ヒルシュホーン症候群；染色体4、染色体座4 p 1 5 . 2 - 1 6 . 1、及び検出する症候群が4 p 重複症候群；染色体5、染色体座5 p 1 5 . 2 - p t e r、及び検出する症候群がネコなき（C r i d u Chat）症候群；染色体7、染色体座7 p 1 3 . 3、及び検出する症候群がミラー・ディッカー（M i l l e r - D i e k e r）症候群；染色体7、染色体座7 q 1 1 . 2 3、及び検出する症候群がウイリアムズ症候群；染色体8、染色体座8 q 2 4 . 1、及び検出する症候群がランガー・ギデオン症候群（L G S）；染色体8、染色体座8 q 2 4 . 1、及び検出する症候群が毛髪鼻指節骨症候群（T R P S）；染色体8、染色体座8 q 1 3 . 3、及び検出する症候群が鰓弓耳腎（b r a n c h i o - o t o - r e n a l）症候群（B O R）；染色体9、染色体座9 p、及び検出する症候群が9 p 欠失症候群；染色体10、染色体座1 0 p 1 3 - p 1 4、及び検出する症候群がディジョージ（D i G e o r g e）症候群I I；染色体1 1、染色体座1 1 p 1 3、及び検出する症候群がW A G R症候群；染色体1 1、染色体座1 1 p 1 5 . 5、及び検出する症候群がベックウィズ・ヴィードマン症候群；染色体1 1、染色体座1 1 p 1 1 . 2、及び検出する症候群がP o t o c k i - S h a f f e r症候群（多発性外骨腫性I I L o c u s）；染色体1 3、染色体座1 3 q 2 2、及び検出する症候群がヒルシュスブルング（H i r s c h s p r u n g）病及びワルデンブルグ（W a a r d e n b u r g）症候群；染色体1 5、染色体座1 5 q 1 2、及び検出する症候群がアンジェルマン症候群；染色体1 5、染色体座1 5 q 1 2、及び検出する症候群がプラダー・ウェイリー症候群；染色体1 6、染色体座末端1 6 p 1 3 . 3、及び検出する症候群がガルビンスタイン・テイビ症候群；染色体1 6、ペリセントロメリックな（p e r i c e n t r o m e r i c）領域、及び検出する症候群が特発性てんかん（i d i o p a t h i c e p i l e p s y）及び発作性ジスキネジア（p a r o x y s m a l d y s k i n e s i a）；染色体1 7、染色体座1 7 p 1 2、及び検出する症候群がシャルコー・マリー・トゥース病1 A型（C M T - 1 A）；染色体1 7、染色体座1 7 p 1 2、及び検出する症候群が圧迫性麻痺の遺伝性ニューロパチー；染色体1 7、染色体座1 7 p 1 3 . 3、及び検出する症候群がミラー・ディッカー症候群 / 分離（I s o l a t e d）滑脳症；染色体1 7、染色体座1 7 p 1 1 . 2、及び検出する症候群がスミス・メイジェニス症候群；染色体2 0、染色体座2 0 p 1 1 . 2 - p 1 2、及び検出する症候群がアラジル症候群；染色体2 2、染色体座2 2 q 1 1 . 2、及び検出する症候群

10

20

30

40

50

50

がディジョージ / V e l o c a r d i o f a c i a l 症候群；染色体 X、染色体座 X p 2 1、及び検出する症候群が先天性副腎過形成症（A H C）；染色体 X、染色体座 X p 2 1、及び検出する症候群がデュシェンヌ / ベッカー筋ジストロフィー；染色体 X、染色体座 X p 2 1、及び検出する症候群がグリセロールキナーゼ欠損症；染色体 X、染色体座 X p 2 2、及び検出する症候群がペリツェウス・メルツバッハ病；染色体 X、染色体座 X p 2 2 . 3、及び検出する症候群がステロイドスルファターゼ欠損症；染色体 X、染色体座 X p 2 2 . 3、及び検出する症候群がL e r i - W e i l l 症候群；染色体 Y、染色体座 S R Y 染色体座 / Y p、及び検出する症候群がS R Y 遺伝子座異常；染色体 X、染色体座 X p 2 2 . 3、及び検出する症候群がカールマン症候群；染色体 X、染色体座 X p 2 1、及び検出する症候群が逆性（D S S）；染色体 1 7、染色体座 1 7 p 1 1 . 2、及び検出する症候群が 1 7 p 1 1 . 2 重複症候群；及び染色体 1 7、染色体座 1 7 p 1 1 . 2、及び検出する症候群がスミス・マイジェニス症候群（S M S）またはこれらの症候群または健康状態の任意の組み合わせまたは全部を含む。本発明の核酸の編集物（ライブラリー、セット、収集物）はこれらの染色体断片由来核酸の全てまたは一部を含むことができる。10 1 の側面において、各染色体断片は本発明の編集物の異なる構成要素（核酸断片）上にある。他の側面において、編集物の少なくとも 1 の構成要素（核酸断片）は 2 以上の上述の染色体断片を有する。

【 0 0 3 3 】

他の側面において、約 4 0 %、4 5 %、5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %または 9 9 %以上の核酸断片は染色体異常、隣接遺伝子異常、遺伝関連の病気または症候群と関連する。他の側面において、核酸断片はゲノム核酸断片由来である。1 の側面において、1 0 0 %の核酸断片が染色体異常、隣接遺伝子異常、遺伝関連の病気または症候群と関連し、または染色体異常、隣接遺伝子異常、遺伝関連の病気または症候群と関連するゲノム核酸断片を含む。20

【 0 0 3 4 】

1 の側面において、核酸断片は基質表面上に固定化する（基質手段）。任意の基質表面が使用でき、例えば、ニトロセルロース、ガラス、石英、融合シリカ、プラスティック等の固体表面または半固体表面である。基質表面はフラットまたは平面、ウェル、キャピラリチューブ、隆起状、エッティング溝、多孔質、ビーズ、糸状等の形状であってもよい。核酸断片はアレイの表面上に固定化することができる。30

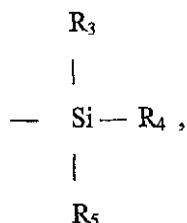
【 0 0 3 5 】

他の側面において、約 4 0 %、4 5 %、5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %または 9 9 %以上または全部の核酸断片は標識ラベルを含む。

【 0 0 3 6 】

1 の側面において、核酸断片は一般式 $R_1 - X - R_2$ を有する化合物をさらに含有し、ここで R_1 は環状エーテル、アルデヒドまたはクロロメチルフェニル成分であり；X は R_1 部分と R_2 部分を結合するのに化学的に適した成分であり、 R_2 部分は以下の一般式を有する。40

【 化 2 】



ここで、 R_3 、 R_4 及び R_5 は同一または異なるアルコキシ基またはクロロ基を含む。

【 0 0 3 7 】

50

1の側面において、核酸断片は一般式 $R_1 - X - R_2$ を有する化合物をさらに含有し、ここで R_1 はアミノ基、 R_2 はアルコキシラン基または塩化ハロゲン基であり；及び X は R_1 基と R_2 基を結合するのに化学的に適した成分である。

【0038】

1の側面において、核酸断片は一般式 $R_1 - X - Si(OR_2)_m(Cl)_n(R)_k$ を有する化合物をさらに含有する。

【0039】

ここで、 $m + k$ は整数の 3 であり、 n はもし m が 0 より大きい場合、0 であってもよく、または $n + k$ は整数の 3 であり、 m はもし n が 0 より大きい場合、0 であってもよい； X は不活性リンカーであり； R_1 は生体分子に反応性を有する基を含み； R はアルキル基；及び R_2 はアルキル基である。

【0040】

1の側面において、少なくとも 1 の核酸断片は、例えば人工染色体を含む構築体などのクローニング輸送手段内にクローンする。人工染色体は細菌性人工染色体 (BAC)、ヒト人工染色体 (HAC)、酵母人工染色体 (YAC)、形質転換 (transformation - competent) 人工染色体 (TAC) 及びバクテリオファージ P1 由来人工染色体 (PAC) 等を含む。1の側面において、少なくとも 1 の核酸断片は、コスミドベクター、プラスミドベクター及びウイルスベクターからなる群より選択されるベクターを含む構築体内にクローンする。

【0041】

他の側面において、核酸断片は約 15 キロ塩基 (0.15 メガ塩基) ~ 約 1000 キロ塩基 (10 メガ塩基) 長、25 キロ塩基 (0.25 メガ塩基) ~ 約 750 キロ塩基 (7.5 メガ塩基) 長、約 50 キロ塩基 (0.5 メガ塩基) ~ 約 500 キロ塩基 (5 メガ塩基) 長、約 100 キロ塩基 (1 メガ塩基) ~ 約 400 キロ塩基 (4 メガ塩基) 長、約 150 キロ塩基 (1.5 メガ塩基) ~ 約 300 キロ塩基 (3 メガ塩基) 長である。

【0042】

1の側面において、核酸の編集物（またはライブラリーまたはセットまたは収集物）は染色体異常の検出、または隣接遺伝子異常にに関する症候群の診断または予後診断に用いることができる。該編集物（またはライブラリーまたはセットまたは収集物）は染色体異常、隣接遺伝子異常、遺伝関連の病気または症候群と関連する複数の核酸断片を含むことができる。1の側面において、複数の核酸断片は、染色体 1、染色体座 1 p 3 6、及び検出する症候群が 1 p 欠失症候群；染色体 3、染色体座 3 p 2 5 - pter、及び検出する症候群が 3 p 欠失症候群；染色体 3、染色体座 3 p 2 1 - pter、及び検出する症候群が 3 p 重複症候群；染色体 4、染色体座 4 p 1 6 . 3、及び検出する症候群がウォルフ・ヒルシュホーン症候群；染色体 4、染色体座 4 p 1 5 . 2 - 1 6 . 1、及び検出する症候群が 4 p 重複症候群；染色体 5、染色体座 5 p 1 5 . 2 - pter、及び検出する症候群がネコなき (Cri du Chat) 症候群；染色体 7、染色体座 7 p 1 3 . 3、及び検出する症候群がミラー・ディッカー (Miller-Dieker) 症候群；染色体 7、染色体座 7 q 1 1 . 2 3、及び検出する症候群がウェーリアムズ症候群；染色体 8、染色体座 8 q 2 4 . 1、及び検出する症候群がランガー・ギデオン症候群 (LGS)；染色体 8、染色体座 8 q 2 4 . 1、及び検出する症候群が毛髪鼻指節骨症候群 (TRPS)；染色体 9、染色体座 9 p、及び検出する症候群が 9 p 欠失症候群；染色体 10、染色体座 10 p 1 3 - p 1 4、及び検出する症候群がディジョージ (DiGeorge) 症候群 II；染色体 11、染色体座 11 p 1 3、及び検出する症候群が WAGR 症候群；染色体 11、染色体座 11 p 1 5 . 5、及び検出する症候群がベックウィズ・ヴィードマン症候群；染色体 11、染色体座 11 p 1 1 . 2、及び検出する症候群が Potoocki-Shafte 症候群 (多発性外骨腫性 II Locus)；染色体 15、染色体座 15 q 1 2、及び検出する症候群がアンジェルマン症候群；染色体 15、染色体座 15 q 1 2、及び検出する症候群がプラダー・ウィリー症候群；染色体 16、染色体座末端 16 p 1 3 . 3、及び検出する症候群がガルビンスタイン・ティビ症候群；染色体 17、染色体座 17 p 1 2、

10

20

30

40

50

及び検出する症候群がシャルコー・マリー・トゥース病 1A 型 (C M T - 1 A) ; 染色体 17 、染色体座 17 p 12 、及び検出する症候群が圧迫性麻痺の遺伝性ニューロパチー ; 染色体 17 、染色体座 17 p 13 . 3 、及び検出する症候群がミラー・ディッカー症候群 / 分離 (I s o l a t e d) 滑脳症 ; 染色体 17 、染色体座 17 p 11 . 2 、及び検出する症候群がスミス・メイジエニス症候群 ; 染色体 20 、染色体座 20 p 11 . 2 - p 12 、及び検出する症候群がアラジル症候群 ; 染色体 22 、染色体座 22 q 11 . 2 、及び検出する症候群がディジョージ / V e l o c a r d i o f a c i a l 症候群 ; 染色体 X 、染色体座 X p 21 、及び検出する症候群が先天性副腎過形成症 (A H C) ; 染色体 X 、染色体座 X p 21 、及び検出する症候群がデュシェンヌ / ベッカー筋ジストロフィー ; 染色体 X 、染色体座 X p 21 、及び検出する症候群がグリセロールキナーゼ欠損症 ; 染色体 X 、染色体座 X p 22 、及び検出する症候群がペリツェウス・メルツバッハ病 ; 染色体 X 、染色体座 X p 22 . 3 、及び検出する症候群がステロイドスルファターーゼ欠損症 ; 染色体 Y 、染色体座 S R Y 染色体座 / Y p 、及び検出する症候群が S R Y 遺伝子座異常 ; 染色体 X 、染色体座 X p 22 . 3 、及び検出する症候群がカールマン症候群 ; 染色体 X 、染色体座 X p 21 、及び検出する症候群が逆性 (D S S) ; 及び染色体 17 、染色体座 17 p 11 . 2 、及び検出する症候群が 17 p 11 . 2 重複症候群を含む。

【 0 0 4 3 】

各核酸断片が染色体異常、隣接遺伝子異常、遺伝関連の病気または症候群と関連する、核酸の編集物、及び該核酸断片は以下からなる群より選択される：染色体 1 、染色体座 1 p 36 ；染色体 3 、染色体座 3 p 25 - p t e r ；染色体 3 、染色体座 3 p 21 - p t e r ；染色体 4 、染色体座 4 p 16 . 3 ；染色体 4 、染色体座 4 p 15 . 2 - 16 . 1 ；染色体 5 、染色体座 5 p 15 . 2 - p t e r ；染色体 7 、染色体座 7 p 13 . 3 ；染色体 7 、染色体座 7 q 11 . 23 ；染色体 8 、染色体座 8 q 24 . 1 ；染色体 8 、染色体座 8 q 24 . 1 ；染色体 9 、染色体座 9 p ；染色体 10 、染色体座 10 p 13 - p 14 ；染色体 11 、染色体座 11 p 13 ；染色体 11 、染色体座 11 p 15 . 5 ；染色体 11 、染色体座 11 p 11 . 2 ；染色体 15 、染色体座 15 q 12 ；染色体 16 、染色体座末端 16 p 13 . 3 ；染色体 17 、染色体座 17 p 12 ；染色体 17 、染色体座 17 p 13 . 3 ；染色体 17 、染色体座 17 p 11 . 2 ；染色体 20 、染色体座 20 p 11 . 2 - p 12 ；染色体 22 、染色体座 22 q 11 . 2 ；染色体 X 、染色体座 X p 21 ；染色体 X 、染色体座 X p 22 ；染色体 X 、染色体座 X p 22 . 3 ；及び染色体 Y 、染色体座 S R Y 染色体座 / Y p 。

【 0 0 4 4 】

1 の側面において、核酸断片は基質表面上に固定化する（基質手段）。任意の基質表面が使用でき、例えば、ニトロセルロース、ガラス、石英、融合シリカ、プラスティック等の固体表面または半固体表面である。基質表面はフラットまたは平面、ウェル、キャピラリチューブ、隆起状、エッティング溝、多孔質、ビーズ、糸状等の形状であってもよい。核酸断片はアレイの表面上に固定化することができる。

【 0 0 4 5 】

本発明は染色体異常を検出する方法または個体の隣接遺伝子異常に関連する症候群を診断または予後診断する方法を提供し、以下の工程を含む：(a) 本発明の核酸の編集物 (c o m p i l a t i o n) を提供する工程；(b) 個体由来のゲノム D N A の実質的に十分な相補体を含むサンプルを提供する工程；(c) 核酸の編集物にサンプル中の核酸が特異的にハイブリダイズできる条件下で工程 (b) のゲノム D N A または工程 (b) のゲノム D N A と同等の配列を含む核酸と工程 (a) の核酸の編集物を接触させる工程；(g) 工程 (a) の核酸の編集物に特異的にハイブリダイズしたゲノム D N A の位置及び量を測定し、それによって染色体異常を検出、または個体の隣接遺伝子異常に関連する症候群の診断をする工程。1 の側面において、個体の染色体異常の検出により個体の病気または健康状態または症候群を検出する。個体はヒトであってもよい。個体は胚であってもよい。

【 0 0 4 6 】

1 の側面において、個体は染色体異常を有する疑いがある。1 の側面において、個体は

10

20

30

40

50

核型異常に関連する病気または健康状態を有する疑いがある。病気は癌を含む。

【0047】

1の側面において、サンプルは体液サンプル、細胞サンプルまたは組織サンプルを含む。サンプルは癌細胞または腫瘍細胞サンプルを含んでもよい。1の側面において、サンプルは生検サンプル、血液サンプル、尿サンプル、脳脊髄液(CSF)サンプル、羊水サンプル、絨毛膜サンプル、または胚細胞または胚組織サンプルである。

【0048】

本方法はさらに、サンプル核酸または核酸の編集物と検出ラベルを結合させる工程を含む。検出ラベルは核酸と共有結合できる。検出ラベルは蛍光ラベルを含み、例えばC y 5(登録商標)または同等物、C y 3(登録商標)または同等物を含む。蛍光ラベルはローダミン、フルオレセインまたはアリール置換4,4-ジフルオロ-4-ボラ-3a,4a-ジアザ-s-インドアセン染料または同等物を含んでもよい。

【0049】

1の側面において、核酸断片の標識はランダムプライム標識及びニックトランスレーション標識を含む。他の側面において、約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%以上または全部の核酸断片は検出ラベルを含む。

【0050】

本方法は検出ラベルを検出できる装置の使用を含んでもよい。該装置は電荷結合素子(CCD)を含む。該装置は多色蛍光イメージングができるものであってもよい。

【0051】

本方法はさらに多色蛍光イメージング・データを分析するためのコンピュータ・プロセッサの使用を含むことができる。本方法はさらにイメージデータ及びディスプレイ結果を解釈するためのコンピュータ及びコンピュータ・プログラムアルゴリズムの使用を含んでもよい。

【0052】

本方法はさらに洗浄工程を含んでもよく、核酸の編集物に特異的にハイブリダイズしないサンプル中の核酸を除去する。洗浄工程は塩濃度が約0.02モル、pH7及び温度が少なくとも約50の溶液の使用を含むことができる。洗浄工程は塩濃度が約0.15M、温度が少なくとも約72の溶液の約15分間の使用を含むことができる。洗浄工程は塩濃度が約0.2XSSC、温度が少なくとも約50の溶液の少なくとも約15分間の使用を含むことができる。

【0053】

本方法はさらに、第1のサンプル中の核酸と検出ラベルを結合させる工程を含む。本方法はさらに、実質的に完全なゲノムに相補的な核酸を含む第2のサンプルを提供する工程であって、該核酸は第1のサンプルゲノム核酸に関連する検出ラベルと区別ができる標識ラベルを含み、第2のサンプルのゲノムの核型は公知である。本方法はさらに、第1のサンプルの核酸と第2のサンプルの核酸を、該サンプルの核酸が核酸の編集物に特異的にハイブリダイズできる条件下で核酸の編集物と接触させる工程を含む。本方法はさらに、核酸の編集物に特異的にハイブリダイズした第1及び第2のサンプル由来の核酸の位置及び量を測定する工程を含む。

【0054】

1の側面において、第1及び第2のサンプル由来の核酸は同じ種由来である。第1及び第2のサンプル由来の核酸はヒトサンプル由来であってもよい。1の側面において、第2のサンプルの実質的に完全なゲノムは野生型ゲノムを含む。

【0055】

本発明は以下の部品を含むキットを提供する：(a)本発明の核酸の編集物、例えば複数の核酸断片を含む核酸の編集物であって、各核酸が染色体異常、隣接遺伝子異常、遺伝関連の病気または症候群と関連する。

【0056】

10

20

30

40

50

1の側面において、該キットは工程(a)の核酸の編集物を用いて染色体異常を検出するための使用説明書を含む。該キットにおいて、核酸の編集物は1または複数の容器内に含まれていてもよく、例えば、ガラス瓶、試験管等である。キットはさらに、核酸の編集物に適用するためのゲノム核酸を含むサンプルを調製するための材料、サンプルゲノム核酸を標識するための材料、及び／または野生型ゲノム核酸のサンプルを含んでもよい。野生型ゲノム核酸は標識できる。野生型ゲノム核酸はサンプルゲノム核酸を標識するために用いるラベルと異なるラベルを含むことができる。野生型ゲノム核酸はヒト野生型ゲノム核酸を含む。

【 0 0 5 7 】

本発明は、染色体異数性の検出のために、例えば、コンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーション(CGH)反応などハイブリダイゼーション反応においてハイブリダイゼーション標的として用いるゲノム核酸断片を選択する方法を提供し、以下を含む(a)ストリンジエントな条件下で单一の遺伝子座にハイブリダイズするための染色体断片を選択する工程であって、該遺伝子座は検出される異数性を含む染色体断片を含む；(b)X染色体またはY染色体由来の染色体断片以外の染色体断片内の少なくとも75%～85%の配列が反復配列となり、X染色体またはY染色体由来の染色体断片は90%～95%以下の反復配列を有することができるよう、その他のゲノム領域には存在しない少なくとも約15%～25%の固有配列を有する染色体断片を選択する工程；及び(c)工程(a)及び工程(b)の両方で選択されたクローニングを選択し、それによって、染色体異数性の検出のためのコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーション(CGH)反応におけるハイブリダイゼーション標的として使用されるゲノム核酸断片を選択する工程。他の側面において、本方法は少なくとも約10%、15%、20%、25%及び30%のゲノムの他の領域には存在しない固有配列を含む染色体断片を選択する工程を含む。

【 0 0 5 8 】

本発明は複数の核酸断片を含んだ、例えばアレイなどの工業製品を提供し、各核酸断片は以下の特徴を有する：(a)各核酸断片はストリンジエントな条件下で单一の遺伝子座にハイブリダイズするゲノム核酸配列を含み；及び(b)X染色体またはY染色体由来の染色体断片以外の染色体断片内の少なくとも75%～85%の配列が反復配列となり、X染色体またはY染色体由来の染色体断片は90%～95%までの反復配列を有することができるよう、各核酸断片はその他のゲノム領域には存在しない少なくとも約15%～25%の固有配列を有する。他の側面において、染色体断片は少なくとも約10%、15%、20%、25%及び30%のゲノムの他の領域には存在しない固有配列を含む。

【 0 0 5 9 】

本発明は核酸断片のライブラリー、収集物、セットまたは編集物を提供し、ライブラリー、収集物、セットまたは編集物の各構成要素は以下の特徴を有する：(a)ライブラリーの各構成要素はストリンジエントな条件下で单一の遺伝子座にハイブリダイズするゲノム核酸配列を含み；及び(b)X染色体またはY染色体由来の染色体断片以外の染色体断片内の少なくとも75%～85%の配列が自然に反復配列となり、X染色体またはY染色体由来の染色体断片は90%～95%までの反復配列を有することができるよう、各ライブラリーの各構成要素はその他のゲノム領域には存在しない少なくとも約15%～25%の固有配列を有する。他の側面において、核酸断片は少なくとも約10%、15%、20%、25%及び30%のゲノムの他の領域には存在しない固有配列を含む。核酸断片のライブラリー、収集物、セットまたは編集物は染色体異数性の検出のためのコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーション(CGH)反応におけるハイブリダイゼーション標的として使用できる。

【 0 0 6 0 】

本発明は、例えば、コンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーション(CGH)反応など染色体異常(例えば、異数性、増幅、欠失等)の検出のためのハイブリダイゼーション反応におけるハイブリダイゼーション標的として使用するためのゲノム核酸断片(ゲノム断片)を選択する方法を提供し、以下を含む(a)ストリンジエントな条件下(典

10

20

30

40

50

型的なハイブリダイゼーション条件に関する実施例など、以下を参照)で单一の遺伝子座にハイブリダイズする染色体断片を選択する工程であって、該遺伝子座は検出される異数性を含む染色体断片を含む; (b) X染色体またはY染色体由来の染色体断片以外の染色体断片内の75%~85%以下の配列が反復配列となり、X染色体またはY染色体由来の染色体断片は90%~95%以下の反復配列を有することができるよう、他のゲノム領域には存在しない少なくとも約15%~25%の固有配列を有する染色体断片を選択する工程; 及び(c)工程(a)及び工程(b)の両方で選択されたクローニングを選択し、それによって、染色体異数性の検出のためのコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーション(CGH)反応におけるハイブリダイゼーション標的として使用されるゲノム核酸断片を選択する工程。他の側面において、本方法は少なくとも約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%以上の他のゲノム領域には存在しない固有配列を含む染色体断片を選択する工程を含む。他の側面において、X染色体またはY染色体は50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%またはそれ以上までの反復配列を含むことができる。

10

20

30

40

50

【0061】

本発明は複数の核酸断片を含んだ、例えばアレイなどの工業製品を提供し、各核酸断片は以下の特徴を有する:(a)各核酸断片はストリンジメントな条件下で单一の遺伝子座にハイブリダイズするゲノム核酸配列を含み; 及び(b)X染色体またはY染色体由来の染色体断片以外の染色体断片内の少なくとも75%~85%の配列が反復配列となり、X染色体またはY染色体由来の染色体断片は90%~95%以下の反復配列を有することができるよう、各核酸断片はその他のゲノム領域には存在しない少なくとも約15%~25%の固有配列を有する。他の側面において、染色体断片は少なくとも約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%以上のゲノムの他の領域には存在しない固有配列を含む。他の側面において、X染色体またはY染色体は50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%またはそれ以上までの反復配列を含むことができる。

30

40

【0062】

本発明は核酸断片のライブラリー、収集物、セット(例えば、クローンセット)または編集物を提供し、ライブラリー、収集物、セットまたは編集物の各構成要素は以下の特徴を有する:(a)ライブラリーの各構成要素はストリンジメントな条件下で单一の遺伝子座にハイブリダイズするゲノム核酸配列を含み; 及び(b)X染色体またはY染色体由来の染色体断片以外の染色体断片内の75%~85%以下の配列が自然に反復配列となり、X染色体またはY染色体由来の染色体断片は90%~95%以下の反復配列を有することができるよう、各ライブラリーの各構成要素はその他のゲノム領域には存在しない少なくとも約15%~25%の固有配列を有する。他の側面において、核酸断片は少なくとも約10%、15%、20%、25%及び30%のゲノムの他の領域には存在しない固有配列を含む。核酸断片のライブラリー、収集物、セットまたは編集物は多数の目的のために使用でき、その1つは染色体異数性の検出のためのコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーション(CGH)反応におけるハイブリダイゼーション標的である。他の側面において、染色体断片は少なくとも約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%以上の他のゲノム領域には存在しない固有配列を含むことができる。他の側面において、X染色体またはY染色体は50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%またはそれ以上までの反復配列を含むことができる。

50

【0063】

1の側面において、ストリンジメントなハイブリダイゼーション条件はポストハイブリダイゼーション洗浄条件を含み、以下を含む:個々のペトリ皿中で以下のハイブリダイゼ

ーション溶液を 50 °C で前もって保温する： 2 X SSC、50% 脱イオン化ホルムアミド、2 X SSC、0.1% NP-40、0.2 X SSC； 2 X SSC、0.5%

SDS にアレイ（例えば、スライド）を室温（RT）で手短に浸す、または 2 X SSC だけ用いててもよい；アレイ（スライド）を前もって保温した 2 X SSC、50% ホルムアミドに移す；50 °C、20 分間、振とう培養器中で培養することによりスライドを洗浄する。1 の側面において、ポストハイブリダイゼーション洗浄条件は前もって保温した 2 X SSC、0.1% NP-40 を用いて洗浄を繰り返すことを含む。1 の側面において、ポストハイブリダイゼーション洗浄条件は前もって保温した 0.2 X SSC を用いて 10 分間洗浄を繰り返すことを含む。1 の側面において、ポストハイブリダイゼーション洗浄条件は蒸留脱イオン化水を用いてスライドを洗浄処理することを含む。1 の側面において、この最後の洗浄は 10 秒を越えない。1 の側面において、アレイ（スライド）は強制空気の下、速やかに乾燥させる。

【0064】

本発明の 1 以上の実施態様の詳細を付随図面及び以下の説明において示す。本発明のその他の特徴、目的及び利点は該説明及び図面及び請求の範囲から明らかである。

【0065】

ここに記載する全ての文献、特許、特許出願、GenBank 配列及び ATCC 保管物はあらゆる目的においてここに明示的に引用するものとする。

【0066】

詳細な説明

本発明は核酸及び工業製品、例えばアレイの新規な編集物またはセット（例えば、クローンセット）、ライブラリーまたは収集物を提供する。また、それらの製造及び使用方法を提供する。1 の側面において、核酸及びアレイのこれらの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物は染色体異数性（ハプロイド数の倍数体が正確でない染色体数に関する異常）などの染色体異常の検出に用いる。また、これらは隣接遺伝子異常に関する症候群の診断または予後診断に用いることができる。

【0067】

本発明は、染色体異常の検出または隣接遺伝子異常に関する症候群の診断または予後診断に用いるための核酸及びアレイの新規な編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物及び方法を提供する。これらの核酸及び / またはアレイの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物は一般的な目的または胚、胎児、子供または大人の遺伝子スクリーニングを目的として用いることができる。これらの核酸及び / またはアレイの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物は、患者が 1 以上の染色体異常に関する症状を有する疑いがあるが、これらの症状が診断上決定的なものではないときに特に、症候群の診断または予後診断を補助するために用いることができる。症状が現れる前の個々の検診は予防的な治療計画を可能とする。

【0068】

本発明はゲノム断片またはクローンセット（例えば、断片またはクローンのライブラリー、収集物または編集物を含む）を選択する方法を提供し、異数性（すなわち、ハプロイド数の倍数体が正確でない染色体数に関する異常）、増幅、欠失等などの染色体異常の検出においてハイブリダイゼーション標的として効果的である。1 の側面において、これらのゲノム断片またはクローンのライブラリー、収集物または編集物は例えば、アレイなどの工業製品上に固定化する。1 の側面において、ゲノム断片またはクローンのこれらのライブラリー、収集物または編集物（例えば、クローンセット）を含む例えばアレイなどの工業製品はコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーション（CGH）を行い、染色体異常を検出するために用いる。

【0069】

選択工程は単一の遺伝子座にだけハイブリダイズする染色体の特異領域を含む任意のクローンを選択することを含む（例えば、in silico（コンピューターで）及び / または in situ）。これにより特異性が保障される。選択工程は少なくとも 15 %

