

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載
 【部門区分】第1部門第1区分
 【発行日】平成23年9月1日(2011.9.1)

【公表番号】特表2004-523201(P2004-523201A)
 【公表日】平成16年8月5日(2004.8.5)
 【年通号数】公開・登録公報2004-030
 【出願番号】特願2001-585298(P2001-585298)
 【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)
 C 1 2 Q 1/68 (2006.01)
 G 0 1 N 21/78 (2006.01)
 G 0 1 N 33/53 (2006.01)
 G 0 1 N 33/566 (2006.01)
 G 0 1 N 33/58 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 15/00 Z N A A
 C 1 2 Q 1/68 A
 G 0 1 N 21/78 C
 G 0 1 N 33/53 M
 G 0 1 N 33/566
 G 0 1 N 33/58 A

【誤訳訂正書】
 【提出日】平成23年7月14日(2011.7.14)
 【誤訳訂正1】
 【訂正対象書類名】明細書
 【訂正対象項目名】特許請求の範囲
 【訂正方法】変更
 【訂正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ゲノム中の3つ以下の部位にハイブリダイズし、そのハイブリダイゼーションが該ゲノム中の既知の配列の標的核酸中のシングルコピーと推定された配列とのハイブリダイゼーションである、標識されたシングルコピー核酸を含有する核酸ハイブリダイゼーションプローブであって、該核酸プローブが少なくとも50ヌクレオチドの長さを有し、プラスミドおよびクローニングベクターの配列を含まないことを特徴とする核酸ハイブリダイゼーションプローブ。

【請求項2】

前記プローブが、該標的核酸中の各々がシングルコピーであると推定された配列にハイブリダイゼーションする、複数の異なる標識された核酸を含有し、該核酸プローブのそれぞれが少なくとも50ヌクレオチドの長さを有することを特徴とする請求項1に記載のプローブ。

【請求項3】

前記核酸プローブが、少なくとも100ヌクレオチドの長さを有することを特徴とする請求項1に記載のプローブ。

【請求項4】

前記核酸プローブが、少なくとも2000ヌクレオチドの長さを有することを特徴とする請求項3に記載のプローブ。

【請求項5】

前記標的核酸がDNA, RNA, mRNAからなる群の中から選択されることを特徴とする請求項1に記載のプロープ。

【請求項6】

前記標的核酸がDNAであることを特徴とする請求項5に記載のプロープ。

【請求項7】

前記核酸プロープが1本鎖であることを特徴とする請求項1に記載のプロープ。

【請求項8】

前記プロープが、標的核酸がその一部となっているゲノムの繰り返し配列にハイブリダイゼーションする、ブロッキング核酸配列を必然的に含んでいないことを特徴とする請求項1に記載のプロープ。

【請求項9】

前記核酸プロープが、蛍光色素応答性ラベル、蛍光色素、発色性化学物質、複合タンパク質、抗体、抗原、およびその混合物からなる群から選択される標識ラベルで標識されていることを特徴とする請求項1に記載のプロープ。

【請求項10】

前記核酸プロープが、蛍光色素応答性ラベルで標識されていることを特徴とする請求項9に記載のプロープ。

【請求項11】

前記プロープと該標識配列と相補的な配列とが、少なくとも80%の相同性を有することを特徴とする請求項1に記載のプロープ。

【請求項12】

前記プロープが、該標的配列に相補性であることを特徴とする請求項11に記載のプロープ。

【請求項13】

標的核酸配列および該標的配列の少なくとも一部にハイブリダイズする核酸プロープを含有する反応溶液を調製し、前記プロープの該標的核酸配列へのハイブリダイゼーションを引き起こす段階を含むハイブリダイゼーション方法において、ゲノム中の3つ以下の部位にハイブリダイズし、そのハイブリダイゼーションが該ゲノム中の既知の配列の標的核酸中のシングルコピーと推定された配列とのハイブリダイゼーションである、標識されたシングルコピー核酸を、前記プロープとして使用することを含むことを特徴とし、前記核酸プロープが少なくとも50ヌクレオチドの長さを有し、プラスミドおよびクローニングベクターの配列を含まないハイブリダイゼーション方法。

【請求項14】

前記プロープが、該標的核酸の各々がシングルコピーであると推定される配列間隔にハイブリダイズする、複数の互いに異なる標識された核酸を含有し、該核酸プロープのそれぞれが、少なくとも50ヌクレオチドの長さを有することを特徴とする請求項13に記載のハイブリダイゼーション方法。

【請求項15】

前記核酸プロープが、少なくとも100ヌクレオチドの長さを有することを特徴とする請求項13に記載のハイブリダイゼーション方法。

【請求項16】

前記核酸プロープが少なくとも2000ヌクレオチドの長さを有することを特徴とする請求項15に記載のハイブリダイゼーション方法。

【請求項17】

前記標的核酸がDNA, RNA, mRNAからなる群の中から選択されることを特徴とする請求項13に記載のハイブリダイゼーション方法。

【請求項18】

前記標的核酸がDNAであることを特徴とする請求項17に記載のハイブリダイゼーション方法。

【請求項19】

前記核酸プローブが1本鎖であることを特徴とする請求項13に記載のハイブリダイゼーション方法。

【請求項20】

前記プローブが、標的核酸がその一部となっているゲノムの繰り返し配列にハイブリダイゼーションする、ブロッキング核酸配列を必然的に含んでいないことを特徴とする請求項13に記載のハイブリダイゼーション方法。

【請求項21】

前記核酸プローブが、蛍光色素応答性ラベル、蛍光色素、発色性化学物質、複合タンパク質、抗体、抗原、およびその混合物からなる群から選択される標識ラベルで標識されていることを特徴とする請求項13に記載のハイブリダイゼーション方法。

【請求項22】

前記核酸プローブが、蛍光色素応答性ラベルで標識されていることを特徴とする請求項21に記載のハイブリダイゼーション方法。

【請求項23】

前記ハイブリダイゼーション方法が、*in situ* ハイブリダイゼーション、サザンブロッティング、核酸が固定されているその他の方法からなる群から選択されることを特徴とする請求項13に記載のハイブリダイゼーション方法。

【請求項24】

前記プローブと該標識配列の一部である配列に、少なくとも80%の同一性を有することを特徴とする請求項13に記載のハイブリダイゼーション方法。

【請求項25】

前記プローブが、該標的配列に相補性であることを特徴とする請求項24に記載のハイブリダイゼーション方法。

【請求項26】

ゲノムの一部を形成している標的核酸配列に対するハイブリダイゼーションプローブを作製する方法であって、

該標的核酸配列のヌクレオチドごとの配列を確認すること、該確認された配列を、該標的核酸配列中の配列番号1～428および447～479の配列と、コンピュータプログラムを用いて比較をすること、ならびに該比較に基づいて該シングルコピー配列を同定することを含む、該標的配列の少なくとも1つのシングルコピーである配列のシーケンスをコンピュータによって決定する段階と、

該同定されたシングルコピー配