10

20

30

40

50

の固有配列、すなわち他のゲノム領域に存在しない配列を含むゲノム断片を含んだ染色体断片（例えば、クローン）を選択することを含んでもよい。言い換えると、1の側面において、X染色体及びY染色体断片（例えば、クローン）を除いて、断片内の85%までの配列が天然で反復可能である（他の側面において、断片内の約30~95%または99%までの配列が反復可能である）。X染色体及びY染色体断片は90%~95%まで反復可能である（他の側面において、X染色体及びY染色体断片内の約50~95%または99%までの配列が反復可能である）。1の側面において、選択工程はこれら両方の工程を含み、すなわち、単一の遺伝子座にだけハイブリダイズする染色体の特異領域を含む染色体断片（例えば、クローン）の選択及び少なくとも15%の固有配列を含むゲノム断片を含んだ染色体断片（例えば、クローン）の選択を含む。

10

【0070】

1の側面において、例えば、アレイなどの工業製品は本方法により選択される約250以下（1の側面において、2474）の染色体断片（例えば、クローン）を含み、例えば、以下に説明する。ゲノムクローンはBAC、PAC、MAC、プラスミド、組換えウイルスまたはファージミド及び／またはコスミド等である。1の側面において、選択した染色体断片（例えば、クローン）は例えば、アレイなどの工業製品のような固体表面に架橋（固定化）する。1の側面において、選択した染色体断片（例えば、クローン）は米国特許第6,048,695号に記載されているように固定化される。工業製品はガラススライド上に固定化された選択染色体断片（例えば、クローン）を含むアレイである。1の側面において、スライドは蛍光標識テスト及び対照標的DNAを用いてハイブリダイズされる。他の側面において、本発明の断片またはクローンのライブラリー、収集物または編集物は本方法により選択される約2500以下（1の側面において、2474）の染色体断片（例えば、クローン）を含み、例えば以下に説明する。

20

【0071】

1の側面において、例えばアレイなどの工業製品は例えばアレイまたはいわゆる“バイオチップ”として、表面上に固定化された複数の核酸断片を含む。アレイまたはアレイ様構造に一般的であるように、各断片はアレイ上のそれぞれ公知の領域または“スポット”に固定化できる。各“スポット”は染色体異常、隣接遺伝子異常、遺伝関連の病気または症候群と関連するゲノム核酸の断片を含む。1の側面において、特定のスポットに固定化された多くの核酸分子を含んでもよいが、スポットにつき染色体異常に関連するゲノム核酸断片は1種または1発現である。本発明のアレイの全スポットは染色体異常に関連するゲノム核酸断片を含むことができる。他の実施態様において、上述の通り、アレイスポットの種々の小集団はそのようなゲノム核酸断片を含むことができる。いくつかのスポットは陽性または陰性対照として働く核酸断片を含むことができ；1の側面において、試験サンプルは公知の型及び陽性または陰性対照として働く核酸断片量に“固定（spiked）”される。

30

【0072】

本発明の核酸及び／またはアレイの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物を含んだキットを提供する。キットは核酸及び／またはアレイの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物を用いて本発明の方法を実施するための使用説明書を含んでもよく、実施者の便宜のため、サンプルからゲノムDNAを抽出し、ゲノム核酸の標識化など該DNAを調製するための材料を含んでもよい。1の側面において、キットは標識“野生型”ゲノム核酸を含むことができ、例えば、“野生型”的ヒトゲノム核酸または染色体異常及び／またはいかなる隣接遺伝子異常を実質的に含まないことが知られていないゲノム核酸なども含むことができる。“野生型”ゲノム核酸は実質的に完全なゲノムを含むことができ、実施者がコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーション（CGH）を実施する場合に有用である。

40

【0073】

定義

別に定義しない限り、ここで用いる全ての技術及び科学用語は本発明の属する当業界に

50

おいて一般的に理解される意味を有する。ここで用いる以下の用語は特に示さない限りそこに記載された意味を有する。

【0074】

ここで用いる“アレイ”または“マイクロアレイ”または“DNAアレイ”または“核酸アレイ”または“チップ”または“バイオチップ”的語は、複数の標的要素であり、各標的要素は基質表面に明確な位置で固定化された1以上のゲノム核酸断片などの生体分子を明確な量含む。さらに下記に詳細を記す。

【0075】

ここで用いる“アリール置換4,4-ジフルオロ-4-ボラ-3a,4a-ジアザ-s-インドアセン染料”的語は全ての“ボロンジピロメテンジフルオリドフルオロフォア”または“BODIPY”染料及び“ジピロメテンボロンジフルオリド染料”（例えば、米国特許第4,774,339号を参照）またはその同等物を含み、ハイブリダイゼーション反応で使用する際にそれらの検出のため核酸の標識に一般的に使用される蛍光染料の種類である。例えば、Chen(2000)J.Org.Chem.65:2900-2906; Chen(2000)J.Biochem.Biophys.Methods 42:137-151を参照されたい。また米国特許第6,060,324号；第5,994,063号；第5,614,386号；第5,248,782号；第5,227,487号；第5,187,288号も参照されたい。

【0076】

“シアニン5”または“Cy5(商標)”及び“シアニン3”または“Cy3(商標)”の語は下記に詳細に説明するAmersham Pharmacia Biotech(ピスカタウェイ、ニュージャージー州)(Amersham Life Sciences, アーリントンハイツ、イリノイ州)により製造されている蛍光シアニン染料または同等物いう。例えば、米国特許第6,027,709号；第5,714,386号；第5,268,486号；第5,151,507号；第5,047,519号を参照されたい。これらの染料はCy5(商標)またはCy3(商標)に結合した5-アミノ-プロパギル-2'-デオキシシチジン5'-トリホスフェートの形で核酸内に組み込まれる。

【0077】

ここで用いる“蛍光染料”及び“蛍光ラベル”的語は全ての公知の蛍光物を含み、ローダミン染料（例えば、テトラメチルローダミン、ジベンゾローダミン、米国特許第6,051,719号を参照）；フルオレセイン染料；“BODIPY”染料及び同等物（例えば、ジピロメテンボロンジフルオリド染料、米国特許第5,274,113号を参照）；1-[イソインドリル]メチレン-イソインドール誘導体（米国特許第5,433,896号を参照）；及び全ての同等物などである。米国特許第6,028,190号、第5,188,934号も参照されたい。

【0078】

ここで用いる“特異的にハイブリダイズする”及び“特異的ハイブリダイゼーション”及び“選択的にハイブリダイズする”的語はストリンジェントな条件下で特定のヌクレオチド配列に選択的に核酸分子を結合、複製またはハイブリダイズすることをいう。“ストリンジェント条件”的語はある核酸が第2の配列に選択的にハイブリダイズする条件（例えば、サンプルゲノム核酸のアレイ内の固定化核酸プローブへのハイブリダイズ）であって、その他の配列に全くではないにしてもより少ない程度にしかハイブリダイズしない条件をいう。核酸ハイブリダイゼーションとの関連で“ストリンジェントなハイブリダイゼーション”及び“ストリンジェントなハイブリダイゼーション洗浄条件”（例えば、アレイ、サザンまたはノーザンハイブリダイゼーションにおける場合）は配列に依存し、異なる環境パラメータ下では異なる。ここで用いるストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は例えば、50%ホルムアミド 5X SSC、及び1% SDSを含むバッファー中4.2%でのハイブリダイゼーションまたは5X SSC、及び1% SDS含むバッファー中6.5%でのハイブリダイゼーション、その両方と0.2×SSC及び0.1% SDSの6.5%での洗浄などを含む。また、典型的なストリンジェントハイブリダイゼ

10

20

30

40

50

ーション条件は40%ホルムアミド、1M NaCl及び1% SDSのバッファー中37でのハイブリダイゼーション、及び1×SSC、45での洗浄も含む。類似のストリンジエンシー条件を得るために同程度だが異なるハイブリダイゼーション及び洗浄条件が利用できることは当業者にとって容易に理解されることである。

【0079】

しかしながら、ハイブリダイゼーションの構成の選択は重要なことではなく、当業界で公知であるように、可溶性サンプル核酸が固定化核酸に特異的にハイブリダイズするかどうかを決定する条件を示す洗浄条件のストリンジエンシーが重要である。洗浄条件は例えば、塩濃度が約0.02モル、pH7及び温度が少なくとも約50または約55～約60；または塩濃度が約0.15M NaCl、温度が少なくとも約72、少なくとも約15分間；または塩濃度が約0.2X SSC、温度が少なくとも約50または約55～約60、少なくとも約15～約20分間；またはハイブリダイゼーション複合体を室温、15分間、0.1% SDSを含む塩濃度約2X SSCの溶液で2回洗浄し、それから0.1% SDSを含む0.1X SSCで68、15分間で2回洗浄する；またはそれと同等の条件を含む。ストリンジエントな洗浄条件はまた、例えば、42、0.2X SSC/0.1% SDSであってもよい。同様のハイブリダイゼーション及び洗浄条件の詳細な説明及び試薬及びバッファー（例えば、SSCバッファー及び同等の試薬及び条件）に関しては、Sambrook、AusubelまたはTijssen（ここに引用する）を参照されたい。

【0080】

ここで用いる“検出組成物を用いた標識”または“検出成分を用いた標識”的語句は検出組成物、すなわちラベルを含む核酸をいい、下に詳しく説明する。ラベルは核酸と別の生体分子であってもよく、例えば下記に説明する“分子ビーコン”のようなステムループ構造の形の核酸である。これは、例えばニックトランスレーション、ランダムプライマー伸長、変質プライマーを用いた增幅等による核酸内への標識塩基（または検出ラベルに結合できる塩基）の結合を含む。該ラベルは例えば、視覚、分光、光化学、生化学、免疫化学、物理学または化学的手段などの手段により検出できる。適当な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミン・フルオレセイン、塩化ダンシルまたはフィコエリトリン；発光物質の例としてはルミノール；生物発光物質の例としてはルシフェラーゼ、ルシフェリン及びエクオリンなどがある。

【0081】

ここで用いる“核酸”的語は、1本鎖または二本鎖のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドをいう。この語は公知の天然ヌクレオチド類似体を含む核酸を包含する。この語は合成骨格を含む核酸様構造も包含する。本発明により提供されるDNA骨格類似体はホスホジエステル、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、ホスホルアミデート、アルキルホスホトリエステル、スルファミン酸、3'-チオアセタール、メチレン（メチルイミノ）、3'-N-カルバメート、モルホリノカルバメート及びペプチド核酸（PNA）を含む。F. Eckstein, IRL Press at Oxford University Press (1991) 編集のOligonucleotides and Analogues, a Practical Approach (オリゴヌクレオチド及びアナログ、実践的手法)；Antisense Strategies (アンチセンス戦略), Annals of the New York Academy of Sciences, 第600巻、Baserga and Denhardt (NYAS 1992) 編集；Michigan (1993) J. Med. Chem. 36: 1923-1937; Antisense Research and Applications (アンチセンス研究及び応用) (1993, CRC Press) を参照されたい。PNAは、N-(2-アミノエチル)グリシン単位など非イオン性骨格を有する。ホスホロチオエート結合は例えば、米国特許第6,031,092号；第6,001,982号；第5,684,148号に記載されており、WO 97/50

0 3 2 1 1 ; W O 9 6 / 3 9 1 5 4 ; Mata (1 9 9 7) T o x i c o l . A p p l . P h a r m a c o l . 1 4 4 : 1 8 9 - 1 9 7 も参照されたい。その他の合成骨格はメチル-ホスホネート結合または別のメチルホスホネート及びホスホジエステル結合（例えば、米国特許第5,962,674号；Strauss-Soukup (1997) Biochemistry 36: 8692-8698を参照）、及びベンジルホスホネート結合（例えば、米国特許第5,532,226号；Samstag (1996) Antisense Nucleic Acid Drug Dev 6: 153-156を参照）の語を包含する。核酸の語は遺伝子、DNA、RNA、cDNA、mRNA、オリゴヌクレオチドプライマー、プローブ及び増幅生成物と交換可能に用いる。

【0082】

“ゲノムDNA”または“ゲノム核酸”的語は1以上の細胞核から単離された核酸を含み、ゲノムDNA由来の（例えば、単離、増幅、クローン、合成された）核酸を含む。ゲノムDNAは以下に詳細を説明するように、いかなる供給源から得てもよい。“野生型ゲノム核酸”的語は公知の隣接遺伝子異常を含まない、または実質的に含まないゲノム核酸サンプルを意味する。

【0083】

ここで用いる“核酸を含むサンプル”または“核酸サンプル”的語は、別の核酸またはポリペプチドまたはそれらの組み合わせ（例えば、固定化プローブ）へのハイブリダイゼーションに適当な形態の（例えば、可溶性水溶液）DNAまたはRNA、または天然源から単離したDNAまたはRNAを表す核酸を含むサンプルをいう。核酸は単離、クローンまたは増幅され、例えば、ゲノムDNA、エピソームDNA、ミトコンドリアDNA、mRNA、またはcDNAであり；例えば、特定プロモーター、エンハンサー、コード配列等を含むゲノム断片であり；また、制限断片、cDNAライブラリーまたはそれらの断片等も含む。該核酸サンプルは特定の細胞、組織または体液から抽出され、または細胞株などの細胞培養物由来、または保存組織サンプル由来であり、以下に詳しく説明する。

【0084】

ここで用いる“コンピューター”及び“プロセッサ”的語は最も広い一般的な意味で用い、そのような全ての装置を含む。本発明の方法は任意のコンピューター／プロセッサを用いて実施することができ、公知のソフトウェアまたは方法と併せて実施できる。例えば、コンピューター／プロセッサは従来の汎用デジタルコンピューターであり、例えば、超小型演算装置及びデータ転送バスなどの従来要素を含む、個人用“ワークステーション”コンピューターである。コンピューター／プロセッサはさらに、ダイナミック・ランダム・アクセス・メモリ、フラッシュメモリ等、または磁気ディスク・オプショナル記憶装置など大容量記憶装置などの記憶素子のいかなる形態を含んでもよい。

【0085】

核酸の生成及び操作

本発明の核酸及び／またはアレイの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物の製造及び使用、及び本発明の方法の実施は核酸の単離、合成、クローニング、増幅、標識及びハイブリダイゼーション（例えば、CGH）を含んでよい。ここに記載するように、核酸の編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物、分析用の核酸及びアレイ上に固定化された核酸は全体ゲノム、染色体の全部または特定部分またはゲノム全体を含むゲノムDNAを発現できる。コンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーション（CGH）反応については以下に詳しく説明し、例えば、米国特許第5,830,645号；第5,976,790号を参照されたい。核酸サンプル、核酸の編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物及び、いくつかの場合において固定化核酸は例えば蛍光染料及び同等物などの検出成分で標識できる。例えば、第1のサンプルはある蛍光物で標識し、第2のサンプルは第2の染料で標識する（例えば、Cy3（商標）及びCy5（商標））。1の側面において、各サンプル核酸はその他の核酸サンプルの標識に使用した染料と異なる少なくとも1の検出成分、例えば異なる蛍光染料で標識する。

【0086】

10

20

30

40

50

いくつかの場合において、核酸は P C R など標準的な技術を用いて増幅する。増幅はハイブリダイゼーション前に核酸をサブクローニングまたは標識するために用いることができる。ここに記載するように、サンプル及び / または固定化核酸は標識できる。アレイ上のサンプルまたはプローブは例えばポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 増幅生成物の収集物、実質的に染色体全体または染色体断片または実質的にゲノム全体、例えばクローンの集合体、例えば B A C 、 P A C 、 Y A C 等 (下記参照) の 1 以上の特定 (前もって選択した) 部分由来の核酸源から生成でき、該核酸源を集合的に表す。アレイ固定化核酸またはゲノム核酸サンプルはいくつかの方法で処理でき、例えば反復核酸の遮断または除去、または選択核酸の濃縮である。

【 0 0 8 7 】

10

1 の側面において、サンプルを固定化プローブ (例えばアレイ上) に塗布し、ハイブリダイゼーション及び洗浄後、各染料の位置 (例えば、アレイ上のスポット) 及び量を読み取る。核酸または複数の固定化核酸断片の編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物は染色体異常、隣接遺伝子異常、遺伝関連の病気または症候群と関連するゲノム核酸の任意の断片を発現でき、例えば染色体またはゲノムの一部または全部を含む。核酸またはアレイ固定化核酸の編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物はクローン D N A の形態であってもよく、例えばここに記載する、 Y A C 、 B A C 、 P A C 等の形態でもよい。アレイ技術分野において一般的なように、1 の側面において、アレイ上の各 “ スポット ” は公知の配列を有し、例えばゲノムまたはその他の配列の公知の断片である。本発明は当業界で公知の方法または手順または装置と併せて実施でき、これらは科学及び特許文献において十分に記載されている。

20

【 0 0 8 8 】

一般技術

R N A 、 c D N A 、ゲノム D N A 、ベクター、ウイルスまたはこれらのハイブリッドのいずれも、本発明を実施するために用いる核酸は、遺伝子操作、増幅及び / 、または発現 / 組換え生成された、種々の供給源から単離できる。任意の組換え発現系を用いることができ、細菌性細胞に加えて、例えば哺乳類、酵母、昆虫または植物細胞発現系を含む。

【 0 0 8 9 】

30

もしくは、例えば Carruthers (1982) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47 : 411 - 418 ; Adams (1983) J. Am. Chem. Soc. 105 : 661 ; Beloussov (1997) Nucleic Acids Res. 25 : 3440 - 3444 ; Frenkel (1995) Free Radic. Biol. Med. 19 : 373 - 380 ; Blommers (1994) Biochemistry 33 : 7886 - 7896 ; Narang (1979) Meth. Enzymol. 68 : 90 ; Brown (1979) Meth. Enzymol. 68 : 109 ; Beauchage (1981) Tetra. Lett. 22 : 1859 ; 米国特許第 4,458,066 号に記載されているように、これらの核酸は公知の化学的合成技術により in vitro で合成できる。それから、二本鎖 D N A 断片は、相補鎖を合成して適当な条件下で該鎖と一緒にアニーリングすることにより、またはプライマー配列と D N A ポリメラーゼを用いて相補鎖を加えることにより得られる。

40

【 0 0 9 0 】

40

核酸操作技術、例えば、サブクローニング、プローブ標識 (例えば、クレノウ・ポリメラーゼを用いるランダムプライマー標識、ニックトランスレーション、増幅) 、シーケンシング、ハイブリダイゼーション、 G バンド、 C G H 、 S K Y 、 F I S H 等は科学及び特許文献に十分に記載されており、例えば Sambrook 編集、 Molecular Cloning : a Laboratory Manual (第 2 版) 、第 1 ~ 3 卷、 Cold Spring Harbor Laboratory, (1989) ; Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel 編集、 John Wiley & Sons, Inc. , New York (1997) ;

50

Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization With Nucleic Acid Probes, Part I. Theory and Nucleic Acid Preparation, Tijssen 編集、Elsevier、N.Y. (1993) を参照されたい。

【0091】

ゲノム核酸のクローニング

本発明のアレイ及び方法で用いる核酸またはゲノム核酸の編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物、例えばアレイ上に固定化したものまたはサンプルとして用いるものは、種々の輸送手段内にクローニングすることにより得られ、操作することができる。必要であれば、ゲノム核酸サンプルは任意のゲノムDNA源からスクリーニング及び再クローン化でき、または増幅できる。従って、様々な側面において、本発明の方法で用いるゲノム核酸の形態（アレイ及びサンプルなど）はゲノムDNA、例えば哺乳類及びヒト人工染色体、衛星人工染色体、酵母人工染色体、細菌性人工染色体、P1人工染色体、組換えベクター及びウイルス、プラスミド等を含むゲノムライブラリーを含む。

【0092】

哺乳類人工染色体（MAC）及びヒト人工染色体（HAC）は例えば、Ascenzioni (1997) Cancer Lett. 118: 135 - 142; Kuroiwa (2000) Nat. Biotechnol. 18: 1086 - 1090; 米国特許第5,288,625号；第5,721,118号；第6,025,155号；第6,077,697号に記載されている。MACは400キロ塩基（Kb）以上の挿入を含むことができ、例えばMejia (2001) Am. J. Hum. Genet. 69: 315 - 326を参照されたい。Auriche (2001) EMBO Rep. 2: 102 - 107は5.5キロ塩基サイズを有するヒト・ミニ染色体を形成する。

【0093】

衛星人工染色体または衛星DNAベース人工染色体（SATAC）は例えば、Warrington (1997) Nature 386: 553 - 555; Roush (1997) Science 276: 38 - 39; Rosenfeld (1997) Nat. Genet. 15: 333 - 335に記載されている。SATACは、異なる哺乳類種の細胞の新しい(de novo)染色体構造を誘発することにより作ることができる；例えば、Hadlaczky (2001) Curr. Opin. Mol. Ther. 3: 125 - 132; Csonka (2000) J. Cell Sci. 113 (Pt 18): 3207 - 3216を参照されたい。

【0094】

また、酵母人工染色体（YAC）も使用でき、80 ~ 700 kbのサイズの挿入を通常含む。YACは100万塩基対サイズ以下のゲノム断片の安定増殖のために長年使用されてきた；例えば、米国特許第5,776,745号；第5,981,175号；Feingold (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 8637 - 8641; Tucker (1997) Gene 199: 25 - 30; Adam (1997) Plant J. 11: 1349 - 1358; Zeschningk (1999) Nucleic Acids Res. 27: 21を参照されたい。

【0095】

細菌性人工染色体（BAC）は120 kbまたはそれ以上の挿入を含むことができるベクターであり、例えば米国特許第5,874,259号；第6,277,621号；第6,183,957号を参照されたい。BACは大腸菌F因子プラスミド系に基づくものであり、マイクログラム量における操作及び精製が容易である。BACプラスミドは細胞につき1 ~ 2のコピーで保存されるので、本方法で使用できるYACで見られる再配列の問題がない；例えば、Asakawa (1997) Gene 69 - 79; Cao (1999) Genome Res. 9: 763 - 774を参照されたい。

【0096】

10

20

30

40

50

P1人工染色体（PAC）、バクテリオファージP1由来ベクターは例えば、Woon (1998) *Genomics* 50:306-316; Boren (1996) *Genome Res.* 6:1123-1130; Ioannou (1994) *Nature Genet.* 6:84-89; Reid (1997) *Genomics* 43:366-375; Nothwang (1997) *Biotechniques* 23:120-124に記載されている。P1は75~100Kb DNA挿入を含むことができる大腸菌に感染するバクテリオファージである（例えば、Mejia (1997) *Genome Res.* 7:179-186; Ioannou (1994) *Nat Genet* 6:84-89を参照されたい）。PACはラムダライブラリーとほぼ同じ方法でスクリーンする。Ashworth (1995) *Analytical Biochem.* 224:564-571; Gingrich (1996) *Genomics* 32:65-74も参照されたい。
10

【0097】

その他のクローニング輸送手段も用いることができ、例えば、組換えウイルス；コスミド、プラスミドまたはcDNAであり；例えば、米国特許第5,501,979号；第5,288,641号；第5,266,489号を参照されたい。

【0098】

これらのベクターは例えばルシフェラーゼ及び緑色蛍光タンパク遺伝子などのマーカー遺伝子を含むことができる（例えば、Baker (1997) *Nucleic Acid Res.* 25:1950-1956を参照）。配列、挿入部分、クローン、ベクター等は天然供給源から単離でき、ATCCまたはGenBankライブラリーまたは市販の供給源などから得られ、または合成または組換え方法により調製できる。
20

【0099】

核酸増幅

オリゴヌクレオチドプライマーを用いた増幅は例えば、本発明のアレイ及び方法で用いるサブクローン、核酸の編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物、または該核酸を生成または操作するために使用でき、固定化またはサンプル核酸内にラベルを組込み、アレイへハイブリダイズされた核酸レベルを検出または測定する等のために使用できる。また一般的に、変質プライマーを用いる増幅も、検出プローブ（例えば、Cy5（商標）-またはCy3（商標）-シトシン結合）を試験または対照ゲノムDNAを表す核酸内に組込むために有用であり、固定化ゲノムDNAにハイブリダイズするために使用する。増幅はサンプル内の核酸の量を測るために使用でき、例えば米国特許第6,294,338号を参照されたい。当業者は適当なオリゴヌクレオチド増幅プライマーを選択及び設計できる。また、増幅方法は当業界に公知であり、例えばポリメラーゼ連鎖反応、PCR (PCR PROTOCOLS, A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS (PCR手順、方法及び応用ガイド)、編集、Innis, Academic Press, N.Y. (1990) 及びPCR STRATEGIES (PCR法) (1995)、編集、Innis, Academic Press, Inc. N.Y.）、リガーゼ連鎖反応（LCR）（例えば、Wu (1989) *Genomics* 4:560; Landegren (1988) *Science* 241:1077; Barringer (1990) *Gene* 89:117を参照）；転写増幅（例えば、Kwoh (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173を参照）；及び自律配列複製（例えば、Guatelli (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874を参照）；Qベータ・レプリカーゼ増幅（例えば、Smith (1997) *J. Clin. Microbiol.* 35:1477-1491を参照）、自動Qベータ・レプリカーゼ増幅分析（例えば、Burg (1996) *Mol. Cell. Probes* 10:257-271）及びその他のRNAポリメラーゼ媒介技術、例えば核酸配列ベース増幅または“NASBA”等があり、例えばBirch (2001) *Lett. Appl. Microbiol.* 33:296-301; Greijer (2001) *J. Virol. Methods* 96:133-147を
40

参照されたい。また、Berger (1987) Methods Enzymol. 152: 307 - 316; Sambrook; Ausubel; 米国特許第4,683,195号及び第4,683,202号も参照されたい。

【0100】

核酸のハイブリダイズ

本方法を実施する際、例えば単離、クローンまたは増幅ゲノム核酸などの核酸サンプルは核酸の編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物または固定化核酸にハイブリダイズする。他の側面において、ハイブリダイゼーション及び/または洗浄条件は中からストリンジエントな条件下で行う。本発明は染色体異常の検出のための例えば、コンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーション(CGH)反応などハイブリダイゼーション反応におけるハイブリダイゼーション標的として使用するためのゲノム核酸断片を選択する方法を提供し、とりわけ、ストリンジエントな条件下で単一の遺伝子座にハイブリダイズする染色体断片を選択する方法を提供する。ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件を含む典型的なハイブリダイゼーション条件は以下に示す。

【0101】

核酸ハイブリダイゼーションの幅広い手引きは例えば、Sambrook Ausubel、Tijssenにある。ストリンジエントなハイブリダイゼーション及び洗浄条件は特定のイオン強度及びpHでの特定配列の熱融解点(T_m)より約5℃低くなるように選択する。 T_m は標的配列の50%を完全に適合するプローブにハイブリダイズする(特定のイオン強度及びpHにおける)温度である。非常にストリンジエントな条件は特定プローブの T_m と等しくなるように選択する。アレイに100以上の相補的残基を有する相補的核酸のハイブリダイゼーションのための典型的なストリンジエントハイブリダイゼーション条件は42℃を含み、標準ハイブリダイゼーション溶液を用い(例えばSambrookを参照)、該ハイブリダイゼーションは一晩中行う。また、典型的な高ストリンジエント洗浄条件は0.15M NaCl、72℃、約15分間を含む。典型的なストリンジエント洗浄条件は、65℃、15分間の0.2×SSC洗浄も含む(例えばSambrookを参照)。1の側面において、背景プローブシグナルを除去するために、中または低ストリンジエンシー洗浄を高ストリンジエンシー洗浄より先に用いる。例えば、100ヌクレオチド以上の二本鎖のための典型的な中ストリンジエンシー洗浄は45℃、15分間、1×SSCを含む。例えば、100ヌクレオチド以上の二本鎖のための典型的な低ストリンジエンシー洗浄は40℃、15分間、4×~6×SSCを含む。

【0102】

他の側面において、核酸またはアレイの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物の製造及び本発明の方法の実施において、蛍光染料Cy3(商標)及びCy5(商標)は、例えば対照(例えば、“野生型”)から得た核酸と試験細胞または組織サンプルなど、2つのサンプル由来の核酸断片に異なる標識をするために、または核酸またはアレイ固定化核酸及び/またはサンプル核酸の編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物を標識するために使用できる。多くの市販機器はこれらの2つの染料検出のために適合させて設計される。Cy5(商標)または蛍光物またはその他の酸化性(oxidation-sensitive)化合物の安定性を増加させるために、酸化防止剤及びフリーラジカル・スカベンジャー(消去剤)をハイブリダイゼーション混合物、ハイブリダイゼーション及び/または洗浄溶液中で使用できる。従って、Cy5(商標)シグナルは格段に増加し、より長いハイブリダイゼーション時間が可能である。

【0103】

他の側面において、本発明の方法は、制御された不飽和湿度環境で行うことができ、本発明の核酸またはアレイの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物は湿度を制御できる器具または装置をさらに含んでもよい。湿度制御はハイブリダイゼーション感度を増加させるために操作できる1のパラメーターである。従って、1の側面において、本発明の方法を実施する際、ハイブリダイゼーションは制御された不飽和湿度環境で行うことができ；ハイブリダイゼーション効率は湿度が飽和していない場合、著しく改善する。

10

20

30

40

50

001年4月19日に提出された同時係属中のUSSN09/839,658を参照されたい。ハイブリダイゼーション効率は湿度を動的制御する場合、すなわち、湿度がハイブリダイゼーション中変化する場合、向上する。プレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーション、洗浄及び／または検出段階時に操作者が湿度を制御できるハウジング及び制御機器を含むアレイ機器が使用できる。該機器はプレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーション、洗浄及び検出工程を含む全体的な手順サイクル中に、湿度（及び温度及びその他のパラメーター）のプレプログラミングを可能とする検出器、制御機器及び記憶部品を含むことができる。

【0104】

他の側面において、本発明の方法は温度変動を含むハイブリダイゼーション条件を含み、本発明の核酸またはアレイの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物は、例えばオープンなどの温度制御ができる器具または装置をさらに含む。ハイブリダイゼーションは温度を前もって設定した場合または温度が比較的一定レベルの場合の条件（例えば、多くの市販オープンのように、プラスまたはマイナス2、3度）と比較して、温度変化がある環境の方がより効率的である。反応チャンバー温度は変動的に言えば、オープンまたは温度変化を作ることができるその他の装置により修正できる。10

【0105】

他の側面において、本発明の方法は浸透圧変動を含むハイブリダイゼーション条件を含むことができる、本発明の核酸またはアレイの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物は、例えば溶質勾配を生成させるなど浸透圧条件を制御できる器具または装置をさらに含む。ハイブリダイゼーション効率（すなわち時間平衡）は、例えば溶質勾配など過剰／低弾力性（tonicity）変化を含むハイブリダイゼーション環境によっても高めることができる。溶質勾配（solute gradient）は機器内で生じる。例えば、低塩ハイブリダイゼーション溶液はアレイハイブリダイゼーション・チャンバーの片側に加え、高塩バッファーはチャンバー内で溶質勾配を生じるためにもう一方の側に加える。20

【0106】

核酸の断片化及び分解

本発明の方法を実施する際、核酸の編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物、固定化核酸及び／またはサンプル核酸を様々な長さでクローニング、標識または固定化できる。例えば、1の側面において、ゲノム核酸断片は約200塩基より短い。この小さいサイズに限定した標識ゲノムDNAの使用は、例えばアレイベースCGHにおいて、分子プロファイル分析の分解能を著しく向上させる。例えば、このような短い断片の使用により、固定化核酸上の反復配列及びその他の望ましくない“背景”クロスハイブリダイゼーションを著しく抑制できる。反復配列ハイブリダイゼーションの抑制は異なるコピー数（例えば増幅または欠失）の検出または固有配列の検出の信頼性を大きく増加させる。30

【0107】

最終的な断片長さは例えばDNAアーゼを用いた処理により修正できる。ニックトランスレーション反応においてDNAポリメラーゼに対するDNAアーゼの比を調節することにより分解生成物の長さが変化する。標準的なニックトランスレーションキットは通常300～600塩基対断片を生じる。必要であれば、標識核酸をさらに200塩基以下、約25から30塩基程度までの断片に断片化でき、例えばDNAエンドヌクレアーゼ、例えばDNAアーゼ（例えば、Herrera(1994)J.Mol.Biol.236:405-411; Suck(1994)J.Mol.Recognit.7:65-70を参照）または2塩基制限エンドヌクレアーゼCviJI（例えば、Fitzgerald(1992)Nucleic Acid Res.20:3753-3762）及び標準手順、例えば、Sambrook、Ausubelを参照、を用いて、その他の断片化方法も用いてまたは用いずに、DNAのランダム酵素消化を行う。40

【0108】

その他の手順もゲノムDNAを断片化するために用いることができ、例えば、機械剪断

50

、超音波処理（例えば、Deininger (1983) Anal. Biochem. 129: 216 - 223を参照）、及び類似の手段（例えば、Sambrook、Ausubel、Tijssen）を用いることができる。例えば、1の機械技術はシリング・ポンプによりDNAサンプルに強引に小さな穴を通した場合に生じるポイントシンク（point-sink）流体力学に基づき、例えば、Thorstenson (1998) Genome Res. 8: 848 - 855を参照。また、Oefner (1996) Nucl. Acids Res. 24: 3879 - 3886; Ordahl (1976) Nucl. Acids Res. 3: 2985 - 2999を参照されたい。断片サイズは種々の技術によって評価でき、例えば、Silles (1997) J. Chromatogr. A. 771: 319 - 329のような、キャピラリー電気泳動中で動的にサイズふるいしたポリマー溶液を用いてDNA断片化を分析する、サイジング電気泳動である。断片サイズは例えば、マトリックス支援レーザー脱離／イオン化・飛行時間型質量分析によっても測定でき、例えば、Chiu (2000) Nucl. Acids Res. 28: E31を参照。

10

20

30

30

40

50

【0109】隣接遺伝子異常に関連する症候群

1の側面において、本発明は核酸及びアレイの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物、及び染色体異常の検出のための方法、または隣接遺伝子異常に関連する症候群の診断または予後診断のための方法を提供する。染色体異常、隣接遺伝子異常、遺伝関連の病気または症候群と関連するゲノム核酸の任意の組み合わせは核酸またはアレイの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物を製造及び使用する際、及びここに具体的に説明していないゲノム核酸断片を含む本発明の方法を実施する際に制限なく使用できる。例えば、核酸またはアレイの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物、及び本発明の方法は文献に記載されているゲノム核酸断片を含むことができ、例えば、Charles R. Scriver, et al. (2000) "The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease (代謝及び分子ベースの遺伝子性疾患)," 第8版、ニューヨーク、McGraw-Hill; Pat Gilbert (2000) "The A-Z Reference Book of Syndromes and Inherited Disorders (症候群及び遺伝子性疾患のA-Zレファレンスブック) : A Manual for Health, Social and Education Workers (医療従事者、ソーシャルワーカー及び教育従事者のためのマニュアル)" 第3版、Stanley Thornes Pub Ltd.; Suzanne B. Cassidy, et al. (編集)、(2001) "Management of Genetic Syndromes (遺伝的症候群の取扱い)," Wiley-Lissを参照されたい。

30

30

40

【0110】

核酸またはアレイの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物及び本発明の方法は、遺伝関連の病気または症候群の分別診断に使用でき、適切な治療計画が設計でき、予後評価ができる。本発明の方法は病気または健康状態の原因、診断または予後（例えば、重症度、転移の可能性）が1以上の遺伝的欠損（例えば、隣接遺伝子欠損により生じる症候群）に関連する状況において使用できる。

40

50

【0111】

例えば、隣接遺伝子欠損の存在の測定は癌の診断及び予後診断を予測するのに有用であり、癌を分類し、または治療計画または予後診断を設計するのに有用である。例えば、皮膚黒色腫に関するヒト染色体上の癌転移抑制遺伝子及びヒトの癌のその他の種々の形態は例えば、7q21 - 22、7q31.2 - 32、8p21 - 12、10q11 - 22、11p13 - 11.2、12p11 - q13、12q24 - ter 及び17pter - q23上に位置する（例えば、Goldberg (2000) Am. J. Hum. Genet. 67 (2) : 417 - 431；Ichikawa (2000) Asian J. Androl. 2 (3) : 167 - 171）。従って、本発明の方法及びアレイは癌の予測、診

断及び予後診断に使用できる。

【0112】

1 p 欠失症候群

1の側面において、本発明の核酸またはアレイの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物は染色体1、染色体座1p ; 36を含むゲノム核酸断片を含み、検出する症候群が1p欠失症候群である。バンド1p36.33の欠失を有する患者は肥満と過食症の臨床所見を有し、プラダー・ウィリー症候群の兆候と重複していた。例えば、Eugster (1997) Am. J. Med. Genet. 70 (4) : 409 - 412を参照されたい。位置1p36.3のモノソミーを生じる核型異常を持つ患者は小頭症、知的障害、額の突出、深くくぼんだ目、くぼんだ鼻梁、平坦な顔面中央、相対顎前突症及び耳の異常を有する。例えば、Reisch (1995) Am. J. Med. Genet. 59 (4) : 467 - 475を参照されたい。10

【0113】

3 p 欠失症候群

1の側面において、本発明の核酸またはアレイの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物は染色体3、染色体座3p25 - pterを含むゲノム核酸断片を含み、検出する症候群が3p欠失症候群である。染色体3p欠失は散発性内分泌腫瘍(EPT)の病原に関係すると考えられており、フォン・ヒッペル・リンドウ病(von Hippel-Lindau / 3p25.5のVHL遺伝子)もEPTに関係すると考えられている。20 染色体3p欠失は固形ヒト腫瘍に関係することが多い。例えば、Barghhorn (2001) J. Pathol. 194 (4) : 451 - 458を参照されたい。染色体3pのいくつかの領域中の対立遺伝子損失は乳房の原発腫瘍において検出されている。例えば、Maitra (2001) Am. J. Pathol. 159 (1) : 119 - 130を参照されたい。20

【0114】

3 p 重複症候群及び“C症候群”

1の側面において、本発明の核酸またはアレイの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物は染色体3、染色体座3p21 - pterを含むゲノム核酸断片を含み、検出する症候群が3p重複症候群である。染色体3pの部分トリソミー、反転重複3p22 - > 3pter (重複(3)(pter -> p26 : : p22(p26 : : p26 > ter))は精神運動遅延及び軽度の形成異常に関連することがわかっている。部分3pトリソミー、3p · 17p転座:t(3;7)(p253;p133)は知的障害及び言語障害に関連することがわかっている。例えば、Smeets (2001) Genet. Couns. 12 (1) : 85 - 89を参照されたい。“C症候群”、複数の先天性異常/知的障害(MCA/MR)症候群は3pの重複に関連することがわかっており、例えば、McGaughran (2000) Am. J. Med. Genet. 94 (4) : 311 - 315を参照されたい。30

【0115】

ウォルフ・ヒルシュホーン(Wolf-Hirschhorn)症候群及びピット・ロジャース・ダンクス(Pitt-Rogers-Danks)症候群

1の側面において、本発明の核酸またはアレイの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物は染色体4、染色体座4p16.3を含むゲノム核酸断片を含み、検出する症候群はウォルフ・ヒルシュホーン症候群である。ウォルフ・ヒルシュホーン症候群(WHS)は染色体4(4p-)の短腕の欠失により引き起こされる公知の先天性形成異常である。ほとんどの場合、新規発生及び父方起源である。WHSの子供は深刻な発育障害を有する。大人のWHS表現型は一般に幼児期WHSの表現型と似ている。成長遅延、小頭症及び知的障害は大人及び子供の両方に決まって見られる。顔面形成異常、小頭症、及び知的障害は大人及び子供の両方に決まって見られる。顔面形成異常も同様に残る。主な違いは大人のWHSには体内(心臓)の異常がないということである。例えば、Battaglia (2001) Adv. Pediatr. 48 : 75 - 113; Marcelis (4050)

2001) Genet. Couns. 12: 35-48 を参照されたい。例えば、Kant (1997) J. Med. Genet. 34(7): 569-572 を参照されたい。ピット・ロジャース・ダンクス (Pitt-Rogers-Danks) 症候群も染色体 4 p 16 上の欠失に関連している。

【0116】

4 p 重複症候群

1の側面において、本発明の核酸またはアレイの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物は染色体 4、染色体座 4 p 15 . 2 - 16 . 1 を含むゲノム核酸断片を含み、検出する症候群が 4 p 重複症候群である。4 p の末端半分の重複は部分トリソミー 4 症候群を生じ、“ボクサー”鼻形及び深くくぼんだ目を特徴とする。これらの兆候は少しの末端重複の場合においてさえ見られることが多い。4 p 16 . 1 p 16 . 3 の“タンデム”重複は、WHS 表現型を持つ患者の同じ染色体における 4 p 16 . 3 pter の微妙な欠失に関して検出されている。例えば、Zolllino (1999) Am. J. Med. Genet. 82(5): 371-375 を参照されたい。

【0117】

ネコなき (Cri du Chat) 症候群

1の側面において、本発明の核酸またはアレイの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物は染色体 5、染色体座 5 p 15 . 2 - pter を含むゲノム核酸断片を含み、検出する症候群がネコなき症候群である。ネコなき症候群の患者のほとんどは染色体 5 (5 p) の短腕の新規な欠失を有する。患者は表現型及び細胞遺伝学上のばらつきを示す。欠失の例としては、末端 - 46 , XX , del (5) (pter - p 15 . 2 :) ; 中間 - 46 , XX , del (5) (pter - p 15 . 2 : : p 13 . 3 - qter) ; 46 , XX , del (5) t (5; 11) (p 15 ; q 25) mat がある。臨床的には、若い患者は甲高い泣き声、精神運動遅延、小頭症、成長速度障害、及び丸顔、隔離症、広い鼻梁、斜め下瞼裂 (downward slanting palpebral fissures) 及び小顎症などの頭部顔面異常を有する。例えば、Mainardi (2001) J. Med. Genet. 38(3): 151-158 ; Van Buggenhout (2000) Am. J. Med. Genet. 90(3): 203-215 を参照されたい。

【0118】

ミラー・ディッカー (Miller-Dieker) 症候群

1の側面において、本発明の核酸またはアレイの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物は染色体 7、染色体座 7 p 13 . 3 を含むゲノム核酸断片を含み、検出する症候群がミラー・ディッカー症候群である。トリソミー 5 p 及びミラー・ディッカー症候群は染色体 5 及び 17 及び他の常染色体との相互転座の不安定な分離を生じる。ミラー・ディッカー症候群は染色体 17 p 13 におけるブレイクポイントに関連している。ミラー・ディッカー症候群患者は知的障害、出生後発育不全、全身性筋緊張低下、発作、小頭症、皮膚萎縮、脳梁の部分形成不全、脳室拡大、顔面異形の症状を示す。例えば、Mutchinick (1999) Am. J. Med. Genet. 85(2): 99-104 ; Pollin (1999) Am. J. Med. Genet. 85(4): 369-375 を参照されたい。

【0119】

ウィリアムズ症候群

1の側面において、本発明の核酸またはアレイの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物は染色体 7、染色体座 7 p 11 . 23 を含むゲノム核酸断片を含み、検出する症候群がウィリアムズ症候群である。ウィリアムズ症候群は通常、7 p 11 . 23 の隣接遺伝子欠失に起因し、特徴的な顔つき、心奇形、幼児高カルシウム血症、及び成長及び発育障害を伴い、軽度から重度の知的障害を含む。例えば、ウィリアムズ症候群は核型が 7 p 11 . 23 及び 7 p 36 で微小欠損を有し、及び 7 p 36 で追加の染色体物質を有する場合に見られる。例えば、Donnai (2000) Am. J. Med. Genet. 9

10

20

30

40

50

7 (2) : 1 6 4 - 1 7 1 ; W o u t e r s (2 0 0 1) A m . J . M e d . G e n e t . 1 0 2 (3) : 2 6 1 - 2 6 5 を参照されたい。

【 0 1 2 0 】

ランガー・ギデオン症候群 (L G S) または T R P S I I

1 の側面において、本発明の核酸またはアレイの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物は染色体 8 、染色体座 8 q 2 4 . 1 を含むゲノム核酸断片を含み、検出する症候群がランガー・ギデオン症候群 (L G S) または毛髪鼻指節骨症候群 2 型 (T R P S I I) である。2 つの常染色体優性疾患、 T R P S I の臨床兆候、及び E X T 1 遺伝子中の変異により引き起こされる軟骨性外骨腫の複数の形態を含む。 T R P S I 患者に対して、ほとんどの T R P S I I 患者は細胞遺伝学上明白な欠失を有し、知的障害がある場合が多い。例えば、 H i l t o n (2 0 0 1) G e n o m i c s 7 1 (2) : 1 9 2 - 1 9 9 ; N a r d m a n n (1 9 7 7) H u m . G e n e t . 9 9 (5) : 6 3 8 - 6 4 3 を参照されたい。染色体 8 q の隣接欠失を有するその他の症候群はコーエン症候群 (8 q 2 2 - q 2 3) 、 K l i p - F e i l 症候群 (8 q 2 2 . 2) 、遺伝性痙性対麻痺 (8 q 2 4) 及び良性成人型家族性ミオクローヌステンかん (8 q 2 3 . 3 - q 2 4 . 1) などがある。

【 0 1 2 1 】

毛髪鼻指節骨症候群 (T R P S) または T R P S I

1 の側面において、本発明の核酸またはアレイの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物は染色体 8 、染色体座 8 q 2 4 . 1 を含むゲノム核酸断片を含み、検出する症候群が毛髪鼻指節骨症候群 (T R P S) または T R P S I である。 T R P S I の個体は通常、形成異常の特徴を有し、深刻な小人症である。 T R P S は髪、顔及び体の異常が独特的組み合わせで種々の形で現れる。全指骨、中手骨及び中足骨の全身の不足がないことにより T R P S I I I と区別され、外骨腫症及び知的障害がないことにより T R P S I I が除外される。例えば、 G e o r g e (1 9 9 8) J . E u r . A c a d . D e r m a t o l . V e n e r e o l . 1 1 (1) : 6 6 - 6 8 ; N a s e l l i (1 9 9 8) P e d i a t r . R a d i o l . 2 8 (1 1) : 8 5 1 - 8 5 5 を参照されたい。

【 0 1 2 2 】

9 p 欠失症候群

1 の側面において、本発明の核酸またはアレイの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物は染色体 9 、染色体座 9 p 、例えば染色体座 9 p 2 2 - p t e r を含むゲノム核酸断片を含み、検出する症候群が 9 p 欠失症候群である。患者は発育遅延 / 知的障害、発作及び学習不能症を有する。知的障害は種々の程度で存在し、記憶障害に関連した v i s u o - p r a x i c 及び v i s u o - s p a t i a l の技能の欠損が明らかである。例えば、 C h i l o s i (2 0 0 1) A m . J . M e d . G e n e t . 1 0 0 (2) : 1 3 8 - 1 4 4 を参照されたい。一方、テトラソミー 9 p のケースは極めてまれであり；この状態の主な臨床症状は頭部顔面異常、全身性低血圧症及び深刻な知的障害を特徴とする。例えば、 K o b a y a s h i (2 0 0 0) J . C r a n i o m a x i l l o f a c . S u r g . 2 8 (3) : 1 6 5 - 1 7 0 を参照されたい。

【 0 1 2 3 】

ディジョージ (D i G e o r g e) 症候群 I I

1 の側面において、本発明の核酸またはアレイの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物は染色体 1 0 、染色体座 1 0 p 1 3 - p 1 4 を含むゲノム核酸断片を含み、検出する症候群がディジョージ症候群 I I である。この症候群は神経冠関連発達欠陥を特徴とする。部分モノソミー 1 0 p はまれな染色体状態であり、患者のかなりの割合はディジョージ症候群 (D G S) 及び V e l o c a r d i o f a c i a l 症候群 (V C F S) の特徴を示す。ディジョージ症候群 (D G S) 表現型の 1 の患者は不安定な転座を有し [4 5 , X Y , - 1 0 , - 2 2 , + d e r (1 0) , t (1 0 ; 2 2) (p 1 3 ; q 1 1)] 1 0 p 1 3 - p t e r 及び 2 2 q 1 1 - p t e r のモノソミーを生じる。例えば、 D a s o u k i (1 9 9 7) A m . J . M e d . G e n e t . 7 3 (1) : 7 2 - 7 5 ; L i c h

10

20

30

40

50

t n e r (2 0 0 0) J . M e d . G e n e t . 3 7 (1) : 3 3 - 3 7 ; E p s t e i n (2 0 0 1) T r e n d s G e n e t . 1 7 (1 0) : S 1 3 - 1 7 を参照されたい。

【 0 1 2 4 】

W A G R 症候群 I I

1の側面において、本発明の核酸またはアレイの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物は染色体 1 1 、染色体座 1 1 p 1 3 を含むゲノム核酸断片を含み、検出する症候群が W A G R 症候群である。 W i l m s ' 腫瘍 - 無虹彩 - 生殖器奇形 (tumor a n i r i d i a g e n i t a l a n o m a l y) - 知的障害 (W A G R) 症候群は W i l m s ' 腫瘍を発達させる危険の増大を伴う。 W A G R (W i l m s ' 腫瘍、無虹彩症、泌尿生殖器の奇形及び知的障害) 症候群異常は安定逆数 7 ; 1 1 転座及び 1 1 p 1 3 ブレイクポイントに関連している。例えば、 C r o l l a (1 9 9 7) J . M e d . G e n e t . 3 4 (3) : 2 0 7 - 2 1 2 ; A r i e l (1 9 9 6) P e d i a t r . P a t h o l . L a b . M e d . 1 6 (6) : 1 0 1 3 - 1 0 2 1 を参照されたい。

【 0 1 2 5 】

ベックウィズ・ヴィードマン症候群 (B W S)

1の側面において、本発明の核酸またはアレイの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物は染色体 1 1 、染色体座 1 1 p 1 5 . 5 を含むゲノム核酸断片を含み、検出する症候群がベックウィズ・ヴィードマン症候群である。ベックウィズ・ヴィードマン症候群 (B W S) は身体の過成長、先天性奇形、及び幼児期腫瘍の傾向を特徴とする、インプリンティング異常である。染色体 1 1 p 1 5 . 5 は、多種多様の悪性腫瘍及び B W S に関する 1 M b のインプリンティング遺伝子群を有することが報告されている。例えば、 L i (2 0 0 1) G e n o m i c s 7 4 (3) : 3 7 0 - 3 7 6 ; H o r i k e (2 0 0 0) H u m . M o l . G e n e t . 9 (1 4) : 2 0 7 5 - 2 0 8 3 を参照されたい。

【 0 1 2 6 】

P o t o c k i - S h a f f e r 症候群 (多発性外骨腫性 I I L o c u s)

P o t o c k i - S h a f f e r 症候群は染色体 1 1 の短腕の隣接欠失により引き起こされる。この症候群の患者は頭頂骨 (頭頂孔) の橈円欠損を有する。例えば、 W u (2 0 0) A m . j . H u m . G e n e t . 6 7 (5) : 1 3 2 7 - 1 3 3 2 を参照されたい。

【 0 1 2 7 】

アンジェルマン症候群 (A S)

1の側面において、本発明の核酸またはアレイの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物は染色体 1 5 、染色体座 1 5 q 1 2 または 1 5 q 1 3 を含むゲノム核酸断片を含み、検出する症候群がアンジェルマン症候群である。 1 5 q 1 1 - q 1 3 領域のハプロ不全、及び染色体 1 5 q 1 1 - q 1 3 の d e n o v o (新たな) 欠失により引き起こされることが報告されている。また、アンジェルマン症候群は染色体領域 1 5 q 1 2 の母方コピーに影響を及ぼす遺伝的異常により引き起こされることも報告されている。母方起源の i n v - d u p (1 5) または染色体内重複の形態において、この同じゲノム領域の余分なコピーは通常、発育遅延及び治療不能の発作を特徴とする深刻な神経系の発現型に関連することが観測されている。例えば、 T o r r i s i (2 0 0 1) A m . j . M e d . G e n e t . 1 0 6 (2) : 1 2 5 - 1 2 8 ; B a u m e r (1 9 9 9) H u m . G e n e t . 1 0 5 (6) : 5 9 8 - 6 0 2 ; G r e g e r (1 9 9 7) A m . j . H u m . G e n e t . 6 0 (3) : 5 7 4 - 5 8 0 を参照されたい。

【 0 1 2 8 】

プラダー・ウィリー症候群 (P W S)

1の側面において、本発明の核酸またはアレイの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物は染色体 1 5 、染色体座 1 5 q 1 2 を含むゲノム核酸断片を含み、検出する症候群がプラダー・ウィリー症候群 (P W S) である。 P W S は神経内分泌異常であり、以下を原因とすることが報告されている：大半は父方由来の 1 5 q 1 1 q 1 3 の染色体欠失、母方片親性ダイソミー (U P D) 、またはインプリンティング変異 (I C) 。深刻な学

10

20

30

40

50

習不能症（例えば、注意欠陥過活動性障害）、失読症及び日中の異様な眠気は PWS の一般的な症状である。例えば、Manni (2001) Clin. Neurophysiol. 112 (5) : 800 - 805; Fernandez-Novo (2001) Rev. Neurol. 32 (10) : 935 - 938 を参照されたい。

【0129】

ルビンスタイン・ティビ症候群 (RTS)

1の側面において、本発明の核酸またはアレイの編集物またはセット、ライプラリーまたは収集物は染色体 16、染色体座末端 16 p 13 . 3 を含むゲノム核酸断片を含み、検出する症候群がルビンスタイン・ティビ症候群 (RTS) である。RTS は顔面異常、平らな親指、幅広い足指及び知的障害を特徴とする奇形症候群である。RTS 患者の小集団において、染色体バンド 16 p 13 . 3 に関連する微小欠失、転座及び反転が検出できる。免疫欠損はこの症候群の顕著な特徴であり、これらの患者は感染症を再発しやすい。例えば、Petrrij (2000) J. Med. Genet. 37 (3) : 168 - 176; Villeda (2000) Arch. Dis. Child. 83 (4) : 360 - 361 を参照されたい。

【0130】

シャルコー・マリー・トゥース病 1A 型 (CMT-1A)

1の側面において、本発明の核酸またはアレイの編集物またはセット、ライプラリーまたは収集物は染色体 17、染色体座 17 p 12 を含むゲノム核酸断片を含み、検出する症候群がシャルコー・マリー・トゥース病 1A 型 (CMT-1A) である。シャルコー・マリー・トゥース・ニューロパチー（神経障害）1型 (CMT1) は、染色体 17 (CMT1A)、染色体 1 (CMT1B) 及びその他の公知でない常染色体 (CMT1C) に位置付ける遺伝子座を含む慢性脱髓性多発神経障害の遺伝的に異種グループである。CMT1A はシャルコー・マリー・トゥース病 1 型のケースの 70 ~ 90 % の主な原因となり、染色体 17 p 12 上の 1 . 4 - Mb ゲノム断片のタンデム重複によりほとんど引き起こされる。また、染色体座 17 p 12 は圧迫性麻痺の遺伝性ニューロパチーなどの末梢神経障害にも関連する。いくつかの分析は、該症候群が、フランкиング・リピート遺伝子群間の相同組換えを原因とする不等交差から生じた父方起源の新たな 17 p 11 . 2 重複に関連するということを示唆している。X 連鎖優性遺伝子シャルコー・マリー・トゥース病 (CMTX) 病はコネキシン 32 (CX32) 遺伝子の変異により引き起こされる運動及び感覚性神経障害である。例えば、Badano (2001) Clin. Chem. 47 (5) : 838 - 843; Potocki (2000) Nat. Genet. 24 (1) : 84 - 87 を参照されたい。

【0131】

遺伝性ニューロパチー (HNPP)

1の側面において、本発明の核酸またはアレイの編集物またはセット、ライプラリーまたは収集物は染色体 17、染色体座 17 p 12 を含むゲノム核酸断片を含み、検出する症候群が圧迫性麻痺の遺伝性ニューロパチー (HNPP) である。HNPP は再発、散発性の脱髓性神経障害を生じる常染色体優性疾患である。また、神経圧迫障害後の感覚運動欠損の改善可能な発作を特徴とする。tomaculous ニューロパチーとしても知られ、HNPP はさらに末梢性ミエリンの複数の病巣肥厚化 (tomacula) による超微形態を特徴とし、常染色体優性遺伝的形質を有する。HNPP は染色体 17 p 11 . 2 - 12 における 1 . 5 - Mb 欠失に関連し、PMP22 遺伝子発現を減少させる。例えば、Mersiyanova (2000) Hum. Mutat. 15 (4) : 340 - 347; Chance (2001) Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am. 12 (2) : 277 - 291; Lane (2001) J. Hand Surg. [Am] 26 (4) : 670 - 674 を参照されたい。

【0132】

ミラー・ディッカー症候群 / 分離 (Isolated) 滑脳症

1の側面において、本発明の核酸またはアレイの編集物またはセット、ライプラリーま

10

20

30

40

50

たは収集物は染色体 17、染色体座 17 p 13 . 3 を含むゲノム核酸断片を含み、検出する症候群がミラー・ディッカー症候群 / 分離 (I s o l a t e d) 滑脳症である。ミラー・ディッカー症候群 (1 型滑脳症) は、染色体 17、染色体座 17 p 13 . 3 の短腕における微小欠損に関連するニューロン移動異常である。例えば、ある患者は 8 p 11 . 2 3 及び 17 p 13 . 3 のブレイクポイントを有する新たな安定転座を有することが見つかった。一方、神経線維腫症 1 型 (N F 1) は染色体 17 の長鎖の変異に関連する常染色体優性状態であり、神経線維腫、カフェオレ斑点及び腋窩レックリングを特徴とする。例えば、 King (2000) Acta Neuropathol. (Berl) 99 (4) : 425 - 427 ; Honda (1998) Brain Dev. 20 (3) : 190 - 192 を参照されたい。

10

【 0133 】

スミス・メイジェニス症候群 (S M S)

1 の側面において、本発明の核酸またはアレイの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物は染色体 17、染色体座 17 p 11 . 2 を含むゲノム核酸断片を含み、検出する症候群がスミス・メイジェニス症候群 (S M S) である。 S M S は臨床的に認識できる症候群であり、複数の先天性異常及び知的障害を含む。その症状は顔面異形、短指症、深刻な知的障害、及び自傷行為などがある。 S M S は染色体座 17 p 11 . 2 、染色体 17 の短腕の微小欠損 (中間部欠失) に関連する。興味深いことに、 del (17) (p 11 . 2 p 12) 核型を有する患者は S M S 及び J o u b e r t 症候群 (J S) の両方の症状を示し、後者は小脳虫部低形成、低血圧症、失調性歩行、発育遅延、及び異常呼吸パターンを特徴とする。 S M S の出生前のケースは顔面形成異常、ファロー四徴症、胸腺遺残 (thymic duct remnant) 、膵島細胞、過形成、異常肺裂 (abnormal lung fissuring) が見つかっている。例えば、 J u y a l (1996) Am. J. Hum. Genet. 58 (5) : 998 - 1007 ; Natacci (2000) Am. J. Med. Genet. 95 (5) : 467 - 472 ; Thomas (2000) Fetal Diagn. Ther. 15 (6) : 335 - 337 を参照されたい。

20

【 0134 】

アラジル症候群 (A G S)

1 の側面において、本発明の核酸またはアレイの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物は染色体 20 、染色体座 20 p 11 . 2 - p 12 を含むゲノム核酸断片を含み、検出する症候群が a r t e r i o h e p a t i c d y s p l a s i a としても知られる、アラジル症候群 (A G S) である。患者は染色体 20 p に最小限の重複領域として染色体座 20 p 11 . 2 3 - p 12 . 2 の欠失を有する。ある A G S ケースは染色体 20 p 12 . 2 p 13 の偏動原体逆位 (P A I) を有した。染色体座 20 p 11 . 2 - p 12 は、分化時の細胞間シグナルにおいて重要な役割を果たす、 Notch 1 膜貫通レセプターのための配位子をエンコードする。例えば、 Yuan (1997) Acta Paediatr. Jpn. 39 (6) : 647 - 652 ; Hol (1995) Hum. Genet. 95 (6) : 687 - 690 を参照されたい。

30

【 0135 】

ディジョージ / V e l o c a r d i o f a c i a l 症候群 (V C F S)

1 の側面において、本発明の核酸またはアレイの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物は染色体 22 、染色体座 22 q 11 . 2 を含むゲノム核酸断片を含み、検出する症候群がディジョージ / V e l o c a r d i o f a c i a l 症候群 (V C F S) である。 V C F S は染色体 22 、染色体座 22 q 11 . 2 上の微小欠失を生じる。 V C F S は複数の先天性形成異常を特徴とする広範な臨床スペクトルに関連し、ディジョージ症候群と重複することが多い口蓋裂及び心臓異常などを含む。評価は、 22 q 11 . 2 欠失は 40 0 0 の生児出生中、約 1 件起こることを示唆している。臨床研究は V C F G を有する子供の 30 % 以上は統合失調症が発展することを示している。また、 V e l o f a c i a l 形成不全 (S e d l a c k o v a 症候群) 及び V e l o c a r d i o f a c i a l (シュブ

40

50

リンツエン) 症候群の両方も d e l 2 2 q 1 1 . 2 に関連する。例えば、E l i e z (2 0 0 1) Am . J . P s y c h i a t r y 1 5 8 (3) : 4 4 7 - 4 5 3 ; F o k s t u e n (2 0 0 1) Eur . J . P e d i a t r . 1 6 0 (1) : 5 4 - 5 7 ; D u k e (2 0 0 0) Arch . O t o l a r y n g o l . Head Neck Surg . 1 2 6 (9) : 1 1 4 1 - 1 1 4 5 を参照されたい。

【 0 1 3 6 】

先天性副腎過形成症 (A H C)

1 の側面において、本発明の核酸またはアレイの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物は染色体 X 、染色体座 X p 2 1 を含むゲノム核酸断片を含み、検出する症候群が先天性副腎過形成症 (A H C) である。 A H C 患者は染色体 X 、染色体座 p 2 1 . 1 ~ p 2 2 . 1 の短腕上に欠失を有する。 A H C はヒト副腎皮質の発達障害であり、染色体座 p 2 1 . 1 ~ p 2 2 . 1 内の D A X - 1 遺伝子の欠失または変異により引き起こされることが提議されている。 D A X - 1 は核ホルモン・レセプター・スーパーファミリーの一種である。 X p 2 1 症候群は副腎機能障害を有するいかななる幼児においても検討すべきである。血清トリグリセリド及びクレアチニーゼ活性の測定、及び核型スクリーニング試験は初期の診断の手助けをする。例えば、P e t e r (1 9 9 8) J . C l i n . E n d o c r i n o l . M e t a b . 8 3 (8) : 2 6 6 6 - 2 6 7 4 ; C o l e (1 9 9 4) C l i n . C h e m . 4 0 (1 1 P t 1) : 2 0 9 9 - 2 1 0 3 及びグリセロールキナーゼ欠損 (G K D) の以下の議論を参照されたい。

10

20

30

40

【 0 1 3 7 】

デュシェンヌ / ベッカー筋ジストロフィー

1 の側面において、本発明の核酸またはアレイの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物は染色体 X 、染色体座 X p 2 1 を含むゲノム核酸断片を含み、検出する症候群がデュシェンヌ / ベッカーリー筋ジストロフィーである。心臓異常、心筋症及び骨格筋衰弱は女性キャリアの X p 2 1 (デュシェンヌ及びベッカーリー) 筋ジストロフィーに記載されている。デュシェンヌ及びベッカーリー筋ジストロフィーは心筋及び骨格筋内のジストロフィン発現の欠如または変化に関連している。これらは心臓肥大及び拡張型心筋症により頻繁に悪化する。例えば、G r a i n (2 0 0 1) Neuromuscul . D i s o r d . 1 1 (2) : 1 8 6 - 1 9 1 ; C r i l l e y (2 0 0 0) J . A m . C o l l . C a r d i o l . 1 3 6 (6) : 1 9 5 3 - 1 9 5 8 及び以下のグリセロールキナーゼ欠損 (G K D) についての議論を参照されたい。

30

【 0 1 3 8 】

グリセロールキナーゼ欠損症 (G K D)

1 の側面において、本発明の核酸またはアレイの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物は染色体 X 、染色体座 X p 2 1 を含むゲノム核酸断片を含み、検出する症候群がグリセロールキナーゼ欠損症 (G K D) である。グリセロールキナーゼ欠損症 (G K D) は X 染色体、染色体座 p 2 1 . 1 ~ p 2 2 . 1 の短腕上に欠失を有する X 連鎖劣勢障害である。2種類のタイプがあり、単独型と複合型がある。単独 G K D の臨床及び生化学的表現型は命を脅かす幼児期代謝の危険から h y p e r g l y c e r o l a e m i a を生じる無症候性成人型 ‘ p s e u d o h y p e r t r i g l y c e r i d a e m i a ’ まで様々である。複合型 G K D はグリセロールキナーゼ染色体座と一緒に先天性副腎過形成症 (A H C) またはデュシェンヌ筋ジストロフィー (D M D) 染色体座または両方を含む X p 2 1隣接遺伝子症候群である。複合型 G K D 患者は顔面中央がくびれた外観；隔離症；丸い瞼裂；内斜視；広く平らな耳たぶ；及び両端が下を向いた口を有する。例えば、S j a r i f (2 0 0 0) J . I n h e r i t . M e t a b . D i s . 2 3 (6) : 5 2 9 - 5 4 7 ; S c h e u e r l e (1 9 9 5) J . P e d i a t r . 1 2 6 (5 P t 1) : 7 6 4 - 7 6 7 を参照されたい。

40

【 0 1 3 9 】

ペリツェウス・メルツバッハ病 (P M D)

1 の側面において、本発明の核酸またはアレイの編集物またはセット、ライブラリーま

50

たは収集物は染色体X、染色体座X p 2 2を含むゲノム核酸断片を含み、検出する症候群がペリツェウス・メルツバッハ病(PMD)である。PMDは中枢神経系のX連鎖劣勢髓鞘形成障害である。ほとんどの患者はプロテオリピドタンパク質(PLP1)遺伝子のエキソン内に点変異を有し、またはX染色体の短腕上、染色体座X p 2 2上のPLP1遺伝子を含むゲノム領域の重複を有する。例えば、Hobson(2001)Hum. Mutat. 17(2):152; Hodes(2000)Am. J. Hum. Genet. 67(1):14-22; Inoue(1999)Ann. Neurol. 45(5):624-632を参照されたい。

【0140】

ステロイドスルファターゼ欠損症

10

1の側面において、本発明の核酸またはアレイの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物は染色体X、染色体座X p 2 2 . 3を含むゲノム核酸断片を含み、検出する症候群がステロイドスルファターゼ欠損症である。X p 2 2 . 3領域内のX染色体の欠失はステロイドスルファターゼ欠損症及びX染色体性魚鱗癬症を生じる。ある患者は、X p 2 2 . 3の中間部欠失によりカールマン(KAL)遺伝子、ステロイドスルファターゼ(STS)遺伝子及び推定上の知的障害遺伝子座(MRX)を伴った。X染色体性魚鱗癬症(XLI)はステロイドスルファターゼ(STS)欠損に起因する代謝の先天異常である。X染色体性魚鱗癬症は大きな、付着性、暗褐色うろこ状の全身性落屑を特徴とする異常角質化である。別の皮膚症状は角膜混濁及び停留睾丸などがある。例えば、Weissortel(1998)Clin. Genet. 54(1):45-51; Santolaya-Forgas(1997)Fetal Diagn. Ther. 12(1):36-39; Valdés-Flores(2001)Am. J. Med. Genet. 102(2):146-148を参照されたい。

20

【0141】

SRY遺伝子座異常

30

1の側面において、本発明の核酸またはアレイの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物は染色体Y、染色体座SRY染色体座/Ypを含むゲノム核酸断片を含み、検出する症候群がSRY(Y染色体上の性決定領域)遺伝子座異常である。SRYは通常のXY男性及びXY性器発育異常症を有する女性においてバンドYp11.31p11.32で同定されている。SRYシグナルはあるXX男性においてもXp22上で同定されている。ウルリッヒ-ターナー症候群(UTS)はY断片及び性腺芽腫(gonadoblastomas)に関連する。従って、UTS患者はY染色体物質を検査すべきであり、陽性的ケースは悪性腫瘍の危険性が高いので彼らの劣性の性腺を摘出すべきと提言している臨床医学者もいる。例えば、Kadandale(2000)Am. J. Med. Genet. 95(1):71-74; Damiani(1999)J. Pediatr. Endocrinol. Metab. 12(6):827-831; Kadandale(2000)Microb. Comp. Genomics 5(2):71-74を参照されたい。

40

【0142】

逆性(Sex Reversal)(DSS)

1の側面において、本発明の核酸またはアレイの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物は染色体X、染色体座X p 2 1を含むゲノム核酸断片を含み、検出する症候群が逆性(DSS)である。染色体座X p 2 1は遺伝子A h c hを含み、Dax1としても知られる。A h c hは性決定及び性器の区別に関する転写調節因子をエンコードする。ヒトAHCにおける変異はX連鎖、先天性副腎過形成症(AHC)及び低ゴナドトロピン性機能低下症(HH)を引き起す。研究により逆性の患者はXp重複が見つかり、YpまたはSRY遺伝子が無傷であるにもかかわらず、女性または外性器異常が起つた。5つの異なる転換について2以上記載されている:(X;Y)(p21;q11)、t(X;Y)(p22;p11)、t(X;Y)(p22;q11-12)、t(X;Y)(q22;q12)、及びt(X;Y)(q28;q12)。例えば、Yu(1998)N

50

a t . G e n e t . 2 0 (4) : 3 5 3 - 7 ; V a s q u e z (1 9 9 9) G e n e t . C o u n s . 1 0 (3) : 3 0 1 - 3 3 4 を参照されたい。

【 0 1 4 3 】

カールマン病またはカールマン症候群 (K S)

1 の側面において、本発明の核酸またはアレイの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物は染色体 X 、染色体座 X p 2 2 . 3 を含むゲノム核酸断片を含み、検出する症候群がカールマン病またはカールマン症候群 (K S) である。 K S は無臭覚または臭覚障害に関連する高ゴナドトロピン性腺機能低下症を特徴とする。 K S は X p 2 2 . 3 領域の遺伝的欠損を含む隣接遺伝子症候群における X 染色体性魚鱗癬症 (X L I) に関連する。また、 K S は嗅覚神経芽細胞腫にも関連する。例えば、 M a y a - N u n e z (1 9 9 9) C l i n . E n d o c r i n o l . (O x f) 5 0 (2) : 1 5 7 - 1 6 2 ; Z a p p i a (1 9 9 2) J . O t o l a r y n g o l . 2 1 (1) : 1 6 - 1 9 を参照されたい。
。

【 0 1 4 4 】

1 7 p 1 1 . 2 重複症候群及び B i r t - H o g g - D u b e 症候群 (B H D)

1 の側面において、本発明の核酸またはアレイの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物は染色体 1 7 、染色体座 1 7 p 1 1 . 2 を含むゲノム核酸断片を含み、検出する症候群が 1 7 p 1 1 . 2 重複症候群である。染色体座 1 7 p 1 1 . 2 の重複は B i r t - H o g g - D u b e 症候群 (B H D) を伴い、常染色体優性組織形成症候群は主に良性皮膚腫瘍 (例えば、毛囊の良性腫瘍) を特徴とし、より少ない程度ではあるが、腎腫瘍、肺囊胞及び自然気胸を特徴とする。 B H D の遺伝子は腎臓腫瘍及び肺と毛囊発育障害に関連する。例えば、 S c h m i d t (2 0 0 1) A m . J . H u m . G e n e t . 6 9 (4) : 8 7 6 - 8 2 ; K h o o (2 0 0 1) O n c o g e n e 2 0 (3 7) : 5 2 3 9 - 5 2 4 2 を参照されたい。
。

【 0 1 4 5 】

スミス・メイジエニス症候群 (S M S)

1 の側面において、本発明の核酸またはアレイの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物は染色体 1 7 、染色体座 1 7 p 1 1 . 2 を含むゲノム核酸断片を含み、検出する症候群がスミス・メイジエニス症候群 (S M S) である。 S M S は染色体 1 7 p 1 1 . 2 の中間部欠失による臨床的に承認された隣接遺伝子症候群である。 S M S 患者は臨床的に承認された複数の先天性異常及び知的障害を有し、自傷行為、かんしゃく、及び睡眠障害などを有する。 S M S 患者は 2 4 時間周期のリズムの位相シフトを有し、逆転した日中ホルモン分泌を有する。例えば、 D e L e e r s n y d e r (2 0 0 1) J . M e d . G e n e t . 3 8 (9) : 5 8 6 - 5 9 0 ; D e L e e r s n y d e r (2 0 0 1) J . P e d i a t r . 1 3 9 (1) : 1 1 1 - 1 1 6 ; S m i t h (1 9 9 8) A m . J . M e d . G e n e t . 8 1 (2) : 1 8 6 - 1 9 1 を参照されたい。
。

【 0 1 4 6 】

特発性てんかん (i d i o p a t h i c e p i l e p s y) 及び発作性ジスキネジア (p a r o x y s m a l d y s k i n e s i a)

1 の側面において、本発明の核酸またはアレイの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物は染色体 1 6 、ペリセントロメリックな (p e r i c e n t r o m e r i c) 領域を含むゲノム核酸断片を含み、検出する症候群が特発性てんかん及び発作性ジスキネジアである。これは常染色体優性乳児けいれん及び発作性 (ジストニー) 舞踏病アテトーゼの同種の症候群である。本発明のアレイ及び方法の使用はてんかん及び発作性ジスキネジアの運動発現が臨床上区別することが難しいので特に有用である。例えば、 G u e r r i n i (2 0 0 1) E p i l e p s i a 4 2 S u p p l 3 : 3 6 - 4 1 を参照されたい。
。

【 0 1 4 7 】

ヒルシュスブルング (H i r s c h s p r u n g) 病 2 型及びワルデンブルグ (W a a r d e n b u r g) 症候群

10

20

30

40

50

1の側面において、本発明の核酸またはアレイの編集物またはセット、ライプラリーまたは収集物は染色体13、染色体座13q22を含むゲノム核酸断片を含み、検出する症候群がヒルシュスブルング病2型を含むヒルシュスブルング病及びワルデンブルグ症候群である。ヒルシュスブルング病は、種々の長さの胃腸部分に沿った神経堤から腸神経の頭尾移動を阻む発育不全である。ワルデンブルグ・シャー症候群は聽覚色素異常である。ヒルシュスブルング病、腸回転異常、等色性、激しい感音難聴、及びその他のいくつかの異常は13qの中間部欠失を有する幼児に見られる。例えば、Shanske(2001)Am.J.Med.Genet.102(3):231-236を参照されたい。

【0148】

鰓弓耳腎(Branchio-oto-renal)(BOR)症候群

10

1の側面において、本発明の核酸またはアレイの編集物またはセット、ライプラリーまたは収集物は染色体8、染色体座8p13.3を含むゲノム核酸断片を含み、検出する症候群が鰓弓耳腎(Branchio-oto-renal)(BOR)症候群である。鰓弓耳腎(BOR)症候群は難聴、鰓欠損、耳孔及び腎臓異常を伴う常染色体優性異常である。本発明のアレイ及び方法は該症候群を、BOR症候群と臨床上類似しており、BOR症候群の特徴に加えて臨床的特長を有するoto-facio-cervical(OFC)症候群から区別するために用いることができる。例えば、Rickard(2001)Hum.Genet.108(5):398-403を参照されたい。

【0149】

スミス・メイジエニス症候群(SMS)

20

1の側面において、本発明の核酸またはアレイの編集物またはセット、ライプラリーまたは収集物は染色体1、染色体座7p11.2を含むゲノム核酸断片を含み、検出する症候群がスミス・メイジエニス症候群(SMS)である。スミス・メイジエニス症候群(SMS)は隣接遺伝子欠失症候群に関連する複数の先天異常/知的障害(MCA/MR)症候群であり、発生率が生児出生の1:25,000と評価されている染色体1、染色体座17p11.2を含む。SMSは特異な身体、行動及び発育パターンを特徴とする。主な臨床兆候は短頭(brachycephaly)の扁平な顔面中央、広い鼻梁、短指症(brachydactily)、言語遅延、しゃがれた太い声、及び末梢神経障害からなる。例えば、Di Cicco(2001)Int.J.Pediatr.Otorhinolaryngol.59(2):147-150を参照されたい。

30

【0150】

Leri-Weill症候群

1の側面において、本発明の核酸またはアレイの編集物またはセット、ライプラリーまたは収集物は染色体X、染色体座Xp22.3を含むゲノム核酸断片を含み、検出する症候群がLeri-Weill症候群である。Leri-Weill症候群は小人症(SHOX)、点状軟骨異形成(ARSE)、双方の橈骨の湾曲、及び知的障害を特徴とする。例えば、Spranger(1999)Am.J.Med.Genet.83(5):367-371を参照されたい。

40

【0151】

染色体異常は一般的に、先天性形成異常及び自然流産を引き起こす。これらは構造異常、倍数性、トリソミー及びモザイクを含む。常染色体のトリソミーはほとんど生き延びることができず、3つの最も一般的な常染色体トリソミーは染色体13、18及び21であり、それぞれパトー(Patau)、エドワード(Edward's)及びダウン(Down's)症候群を生じる(例えば、Moore(2000)Eur.J.Hum.Genet.8:223-228を参照)。従って、別の側面において、本発明のアレイ及び方法はパトー症候群、エドワード症候群及びダウン症候群の診断に用いられる。例えば、Djalali(2000)Prenat.Diagn.20:934-935を参照されたい。表1は、本発明の核酸、アレイ及び方法の編集物またはセット、ライプラリーまたは収集物により診断できる典型的な隣接遺伝子症候群を要約して説明するものである:

【表1】

表1: 隣接遺伝子症候群の染色体座プロファイル

染色体番号	遺伝子座	症候群
1	1p36	1p 欠失症候群
3	3p25·pter	3p 欠失症候群
3	3p21·pter	3p 重複症候群
4	4p16.3	ウォルフ・ヒルシュホーン症候群
4	4p15.2-16.1	4p 重複症候群
5	5p15.2·pter	ネコなき (Cri du Chat) 症候群
7	7p13.3	ミラー・ディッカー症候群
7	7p11.23	ウィリアムズ症候群
8	8q24.1	ランガーギデオン症候群 (LGS)
8	8q24.1	毛髪鼻指節骨症候群 (TRPS)
9	9p, 通常 9p22·pter	9p 欠失症候群
10	10p13p14	ディジョージ症候群II
11	11p13	WAGR 症候群
11	11p15.5	ベックウィズ・ヴィードマン症候群
11	11p11.2	Potocki-Shaffer 症候群 (多発性外骨腫性II Locus)
15	15q12	アンジェルマン症候群
15	15q12	プラダー・ウイリー症候群
16	末端 16p13.3	ルビンスタイン・ティビ症候群
17	17p12	シャルコー・マリー・トゥース病 1A 型 (CMT-1A)
17	17p12	圧迫性麻痺の遺伝性ニューロバチー
17	17p13.3	ミラー・ディッカー症候群/分離 (Isolated) 滑脳症
17	17p11.2	スミス・メイジェニス症候群
20	20p11.2p12	アラジル症候群
22	22q11.2(1·p13p14 も参照)	ディジョージ/Velocardiofacial 症候群
X	Xp21	先天性副腎過形成症 (AHC)
X	Xp21	デュシェンヌ/ベッカーフィストロフィー
X	Xp21	グリセロールキナーゼ欠損症
X	Xp22	ペリツェウス・メルツバッハ病
X	Xp22.3	ステロイドスルファターゼ欠損症
Y	SRY 遺伝子座/Yp	SRY 位置異常

10

20

30

40

50

【0152】

本発明の核酸、アレイ及び方法の編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物は新生児非培養血液サンプルから得たゲノムDNA由来染色体13、18、21、X、及びYの異数性を検出するために用いることができる（例えば、Jalail (1997) Mayo Clin. Proc. 72: 705-710を参照されたい）。染色体異常は妊娠9-11週の絨毛膜サンプルにより調査して生育可能な妊娠が約1%~2%であることが報告されている。例えば、Harrison (1993) Hum. Genet. 92: 353-358を参照されたい。

【0153】

体外受精（IVF）プログラムにおいて、卵細胞及び胚の着床前遺伝子診断（PGD）は胚移植前の異常胚に備えた選択をする技術となっている。従って、別の側面において、本発明の核酸、アレイ及び方法の編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物は着床前遺伝子診断及び卵細胞及び胚中の染色体異常及び構造異常の診断に用いられる。例えば、Fung (2001) J. Histochem. Cytochem. 49: 797-798を参照されたい。従って、別の側面において、本発明の核酸、アレイ及び方法の編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物は絨毛膜サンプリング（CVS）及び胎児の染色体分析に用いられる。例えば、Sanz (2001) Fetal Diagn. Ther. 16: 95-97を参照されたい。

【0154】

遺伝的欠損は受精卵前核マイクロインジェクションにより作ったトランスジェニック動物の間では多い。創始動物の交配前の染色体異常のスクリーニングの成功した方法はトランスジェニック株の増殖に関する費用を大幅に減少させ、トランスジェニック家畜生産の効率を向上させるものである。従って、別の側面において、本発明の核酸、アレイ及び方法の編集物またはセット、ライプラリーまたは収集物はトランスジェニック動物の生産、特に交配前の遺伝的欠損に関する創始動物のスクリーニングに用いられる。例えば、Ibanez (2001) Mol. Reprod. Dev. 58 : 166 - 172 を参照されたい。

【0155】

コンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーション (CGH)

1の側面において、本発明の核酸、アレイ及び方法の編集物またはセット、ライプラリーまたは収集物は、組織（例えば生検または血液サンプル）などの細胞集団中の染色体異常、例えば隣接遺伝子異常を検出するために、アレイベースのコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーション (CGH) 反応を含む。CGHは、例えば配列またはコピー数の増減など、定量的变化を受けるゲノム内の領域を検出するために用いることができる分子細胞遺伝学手法である。腫瘍細胞のゲノム分析は変則的に増減を受けた領域を検出できる。

【0156】

CGH反応は試験遺伝子組成物と対照サンプルとを比較する；例えば、ゲノムDNAの試験サンプル（例えば、異なるまたは蓄積した遺伝子的欠陥を含む1以上の小集団を有すると疑われる細胞集団由来のもの）が例えば、“通常”または“野生型”遺伝子型の“陰性”対照、または例えば、公知の癌細胞または公知の欠陥、例えば転位または欠失または増幅等を含む細胞などの“陽性”対照と比較して、増幅、または欠失または変異断片を含むかどうかを比較する。

【0157】

本発明の核酸、アレイの編集物またはセット、ライプラリーまたは収集物の製造及び使用及び本発明の方法の実施はコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーションを実施するためのあらゆる公知の方法及び手段及びそれらの変形を含むことができ、例えば、米国特許第6,197,501号；第6,159,685号；第5,976,790号；第5,965,362号；第5,856,097号；第5,830,645号；第5,721,098号；第5,665,549号；第5,635,351号；及びDiagno (2001) American J. of Pathol. May ; 158 (5) : 1623 - 1631 ; Theillet (2001) Bull. Cancer 88 : 261 - 268 ; Werner (2001) Pharmacogenomics 2:25-36 ; Jain (2000) Pharmacogenomics 1 : 289 - 307 を参考されたい。

【0158】

アレイまたは“バイオチップ”

本発明はアレイなどの工業製品を提供し、本発明の核酸の編集物またはセット、ライプラリーまたは収集物を含む。本発明の核酸、アレイの編集物またはセット、ライプラリーまたは収集物の製造及び使用、及び本発明の方法の実施は“マイクロアレイ”または“DNAアレイ”または“核酸アレイ”または“バイオチップ”とも呼ばれる公知の“アレイ”またはそれらの変形を含む。アレイは多数の“標的要素”または“スポット”を総称したものであり、各要素は例えば、基質表面上の所定の位置に固定化されたポリペプチド、核酸分子またはプローブなどの1以上の生体分子を所定量含む。通常、固定化生体分子は特異結合のためにサンプルと接触させ、例えば、サンプル中の分子とアレイ間のハイブリダイゼーションである。固定化核酸は、ヒトゲノムなどの例えば、実質的に染色体全部または小部分または実質的にゲノム全部を含む、特異メッセージ (specific messages) (例えば、cDNAライプラリー) 由来または遺伝子 (例えば、ゲノム

10

20

30

40

50

ライブラリー)由来の配列を含むことができる。その他の標的要素は、陽性及び陰性対照等の参照配列を含むことができる。アレイの標的要素は種々のサイズ及び種々の密度で基質表面上に配置できる。様々なアレイの標的要素は異なる量、密度、サイズ、標識または非標識で同じ分子種を含むことをできる。標的要素サイズ及び密度は、標識の性質(固定化分子も標識できる)、基質担体(固体、半固体、纖維質、キャピラリーまたは多孔性)等の多数の要因に依存する。各標的要素は実質的に同じ核酸配列、または異なる長さ及び/または異なる配列の核酸の混合物を含んでもよい。従って、ここに記載するように例えば、標的要素は1以上のDNAクローン断片を含んでもよく、各コピーは異なる長さの断片にバラバラにされてもよい。アレイ表面上に固定された核酸の長さ及び複合性は本発明にとって重要ではない。アレイは任意の基質、例えば固体表面(例えば、ニトロセルロース、ガラス、石英、石英ガラス、プラスティック等)上に固定化された核酸を含むことができる。例えば、蛍光を測定する場合のシクロオレフィンポリマーを含むマルチウェル・プラットフォームについて記載する米国特許第6,063,338号を参照されたい。本発明の方法で使用されるアレイは、ハイブリダイゼーション及び洗浄反応時に湿度及び温度を制御するための部品を含むハウジングを含むことができる。

【0159】

本発明の核酸、アレイの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物の製造及び使用、及び本発明の方法の実施において、公知のアレイ及びアレイを製造、使用する方法は、例えば、米国特許第6,277,628号；第6,277,489号；第6,261,776号；第6,258,606号；第6,054,270号；第6,048,695号；第6,045,996号；第6,022,963号；第6,013,440号；第5,965,452号；第5,959,098号；第5,856,174号；第5,830,645号；第5,770,456号；第5,632,957号；第5,556,752号；第5,143,854号；第5,807,522号；第5,800,992号；第5,744,305号；第5,700,637号；第5,556,752号；第5,434,049号；に記載されている全体または一部またはそれらの変形を含むことができ、また例えば、WO99/51773；WO99/09217；WO97/46313；WO96/17958；Johnston(1998)Curr.Biol.8:R171-R174；Schummer(1997)Biotechniques23:1087-1092；Kern(1997)Biotechniques23:120-124；Solinas-Toldo(1997)Genes,Chromosomes&Cancer20:399-407；Bowntell(1999)NatureGeneticsSupp.21:25-32も参照されたい。また、公開された米国特許出願番号第20010018642号；第20010018927号；第20010016322号；第20010014449号；第20010014448号；第20010012537号；第20010008765号を参照されたい。本発明は任意の公知アレイを用いることができ、例えば、GeneChips(商標)、Affymetrix、SantaClara、CA(アフィメトリックス、サンタクララ、カリフォルニア州)；SpectralChip(商標)マウスBACアレイ、SpectralChip(商標)ヒトBACアレイ及びSpectral GenomicsのCustom Arrays、ヒューストン、テキサス及びそれら製造元の添付取扱説明書である。

【0160】

他の実施態様において、本発明の核酸の編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物及びアレイなどの本発明の工業製品は、以下の表2に示すヒトゲノム核酸断片を1、または数個または全部含むことができる(全24ヒト染色体由来の2474のクローンのリスト及び24の全ヒト染色体を表す)。これらのクローンはRPIまたはCTBクローン名を有し、これらのクローンの記載はNature409:953-958(2001)、“Integration of cytogenetic landmarks into the draft sequence of the human genome(ヒトゲノムのドラフト配列への細胞遺伝学的目印の組込み)”BACリソース・

コンソーシアムにある。表2右側欄の数はクローン核酸断片の糸尺を示し、メガ塩基（M b）である。これらのクローンは約1 M b分解能における全24ヒト染色体を表す。

【表2】

表2

クローンID	染色体	線形
RP11-421C4	1	0.7
RP1-283E3	1	0.9
RP4-703E10	1	2.4
RP1-163G9	1	2.8
RP11-447M5	1	4.4
RP3-491M17	1	4.7

RP11-33M12	1	5.4	
RP3-438L4	1	6.4	
RP3-330O12	1	8.2	
RP4-633I8	1	9.1	
RP11-476D13	1	9.6	
AL358492.9	1	10.9	
RP5-888M10	1	12	
RP11-219C24	1	12.4	
RP4-726F20	1	13.8	
RP5-864I18	1	14.6	
RP11-169K16	1	15.7	
RP1-163M9	1	16.4	10
RP1-37C10	1	17.2	
RP11-79D15	1	18	
RP1-8B22	1	18.8	
RP11-91K11	1	20.1	
RP3-340N1	1	20.5	
RP5-886K2	1	24.4	
RP3-462O23	1	25.2	
RP3-465N24	1	26	
RP1-125I3	1	26.6	
RP11-261P19	1	27.8	
RP1-50O24	1	29	
RP1-212P9	1	29.7	
RP3-437I16	1	30.1	
RP5-893G23	1	31.2	20
RP4-655C4	1	33.3	
AL033524.11	1	34.1	
RP3-423B22	1	35.5	
RP1-93K19	1	36.2	
RP1-117O3	1	37.9	
RP5-1007G16	1	38.6	
RP1-34M23	1	39.5	
RP4-811I8	1	40.6	
AL512599	1	41.7	
RP1-92O14	1	44.4	
RP5-1029K14	1	45.3	
RP11-319C21	1	46.1	
RP5-820O16	1	47.2	30
RP4-639P2	1	48.2	
RP11-112C15	1	48.9	
RP5-965L7	1	50.3	
RP11-116M11	1	51.5	
RP5-1013G21	1	52.1	
RP11-253A20	1	52.4	
RP4-814E15	1	53.4	
RP5-1024N4	1	55.5	
RP11-13N22	1	56.5	
RP11-79A13	1	57.1	
RP11-89O16	1	57.7	
RP4-737A23	1	58.6	
RP11-63G10	1	59.5	
RP11-89D5	1	61.3	40
RP3-333A15	1	62.4	
RP4-685B19	1	63.3	

RP11-79O23	1	64
RP11-205P11	1	65.3
RP5-879H24	1	66.8
RP4-542O18	1	67.3
RP11-221L2	1	67.9
RP6-65F20	1	68.9
RP4-662P1	1	69.7
RP11-5P4	1	71.4
RP4-534K7	1	71.9
RP4-537F10	1	72.3
RP11-75N16	1	73.4
RP11-26A10	1	74.7
RP11-131O15	1	75.7
RP11-89K2	1	76.9
RP11-88B10	1	78
RP11-492C3	1	79.5
RP4-595K12	1	79.7
RP5-1153M13	1	80.8
RP11-80G24	1	81.7
RP5-831O21	1	82.8
RP4-572F19	1	83.6
RP5-989D17	1	84.8
RP11-79I13	1	85.7
RP4-612J11	1	86
RP4-601K24	1	86.9
RP5-896C23	1	88
RP11-78E18	1	88.2
RP4-552O12	1	89.1
RP11-193H16	1	90.7
AL122002.16	1	91.7
RP5-1027O11	1	92.9
RP5-905H16	1	93.8
RP5-1007M22	1	94.5
RP5-871E2	1	95
RP11-99A8	1	95.6
RP11-47K11	1	96.5
RP11-79M15	1	98.2
RP11-163M2	1	98.9
RP4-713B5	1	99.7
RP11-148B18	1	100.9
RP11-48A6	1	101.7
RP11-335D10	1	102
RP11-122C9	1	103.2
RP4-672J20	1	104.5
RP11-79C3	1	105
RP11-90N15	1	105.4
RP11-411H5	1	108.5
RP11-79H19	1	109
RP11-259N12	1	110.5
RP4-669H10	1	113
RP5-1077K16	1	113.8
RP11-96F24	1	114.6
RP11-180N18	1	117.6
RP5-1125M8	1	118.9
RP4-773A18	1	119.2

10

20

30

40

RP4-580L15	1	120.3	
RP5-1156J9	1	122.1	
RP11-90J3	1	124	
RP11-88D6	1	124.2	
RP11-315I20	1	126.1	
RP4-599G15	1	128.4	
RP4-787H6	1	130.5	
RP11-433J22	1	149.1	
RP11-458I7	1	149.9	
RP4-790G17	1	150.3	
RP11-71L20	1	151.6	
RP11-81P11	1	153.1	10
RP1-148L21	1	153.8	
RP11-137P24	1	154.6	
RP11-77I10	1	161	
RP11-80F2	1	162.4	
RP11-260G23	1	163.2	
RP11-90A11	1	164.6	
RP11-80B20	1	165	
RP11-80D6	1	166.4	
RP1-9E21	1	167.9	
RP11-354K16	1	169.4	
Z99572.1	1	170.8	
RP11-81H19	1	172	
RP11-89P2	1	173.2	20
RP11-79E17	1	174.4	
RP11-469I6	1	175.5	
RP1-105D12	1	175.8	
RP3-395P12	1	176.4	
RP11-415M14	1	178.2	
RP11-91K17	1	179	
RP11-90C19	1	179.5	
RP4-593C16	1	180.7	
AL022171	1	182.3	
RP11-12M5	1	183.3	
RP11-375F5	1	184.2	
RP11-46A10	1	184.6	
RP11-98G7	1	185	30
RP11-317P15	1	186	
RP11-452O22	1	187.7	
RP11-63O2	1	188.7	
RP1-53A19	1	189.7	
RP11-79I7	1	190.3	
RP4-799N4	1	191.8	
RP11-71C11	1	192.9	
RP11-91N1	1	193	
RP11-113I24	1	194.4	
RP3-419C19	1	197.7	
RP11-101E13	1	197.9	
RP11-358A9	1	198.8	
RP11-173E24	1	201.4	40
RP11-88D12	1	201.7	
RP11-91G12	1	202.5	
RP11-88N22	1	204.3	
RP11-80N24	1	205.1	

AF190464.1	1	207	
RP11-150L7	1	208.1	
RP11-335O13	1	209.2	
RP11-80N9	1	210.4	
RP11-243M13	1	211.2	
RP11-246J15	1	212.1	
RP11-35C1	1	214.1	
RP11-45F21	1	214.5	
RP11-79M12	1	216.3	
RP11-89N3	1	217	
RP11-90A5	1	219.9	
RP11-91G6	1	220.1	10
RP11-79H5	1	223.4	
RP11-260A10	1	224.6	
RP11-66M7	1	224.7	
RP11-135J2	1	226.9	
RP11-553F10	1	227.6	
RP11-124J24	1	228.5	
RP11-239E10	1	231.6	
RP5-1090A23	1	232.2	
RP11-543G21	1	232.7	
RP11-275O4	1	234.5	
RP5-915N17	1	235.4	
RP11-108F13	1	236.5	
RP11-543E8	1	237.6	20
RP5-865N13	1	238.9	
RP5-1016N21	1	240.2	
RP5-885P2	1	240.9	
RP4-781K5	1	241.8	
RP4-670F13	1	243.8	
RP11-80P14	1	245.4	
RP11-136B18	1	245.6	
RP11-90L13	1	247	
RP11-81J5	1	247.8	
AL365366.19	1	249.3	
RP11-28E22	1	250.4	
RP1-241M7	1	251.9	
RP11-152M6	1	252.5	30
RP11-656O22	1	252.7	
RP11-88H4	1	254.4	
RP11-91C5	1	254.5	
RP11-407H12	1	256.1	
RP11-438F14	1	256.1	
RP11-1N7	2	0.1	
RP11-90H11	2	1.6	
RP11-352J11	2	1.7	
AC011995.8	2	2.2	
RP11-457A20	2	2.6	
RP11-36C8	2	2.9	
RP11-513H7	2	4	
RP11-350H23	2	4.9	40
AC007464.4	2	7.2	
RP11-327F6	2	8	
RP11-484O9	2	10.9	
RP11-91E9	2	12.8	

RP11-282G6	2	15.6	
RP11-79E20	2	16.6	
RP11-80H16	2	19.9	
RP11-414D15	2	22.9	
RP11-443B20	2	24.2	
RP11-91I23	2	24.9	
RP11-88F6	2	25.9	
RP11-45M3	2	26.8	
AC024386.5	2	27.8	
RP11-328L16	2	28.7	
RP11-62F14	2	30	
RP11-93O2	2	31.1	10
RP11-444D15	2	31.2	
RP11-3J7	2	32.4	
RP11-77G15	2	34	
RP11-119B15	2	35.7	
RP11-89F19	2	38.3	
RP11-555N21	2	39	
RP11-299C5	2	42.5	
RP11-119J12	2	44.3	
AC084265.2	2	45.9	
RP11-130P22	2	46.5	
RP11-436K12	2	47.9	
RP11-89G16	2	49.7	
AC016714.5	2	53.9	20
RP11-321E13	2	56.2	
RP11-494H5	2	56.8	
RP11-482H16	2	57.4	
RP11-81L7	2	58	
RP11-90D1	2	60.2	
RP11-81L13	2	61.3	
RP11-79K21	2	62.1	
RP11-355B11	2	62.7	
RP11-240J3	2	64.9	
RP11-90B13	2	65.7	
RP11-88F20	2	66.2	
RP11-79H11	2	66.6	
RP11-340F16	2	67.3	30
RP11-474G23	2	68.1	
RP11-179G23	2	69.5	
RP11-401N16	2	70.7	
RP11-175A7	2	71.5	
RP11-356H17	2	72.4	
AC013408	2	73.9	
AC007681.3	2	76	
AC016758	2	78.1	
RP11-91F23	2	78.3	
RP11-79C11	2	79.2	
RP11-79D19	2	80.1	
RP11-79O3	2	81.4	
RP11-89C12	2	82.7	40
RP11-345F13	2	84.3	
RP11-451C8	2	84.6	
RP11-4C8	2	87.1	
RP11-90C7	2	87.6	

RP11-21P18	2	88.4	
RP11-554H10	2	88.7	
RP11-81F3	2	91.9	
AC013270.5	2	92.5	
RP11-89J19	2	93	
RP11-629A22	2	94	
RP11-38C17	2	94.8	
RP11-89L1	2	95.5	
RP11-90J9	2	96.3	
RP11-315O22	2	101	
RP11-83A12	2	101.3	10
RP11-289J14	2	101.9	
RP11-89O22	2	102.6	
RP11-90O9	2	103	
RP11-88F14	2	103.8	
RP11-89O10	2	104.1	
AC010978.7	2	104.6	
RP11-464P18	2	105.4	
RP11-79K7	2	106.4	
AC092645.1	2	109.2	
RP11-368K23	2	110.3	
RP11-91C22	2	111.3	
RP11-89L12	2	112.3	
RP11-98C1	2	113.8	
RP11-434I13	2	114.4	20
RP11-17N4	2	116.6	
RP11-438O12	2	117.6	
RP11-90K23	2	118.5	
RP11-498O20	2	119.5	
RP11-91G8	2	121.7	
RP11-270M20	2	122.2	
RP11-67G15	2	123.8	
RP11-140B20	2	124.4	
RP11-88B6	2	125.5	
RP11-81H7	2	125.9	
RP11-32C20	2	126.9	
RP11-91K13	2	127.1	
RP11-89B17	2	128.2	30
RP11-294I11	2	128.8	
AC097499.2	2	129.8	
RP11-467A23	2	130.8	
RP11-289K3	2	131.8	
RP11-81H1	2	132.9	
AC010873.12	2	133.8	
RP11-119N3	2	133.9	
RP11-472M4	2	134.6	
RP11-231E19	2	134.9	
RP11-91C20	2	136.2	
RP11-434H14	2	137.9	
AC009957.10	2	138.2	
RP11-67J2	2	138.9	40
RP11-357J9	2	139	
RP11-29N17	2	141.8	
RP11-90K5	2	143.6	
AC018465.7	2	144.9	

RP11-375H16	2	145.3	
RP11-91A11	2	147.6	
RP11-79A11	2	149	
RP11-364H22	2	149.6	
RP11-185M22	2	150.6	
RP11-17E6	2	151.4	
RP11-11C17	2	152.4	
RP11-44N6	2	153.4	
RP11-79B5	2	154.1	
RP11-546J1	2	157.1	
RP11-91K6	2	158.4	
RP11-50J20	2	159.1	
RP11-615B17	2	159.3	10
RP11-79L13	2	161	
AC010876	2	161.5	
AC092632.1	2	162.1	
AC016723.10	2	165.9	
RP11-79E23	2	167.2	
RP11-91O10	2	167.8	
RP11-80D14	2	170	
RP11-81F17	2	170.1	
RP11-91L3	2	170.8	
RP11-79D11	2	171.8	
RP11-91L23	2	172.2	
RP11-91A9	2	172.3	
RP11-79C17	2	172.6	
AC013467.8	2	173.4	
RP11-12N7	2	174.5	
RP11-279N12	2	176.2	
RP11-428I14	2	177.1	
RP11-88L24	2	178.1	
RP11-30N9	2	179.4	
RP11-131G20	2	179.8	
RP11-69G4	2	181.5	
RP11-598C21	2	182.4	
AC074182.6	2	183	
RP11-270G18	2	188.5	
RP11-88L20	2	188.6	30
AC046197	2	189.8	
RP11-192M8	2	190.4	
RP11-59L22	2	191.1	
RP11-30M1	2	193.5	
RP11-90C17	2	194.1	
RP11-387H5	2	195.4	
RP11-89B13	2	195.7	
RP11-2C13	2	197	
AC020718.6	2	198.3	
RP11-91M5	2	200.4	
RP11-329O10	2	202.6	
RP11-47E6	2	203.5	
AC009498.3	2	203.9	40
RP11-15J24	2	204.4	
RP11-89K8	2	205.2	
RP11-90D19	2	205.9	
RP11-89J16	2	206.8	

RP11-13N10	2	207.7
RP11-90O3	2	208.9
RP11-79C24	2	210.5
RP11-300D24	2	211.3
RP11-560C24	2	212.6
RP11-44J16	2	213.6
AC073284.3	2	215.2
RP11-4B6	2	217.2
RP11-146N10	2	218.2
RP11-316O14	2	219.2
AC009310.3	2	219.7
RP11-23G2	2	220.9
AC009231.4	2	221.6
RP11-247E23	2	222.6
RP11-551D18	2	223.4
RP11-79C2	2	223.8
RP11-89F8	2	226.8
RP11-91J17	2	226.8
AC009950	2	227.6
RP11-91C14	2	228
RP11-252C12	2	229.1
RP11-69J7	2	230.4
RP11-71H20	2	231.2
RP11-91N19	2	232.5
RP11-176L22	2	232.7
RP11-79G2	2	234.2
RP11-21K1	2	234.7
RP11-680O16	2	235.7
RP11-155J6	2	236.4
RP11-88P18	2	237.5
RP11-118M12	2	239.8
RP11-89N23	2	240.3
RP11-463B12	2	241
RP11-204C23	3	3
RP11-32F23	3	4.1
RP11-63O1	3	4.8
RP11-91K16	3	6.3
RP11-33E18	3	7.9
RP11-271E2	3	9.2
RP11-21J23	3	10.4
RP11-91K4	3	11.5
RP11-115G3	3	13.3
RP11-105H19	3	13.8
RP11-57D6	3	15.7
RP11-255O19	3	18.3
RP11-80D24	3	19.7
RP11-451A20	3	22
RP11-90I9	3	22.3
RP11-79E6	3	23.7
RP11-89F18	3	25.8
RP11-41F5	3	26.1
RP11-245E5	3	26.7
RP11-421F9	3	27.8
RP11-451C4	3	28
AC013500.4	3	29.8

10

20

30

40

RP11-11L6	3	30.7	
RP11-103N21	3	31.8	
RP11-56P22	3	35.9	
RP11-286G5	3	37.2	
RP11-90M23	3	38.6	
RP11-90B15	3	40.7	
RP11-241P3	3	42.6	
RP11-219I21	3	43.1	
RP11-24L15	3	44.3	
RP11-348P10	3	45.3	
RP11-91E8	3	46.4	
RP11-425J9	3	47.6	
RP11-91M18	3	48	10
RP11-804H8	3	51	
RP11-89F17	3	51.6	
RP11-865O5	3	53.6	
RP11-124O2	3	54.8	
RP11-189K9	3	55	
RP11-754F19	3	57.2	
RP11-80H18	3	58.2	
RP11-79K17	3	59.2	
RP11-34D21	3	60.7	
RP11-88P20	3	63.2	
RP11-108A8	3	64	
RP11-89O2	3	64.9	
RP11-129B22	3	65	20
RP11-88H12	3	66.2	
RP11-146E16	3	67.9	
RP11-89A12	3	68.2	
RP11-79C12	3	68.3	
RP11-81N13	3	68.3	
RP11-444P10	3	70	
RP11-90H15	3	71.6	
RP11-522N9	3	73.1	
RP11-781E19	3	74.8	
RP11-89H10	3	76.1	
RP11-79O5	3	76.4	
RP11-447J13	3	78.2	30
RP11-79F5	3	80.3	
RP11-220O14	3	80.7	
AC018918	3	81.5	
RP11-208G16	3	86.5	
RP11-81P15	3	89.2	
RP11-424C9	3	90	
RP11-91A15	3	96.4	
AC019233.7	3	97.4	
RP11-91M15	3	98.4	
RP11-449F7	3	100.5	
RP11-114I8	3	103.1	
AC018352.13	3	103.7	
RP11-490H13	3	106.5	40
RP11-90I19	3	108	
RP11-91B3	3	108.7	
RP11-71D1	3	113.1	
RP11-12P11	3	114.8	

RP11-745L2	3	115	
RP11-79H17	3	115.2	
RP11-5K13	3	116.9	
RP11-24O5	3	117.1	
RP11-342J15	3	118.3	
RP11-373C21	3	119.8	
AC027296.12	3	120.3	
RP11-91F9	3	120.6	
RP11-169N13	3	122	
RP11-217N3	3	123.3	
RP11-10G15	3	125.6	
RP11-79M2	3	126.7	
RP11-25L9	3	128.6	10
RP11-59J16	3	130.5	
RP11-205A6	3	131.8	
RP11-525K18	3	133	
RP11-452H12	3	134.1	
RP11-446K3	3	137.3	
RP11-79L21	3	138.3	
RP11-91K8	3	138.9	
RP11-91O5	3	140.4	
RP11-220J13	3	141.1	
RP11-566E10	3	141.8	
RP11-197K1	3	142.2	
RP11-630C21	3	143.6	
RP11-79L9	3	144.6	20
RP11-548O1	3	144.8	
RP11-166D18	3	145.8	
RP11-89E16	3	146.2	
RP11-372E1	3	148.8	
RP11-80H8	3	149	
RP11-260J24	3	149.9	
RP11-88H10	3	151.7	
RP11-229G6	3	155.2	
RP11-145F16	3	156.4	
RP11-385G14	3	157.2	
RP11-362A9	3	158.4	
RP11-372M20	3	159.8	30
RP11-451C20	3	160.7	
RP11-286N6	3	162.1	
RP11-392A22	3	163.2	
RP11-90N21	3	164	
RP11-79A14	3	164.1	
RP11-91L9	3	164.7	
RP11-79M21	3	164.9	
RP11-209H21	3	166.5	
RP11-203L15	3	167.7	
RP11-79G24	3	168.6	
RP11-90M7	3	170.1	
RP11-79F11	3	171.1	
RP11-80L14	3	171.1	40
RP11-91B7	3	173.3	
AC018356.25	3	176.1	
RP11-151A21	3	176.4	
RP11-172G5	3	177.2	

RP11-91A17	3	179.4	
RP11-44A1	3	180.2	
RP11-89J17	3	180.7	
RP11-278A4	3	183	
RP11-114M1	3	183.4	
RP11-91K9	3	183.7	
RP11-89B3	3	185.1	
RP11-45I24	3	185.4	
RP11-510K16	3	186.2	
RP11-275H4	3	186.7	
RP11-259I19	3	187.9	
RP11-102G2	3	188.4	10
RP11-63G1	3	189.7	
RP11-79K10	3	190.5	
RP11-379C23	3	191.6	
RP11-88P6	3	192.6	
RP11-67E18	3	194.6	
RP11-54L9	3	196.1	
RP11-88H6	3	197.1	
RP11-608P9	3	197.6	
RP11-91M9	3	198.2	
RP11-326J2	3	200.1	
RP11-313F11	3	201.8	
RP11-778E2	3	202.9	
RP11-338O10	3	204.6	
AC018707.5	3	204.9	20
AC092535.3	4	0.7	
RP11-572O17	4	1.1	
RP11-262P20	4	1.2	
RP11-478C1	4	1.9	
RP3-323A24	4	2.8	
RP11-520M5	4	4	
RP11-808B21	4	4.5	
RP11-357G3	4	5.3	
AC004555.2	4	7.6	
RP11-101J14	4	9.3	
RP11-17I9	4	10.6	
RP11-34C20	4	11.9	30
RP11-79G9	4	13.4	
RP11-81N5	4	14	
RP11-89K12	4	14.6	
RP11-81L15	4	15.5	
RP11-91N13	4	16.8	
RP11-206O9	4	17.1	
RP11-89H17	4	18.2	
RP11-79N22	4	19.4	
RP11-11M9	4	20.1	
RP11-91B20	4	20.8	
RP11-151G21	4	21.9	
RP11-238L9	4	22.2	
RP11-88B22	4	23.9	40
RP11-660M5	4	26.9	
RP11-239C17	4	28.4	
RP11-89I6	4	31.6	
RP11-53F2	4	32.1	

RP11-363G1	4	32.2	
RP11-81H11	4	33.9	
RP11-79E3	4	35.8	
RP11-81N11	4	36.6	
RP11-108H14	4	38.9	
RP11-24G16	4	40	
RP11-472B18	4	41.5	
RP11-138F23	4	42.7	
RP11-227F19	4	43.4	
RP11-91F19	4	44.4	
RP11-90L23	4	45.1	
RP11-89N6	4	49.7	
RP11-109P3	4	50	10
AC022904.3	4	52.9	
RP11-80L11	4	55.4	
AC069068.9	4	56.4	
RP11-7J22	4	57.4	
RP11-319E12	4	58.3	
RP11-89B16	4	59.8	
RP11-91C3	4	61	
RP11-24I7	4	62.8	
RP11-63E13	4	66.5	
RP11-89M12	4	68.3	
RP11-642E20	4	69	
RP11-529K3	4	70.5	
RP11-121P15	4	71.3	20
RP11-89G2	4	71.7	
RP11-373J21	4	72.7	
RP11-155P6	4	73.8	
RP11-88J6	4	74.6	
RP11-144I19	4	76.2	
RP11-49H14	4	77.5	
RP11-79M16	4	78	
RP11-17P19	4	78.4	
AC021127.8	4	80.5	
RP11-110P12	4	81.3	
RP11-449B1	4	83	
RP11-91J11	4	83.7	30
RP11-36G19	4	84.5	
RP11-91E6	4	86.4	
RP11-397E7	4	87.3	
RP11-203P12	4	87.5	
RP11-17P8	4	88.9	
RP11-79M20	4	89.8	
RP11-49M7	4	90.7	
RP11-451M10	4	91.3	
RP11-16I17	4	94.3	
RP11-21O14	4	96.8	
RP11-369I16	4	98.2	
RP11-144B4	4	99.3	
RP11-414I7	4	100.8	40
RP11-91G13	4	103	
RP11-26E14	4	104.5	
RP11-91C2	4	105.2	
RP11-88D10	4	107.8	

RP11-80H22	4	109.9	
RP11-81J9	4	110	
RP11-89G6	4	110.3	
RP11-144H4	4	111.1	
RP11-380D23	4	112.1	
RP11-18D18	4	112.9	
RP11-89D13	4	113.2	
RP11-73K9	4	113.8	
RP11-260E23	4	115.2	
RP11-362M19	4	116	
RP11-778G8	4	118.8	
RP11-21I10	4	119.7	10
RP11-101N17	4	119.9	
AC007512.2	4	121.1	
RP11-647P12	4	122.4	
RP11-100E15	4	123.9	
RP11-27C19	4	124.7	
RP11-728C8	4	125.2	
RP11-79I18	4	126.1	
RP11-89D9	4	126.9	
RP11-77P11	4	128.4	
RP11-11P20	4	129.2	
RP11-184M15	4	130.2	
RP11-14N24	4	131.4	
RP11-80P12	4	132.2	20
RP11-94J9	4	134.8	
RP11-89P23	4	135.7	
RP11-81F5	4	136.8	
RP11-60A1	4	137.8	
AC016487.5	4	138.3	
RP11-53C1	4	139.6	
AC019343.3	4	141	
RP11-5K16	4	141.9	
RP11-79E2	4	143	
RP11-739G21	4	143.4	
RP11-122I3	4	144.7	
RP11-89E4	4	145.5	
AC032008.2	4	147	30
RP11-91O3	4	148.1	
RP11-56F3	4	149	
RP11-24I21	4	150.6	
RP11-77F4	4	152.3	
RP11-73G16	4	153.3	
RP11-119B13	4	154.6	
RP11-136D2	4	157.9	
RP11-17C4	4	158.7	
RP11-89C4	4	159.8	
RP11-81P7	4	160.9	
AC011101.4	4	162.2	
RP11-177L7	4	163.4	40
RP11-808H17	4	163.6	
RP11-79E19	4	166.4	
RP11-6F19	4	167	
RP11-36G9	4	170	
RP11-90E13	4	171.1	

RP11-90D5	4	173.2	
RP11-110O14	4	174.5	
RP11-89D7	4	174.9	
RP11-134F18	4	175.6	
RP11-122D8	4	177.5	
RP11-79K2	4	178	
RP11-62B4	4	179	
RP11-79G20	4	180.5	
RP11-80P4	4	181.8	
RP11-244K2	4	182.6	
RP11-125M9	4	182.8	
RP11-18D7	4	183.9	10
RP11-90E7	4	184.8	
RP11-267E24	4	185.6	
RP11-279K24	4	186.8	
RP11-597P9	4	187.5	
RP11-91J3	4	188.5	
AC025775.4	5	1.9	
RP11-20B3	5	2.7	
RP11-89N22	5	3.2	
AC010635.5	5	6.2	
RP11-58A5	5	7.1	
RP11-72C10	5	8.2	
RP11-79G1	5	8.6	
RP11-145B1	5	9.6	20
RP11-91M12	5	10.3	
RP11-91E7	5	11.1	
RP11-91M19	5	12	
RP11-88L18	5	13.7	
RP11-81P9	5	14.7	
RP11-135M13	5	16.4	
AC018409.3	5	17.5	
RP11-260E18	5	19.4	
RP11-91E20	5	21.8	
RP11-91L13	5	21.9	
RP11-90G17	5	22.9	
RP11-5N11	5	26.2	
RP11-422J14	5	26.5	30
RP11-89M18	5	27.5	
RP11-81B23	5	28	
RP11-79I8	5	30.4	
RP11-80D4	5	31.2	
AC025447.4	5	32.9	
RP11-67N10	5	33.6	
RP11-90P7	5	35.8	
AC008830.4	5	39.6	
RP11-91I22	5	42.6	
RP11-79E13	5	44.1	
RP11-91M6	5	45.4	
RP11-19F12	5	45.6	
AC027339.3	5	48.4	40
RP11-551B22	5	49.1	
RP11-17H13	5	52.4	
RP11-143O12	5	53.9	
AC034244.6	5	54.6	

AC016635.8	5	60.2	
RP11-19I19	5	61.7	
RP11-79C4	5	63.5	
RP11-89N5	5	63.5	
RP11-79C20	5	65.7	
RP11-480H11	5	66	
RP11-91C10	5	68.1	
RP11-88J2	5	70.1	
RP11-91M11	5	71.4	
RP11-91E18	5	71.5	
RP11-79I10	5	73.9	
RP11-90A9	5	78.7	10
RP11-90M19	5	80.3	
RP11-80D2	5	82.6	
RP11-275E14	5	83.2	
RP11-258M21	5	85	
RP11-90J17	5	86.1	
AC005406.2	5	89.9	
AC104125.1	5	90.3	
RP11-88D22	5	94.3	
RP11-89C2	5	99.6	
RP11-115L24	5	101.1	
RP11-277N18	5	103.3	
RP11-252I13	5	103.7	
RP11-88L16	5	108.1	
RP11-89L24	5	110	
RP11-91G9	5	110.6	
RP11-64F17	5	111.4	
RP11-58G19	5	112.4	
RP11-81L23	5	113.8	
RP11-47L19	5	118.1	
RP11-81C5	5	120.5	
RP11-79K4	5	121.6	
RP11-90A15	5	123	
RP11-90G5	5	123.9	
RP11-265M23	5	124.7	
RP11-42M12	5	129	
AC004038.1	5	130.2	30
AC005178.1	5	133.5	
RP11-21C10	5	134.5	
AC027305.4	5	134.8	
CTD-2004C12	5	137.5	
RP11-89G4	5	137.9	
AC008667.7	5	141.2	
RP11-115I4	5	142	
RP11-15J20	5	143	
RP11-55M16	5	143.1	
CTB-60P23	5	144.7	
RP11-124B12	5	149	
AC011352.4	5	149.8	
RP11-89F1	5	151.9	40
RP11-79I6	5	153.9	
RP11-86C20	5	155	
RP11-91G17	5	156.3	
AC010603	5	158.2	

RP11-79I9	5	159.1	
RP11-89J5	5	159.9	
RP11-90N23	5	161.1	
RP11-31B18	5	164.8	
CTB-4E7	5	165.7	
RP11-134N14	5	166.7	
AC010254.5	5	167.1	
AC091921.1	5	169.7	
RP11-94L2	5	171	
RP11-13H20	5	172.6	
RP11-90C21	5	173.2	
AC011384.3	5	174.5	10
RP11-14K9	5	175	
RP11-15F10	5	175.6	
AC011387.4	5	177.7	
RP11-626B22	5	182.4	
RP1-136B1	6	0.1	
AL035696.14	6	0.4	
RP11-91F13	6	1.7	
RP3-380B8	6	3.7	
RP1-80N2	6	4.3	
RP11-177C16	6	5.2	
RP3-470K1	6	6.2	
RP1-103M22	6	7.2	
RP3-416J7	6	7.9	20
RP1-20B11	6	8.3	
RP11-79M24	6	9.4	
RP11-90P11	6	9.5	
RP11-91C13	6	10.5	
RP3-398A12	6	10.8	
RP11-421M1	6	11.6	
RP11-304M10	6	12.7	
RP3-441J1	6	13.7	
RP1-257A7	6	14.3	
RP11-90I11	6	15.4	
RP3-365E2	6	15.5	
RP1-147M19	6	16.7	
RP1-273P12	6	18.9	30
RP11-90M17	6	19.3	
RP1-298J15	6	19.7	
RP1-209A6	6	21.3	
RP11-91H17	6	22.2	
RP3-369A17	6	22.9	
RP1-242N11	6	23.8	
RP1-130G2	6	25.2	
RP1-52M20	6	26.3	
RP1-224B21	6	27.8	
AL0201917.3	6	28.8	
RP5-874C20	6	30.6	
RP11-88D2	6	30.8	
RP5-974I11	6	31.6	40
RP3-377H14	6	32.1	
RP11-79J17	6	35.2	
RP11-79J23	6	37.1	
RP3-329A5	6	37.5	

RP3-524E15	6	38.4	
RP1-50J22	6	38.6	
RP11-91E11	6	39.7	
RP3-460D19	6	40.7	
RP11-505E17	6	42.1	
RP11-81F7	6	43.9	
RP11-79I2	6	44.3	
RP5-973N23	6	45.9	
RP11-121G20	6	47.1	
RP3-449H6	6	47.4	
RP1-244F24	6	48.3	
RP3-447E21	6	48.9	10
RP11-90H17	6	49.3	
RP1-306F2	6	51.1	
RP11-79F13	6	52	
RP4-753D5	6	53.7	
RP3-357H1	6	54.7	
RP11-90K15	6	55.2	
RP1-27K12	6	56.3	
RP11-7H16	6	56.4	
RP11-146B10	6	58.5	
RP11-79O24	6	59.2	
RP3-496N17	6	60.4	
RP1-271N20	6	65.5	
AL133459.9	6	66	20
RP11-448N11	6	66.6	
RP11-79F21	6	67.7	
RP11-88N6	6	68.1	
RP3-442I1	6	68.4	
RP5-819L10	6	69.5	
RP1-129L7	6	70.1	
RP11-80L16	6	70.4	
RP1-304O5	6	71.6	
RP1-46B1	6	73.3	
RP3-376F14	6	74.8	
RP1-104A17	6	75.5	
RP11-90G9	6	76.4	
RP5-1046G13	6	76.9	30
RP11-374I18	6	77.6	
RP11-28P18	6	79	
RP1-238D15	6	79.8	
RP1-134M13	6	80.5	
RP11-343P23	6	81.9	
RP11-79L15	6	82.8	
RP1-136A11	6	83.4	
RP11-217L13	6	83.5	
RP1-232L24	6	84.6	
RP1-159G19	6	84.9	
RP1-279A18	6	85.5	
RP5-1046E21	6	86.1	
RP11-80I18	6	87.2	40
AL049699.8	6	88.3	
RP4-676J13	6	89.1	
RP1-33L1	6	90	
RP11-43O2	6	91.5	

RP1-102H19	6	92.5	
RP3-486L4	6	93.2	
RP4-570O12	6	93.8	
RP1-131H7	6	94.8	
RP1-154G14	6	96	
RP3-433F14	6	97.2	
RP1-149C7	6	97.9	
RP11-538A16	6	98.5	
RP11-79F23	6	100	
RP1-104O17	6	101.6	
RP11-22L21	6	102.6	
RP3-453D15	6	103.9	10
RP11-79G15	6	104.6	
RP1-121G13	6	105.8	
RP11-79K22	6	106.6	
RP11-90O11	6	106.8	
RP11-79O12	6	107.1	
RP3-514B11	6	108.8	
RP11-284O5	6	109.8	
RP3-454N4	6	110.9	
RP3-429G5	6	113.6	
RP1-128O3	6	113.7	
RP1-70A9	6	115.1	
RP1-261K5	6	115.9	
RP3-487J7	6	117.1	20
RP11-506B6	6	117.9	
RP11-91B17	6	118.7	
RP11-367G18	6	119.4	
RP1-124O9	6	120.2	
Z95329.1	6	120.5	
RP1-136O14	6	122.1	
RP1-94G16	6	123.5	
RP3-344F17	6	124.2	
RP1-193N13	6	125.3	
RP11-411H20	6	126	
RP1-224E15	6	126.6	
RP3-438G17	6	128	
RP3-425C14	6	128.7	30
RP11-80B14	6	129.4	
RP3-329N18	6	129.9	
RP1-249H1	6	130.1	
RP11-138M12	6	131.5	
RP1-312L17	6	133.3	
RP3-480J14	6	134.1	
RP1-86D1	6	134.8	
RP1-69D17	6	136.2	
RP3-353O9	6	137.7	
RP1-215F14	6	138.7	
RP11-435E4	6	139.4	
RP11-368O13	6	140.4	
RP11-557H15	6	141.3	40
RP1-38C16	6	142.4	
RP11-89G8	6	142.6	
RP11-91G15	6	143.7	
RP3-372K1	6	144.2	

RP11-133O15	6	145	
RP1-225E12	6	145.9	
RP5-899B16	6	147	
AL357080.13	6	148	
RP11-89A10	6	148.5	
RP3-468K18	6	150.9	
RP11-43G16	6	152.3	
RP11-545I5	6	153	
RP1-69B13	6	153.6	
RP3-434O8	6	155	
RP1-281H8	6	156.6	
RP1-12G14	6	156.7	
RP11-291C6	6	157.7	10
RP3-358E10	6	159.9	
RP11-535A9	6	160.4	
RP1-278N12	6	161.6	
RP1-257I9	6	162.7	
RP11-91I3	6	164.4	
RP11-266C7	6	165.3	
RP11-88B24	6	166.4	
RP3-393E18	6	166.9	
RP3-428L16	6	168.3	
RP11-81H13	6	168.4	
RP1-119H20	6	169.1	
RP1-51J12	6	171	20
RP11-104N13	6	172.2	
RP3-345E4	6	173.5	
RP1-167A14	6	174.6	
RP1-125N5	6	175.9	
RP11-351J23	6	176.7	
RP1-182D15	6	177.5	
RP1-140C12	6	178.1	
AC073957.7	7	0.7	
RP11-90J23	7	3.8	
RP11-42B7	7	3.9	
RP11-2K20	7	4.7	
RP11-161C7	7	6.1	
RP11-79G16	7	7.6	30
RP11-79O21	7	9.3	
RP11-451C12	7	10.9	
RP11-89B15	7	15.1	
RP11-123E5	7	17.1	
RP11-70K3	7	17.8	
RP11-91A24	7	19.4	
CTB-23M10	7	21.1	
RP11-79G17	7	21.5	
RP11-79D17	7	22.8	
CTB-119H12	7	23.6	
AC010677.4	7	27.1	
RP11-81F15	7	28	
RP11-88B20	7	29	40
RP11-80J6	7	29.9	
RP11-242I4	7	30.5	
RP11-90J13	7	32.1	
AC018648.5	7	33	

RP11-89N17	7	34	
RP11-115G23	7	35.4	
AC083876.2	7	36.7	
RP11-75O22	7	37.5	
RP11-115G1	7	39	
RP11-64I2	7	40	
RP11-112L4	7	40.1	
AC005027.2	7	42.3	
RP11-100C21	7	43.3	
RP11-449D13	7	44.2	
RP11-52M17	7	45.2	
RP11-109N2	7	46.9	10
AC073341.9	7	48.1	
RP11-11D14	7	48.4	
RP11-15L23	7	51.8	
RP11-91C9	7	53.2	
RP11-90N11	7	54.6	
AC073347.3	7	56.5	
RP11-90O18	7	61	
RP11-45N18	7	61.9	
RP11-35P20	7	65.5	
AC006319.3	7	66	
RP11-41F23	7	67.7	
RP11-89D15	7	67.8	
RP11-88H20	7	68.5	20
RP11-114E12	7	69.2	
RP11-90B1	7	69.6	
RP11-137E8	7	72.5	
RP11-89A20	7	74.8	
RP11-451M14	7	75.5	
RP11-88H22	7	76.8	
RP11-60N2	7	78	
RP11-91E1	7	78.4	
RP11-89L18	7	78.9	
AC005064.3	7	80.5	
RP11-90N9	7	83.2	
RP11-22M18	7	84.7	
RP11-88D24	7	85	30
RP11-46O13	7	87.7	
AC000059.1	7	89.6	
RP11-90H9	7	91.8	
RP11-79O7	7	93.2	
RP11-91M13	7	93.8	
RP11-10D8	7	99.1	
RP11-80P24	7	99.4	
RP11-72J24	7	105	
RP11-80L6	7	106.9	
RP11-89M2	7	107.6	
RP11-77E2	7	108.5	
AC002487.1	7	109.2	
RP11-12L9	7	112.3	40
CTB-22K14	7	113.2	
RP11-90N13	7	113.4	
RP11-88J20	7	114.3	
RP11-89O20	7	115.1	

RP11-78C11	7	116.5	
RP11-110C11	7	117.5	
RP11-51M22	7	117.9	
CTB-133K23	7	119.2	
RP11-140O21	7	122.6	
RP11-3L10	7	123	
RP11-112P4	7	123.6	
RP11-81B7	7	129.3	
RP11-80N8	7	129.9	
RP11-66F23	7	131.3	
RP11-35B6	7	131.9	
AC007938.1	7	132.8	10
RP11-79E7	7	136.5	
RP11-140I14	7	137.7	
RP11-88K4	7	139.5	
RP11-80J18	7	140.1	
RP11-137O4	7	141	
AC083883.6	7	141.6	
AC004853.1	7	147.4	
RP11-79M8	7	148.1	
RP11-79K23	7	151	
RP11-89P11	7	151.3	
RP11-91P1	7	152.3	
RP11-43L19	7	155.6	
RP11-79K9	7	157.4	20
RP11-80J22	7	157.8	
RP11-58F7	7	160.8	
RP11-91J19	8	0.2	
AF188030.3	8	1.5	
RP11-11P7	8	2.7	
RP11-121F7	8	3.3	
RP11-45M12	8	4	
RP11-89I12	8	4.6	
RP11-1K11	8	4.8	
RP11-90J21	8	7.4	
RP11-79E11	8	7.8	
RP11-79I19	8	9.3	
RP11-252K12	8	11.5	30
RP11-80B8	8	11.6	
RP11-90O17	8	12.9	
RP11-23H1	8	15.5	
AC010656.7	8	16	
RP11-90I3	8	17.1	
RP11-89M16	8	17.8	
RP11-51C1	8	20	
RP11-89O4	8	21.5	
RP11-110I16	8	22.3	
RP11-89M8	8	23.6	
RP11-76B12	8	25.7	
RP11-90M13	8	26.7	
RP11-70L1	8	27.7	40
RP11-138J2	8	28.4	
RP11-116F9	8	29.3	
RP11-662B19	8	29.8	
RP11-279J6	8	30.9	

RP11-173D10	8	31.9	
RP11-139G9	8	32.2	
RP11-57I3	8	33.7	
RP11-2I13	8	34.6	
RP11-91P13	8	34.9	
RP11-79H13	8	36.1	
RP11-237M13	8	37.4	
RP11-89M20	8	37.8	
RP11-113G10	8	39.4	
RP11-90P5	8	39.5	
RP11-262I23	8	40.5	
AC015649.6	8	42.2	10
RP11-89A4	8	43.3	
RP11-12L15	8	46	
RP11-113H14	8	47.9	
RP11-10H3	8	49	
RP11-11C20	8	51.6	
AC090814.2	8	52.7	
RP11-105K5	8	53.4	
RP11-767C6	8	54	
RP11-99M6	8	54.5	
RP11-172D2	8	54.7	
AC046176.7	8	55.9	
RP11-16M8	8	56.2	
AC021393.5	8	58.4	20
RP11-91I20	8	58.8	
RP11-24L2	8	60.2	
AC019357.5	8	61.5	
AC023533.6	8	62.5	
RP11-89A16	8	63.2	
AC087768.3	8	64.3	
RP11-79G22	8	67.5	
RP11-11K9	8	69.9	
RP11-114M5	8	71.2	
RP11-148M7	8	73.2	
RP11-359N14	8	73.7	
RP11-117N14	8	74.3	30
RP11-88N8	8	75.1	
RP11-65J24	8	76.3	
RP11-89H1	8	77.4	
RP11-80F24	8	78.3	
RP11-90B7	8	79.1	
RP11-15K1	8	79.9	
RP11-89I14	8	80.5	
RP11-93E11	8	81.6	
RP11-257P3	8	82.2	
RP11-90F1	8	85.5	
RP11-90O15	8	85.7	
RP11-96G1	8	86.5	
RP11-91K2	8	87	40
RP11-80P18	8	87.7	
RP11-90G19	8	88.6	
RP11-88J22	8	89.6	
RP11-88J8	8	91	
RP11-89F14	8	91.9	

RP11-27I15	8	94.1	
RP11-90N3	8	95.2	
RP11-80P10	8	96.1	
RP11-90D11	8	98.8	
RP11-30J11	8	100	
RP11-91O11	8	102.2	
RP11-79F7	8	107	
RP11-79J9	8	108	
RP11-81B5	8	109.2	
RP11-80D8	8	109.8	
RP11-79C21	8	109.9	
RP11-91K1	8	110.8	10
RP11-79C18	8	111.2	
RP11-3A12	8	113.6	
RP11-89I16	8	115.3	
RP11-30P9	8	119	
RP11-89P19	8	119.5	
RP11-88J18	8	121.8	
AC037486.2	8	122.6	
RP11-89P9	8	125.8	
RP11-91M23	8	127.3	
RP11-65D17	8	127.7	
RP11-89K10	8	128.1	
RP11-79E8	8	131.1	
RP11-94M13	8	133.3	
RP11-184M21	8	134.7	20
AF186190.3	8	135.1	
RP11-45B19	8	135.9	
RP11-21H16	8	136.2	
RP11-17M8	8	137.9	
RP11-449D3	8	138.2	
RP11-489O18	8	139.1	
RP11-13A18	8	141.7	
RP11-642A1	8	141.7	
RP11-349C2	8	144.7	
RP5-1124C13	8	145.2	
RP11-31M2	9	0.7	
AL136231.12	9	1.2	30
RP11-140C18	9	1.9	
RP11-207C16	9	2.4	
RP11-79M14	9	3	
RP11-79K3	9	4.3	
RP11-376O21	9	5	
RP11-91E3	9	6.5	
RP11-32D4	9	8.5	
RP11-130C19	9	10.6	
RP11-88P16	9	11.6	
RP11-125B21	9	12.3	
RP11-32F11	9	13.1	
RP11-328C23	9	14.1	
RP11-382H24	9	14.6	40
RP11-79B9	9	15.7	
RP11-490C5	9	16.8	
RP11-109M15	9	17.8	
RP11-340N12	9	18.9	

RP11-163F8	9	19.3	
RP11-81B11	9	20.5	
RP11-87O1	9	20.7	
RP11-399M15	9	21.1	
RP11-89C6	9	21.7	
RP11-408N14	9	24.2	
AL391117.7	9	24.9	
RP11-332M12	9	26.9	
AL139235	9	27.1	
RP11-381K22	9	28.4	
RP11-57P14	9	29.2	
RP11-64M21	9	30.1	10
RP11-159L16	9	31.5	
RP11-29M23	9	32.1	
RP11-630H9	9	32.6	
RP11-70F16	9	33.3	
RP11-52I10	9	34	
RP11-79E21	9	34.4	
RP11-54K16	9	35.3	
RP11-395N21	9	37.6	
RP11-327L3	9	38.2	
RP11-12P15	9	39	
RP11-203L2	9	59.2	
RP11-16N10	9	59.7	
RP11-129O15	9	60.8	
RP11-89K20	9	61.2	
RP11-63P12	9	62.8	
RP11-54O21	9	63.6	
RP11-174B4	9	65.5	
RP11-323A7	9	66.5	
RP11-158I5	9	67.5	
AL445684	9	69.1	
RP11-79G7	9	70.7	
RP11-91M2	9	71.6	
RP11-79J13	9	72.7	
RP11-22C13	9	73.7	
RP11-80F16	9	73.7	
RP11-80H20	9	74.9	30
RP11-65C15	9	76.9	
RP11-79I21	9	77.7	
RP11-65B23	9	78.7	
RP11-88J16	9	79.6	
RP11-406A20	9	80.4	
RP11-563G12	9	81	
RP11-95G21	9	81.5	
RP11-89K14	9	82.1	
RP11-62C3	9	83.4	
RP11-19J3	9	83.8	
RP11-30L4	9	84.8	
RP11-173G21	9	87.1	
RP11-89L5	9	88	40
RP11-80J10	9	88.2	
RP11-79A20	9	88.3	
RP11-23B15	9	89.2	
RP11-69F21	9	90.7	

AL356798.17	9	91.9
RP11-80H12	9	92.7
RP11-91L19	9	94.2
RP11-318L4	9	95.4
RP11-217O12	9	96.4
RP11-80N14	9	96.9
RP11-80F13	9	99.6
RP11-505C13	9	100.4
RP11-115J22	9	101.3
RP11-81P13	9	102.6
RP11-104M22	9	103.2
RP11-4O1	9	104.4
RP11-408O19	9	105.4
RP11-9H12	9	105.7
RP11-88F16	9	107.5
RP11-45A16	9	109
RP11-451E16	9	111
RP11-98E22	9	111.5
RP11-57K1	9	112.4
RP11-342H3	9	114
RP11-297L11	9	114.7
RP11-74E13	9	115.7
RP11-142K22	9	115.8
RP11-116C10	9	117.2
RP11-91G7	9	117.9
RP11-282P20	9	118.8
RP11-1M19	9	119.8
RP11-339B21	9	121.1
RP11-98H23	9	121.8
RP11-17O4	9	122.5
RP11-89P10	9	123.4
RP11-81P5	9	125.3
RP11-326L24	9	126
RP11-153P4	9	127.1
AL354671.10	9	127.7
RP11-92B21	9	128.5
RP11-145E17	9	129.3
RP11-100C15	9	129.8
RP11-417A4	9	131.3
AL590627.18	9	132.2
RP11-10D13	10	0.2
RP11-164C1	10	0.7
RP11-809C18	10	0.7
RP11-38M7	10	0.9
RP11-90D7	10	1
RP11-89B19	10	1.2
RP11-74N14	10	1.7
RP11-80D10	10	2.6
RP11-118K6	10	3.1
RP11-89J3	10	4.5
RP11-90M21	10	7
RP11-79C22	10	7.6
RP11-42I17	10	8.6
RP11-91K20	10	8.8
AL136319.8	10	11.2

10

20

30

40

RP11-89C21	10	12.1	
RP11-796C22	10	13.5	
RP11-24J20	10	13.8	
AL157392.11	10	14.2	
RP11-22K18	10	15.1	
RP11-271M1	10	15.7	
RP11-149I8	10	16.3	
RP11-394I23	10	16.7	
RP11-337F21	10	17.8	
RP11-576H16	10	18.8	10
RP11-91D9	10	19.3	
RP11-60J16	10	20.5	
RP11-108B14	10	22.6	
RP11-89J6	10	23.4	
RP11-90F7	10	23.6	
RP11-176P2	10	24.9	
RP11-80K21	10	26	
RP11-79D7	10	27.5	
RP11-91A23	10	28.7	
RP11-89I20	10	29.4	
RP11-89D1	10	30	
RP11-15H10	10	30.6	
RP11-125C10	10	33.1	
RP11-33I16	10	33.4	
RP11-79K19	10	34.5	20
RP11-174P15	10	35.9	
RP11-365P10	10	37.1	
RP11-155G16	10	37.3	
RP11-393J16	10	38.4	
RP11-109N22	10	39.4	
RP11-22B24	10	41	
RP11-80J20	10	41.2	
RP11-48O11	10	43.9	
RP11-20J15	10	44.6	
RP11-42B19	10	47.4	
AL390716.26	10	49.1	
RP11-71N21	10	49.7	
RP11-27P22	10	50.3	30
RP11-92I18	10	51.4	
RP11-75M12	10	52.3	
RP11-133C15	10	53	
RP11-319F12	10	53.9	
RP11-449J3	10	55.1	
RP11-394D15	10	55.5	
RP11-88B18	10	56.6	
RP11-373P23	10	59	
RP11-79A2	10	61.1	
RP11-91H19	10	62.3	
RP11-166B18	10	63.4	
RP11-267O2	10	64.3	
RP11-90E17	10	65.5	40
RP11-351O1	10	66.5	
RP11-428G2	10	68.4	
RP11-344A5	10	70.2	
RP11-474D14	10	71.2	

RP11-86K9	10	71.9	
RP11-135E4	10	72.3	
RP11-6P16	10	73	
RP11-52K17	10	73.4	
RP11-91A1	10	74.2	
RP11-472K8	10	75.8	
RP11-354E23	10	76.9	
RP11-390A15	10	78	
RP11-90D9	10	79	
RP11-89A18	10	79.3	
RP11-399K21	10	79.8	
RP11-79M9	10	80.8	10
RP11-19C18	10	81.8	
RP11-157J13	10	82.8	
RP11-90J7	10	83.5	
RP11-93O23	10	85.4	
RP11-175M21	10	86.4	
RP11-315E23	10	87.1	
RP11-185K11	10	87.8	
RP11-124L5	10	88.9	
RP11-90O7	10	90.3	
RP11-52G13	10	91.7	
RP11-57C13	10	92.2	
RP11-79A15	10	92.7	
RP11-129G17	10	93.3	
AL157394.14	10	94	
RP11-248C1	10	94.9	
RP11-152G7	10	96.5	
AC079844.3	10	96.6	
RP11-366I13	10	97.8	
RP11-91M16	10	99.7	
RP11-80J24	10	99.8	
RP11-90J1	10	100.1	
RP11-79M5	10	101.1	
RP11-90O1	10	102	
RP11-123G19	10	103.4	
CTD-2022D20	10	104.6	30
RP11-483F11	10	105.8	
RP11-316M21	10	106.3	
RP11-108L7	10	107.2	
RP11-68M5	10	107.9	
RP11-89G15	10	108.5	
RP11-416N2	10	110.3	
RP11-541N10	10	110.5	
RP11-202C2	10	111.8	
RP11-89G20	10	112.8	
RP11-432B10	10	114.1	
RP11-626C11	10	115.1	
RP11-90K19	10	115.9	
RP11-469M11	10	117.3	
RP11-271I13	10	118	40
RP11-431P18	10	119.9	
RP11-89C18	10	120.2	
RP11-106N20	10	121.5	
RP11-89H7	10	123	

RP11-96N16	10	124.7	
CTB-54O2	10	125.6	
RP11-140G2	10	126.2	
RP11-354M20	10	126.7	
RP11-51G15	10	127.6	
RP11-79M19	10	128	
RP11-140B17	10	129	
RP11-95I16	10	129.8	
RP11-500G22	10	130.9	
RP11-101I20	10	131.9	
RP11-8O10	10	133.1	
RP11-16P8	10	133.9	10
RP11-42K2	10	135.3	
RP11-88B12	10	135.7	
RP11-48A2	10	135.9	
RP11-90O13	10	137.6	
RP11-122K13	10	138.1	
RP11-408L20	10	139.2	
RP11-142I8	10	139.6	
AL392043.10	10	140.6	
RP11-288G11	10	141.2	
RP11-90B19	10	141.4	
RP11-108K14	10	141.8	
RP11-371C18	11	1.5	
RP11-89O6	11	5.8	20
RP11-21N2	11	7	
RP11-79E12	11	9.4	
RP11-170F20	11	9.9	
RP11-206L19	11	10.9	
RP11-98J9	11	12.5	
RP11-21L19	11	13.1	
RP11-7O20	11	13.8	
RP11-89P13	11	14.6	
RP11-166E15	11	16	
RP11-108J18	11	16.9	
RP11-81D23	11	17.2	
RP11-80B10	11	18.3	
RP11-11A11	11	19	30
AC016904.4	11	21.4	
AC009638.4	11	24.4	
RP11-16H3	11	26	
RP11-79M22	11	26.8	
RP11-79E9	11	29.1	
RP5-859D17	11	29.6	
RP1-296L11	11	31	
AC027548	11	31.8	
RP1-187A11	11	33.2	
RP11-90F13	11	33.9	
RP1-22J9	11	34.1	
RP11-91G22	11	35.6	40
AC026970.4	11	36.1	
RP11-72A10	11	36.6	
RP11-219O3	11	37.2	
RP11-36H11	11	37.9	
RP11-89G12	11	39.3	

AC013488.6	11	40.9	
RP11-220C23	11	41.4	
RP11-150D18	11	42.4	
RP11-79O11	11	44	
RP11-12C11	11	45.6	
AP002509.1	11	48.3	
RP11-79A4	11	48.6	
RP11-56E13	11	51.5	
RP11-77M17	11	53.9	
RP11-135H8	11	54.6	
AC090309.4	11	57.6	
RP11-205I14	11	59.1	10
RP11-729B4	11	59.4	
RP11-5F17	11	61	
RP11-49D19	11	62.4	
RP11-15L8	11	64.3	
RP11-607L20	11	64.4	
RP11-203N8	11	67.7	
AP000405.3	11	68	
RP11-20K4	11	68.8	
RP11-730K20	11	69.7	
RP11-80B24	11	71.2	
RP11-8D13	11	71.4	
RP11-44J5	11	72.7	
RP11-548G17	11	73.6	20
RP11-115O9	11	74.5	
RP11-168B13	11	75.6	
RP11-102M18	11	77.4	
RP11-91P18	11	78.2	
RP11-483P13	11	78.6	
AP002343.1	11	79.3	
RP11-79B7	11	80.2	
RP11-7H7	11	81	
AP001557.3	11	82	
RP11-91A3	11	82.9	
RP11-1E8	11	84.7	
RP11-90K17	11	86.5	30
RP11-89M14	11	87.2	
RP11-19P3	11	87.8	
RP11-80P16	11	88.7	
RP11-80F20	11	89.4	
RP11-876F8	11	91.2	
RP11-30C9	11	92.7	
RP11-372E19	11	94.7	
RP11-163O18	11	96.6	
RP11-91O4	11	96.9	
RP11-16K5	11	99.1	
RP11-267L1	11	101.3	
RP11-775E2	11	103.8	
RP11-88H18	11	106.4	40
RP11-33F6	11	106.6	
RP11-179B7	11	108.1	
RP11-51M23	11	108.6	
RP11-648J7	11	109.9	
AP003057.1	11	110.9	

RP11-56J3	11	112.4	
RP11-209E9	11	112.6	
RP11-2F21	11	114.1	
RP11-89O8	11	114.4	
RP11-163A13	11	116.1	
RP11-79I17	11	117.6	
AP003463.1	11	119.5	
RP11-356E17	11	121.2	
RP11-35P15	11	122.2	
RP11-45N4	11	123.2	
RP11-112I9	11	123.7	
RP11-62A14	11	124.6	10
RP11-89H13	11	125.6	
RP11-89P5	11	126.2	
RP11-344F5	11	127.5	
RP11-164B14	11	128.1	
RP11-87O12	11	129.2	
RP11-11C15	11	129.4	
RP11-164A10	11	130.2	
RP11-10N17	11	131.2	
RP11-50B3	11	132.4	
RP11-20M1	11	132.8	
RP11-41K5	11	133.2	
RP11-112M22	11	134.7	
AP003482.1	11	136	20
AC023429	11	136.9	
RP11-354O3	11	137.6	
RP11-77C9	11	138.6	
RP11-17M17	11	139.6	
AP000903.5	11	139.7	
RP11-27H17	11	140.9	
RP11-469N6	11	141.4	
RP11-598F7	12	0.1	
RP11-283I3	12	0.2	
RP11-359B12	12	1	
RP11-79K20	12	1	
RP11-543P15	12	3.1	30
RP11-88D16	12	3.3	
RP11-74M9	12	4.2	
RP11-388F6	12	4.4	
RP11-91B13	12	4.6	
RP11-319E16	12	5.2	
RP11-451H11	12	5.9	
RP11-433J6	12	6.7	
RP11-277E18	12	8.3	
RP11-13C13	12	10.2	
RP11-144O23	12	11.1	
RP11-434C1	12	12	
RP11-4N23	12	13.4	
RP11-59H1	12	13.8	
RP11-96K24	12	14.5	40
RP11-502N13	12	15	
RP11-91B19	12	16.3	
RP11-1018J8	12	17.2	
AC087311.22	12	17.7	

RP11-871F6	12	18.7	
RP11-489N6	12	20.1	
RP11-206D16	12	21.3	
RP11-956A19	12	22.7	
RP11-460N10	12	23.4	
RP11-12D15	12	24.7	
RP11-80N2	12	25	
RP11-729H10	12	26.1	
RP11-90K13	12	28.3	
RP11-89L4	12	29.3	
RP11-64J22	12	30.1	
RP11-1060J15	12	31.7	10
RP11-780A5	12	34	
RP11-100P18	12	34.3	
AC011324.22	12	35.6	
RP11-56J24	12	36.6	
RP11-152M7	12	40.4	
RP11-91K15	12	42.3	
RP11-90I21	12	44.4	
RP11-624G19	12	45.6	
RP11-490D11	12	46.7	
RP11-139E19	12	46.9	
RP11-79K1	12	49.1	
RP11-89H19	12	49.5	
RP11-25K5	12	51.5	20
RP11-91L17	12	53	
RP11-79O1	12	53.9	
RP11-97N16	12	55.1	
RP11-101H10	12	55.8	
RP11-972K6	12	56.5	
RP11-681G7	12	57.2	
RP11-548L8	12	57.9	
RP11-183H16	12	58.9	
RP11-91I15	12	59.3	
RP11-799O6	12	60.1	
RP11-39G24	12	60.8	
RP11-90P21	12	62.9	
RP11-35G5	12	63.4	30
RP11-80D18	12	64.2	
RP11-88F24	12	64.2	
RP11-88F18	12	64.4	
RP11-91H3	12	64.5	
RP11-631N16	12	65.2	
RP11-196H14	12	66.2	
RP11-1022B3	12	66.4	
AC025603.1	12	68.8	
RP11-596J18	12	69.9	
RP11-91K23	12	71	
RP11-90G3	12	73.7	
RP11-89P15	12	75.3	
RP11-89M22	12	75.9	40
RP11-92P22	12	77.2	
RP11-81H3	12	78.4	
RP11-96F19	12	81	
RP11-90C1	12	82.4	

RP11-530C5	12	83.8	
RP11-230I13	12	85.3	
RP11-362A1	12	86.1	
RP11-79B17	12	90.8	
RP11-88N10	12	91.4	
RP11-900F13	12	92.8	
AC083808.9	12	93.8	
RP11-89F16	12	94.9	
RP11-141N1	12	95.8	
AC073655.26	12	97.5	
RP11-282G15	12	98.4	10
AC069263.8	12	99.5	
RP11-510I5	12	100.5	
RP11-79K8	12	102	
RP11-81D15	12	102.3	
RP11-90E9	12	102.8	
RP11-91M8	12	107.4	
RP11-443B14	12	109.4	
RP11-91M22	12	109.6	
RP11-110L13	12	111.2	
RP11-90N16	12	112	
RP11-81H23	12	112.4	
RP11-951I11	12	113.5	
RP11-91I24	12	114.3	20
AC007570.23	12	115.3	
RP11-426H24	12	117.4	
RP11-90D13	12	118	
RP11-90F3	12	118.2	
RP11-100B17	12	119	
RP11-91M21	12	120.4	
RP11-119J23	12	121.2	
RP11-101P14	12	122.5	
RP11-110J12	12	124	
RP11-3L23	12	125.1	
RP11-665J20	12	127.3	
RP11-87C12	12	128.7	
RP11-512M8	12	129.1	30
RP11-486O12	12	130.9	
RP11-526P6	12	135.5	
RP11-91B1	12	136.2	
RP11-81G12	12	137.7	
RP11-119J21	12	138.1	
RP11-89F23	12	138.5	
AC048343.14	12	146.5	
RP11-408E5	13	17.3	
RP11-110K18	13	18.1	
RP11-26D3	13	19	
RP11-347L8	13	20.2	
RP11-316G23	13	20.6	
RP11-300N13	13	22.9	40
RP11-90M15	13	23.6	
RP11-111G7	13	24.2	
RP11-91C24	13	25.4	
RP11-89J10	13	25.9	
RP11-35M5	13	26.8	

RP11-90M5	13	28.6	
RP11-63C16	13	29.5	
RP11-367C11	13	30.3	
CTD-2037D17	13	31.4	
RP11-141M1	13	32.4	
RP11-87G1	13	32.5	
RP11-269G10	13	33.5	
RP11-90F5	13	33.9	
RP11-91K18	13	35.4	
RP11-495J3	13	36.4	10
RP11-186J16	13	38.6	
RP11-83P2	13	40.1	
RP11-13I8	13	41.3	
RP11-117I13	13	42	
RP11-160G19	13	43.2	
RP11-71C5	13	43.7	
RP11-80H2	13	45.4	
RP11-457D13	13	46.2	
RP11-480G1	13	47.6	
RP11-189B4	13	48.2	
RP11-94N9	13	49	
RP11-90K7	13	50.5	
RP11-185C18	13	51.3	
RP11-91J7	13	52.3	
RP11-456B18	13	54.7	
RP11-100C24	13	56.8	
RP11-81D19	13	57.5	
RP11-142D16	13	59.1	
RP11-218B22	13	59.5	
RP11-282D7	13	63.2	
RP11-91F3	13	63.7	
RP11-37I8	13	64.6	
RP11-23B16	13	66.6	
AL138958.18	13	68.1	
RP11-1G3	13	69.2	
RP11-14B2	13	70.3	
RP11-81D9	13	71.4	
RP11-79I4	13	72	30
RP11-132L12	13	73.3	
RP11-29G8	13	73.9	
RP11-138D23	13	74.9	
RP11-298H15	13	75.8	
AL359257.8	13	77.2	
RP11-318G21	13	78.2	
RP11-25J23	13	79.9	
RP11-80N10	13	81.2	
RP11-89A14	13	83.4	
RP11-118K20	13	84.7	
RP11-29C8	13	86.1	
RP11-30L8	13	86.6	
RP11-753M10	13	87.5	40
RP11-29P20	13	88.1	
RP11-27D9	13	89.2	
RP11-114G1	13	89.9	
RP11-79H7	13	90.8	

RP11-51B13	13	91.6	
RP11-121J7	13	91.9	
RP11-165N12	13	92.9	
RP11-80B16	13	94.2	
RP11-210E23	13	95	
RP11-74A12	13	95.6	
RP11-79A16	13	96.6	
RP11-83D23	13	97	
RP11-122A8	13	99.8	
RP11-366N24	13	100.4	
RP11-151A6	13	101.2	
RP11-90C11	13	101.8	10
AL391122.9	13	102.5	
RP11-36L18	13	103.6	
RP11-202O6	13	104.5	
RP11-100K21	13	106.1	
RP11-25E13	13	107.2	
RP11-207D10	13	107.7	
AL445649.15	13	108.5	
RP11-330C15	13	109.4	
RP11-107H21	13	110	
RP11-90L1	13	111.5	
RP11-91C11	13	111.8	
RP11-474D23	13	112.4	
RP11-75F3	13	113	20
RP11-98F14	13	114.5	
RP11-245B11	13	114.8	
RP11-391H12	13	117.7	
RP11-98N22	14	17	
RP11-89F2	14	17.4	
RP11-71E6	14	18.5	
RP11-566I2	14	18.6	
RP11-65O3	14	20	
RP11-81F9	14	20.3	
RP11-89K22	14	22.2	
RP11-529E4	14	25.5	
RP11-125A5	14	26.4	
RP11-369O9	14	27	30
RP11-91K19	14	29	
RP11-91C17	14	29.4	
RP11-54H22	14	29.9	
RP11-557O15	14	30.5	
RP11-26M6	14	32.2	
RP11-465B6	14	33.4	
RP11-88D14	14	34.8	
RP11-91H1	14	35.3	
RP11-305B23	14	36.4	
RP11-88N14	14	37.8	
RP11-89D19	14	38.6	
RP11-89H24	14	40.5	
RP11-435L2	14	41.2	40
RP11-453F20	14	43.1	
RP11-91J1	14	43.6	
RP11-52O23	14	45.8	
RP11-94K16	14	46.7	

RP11-90K14	14	47.7	
RP11-368A1	14	48.9	
RP11-262M8	14	50.4	
RP11-12P7	14	51.8	
RP11-172G1	14	53.2	
AL359234.4	14	54.6	
RP11-571J17	14	56.1	
RP11-2L22	14	57.3	
RP11-79M1	14	57.8	
RP11-471N20	14	58.9	
RP11-79I3	14	59.9	
RP11-445J13	14	61.6	10
RP11-44K16	14	62.7	
RP11-63G22	14	63.1	
RP11-156E22	14	65.7	
RP11-79B13	14	66.6	
AL160191.3	14	68.4	
CTD-3014H8	14	69.1	
RP11-325N20	14	70.8	
RP11-89B22	14	71.5	
RP11-382O4	14	73.1	
CTD-2317F5	14	74.2	
RP11-81O20	14	74.9	
RP11-463C8	14	75.9	
RP11-63D17	14	76.7	
RP11-232C2	14	77.5	
RP11-80L10	14	78.8	
RP11-114N19	14	79.7	
AL133279.7	14	87.1	
RP11-79J20	14	88.3	
RP11-99C24	14	89.4	
RP11-90H21	14	90.4	
RP11-90P19	14	90.4	
RP11-28G16	14	91.3	
RP11-374H13	14	92.1	
RP11-160P21	14	93.4	
RP11-80F23	14	95.1	
RP11-88L4	14	98.1	30
RP11-431B1	14	98.4	
RP11-89J8	14	99.3	
RP11-90G22	14	100	
RP11-365N19	14	102.7	
RP11-454M12	14	102.8	
RP11-73M18	14	103.6	
RP11-894P9	14	103.6	
AL049840.8	14	104	
RP11-80H14	15	17.1	
AC090983.2	15	21.1	
RP11-339C21	15	21.8	
AC079090.3	15	23.9	
AC021360.4	15	24.9	40
RP11-420B6	15	26	
RP11-303I17	15	26.7	
AC011938.4	15	28.4	
RP11-81N9	15	28.7	

RP11-194H7	15	29.4	
RP11-462A2	15	30.3	
RP11-79A5	15	33	
RP11-62L9	15	34.3	
RP11-521C20	15	35.1	
CTD-2339L15	15	35.7	
RP11-328J12	15	36.4	
RP11-79O13	15	38.4	
RP11-88J10	15	38.7	
RP11-329C22	15	40.3	
RP11-88D20	15	40.9	
RP11-81G13	15	42.2	10
AC066615	15	42.8	
RP11-89O12	15	43.2	
RP11-154J22	15	44	
RP11-295H24	15	45	
RP11-416K5	15	45.9	
RP11-105D1	15	46.8	
RP11-313P18	15	47.5	
RP11-23N2	15	48.4	
RP11-316P21	15	48.8	
RP11-390M11	15	50.2	
RP11-548M13	15	51.2	
RP11-80N16	15	51.7	
RP11-139H15	15	52.7	20
RP11-79C5	15	53.3	
CTD-2330J20	15	54.3	
CTD-2280O8	15	55	
RP11-79J15	15	55.4	
RP11-90A19	15	57.2	
RP11-89A6	15	59.2	
RP11-53H4	15	61.3	
RP11-70A7	15	62.6	
RP11-54P3	15	62.8	
RP11-85E15	15	63.8	
AC048383	15	66.2	
RP11-101C13	15	66.5	30
RP11-64K10	15	68	
RP11-368G21	15	68.3	
RP11-5000O23	15	69.3	
AC023300.6	15	71.1	
RP11-79J21	15	73.1	
RP11-338C8	15	74.2	
RP11-10K12	15	74.9	
AC015970.4	15	75.5	
RP11-81A1	15	76.3	
RP11-558F16	15	77.8	
AC011441.4	15	78.2	
RP11-152F13	15	78.7	
RP11-81L17	15	80.2	40
RP11-90B9	15	80.7	
RP11-91O13	15	80.9	
RP11-296P8	15	82.5	
RP11-80J8	15	84.1	
RP11-91E10	15	85.2	

RP11-533L13	15	85.7	
AC013787.9	15	86.9	
RP11-360F18	15	88.2	
RP11-79A7	15	89.4	
RP11-369O17	15	90.2	
RP11-79C10	15	93	
RP11-337N12	15	93.4	
RP11-120N1	15	94.7	
RP11-80F4	15	95.4	
RP11-397C10	15	96	
RP11-90E5	15	97.3	
RP11-14C10	15	98.5	10
RP11-344L6	16	0.2	
RP11-334D3	16	1.3	
RP11-417B20	16	1.8	
RP11-433P17	16	3.1	
RP11-95P2	16	5.1	
RP11-89M4	16	5.6	
RP11-24M13	16	6.8	
RP11-349I11	16	7.5	
RP11-79M18	16	8.4	
RP11-475D10	16	9.7	
RP11-89D3	16	11.3	
RP11-490O6	16	12.2	
AC007216.2	16	12.6	20
RP11-165M1	16	13	
RP11-81L19	16	15.5	
RP11-91M7	16	16.5	
RP11-396B14	16	18.1	
RP11-81F1	16	18.2	
RP11-79I15	16	19.2	
RP11-109D4	16	19.6	
RP11-141E3	16	22	
RP11-450G5	16	22.7	
RP11-146J7	16	24.3	
RP11-79F19	16	25.1	
RP11-167K14	16	26.5	30
RP11-488I20	16	28.2	
CTA-670B5	16	28.4	
RP11-85E7	16	30.8	
RP11-499D5	16	32.8	
RP11-80F22	16	43.2	
RP11-79M6	16	44.8	
RP11-89O14	16	46.4	
RP11-474B12	16	47.4	
RP11-1103K14	16	48	
RP11-303G21	16	48.8	
RP11-98C8	16	49.3	
RP11-305A7	16	50	
RP11-147B17	16	51	40
RP11-424K7	16	51.6	
RP11-142G1	16	52.7	
RP11-79E10	16	53.1	
RP11-466N18	16	54	
RP11-81D3	16	55	

RP11-212I21	16	55.9
RP11-250E14	16	58.8
RP11-79E15	16	59.9
RP11-11E14	16	60.2
RP11-246M14	16	62.4
RP11-89G14	16	63
RP11-3I14	16	64.2
RP11-154N7	16	68.2
RP11-5A19	16	69
RP11-553M22	16	69.8
RP11-89K4	16	73.1
RP11-58M3	16	74.4
RP11-90L19	16	75
AC009054.6	16	78.1
RP11-12H11	16	79.9
RP11-91O9	16	80.8
RP11-118F19	16	85.2
RP11-90J5	16	86.4
RP11-80H6	16	88.4
RP11-309G16	16	89.3
RP11-443M9	16	89.6
RP11-7D23	16	92.1
RP11-79A1	16	92.2
RP4-597G12	16	93.2
AC027455.12	17	0.4
RP11-91C8	17	0.6
RP11-356I18	17	0.7
RP11-26N16	17	0.9
RP5-1029F21	17	1.21
RP11-4F24	17	1.8
RP11-380H7	17	2.2
RP11-545O6	17	4.3
RP11-459C13	17	4.4
RP11-457I18	17	5.6
CTB-44J6	17	6.7
RP11-89D11	17	8.9
RP11-405P10	17	9.6
CTB-41I6	17	11.1
RP11-383G9	17	11.7
RP11-385G5	17	14.2
RP11-90G21	17	15.6
RP11-89F21	17	16
RP11-78J16	17	16.9
RP11-89K6	17	17.9
RP11-746E8	17	18.5
RP11-404D6	17	19.3
RP11-79O4	17	24.8
RP11-363P3	17	25
RP11-88B16	17	29.1
RP11-73F15	17	30
RP11-79O9	17	31.7
RP11-79K15	17	32.9
RP11-521P1	17	33.4
RP11-58O8	17	34.9
RP11-81D5	17	39

10

20

30

40

RP11-19G24	17	39.4	
RP11-513C18	17	40.4	
RP11-89A22	17	40.8	
RP11-29C11	17	41.6	
AC016889.11	17	42.7	
RP11-266I24	17	43	
RP11-436J4	17	44.1	
RP11-510P20	17	46.5	
RP11-79O18	17	46.9	
RP11-110H20	17	49.4	
RP11-81D7	17	50.3	
CTB-43I4	17	53.2	10
RP11-42M14	17	54.1	
RP11-524I12	17	57.2	
RP11-506H21	17	59.7	
RP11-481M4	17	61.1	
AC040904.2	17	61.9	
RP11-561K8	17	63.7	
RP11-89H15	17	65.8	
RP11-52B5	17	66.9	
RP11-89L7	17	68	
RP11-387O17	17	69.6	
RP11-79K13	17	70.1	
RP11-300G13	17	71.2	
RP11-90L11	17	71.7	20
AC087301.3	17	73	
RP11-65C22	17	75.4	
RP11-91M1	17	75.7	
RP11-91O17	17	75.7	
RP11-76G4	17	76.7	
RP11-89B11	17	77.5	
RP11-61B11	17	77.9	
RP11-165J13	17	80.9	
RP11-46E14	17	81.4	
RP11-55N14	18	4.3	
RP11-80L18	18	5.7	
RP11-102E12	18	6.4	
RP11-105C15	18	7.5	30
RP11-91I8	18	8.1	
RP11-102O20	18	11.2	
AP001077.4	18	14.4	
RP11-151D11	18	15.6	
RP11-411B10	18	16.5	
RP11-79F3	18	21.6	
RP11-90G7	18	26.5	
RP11-676D16	18	27.9	
RP11-79G13	18	28.8	
AC021224.7	18	30.5	
RP11-63N12	18	33.2	
RP11-79G5	18	33.8	40
RP11-90B5	18	35.2	
RP11-104N11	18	36.5	
RP11-89M10	18	40.5	
RP11-20A13	18	44.9	
RP11-91K12	18	45.6	

RP11-80P2	18	48	
RP11-160B24	18	55	
RP11-153B11	18	55.6	
RP11-79L5	18	58.7	
RP11-4G8	18	59.6	
AC067859.3	18	60.2	
RP11-91H13	18	61.7	
RP11-75O12	18	65.2	
RP11-90B3	18	65.8	
RP11-89I22	18	65.9	
RP11-88B2	18	67.4	
RP11-105L16	18	69	10
RP11-79A24	18	69.2	
RP11-90A7	18	69.2	
RP11-49H23	18	69.4	
RP11-57F7	18	71.5	
RP11-90L15	18	73.4	
RP11-90L3	18	79	
RP11-91C19	18	80.5	
RP11-89N1	18	81.5	
AP001933.3	18	86.9	
RP11-54G9	19	4.2	
RP11-268O21	19	4.4	
AC027319.5	19	6.8	
CTD-3193O13	19	10.1	20
RP11-79F15	19	11.1	
RP11-91O21	19	13.1	
RP11-19I2	19	14.6	
AC010422.7	19	15.3	
RP11-56K21	19	17.2	
CTD-2231E14	19	19.2	
AC004447.1	19	22.4	
RP11-152P7	19	42.7	
RP11-46I12	19	43.8	
RP11-110J19	19	43.9	
RP11-79M11	19	46.4	
RP11-91H20	19	46.8	
RP11-147D7	19	47.1	30
AC008555.5	19	49.9	
RP11-92J4	19	51	
RP11-118P21	19	52.5	
RP11-46C6	19	52.9	
RP11-208I3	19	57.4	
RP11-210C7	19	59.6	
RP11-79A22	19	60.3	
RP11-21J15	19	60.9	
RP11-126L20	19	61.6	
RP11-17I20	19	63.8	
RP11-510I16	19	66.5	
RP11-79A3	19	68.7	
RP11-79I16	19	69.4	40
RP11-35J17	19	70.5	
AC005261.1	19	74.3	
RP11-420P11	19	75.9	
RP5-1103G7	20	0.3	

RP5-863C7	20	0.5	
AL031665.19	20	1.2	
AL031665.19	20	1.3	
AL049634.8	20	1.4	
RP4-684O24	20	1.9	
RP4-816K17	20	2.3	
RP11-26F18	20	3.2	
RP4-599I11	20	4.7	
RP5-1054C24	20	5.7	
RP5-859D4	20	6.7	
RP5-836E8	20	7.7	
RP11-79E16	20	8.6	10
RP5-873P14	20	9.5	
RP5-931K24	20	10.3	
RP11-90E23	20	11.2	
RP11-88P14	20	12.2	
RP11-89F13	20	14.5	
RP11-91O7	20	15.6	
RP11-80N12	20	16.8	
RP11-11M17	20	17.8	
RP11-91M17	20	19.4	
RP11-91G1	20	20.9	
RP4-788L20	20	22.5	
RP11-218C14	20	23.5	
RP11-79K14	20	25	20
RP11-90H19	20	25.6	
RP3-410C9	20	26.2	
RP5-1018D12	20	29.8	
RP5-857M17	20	30.1	
RP5-836N17	20	30.6	
RP5-1125A11	20	32.3	
RP4-756N5	20	33.5	
RP5-901O8	20	34.3	
RP3-460J8	20	35.1	
RP11-138A15	20	35.9	
RP4-564F22	20	36.8	
RP4-616B8	20	37.4	
RP5-1123D4	20	38.9	30
RP5-824J5	20	39	
RP4-661I20	20	40	
RP1-3E5	20	40.9	
RP5-970A17	20	41.1	
AL031676.3	20	41.5	
RP11-169A6	20	43.5	
RP3-337O18	20	44.3	
RP11-323C15	20	45.3	
RP3-453C12	20	45.8	
RP1-73E16	20	46.3	
RP5-1063B2	20	48.1	
RP5-963K23	20	48.3	
RP11-5P14	20	49.4	40
RP5-1185N5	20	50.4	
RP4-715N11	20	51.1	
RP11-91L1	20	51.8	
RP5-885A10	20	54.4	

RP4-749H19	20	55.4	
RP5-907D15	20	57	
RP5-1043L13	20	58.6	
RP5-1040G13	20	59.5	
RP5-1107C24	20	60.4	
RP5-1005F21	20	60.5	
RP5-885L7	20	61.5	
AL158091.31	20	62.4	
RP4-583P15	20	62.4	
AL121581.41	20	62.7	
RP11-89M24	21	13.5	
AL163206	21	14.3	10
RP11-15E10	21	16.5	
RP11-375O2	21	17	
RP11-49B5	21	18.1	
RP11-49J9	21	18.8	
RP11-64I12	21	19.7	
RP11-97F14	21	20.5	
RP11-80N20	21	21.4	
RP11-13J15	21	21.8	
RP11-68D18	21	23.1	
RP11-15H6	21	24.4	
RP11-90A17	21	25.4	
RP11-79G23	21	27	
RP11-30N6	21	27.5	20
RP11-191I6	21	29.1	
RP11-147H1	21	30	
RP11-79D9	21	30.9	
RP11-79A12	21	32.3	
RP11-17O20	21	33	
AL163281.2	21	37.9	
RP11-114H1	21	38.8	
RP11-120C17	21	39.4	
RP11-88N2	21	41.3	
RP11-91O6	22	15.2	
RP11-81B3	22	15.6	
RP11-186O8	22	16.8	
RP11-22M5	22	19.1	30
RP11-76E8	22	21.4	
RP5-930L11	22	22	
RP11-89A2	22	22.9	
RP11-91K24	22	24.1	
RP11-79G21	22	25	
RP11-79G6	22	27.2	
RP11-247I13	22	28.7	
Z73979.1	22	30.1	
RP1-215F16	22	32.3	
RP11-89D12	22	33	
RP5-1119A7	22	33.6	
RP3-327J16	22	35.9	
RP3-370M22	22	37	40
RP5-979N1	22	38.4	
RP5-821D11	22	38.9	
RP3-323M22	22	40.1	
RP1-185D5	22	40.6	

RP1-32I10	22	41.5	
RP4-695O20	22	42.3	
RP11-140I15	22	42.9	
RP5-1163J1	22	43.4	
RP1-111J24	22	44.4	
RP11-262A13	22	45.8	
RP3-355C18	22	47.1	
U62317.2	22	47.7	
U82668.1	X	0.04	
LLNOYCO3M"15D10	X	0.05	
RP4-617A9	X	0.9	
AC079264.23	X	2.6	10
RP11-366M24	X	3.9	
CTB-9P2	X	5.7	
RP11-383I22	X	6.7	
RP11-451G24	X	7	
RP11-89B5	X	8.3	
AC005859.1	X	10.3	
RP11-90F9	X	11.4	
AC095352.5	X	12.6	
RP11-143E20	X	14.5	
RP11-79B3	X	15.8	
RP5-958B3	X	16.8	
RP1-245G19	X	17.1	
AC017058.4	X	18.2	
RP11-497C10	X	19.2	
RP11-507P24	X	20	
RP11-487M22	X	25.2	
RP6-27C10	X	25.8	
CTB-229E10	X	27.1	
RP11-89L23	X	27.3	
RP11-122N14	X	28.1	
RP11-124H12	X	28.4	
RP5-1147O16	X	29	
AL031643.1	X	29.9	
RP11-70D7	X	31	
RP13-46M24	X	33.2	
CTB-227D11	X	34	30
RP11-91I16	X	34.3	
RP11-495K15	X	35.1	
RP11-506C6	X	35.8	
RP11-258I23	X	37.2	
RP11-524P6	X	38.3	
RP11-252K10	X	39.3	
RP11-561I16	X	40.1	
RP4-551E13	X	40.8	
AL020989.2	X	42.2	
RP1-30G7	X	43	
RP1-306D1	X	43.9	
RP1-212G6	X	44.7	
DJ230G1	X	44.9	
RP11-107C19	X	45.6	
RP11-58H17	X	46.6	
RP11-637B23	X	47.8	
RP11-363G10	X	48.7	40

ICRFC100H0164	X	49.2	
RP3-501A4	X	49.9	
RP11-292J24	X	50.5	
RP11-266I3	X	51.2	
RP11-465E19	X	52.1	
RP3-323P24	X	53.2	
ICRFC100G11100	X	53.5	
ICRFC104A07135	X	53.8	
RP3-344I7	X	54.2	
RP11-90N17	X	57	
RP11-151A2	X	57.5	
RP11-90I7	X	58.7	10
RP1-80C12	X	60.8	
RP11-523P2	X	61.6	
RP11-470E22	X	62.8	
ICRFC104E01154	X	63.6	
RP11-451A4	X	63.6	
RP11-177A4	X	64.6	
RP11-291O7	X	65.1	
RP11-136A22	X	66.2	
RP13-260P4	X	66.9	
RP13-36G14	X	67.6	
RP3-368A4	X	67.9	
ICRFC100H0130	X	68	
RP11-79C13	X	69.8	
RP11-236O12	X	70.7	
RP4-570L12	X	71.6	
RP11-346E8	X	73.5	
ICRFC104B1939	X	74.5	
RP11-217H19	X	74.7	
RP1-75N13	X	75.9	
RP11-405O21	X	76.6	
RP11-326A14	X	77.2	
RP1-223D17	X	78.9	
RP1-287L14	X	80	
RP11-192B18	X	80.8	
RP11-145I17	X	81	
RP3-473J6	X	82.7	30
RP11-156J23	X	86.8	
RP11-88F12	X	87.3	
RP11-465C5	X	88.5	
RP11-483J19	X	88.9	
AL449189.1	X	89.9	
RP1-117P19	X	91.1	
RP13-75G22	X	92.2	
RP11-485F13	X	93.1	
RP3-377O6	X	94	
RP11-89G18	X	95.1	
Z70281	X	95.7	
RMCOXP001	X	96.4	
RP1-198P4	X	97.6	40
RP11-572H24	X	99.6	
RP1-315B17	X	100.5	
RP1-75H8	X	101.9	
RP5-1070B1	X	102.6	

AL031177.1	X	103.4	
RP11-40K1	X	103.9	
RP1-302C5	X	105.3	
CTB-423D18	X	105.8	
RP11-14G9	X	105.9	
RP11-80F14	X	106.8	
RP11-485M23	X	107.5	
RP5-961O8	X	108.2	
RP5-964N17	X	109.1	
RP11-491C15	X	110.5	
RP3-525N14	X	113.4	
CTB-281O10	X	114.3	
RP1-93I3	X	114.3	10
RP11-566B18	X	116.7	
RP6-64P14	X	118.2	
RP3-370N13	X	118.4	
RP5-1052M9	X	119.6	
RP1-96A9	X	120.4	
RP1-256K24	X	121.2	
RP11-79C15	X	122	
RP1-293E14	X	123.5	
RP3-454M7	X	124.4	
RP5-875H3	X	125.7	
RP1-297J13	X	126.2	
RP1-197O17	X	126.9	
RP1-84F12	X	128.8	
CTB-45B24	X	129.5	
RP4-809E13	X	130.4	
RP11-112K13	X	132.4	
RP11-483M22	X	133.2	
RP5-833B2	X	134.2	
RP13-34G21	X	135.1	
CTB-138O16	X	136	
RP1-177G6	X	136.1	
RP6-232G24	X	137.3	
RP1-231L4	X	138.7	
RP11-514L15	X	139.3	
RP1-145B12	X	140.1	30
RP1-73A14	X	142.4	
RP5-824H1	X	143	
RP11-489K19	X	143.5	
c31.4	X	143.6	
L31948.1	X	145.9	
RP11-414C23	Y	2.8	
RP11-71M14	Y	15.9	
RP11-91A13	Y	17.7	
AC009235.4	Y	20	

【 0 1 6 1 】

40

基質表面

核酸の編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物は任意の基質表面に（直接または間接、共有結合またはその他の手段により）固定化できる。本発明のアレイは例えば基質手段など任意の基質表面を含むことができる。基質表面は剛体、半剛体または可撓性材料であってよい。基質表面はフラットまたは平面、ウェル形状、隆起状、エッティング溝、多孔質、ビーズ、糸状等の形であってもよい。基質は核酸（例えば、“捕獲プローブ”）が直接または間接的に結合するいかなる材料であってもよい。例えば、適当な材料としては紙、ガラス（例えば、米国特許第5,843,767号を参照）、セラミックス、石英またはその他の結晶基質（例えば、ガリウムヒ素）、金属、半金属、ポリアクリロイルモルホリド（polacrystallomorpholide）、種々のプラスティック及び

50

プラスティックコポリマー、ナイロン(商標)、テフロン(登録商標)、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ(4-メチルブテン)、ポリスチレン、ポリスチレン/ラテックス、ポリメタクリレート、ポリ(エチレンテレフタレート)、レーヨン、ナイロン、ポリ(ビニルブチレート)、ポリビニリデンジフルオリド(PVDF)(例えば、米国特許第6,024,872号を参照)、シリコーン(例えば、米国特許第6,096,817号)、ポリホルムルデヒド(例えば、米国特許第4,355,153号;第4,652,613号を参照)、セルロース(例えば、米国特許第5,068,269号を参照)、酢酸セルロース(例えば、米国特許第6,048,457号を参照)、ニトロセルロース、種々の膜及びゲル(例えば、シリカ・エアロゲル、例えば、米国特許第5,795,557号を参照)、常磁性または超常磁性微粒子(例えば、米国特許第5,939,261号)等がある。反応性官能基は例えば、ヒドロキシル、カルボキシル、アミノ基等がある。シラン(例えば、モノ-及びジヒドロキシアルキルシラン、アミノアルキルトリアルコキシラン、3-アミノプロピル-トリエトキシシラン、3-アミノプロピルトリメトキシシラン)はアミン官能基と反応するヒドロキシ官能基を提供することができる。10

【0162】

標識及び走査アレイを含む、核酸及び検出成分

本発明の核酸及びアレイの編集物またはセット、ライブラリーまたは収集物の製造及び使用、並びに本発明の方法の実施において、検出ラベルを含む核酸が使用できる。検出ラベルは核酸に組込むことができ、または結合させることができ。任意の検出成分を用いることができる。検出成分との接合は共有または非共有である。他の側面において、アレイ固定化核酸及びサンプル核酸は異なった形で検出され、例えば、これらは異なる標識を有し、異なるシグナルを放出する。20

【0163】

有用な標識は例えば、³₂P、³₅S、³H、¹₄C、¹₂⁵I、¹₃¹I；蛍光染料(Cy5(商標)、Cy3(商標)、FITC、ローダミン、ラントニド・リン光体、テキサスレッド)、電子密集試薬(例えば、金)、酵素、例えば、ELISAで一般的に使われるもの(例えば、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ、-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリ性ホスファターゼ)、比色分析ラベル(例えば、コロイド金)、磁気ラベル(例えば、Dynabeads(ダイナビーズ)(商標))、ビオチン、ジゴキシゲニンまたは抗血清またはモノクローナル抗体が利用できるハプテン及びタンパク質を含む。標識は検出する核酸に直接組込むことができ、または標的にハイブリダイズまたは結合するプローブまたは抗体に付着させることができる。ペプチドは第2のレポーター(reporter)(例えば、ロイシンジッパー対配列、第2の抗体の結合部位、転写活性ポリペプチド、金属結合ドメイン、エピトープタグ)により認識される所定のポリペプチドエピトープを(例えば、ヌクレオシド塩基内に)組込むことにより検出可能になる。標識は、潜在的な立体障害を減少させるため、またはその他の有用または望ましい特徴に影響を与えるため、様々な長さのスペーサーアームにより付着できる。例えば、Mansfield(1995)Mol Cell Probes 9:145-156を参照されたい。アレイベースCGHにおいて、蛍光物は対にして一緒に用いることができる;例えば、1の蛍光物が対照を標識し(例えば、“公知の、または通常核型の核酸”)、及びもう一方の蛍光物が試験核酸を標識する(例えば、絨毛膜サンプルまたは癌細胞サンプル由来)。典型的な対としては:ローダミンとフルオレセイン(例えば、DeRisi(1996)Nature Genetics 14:458-460);リサミン(lissamine)結合核酸類似体とフルオレセイン結合核酸類似体(例えば、Shalon(1996)上述);Spectrum Red(商標)とSpectrum Green(商標)(Vysis、Downers Grove(ダウナーズグローブ)、イリノイ州);Cy3(商標)とCy5(商標)がある。Cy3(商標)及びCy5(商標)は一緒に用いることができる;両方ともAmersham Life Science(アマシャムライフサイエンス)社(アーリントンハイツ、イリノイ州)により製造されている蛍光シアニン染料である。メロシアニン、スチリル及びオキソノール染料などのシ30

アミニ及び関連染料は特に光吸收性が強く、発光性が高い。例えば、米国特許第4,337,063号；第4,404,289号；第6,048,982号を参照されたい。

【0164】

その他の蛍光ヌクレオチド類似体も用いることができ、例えば、Jameson(1997)Methods Enzymol. 278: 363-390; Zhu(1994)Nucleic Acid Res. 22: 3418-3422を参照。米国特許第5,652,099号及び第6,268,132号も例えば、蛍光オリゴヌクレオチドを生成するために酵素的または化学合成により、DNA及び／またはRNAまたはオリゴヌクレオチドなどの核酸に組込むためのヌクレオシド類似体について記載している。米国特許第5,135,717号は蛍光ラベルとして使用するためのフタロシアニン及びテトラベンズトリアザボルフィリン試薬について記載している。
10

【0165】

検出成分は、共有または非共有手段により、例えば、クレノウポリメラーゼを用いるランダムプライマーラベリングなどの転写により、または“ニックトランスレーション”または增幅等によりサンプルゲノム核酸内に組込むことができ、所望により核酸またはアレイ固定化核酸の編集物の構成要素に組込むことができる。例えば、1の側面において、ヌクレオチド塩基を例えば、Cy3(商標)またはCy5(商標)のような蛍光染料などの検出成分に結合させ、それからサンプルゲノム核酸に組込む。ゲノムDNAのサンプルは非標識dCTPを用いてCy3(商標)-またはCy5(商標)-dCTP結合混合物と組み合わせることができる。Cy5(商標)は通常633nm線のHeNeレーザーにより励起され、発光は680nmで集まる。例えば、Bartosiewicz(2000)Archives of Biochem. Biophysics 376: 66-73; Schena(1996)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 10614-10619; Pinkel(1998)Nature Genetics 20: 207-211; Pollack(1999)Nature Genetics 23: 41-46も参照されたい。
20

【0166】

他の側面において、核酸を標識するためにPCRまたはニックトランスレーションを用いる場合、アリルアミン-dUTPを蛍光染料またはハプテンのスクシンイミジル-エステル誘導体(ビオチンまたはジゴキシゲニン)にカップリングすることにより合成した修飾ヌクレオチドを用いる；この方法により最も一般的な蛍光ヌクレオチドのカスタム調製が可能となる。例えば、Heneagarlu(2000)Nat. Biotechnol. 18: 345-348を参照されたい。
30

【0167】

本発明の核酸、アレイの編集物及び方法において、検出組成物を用いた標識(検出成分を用いたラベリング)は例えば、“分子ビーコン”または“アプタマービーコン”のようなステムループ構造形態の核酸など他の核酸などの生体分子に付着した核酸を含んでもよい。検出成分としての分子ビーコンは当業界に公知である；例えば、Sokol(1998)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 11538-11543、5'及び3'末端上に適合蛍光ドナー及びアクセプター発色団を用いる合成“分子ビーコン”レポーター・オリゴデオキシヌクレオチド。相補的核酸鎖がない場合において、蛍光共鳴エネルギー移動がシグナル発信を妨げる場合分子ビーコンはステムループ構造内に残る。相補的配列を用いるハイブリダイゼーションにおいて、ステムループ構造はドナーとアクセプター部分間の物理的距離を広げ、その結果蛍光共鳴エネルギー移動を減少させ、ビーコンが適当な波長の光により活性化される場合検出シグナルを放出する。例えば、Gリッチな18マー三重鎖形成オリゴデオキシリボヌクレオチドを含む分子ビーコンについて記載するAntony(2001)Biochemistry 40: 9387-9395を参照されたい。また、米国特許第6,277,581号及び第6,235,504号も参照されたい。
40

【0168】

アプタマービーコンは分子ビーコンによく似ている；例えば、Hamaguchi (2001) Anal. Biochem. 294: 126-131; Poddar (2001) Mol. Cell. Probes 15: 161-167; Kaboev (2000) Nucleic Acids Res. 28: E94を参照。アプタマービーコンは2以上の立体構造を選ぶことができ、その1つは配位子に結合できる。蛍光消光対は配位子結合により導入された構造変化を報告するために用いる。例えば、Yamamoto (2000) Genes Cells 5: 389-396; Smirnov (2000) Biochemistry 39: 1462-1468を参照されたい。

【0169】

検出染料及び蛍光物

蛍光染料を用いて核酸を標識することに加え、本発明はサンプルゲノム核酸、核酸またはアレイ固定化核酸の編集物の構成要素の“検出ラベル”を検出するための装置または方法を用いて、またはお互いに特異的にハイブリダイズする核酸を検出するための装置または方法を用いて実施することができる。1の側面において、複数の蛍光を同時に検出する装置または方法を使用し、これらは当業界において公知である。例えば、米国特許第5,539,517号；第6,049,380号；第6,054,279号；第6,055,325号；第6,294,331号を参照されたい。任意の公知の装置または方法またはそれらの变形は本発明の方法を実施するために使用または適応でき、多色蛍光画像をスキャン及び分析するなどのアレイ読み取りまたは“スキャニング”装置を含む。例えば、米国特許第6,294,331号；第6,261,776号；第6,252,664号；第6,191,425号；第6,143,495号；第6,140,044号；第6,066,459号；第5,943,129号；第5,922,617号；第5,880,473号；第5,846,708号；第5,790,727号及びここにアレイの議論において引用する特許を参照されたい。また、公開米国特許出願第20010018514号；第20010007747号；公開国際特許出願WO0146467A号；WO9960163A；WO0009650A；WO0026412A；WO0042222A；WO0047600A；WO0101144Aを参照されたい。

【0170】

例えば、例えば、分光器は光検出器の二次元アレイ上の発光スペクトルをイメージでき、従ってアレイのスペクトル的に十分解像された画像が得られる。例えば、量子収量及び光破壊（photodestruction）収量などの蛍光物理学（Photophysics of the fluorophore）及び検出器の感度はオリゴヌクレオチドアレイの読み取り時間パラメーターである。十分なレーザー出力及び低光破壊率の、Cy5（商標）及び／またはCy3（商標）の使用により、アレイは5秒以下で読み取ることができる。

【0171】

Cy3（商標）及びCy5（商標）などの2以上の蛍光物を（例えば、CGH中で）一緒に用いる場合、すべての蛍光物の合成画像を作ることが必要である。2以上の画像を獲得するために、アレイは同時または順次スキャンできる。電荷結合素子またはCCDは、本発明の方法の実施を含むマイクロアレイ走査システムで使用される。従って、本発明の方法で使用するCCDは多色蛍光画像をスキャン及び分析できる。

【0172】

また、色識別も3色CCDビデオ画像に基づくものであり、これらは色相を測定することにより行う。色相は色を数的に特定するために取り入れる。計算はカメラの別個のチャネルにより記録される赤、緑及び青の光（RGB）の強度に基づいてされる。RGB値を色相に転換するために用いる式は、しかしながら、データを簡略化するものであり、実際の光の物理的性質に言及するものではない。あるいは、スペクトル・イメージングも用いることができ、光の色を正確に表す唯一の量である、波長当たりの光強度を分析する。さらに、スペクトル・イメージングは、画像中のピクセル毎のスペクトル情報を含むので空間データを提供できる。もしくは、スペクトル画像は明視野顕微鏡を用いて行うことができる。

10

20

30

40

50

きる。例えば、米国特許第6,294,331号を参照されたい。

【0173】

データ分析

本発明の方法はさらにデータ分析を含み、例えば基質位置の関数として蛍光強度などを測定する工程、“外れ値”（所定の統計的分布から逸脱したデータ）を除去する工程または残存データから得た標的の相対結合親和力を計算する工程を含むことができる。結果データは標的及びプローブ間の光放射または結合親和力に従って変化する各領域ごとの色付き画像として表示できる。例えば、米国特許第5,324,633号；第5,863,504号；第6,045,996号を参照されたい。本発明はまた、担体上に位置するサンプル上の標識マーカーを検出するための装置を含み、米国特許第5,578,832号を参照されたい。

10

【0174】

ゲノム核酸源

本発明は、アレイベースのコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーション（C G H）を行うことにより細胞集団または組織または液体サンプルなど、核酸を含む任意のサンプル中の遺伝子モザイクを検出する方法を提供する。核酸はゲノムDNA由来（例えば、単離、增幅、クローンした）のものであってよい。ゲノムDNAは任意の供給源から得られる。

20

【0175】

1の側面において、核酸サンプルを調製する細胞、組織または体液サンプルは遺伝的欠陥に関する病気または健康状態を有する疑いがある患者から得たものである。病気または健康状態の原因、診断または予後診断は、例えばゲノム核酸塩基置換、増幅、欠失及び/または転位を有する、遺伝的欠陥と関連し得る。細胞、組織または体液は例えば、羊膜サンプル、絨毛膜サンプル（CVS）、血清、血液、脊髄液（chord blood）または尿サンプル、CSFまたは骨髄穿刺、糞便サンプル、唾液、涙、組織及び外科生検、針生検またはパンチ等から得られる。

10

【0176】

細胞、組織または体液サンプルを単離する方法は当業者に公知であり、限定されないが、吸引、組織切片、血液またはその他の体液の抽出、外科または針生検等を含む。患者から得た“臨床サンプル”は組織学的目的のために取得した凍結切片またはパラフィン切片を含む。サンプルは（細胞培養物の）上澄み、細胞溶解物、染色体異常及びコピー数などモザイクレベルを検出するために望ましい組織培養物から得た細胞由来のものであってよい。

30

【0177】

実施例

以下の実施例は説明のためのものであり、請求項に記載した発明を限定するものではない。

【0178】

実施例1：核酸アレイの作成

以下の実施例は本発明のアレイを作成する典型的な手順を示すものである。

40

【0179】

BACマイクロアレイの作成：

50キロ塩基（kb）以上、約300kb以下のBACクローンをTerrific Broth培地内で成長させる。より大きな挿入、例えば300kbより小さいクローン及びより小さい、約1~20kbも用いられる。DNAは修正アルカリ溶菌法により調製する（例えば、sambrookを参照）。DNAは以下に説明するように標識する。

【0180】

それから、DNAを米国特許第6,048,695号に記載されているように化学修飾する。修飾DNAはそれから適当なバッファーに溶解し、米国特許第6,048,695号に記載されているように清潔なガラスに直接プリントする。通常、各クローンにつき複

50

数のスポットがプリントされる。

【0181】

実施例2：核酸標識及びDNAアーゼ酵素断片化

標準ランダムプライミング法はゲノムDNAをアレイに付着させる前に、該ゲノムDNAを標識するために用い、例えば、s a m b r o o kを参照。サンプル核酸も同様に標識する。C y 3(商標)またはC y 5(商標)標識ヌクレオチドは0.0~約6の範囲のモル比(非標識ヌクレオチド対標識ヌクレオチド)で対応非標識ヌクレオチドを加えて補完される。標識は2~10時間、37で実施する。標識後、反応混合物を3~5分間、95~100に加熱して、ポリメラーゼを不活化し、テンプレートから新しく生成した標識“プローブ”核酸を変性させる。

10

【0182】

それから加熱サンプルを5分間、氷の上で冷却する。“較正”DNAアーゼ(DNAエンドヌクレアーゼ)酵素は(ランダムプライミングにより生成した)標識テンプレートを断片化するために加える。“トレース”量(微量)DNAアーゼを約30~約100塩基サイズの断片に標識核酸を消化/断片化するために加える(最終的な濃度は0.2~2ng/mlであった;培養時間15~30分)。

【0183】

実施例3：核酸サンプルのアレイへのハイブリダイゼーション

以下の実施例は核酸サンプルを前処理する典型的な方法及びこれらサンプルをアレイへハイブリダイズする方法を説明する。この典型的なハイブリダイゼーション手順はゲノムクローンなどの核酸断片が本発明の範囲内であるかどうか(例えば、本発明の編集物、ライブラリー、クローンセットの構成要素であるかどうか)を決定するために用いることができる。

20

【0184】

工程1：DNAサンプルの前処理

ゲノムDNAなど、大きなサイズのDNAサンプルのランダムプライム標識は該DNAサンプルを最初に消化して、より小さい断片を生じる場合により効果的である。全分析試験サンプルについて、4つのゲノムDNA消化を行った: 2つの試験サンプル及び2つの適当な参考または対照サンプルである。

30

【0185】

1. ゲノムDNAの制限酵素消化: 氷上で、以下をオートクレーブ微量遠心機管にピペットで取った:

1 μgにつきDNA X μl
React 3 10X バッファー 5 μl
Eco R 1 2 μl (20単位)
水(オレンジ・バイアル) μl、最終体積50 μl

2. 酵素とDNAを添加した後、かき混ぜて簡単に混合し、手短な遠心分離によりサンプルを再回収する。

【0186】

3. サンプルを一晩中(16時間)、37で培養する。

40

【0187】

4. 反応混合物から5 μlアリコートを除去することにより反応を完了させ、アガロースゲル・エレクトロフォレーシス(0.8%アガロース)によりアリコートを分析する。

【0188】

消化が完了した場合、10分間、72で加熱ブロック中で培養することにより反応を止める。サンプルを変性させる前に加熱ブロックのウェルを水で約15分間満たし、試験管が72で水と接するようにすることが推奨される。

【0189】

5. 消化DNAサンプルを再精製する(フェノール/クロロホルム抽出/E t O H沈殿または適当な市販‘酵素消化後/PCRクリーンアップ・キット’例えば、Zymo R

50

researchのDNA Clean and Concentrator TM - 5 Cat No. D4005を用いて）。注：以下の工程で公正な量の試験及び参考サンプルが標識されることを確実にするために、この時点でDNAサンプルの量を再度測ることが推奨される。

【0190】

少なくとも500ngの各サンプルの消化DNAを標識に用いた。

【0191】

EcoR1などの4塩基対(4-bp)切断制限酵を用いて十分に消化されるゲノムDNAサンプルは20kb～約600bpまで広がる比較的均一な標本(smear)を生成する。

10

【0192】

工程2：Cyt3-dCTP及びCyt5-dCTPの異なる標識DNA

この工程の目的は試験及び参考サンプルをCyt-3及びCyt-5の両方を用いて標識し、Cyt-3標識試験サンプル及びCyt-5標識参考サンプル間、及び逆のCyt-5標識試験サンプル及びCyt-3標識参考サンプル間のコハイブリダイゼーションを促進することにある。

【0193】

1. 再精製DNAサンプルに滅菌水を加え、全体積を25μlにする。そして、20μlの2.5Xランダムプライマー/反応バッファー・混合物(例えば、Gibco/BRL's BIOPRIME(登録商標)ラベリングキット)を加える。

20

【0194】

2. サンプルをよく混合し、5分間沸騰させる。

【0195】

3. サンプルを速やかに氷の上に置き、5分間放置する。

【0196】

4. 氷の上で、SPECTRAL CHIP(登録商標)(Spectral Genomics, ヒューストン、テキサス州)用の2.5μlのSPECTRALラベリングバッファーを各サンプルに加える。

【0197】

5. 1.5μlのCyt5-dCTPまたはCyt-3-dCTPをそれぞれ試験及び参考DNAサンプルに加える(1mMストック)

30

6. 最後に、1μlのクレノウ断片(Gibco/BRL BIOPRIME(登録商標)ラベリングキット)をサンプルに加え、タッピングによりサンプルをよく混合し、簡単な遠心分離により再回収する。

【0198】

7. サンプルを37℃で1時間半～2時間培養する。サンプルを氷上に置き、反応混合物から5μlアリコートを取除くことによりプローブサイズ分布を測定し、アガロースゲル・エレクトロフォレーシス(0.8%アガロース)によりアリコートを分析する。注：好ましくは、プローブサイズは大部分が100～500bpの範囲であるのがよい。

40

【0199】

8. 5μlの0.5M EDTA pH 8.0を加えることにより反応を止め、加熱ブロック中、72℃で10分間培養する。サンプルを氷上に置く。該サンプルはハイブリダイゼーションを起すために使用でき、または必要なときまで-20℃で保存できる。

【0200】

好ましくは、プローブサイズは大部分が100～500bpの範囲であるのがよい。

【0201】

工程3：標識DNAのアレイへのハイブリダイズ

この時点では、Cyt-3及びCyt-5標識試験サンプル及びCyt-3及びCyt-5標識参考サンプルに対応する4つの試験管がある。

【0202】

50

1. Cy - 3 標識試験DNAサンプルとCy - 5 標識参考サンプルを混合し、反対のCy - 5 標識試験DNAサンプルとCy - 3 標識参考サンプルを混合する。SPECTRAL SL CHIP (登録商標) (Spectral Genomics、ヒューストン、テキサス州)用の45 μlのSPECTRALハイブリダイゼーション・バッファーIを各2試験管に加える。

【0203】

2. 11.3 μlの5M NaCl及び110 μlの室温イソプロパノールを添加することにより2つのサンプルを沈殿させる。該サンプルをよく混合し、暗闇中、室温で10~15分間培養する。

【0204】

3. 全速力(10,000g)で10分間サンプルを遠心分離する。

【0205】

4. 沈殿物を避けながら、上澄みを注意深く吸引する。注：沈殿物は紫色がかかった色相を有し、公平量のCy3及びCy5 標識DNAを有することを示す。ピンクまたは青色が強いサンプルは対応するゲノムDNAが効率的に標識されていないことを示唆する。

【0206】

5. 沈殿物を500 μlの70%エタノールでゆすぎ、沈殿物を暗闇中、室温で空気乾燥させる。

【0207】

6. 10 μlの滅菌水(オレンジ・バイアル)を沈殿物に加える。室温で5分間放置し、それから十分に再けん濁する。沈殿物が十分に再けん濁されたことを確認した後、SPECTRAL CHIP (登録商標) (Spectral Genomics、ヒューストン、テキサス州)用の30 μlのSPECTRALハイブリダイゼーション・バッファーIIを加え、ピペットで繰り返し取ることによりよく混合する。

【0208】

7. 水槽中で72、10分間、培養することによりサンプルを変性させる。注：もしくは、サンプルは72にセットした過熱ブロック中で変性させる。サンプルを変性させる前に、約15分間加熱ブロックのウェルを水で満たし、72の水と試験管が接触するようにした方がよい。

【0209】

8. サンプル変性後、すぐに試験管を氷上に5分間置く。

【0210】

9. サンプルを37、30分間培養する。

【0211】

10. サンプルをアレイ中央上にピペットで取り、22 X 60 カバー・スリップでカバーして広げる。注：アレイ全体をカバーし、気泡を防ぐことが必要である。

【0212】

11. スライドをハイブリダイゼーション・チャンバーに置く。マイクロアレイハイブリダイゼーション・チャンバーを用いる場合、10 μlの2X SSC、50%ホルムアミドをチャンバーの両側に加える(H₂Oもちょうど同じように働く)。

【0213】

12. チャンバーを閉じ、アルミホイルで覆う。チャンバーをウェット・ペーパーを用いてKapak Pouche中に置き、該容器をヒート・シールする。該容器を37の培養器に16時間置く。注：スライド上のプローブ分配を容易にし、維持するために、振動基盤培養器を用いた方がよい。

【0214】

工程4：ハイブリダイゼーション洗浄後

蓋付き小型ビン(Coplin jars)をハイブリダイゼーション洗浄後に用いることができるが、各スライドを別個に振動基盤培養器中でペトリ皿に入れて洗浄することを薦める。

10

20

30

40

50

【 0 2 1 5 】

1 . 以下の溶液を個々のペトリ皿に入れて、 5 0 °で前もって温める :

2 X SSC、 5 0 % 脱イオン化ホルムアミド

2 X SSC、 0 . 1 % NP - 4 0

0 . 2 X SSC

2 . スライドを室温で 2 X SSC、 5 0 % SDS に簡単に浸し、 ピンセットを用いてカバー・スリップから静かに滑り落とす。カバー・スリップを無理やり剥がすことは避ける。(または、 2 X SSC が使用できる。)

3 . ピンセットを用いて、スライドを前もって温めた 2 X SSC、 5 0 % ホルムアミドに移す。スライドを振動培養器中、 5 0 °、 2 0 分間で培養することにより洗浄する。 10

【 0 2 1 6 】

4 . 前もって温めた 2 X SSC、 0 . 1 % NP - 4 0 を用いて工程 3 を繰り返す。

【 0 2 1 7 】

5 . 前もって温めた 0 . 2 X SSC を用いて工程 3 を 1 0 分間繰り返す。

【 0 2 1 8 】

6 . 蒸留脱イオン化水を用いてスライドを簡単にゆすぐ。この最後の洗浄は背景の蛍光を大いに減少させるが、 1 0 秒を超えるべきではない。

【 0 2 1 9 】

7 . 強制空気の下、速やかにスライドを乾燥させる。該スライドは空気乾燥をしてはならない。スライドはスキヤニングできる状態となる。 20

【 0 2 2 0 】

本発明の多数の実施態様を記載したが、本発明の概念及び範囲を逸脱することなく種々の修正が可能なことは当然のことである。従って、その他の実施態様も請求の範囲の範囲内である。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/33044

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : C12N 15/00, 1/20; C07H 21/04 US CL : 435/69.1, 252.3, 320.1; 536/23.5, 24.31, 24.33 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) U.S. : 435/69.1, 252.3, 320.1; 536/23.5, 24.31, 24.33		
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)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5,830,645 A (PINKELE et al) 03 November 1998 (03.11.1998), column 2, lines 15-27.	1
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		See patent family annex.
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>		
<p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 29 April 2003 (29.04.2003)	Date of mailing of the international search report 17 JUN 2003	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230	<p>Authorized officer <i>Gary Benzon</i> Telephone No. 703-308-1235</p>	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/33044

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claim Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claim Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claim Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/33044

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING Groups 1-132, claim(s) 1-76, in part, drawn to an array for the detection of a chromosomal abnormality comprising a plurality of nucleic acids segments, wherein each nucleic acid segment is immobilized to a discrete and known spot on a substrate surface to form an array of nucleic acid segment is immobilized to a discrete and known spot on a substrate surface to form an array of nucleic acids. Arrays comprising 132 different groups corresponding to each of the delineated loci positions and correlated disease. Therefore, the first mentioned invention is the array of claim 1 alone. Group 1, the first mentioned invention, is the invention that will be searched in accordance with PCT Article 17(3)(a). Additional groups may be elected. For example, if Group 2 is elected, and the proper fees are paid, then claim 1 and 2 will be searched to the extent that it applies to the array recited in claim 1 and to chromosome 1, locus 1p;36, and the syndrome detected is 1p Deletion Syndrome. Upon election of an invention to be searched in addition to group 1, please identify the number chromosome, loci, and the syndrome detected to be searched in the array claims. Group 133, claims 77-103 and 111-114, drawn to methods of array detection of chromosome abnormalities. Group 134, claims 104-110, in part, drawn to a computer-aided method for detecting array results. For example, if Group 134 is elected, claims 104-110 will be searched to the extent that they apply and are limited to computer-based method for detecting spots and labels necessary for imaging and display of array results. Groups 135-138, claims 115-118, in part, drawn to a method of comparative genomic hybridization(CGH) between two nucleic acid samples. For example if Group 135 is elected, claim 115 will be searched to the extant that it applies to any two samples. If group 136 is elected, claim 116 will be searched to the extant that CGH will be performed wherein the nucleic acid from the first and second sample are from the same species. Group 139, claim(s) 119-125, in part, drawn to a kit comprising an array, instructions and genomic DNA samples. Groups 140-264 claim(s) 126-193, in part, drawn to compilations of nucleic acids for the detection of a chromosomal abnormality or a diagnosis of a syndrome associated with a contiguous gene abnormality comprising a segment of genomic nucleic acid associated with a chromosomal abnormality, a contiguous gene abnormality, a genetically linked disease or a syndrome. For example, if group 140 is elected, this aforementioned, broad grouping of claim 126 will be searched. If for example group 141 is elected, only claim 127's recitation of chromosome 1, locus 1p;36 in conjunction with 1p Deletion Syndrome will be searched. The same will be true for every group 142-264 corresponding to each successive recited loci of interest in remaining claims 128-193. If for example group 264 is elected, claim 193 will be searched to the extant that it applies to a SINGLE chromosomal loci selected from claim 191. Generally, when claims depend from a claim reciting multiple loci, only a single loci may be elected for further search with respect to the elected dependent claim. Upon election of an invention to be searched in addition from groups 140 -264, please identify the loci to be searched if not recited implicitly in the elected group's claim. Groups 265-291, claims 194-220 and 226-229, drawn to a method for the detection of a chromosomal abnormality or a diagnosis of a syndrome associated with a contiguous gene abnormality comprising comparing certain delineated nucleic acids and the genomic DNA from the individual. For example, if group 265 is elected, claim 194 will be searched as it applies to the general nucleic acids recited in claim 126. If group 266 is elected the method of claims 194-220 and 226-229 will be searched to the extant that it applies to the first recited loci of claim 191, chromosome 1, locus 1p36. Similarly, if group 291 is elected, the same method claims will be searched to the extant that they apply to chromosome Y, locus SRY locus/Yp. Groups 292-318, claims 221-225, in part, drawn to a computer-aided method for detecting array comprising the further elected single nucleic acids listed either generally in claim 126 or one of those recited in claim 191, just as groups 265-291 above are drawn. So similarly, if group 292 is elected, the computer-aided method will be searched to the extant that it applies to the general nucleic acid requirement provided in claim 126. If instead group 293 is elected, then the method of claims 221-225 will be searched to the extant that it reads upon the first recited loci of claim 191, chromosome 1, locus 1p36. Each method using different nucleic acids is a separate group.
--

PCT/US02/33044

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Group 319-322, claim(s) 230-233, in part, drawn to a method of comparative genomic hybridization(CGH) between two nucleic acid samples. For example if Group 319 is elected, claim 230 will be searched to the extant that it applies to any two samples(as it depends from 194 and 126). If group 320 is elected, claims 231 will be searched to the extant that CGH will be performed wherein the nucleic acid from the first and second sample are from the same species and these nucleic acids may be selected according to the dependency from claim 194 and then claim 191. Again, applicant should note that only a single first and a single second from claim 191 can be elected for searching.

Group 323, claims 234-240 in part, drawn to a kit comprising an array, instructions and genomic DNA samples0.

Group 324, claim(s) 241-242, in part, drawn to a method of CGH for the detection of aneuploidy by selecting any chromosomal segment.

Group 325, claim 243, in part, drawn to an article of manufacture comprising a plurality of nucleic acid segments.

Group 326, claim 244, in part, drawn to a method of using a plurality of nucleic acid segments as an array.

Group 327, claim 245, in part, drawn to a library of nucleic acid segments wherein each member hybridizes to a single locus of the genome.

The inventions listed in the instant application lack unity for a number of reasons.

The technical feature which joins the array of claim 1 with the rest of the 244 claims is its detection of a chromosomal abnormality or a diagnosis of a syndrome associated with a contiguous gene abnormality comprising a segment of genomic nucleic acid associated with a chromosomal abnormality, a contiguous gene abnormality, a genetically linked disease or a syndrome. This claimed array requires that the a plurality of nucleic acids segments, wherein each nucleic acid segment is immobilized to a discrete and known spot on a substrate surface to form an array of nucleic acids, and each spot comprises a segment of genomic nucleic acid associated with a chromosomal abnormality comprising a segment of genomic nucleic acid associated with a chromosomal abnormality, a contiguous gene abnormality, a genetically linked disease or a syndrome. However, this technical feature is not a "special technical feature" because it does not provide a contribution over the prior art. This method does not provide a special technical feature over the art, since the arrays containing such sequences relating to such syndromes already exist as exemplified in Pinkel et al. US Patent 5,830,645. Pinkel et al. teach CGH with genomic DNA isolated form normal reference cells as well as with that of test cells to detect precise locations of chromosomal abnormalities and which can detect differences in levels of gene expression that are particularly desirable for the diagnosis of disease.(Col.2 Lines 15-27) The particular array taught contained target sequences consisting of two target elements, one contained cloned cMYC oncogenes sequences, and the other contained cloned sequences from the region of the human genome (21D7) known to be unamplified in the Colo-320 cell line. Thus, there is no special technical feature linking the recited groups. as would be necessary to fulfill the requirement for unity of invention.

Furthermore, Brennan et al. provides an array that has spots of isolated nucleic acids comprising every possible 10-mer oligonucleotide. Thus, this teaching further anticipates at least claims 1-76 and 126-193 since these all claim isolated nucleic acids of at least ten nucleotides or which have no length limitation at all. Thus, there is a lack of unity since the broadest claims do not provide a special technical feature over the prior art. PCT Rule 13.2 states "The expression "special technical features" shall mean those technical features that define a contribution which each of the claimed inventions, considered as a whole, makes *over the prior art*. (emphasis added)" Since claim 1 as referenced above and also 1-76 and 126-193 are anticipated by these references the claims are not joined by a special technical feature.

The arrays(Groups 1-132), compilations of nucleic acids(140-264), kits(139 and 323), article of manufacture(325) and library (327) represent different products and different inventions between each product and each group of product and as such are themselves not joined by a special technical feature. For example, a molecule represented by Group 1, comprising a particular combination of nucleic acids, differs chemically, structurally, and functionally from a molecule represented Group 2 or 325 or 327. The special technical feature of each array is the combination of nucleic acids contained therein, which feature is lacking from and not shared with each other arrays, kits, articles of manufacture and library. Similarly, with respect to the methods utilizing and investigating these nucleic acids are not joined by a special technical feature for the same reasons that the nucleic acids themselves are not joined by a special technical feature. Thus, the claims have been separated into a number of groups corresponding to the number of different inventions encompassed thereby, and the claims will be searched only as they read upon the invention of the elected group.

The claims encompass a number of different types of methods that require the examination of different nucleic acids. The methods which require determination of the nucleotides in different sequences present at different loci are not joined by a special technical feature because the each loci and each molecule containing said loci is structurally and functionally distinct from one another. Thus, methods for CGH or for the detection of a chromosomal abnormality or a diagnosis of a syndrome associated with a contiguous gene abnormality comprising comparing certain delineated nucleic acids and the genomic DNA from the individual, or those employing

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/33044

computer based methods for said CGH, each have different special technical feature depending on the loci or nucleic acids selected for interrogation. The chemical structure of each loci and of each molecule containing the same differ from each other. For example, a polynucleotide comprising chromosome 1, locus 1p36 is chemically, structurally, and functionally different from a molecule comprising chromosome 5, locus 5p15.2-pter. For the same reason the nucleic acids that are specific for the determination of the presence of a particular nucleotide present in a particular array are not joined by a special technical feature to those methods using these same nucleic acids neither share a special technical feature. Accordingly, the claims have been separated into a number of groups corresponding to the number of different inventions encompassed by the claims, and the claims will be searched only as they read upon the invention of the elected group.

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 01 N 37/00	G 01 N 37/00 102	
	C 12 N 15/00 F	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N0,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100129713

弁理士 重森 一輝

(72)発明者 モハメド、マンスー

アメリカ合衆国 テキサス州 77054、ヒューストン、アルメダ・ロード 7200、アパートメント 215

(72)発明者 カン、ジョスパル・シン

アメリカ合衆国 テキサス州 77054、ヒューストン、ノース・スタジアム・ドライブ 8080、スイート 2200

(72)発明者 シャー、シシー

アメリカ合衆国 テキサス州 77059、ヒューストン、オーク・リンクス・アベニュー 2302

(72)発明者 カイ、ウェイ - ウエン

アメリカ合衆国 テキサス州 77584、ペアランド、エッジウッド・ドライブ 3106

F ターム(参考) 4B024 AA11 AA12 AA19 CA03 CA09 HA13 HA14

4B029 AA07 AA23 BB20 CC03 FA15

4B063 QA01 QA13 QA19 QQ02 QQ03 QQ08 QQ42 QQ58 QQ60 QR32
QR41 QR56 QR66 QR82 QS03 QS11 QS34 QS36 QX02

专利名称(译)	核酸组合物和使用它们的阵列和方法		
公开(公告)号	JP2005519634A	公开(公告)日	2005-07-07
申请号	JP2003587960	申请日	2002-10-15
[标]申请(专利权)人(译)	基因组学谱油墨		
申请(专利权)人(译)	光谱基因组学，油墨。		
[标]发明人	モハメッドマンスー カンジョスパルシン シャーシシー カイウェイウェン		
发明人	モハメッド、マンスー カン、ジョスパル・シン シャー、シシー カイ、ウェイ-ウェン		
IPC分类号	G01N33/53 C07H21/00 C12M1/00 C12N15/09 C12Q1/68 C40B20/04 C40B30/04 C40B40/08 C40B60/10 G01N33/566 G01N37/00		
CPC分类号	C40B40/08 C07H21/00 C40B20/04 C40B30/04 C40B60/10		
FI分类号	C12N15/00.ZCC.A C12M1/00.A C12Q1/68.A G01N33/53.M G01N33/566 G01N37/00.102 C12N15/00.F		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/AA12 4B024/AA19 4B024/CA03 4B024/CA09 4B024/HA13 4B024/HA14 4B029/AA07 4B029/AA23 4B029/BB20 4B029/CC03 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ58 4B063/QQ60 4B063/QR32 4B063/QR41 4B063/QR56 4B063/QR66 4B063/QR82 4B063/QS03 4B063/QS11 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02		
代理人(译)	山崎 行造 杉山直人 白银 博 赤松俊明		
优先权	60/329030 2001-10-12 US		
其他公开文献	JP2005519634A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

在一个方面，本发明是，例如，染色体非整倍，检测缺失和染色体扩增这种异常，并且核酸与相邻基因异常综合征的诊断或预后的汇编，例如，工业，如阵列产品和方法。还提供套件。

表1: 開放遺伝子症候群の染色体座プロファイル

染色体番号	遺伝子座	症候群
1	1p36	1p 欠失症候群
3	3p25-pter	3p 欠失症候群
3	3p21-pter	3p 重複症候群
4	4p16.3	ウオルフ・ヒルシュホーン症候群
4	4p15.2-16.1	4p 重複症候群
5	5p15.2-pter	ネコなき (Cri du Chat) 症候群
7	7p13.3	ミラー・ディッカー症候群
7	7p11.23	ウィリアムズ症候群
8	8q24.1	ランガーギデオン症候群 (LGS)
8	8q24.1	毛髪鼻指節骨症候群 (TRPS)
9	9p_通常 9p22-pter	9p 欠失症候群
10	10p13p14	ディジョージ症候群II
11	11p13	WAGR 症候群
11	11p15.5	ベックヴィズ・ヴィードマン症候群
11	11p11.2	Potocki-Shaffer 症候群 (多発性外骨腫性II Locus)
15	15q12	アンジェルマン症候群
15	15q12	ブラダー・ウィリー症候群
16	末端 16p13.3	ルビンスタイン・ティビ症候群
17	17p12	シャルコー・マリーナー病 1A型 (CMT-1A)
17	17p12	圧迫性麻痺の遺伝性ニューロバチ
17	17p13.3	ミラー・ディッカー症候群分離 (Isolated) 滑脳症
17	17p11.2	スマス・メイジニス症候群
20	20p11.2p12	アラジル症候群
22	22q11.2(1-p13p14 も参照)	ディジョージ/Velocardiofacial 症候群
X	Xp21	先天性副腎過形成症 (AHC)
X	Xp21	デュシェンヌ・ベッカー筋ジストロフィー
X	Xp21	グリセロールキナーゼ欠損症
X	Xp22	ペリツュウス・メルツバッハ病
X	Xp22.3	ステロイドスルファターゼ欠損症
Y	SRY 遺伝子座/Yp	SRY 位置異常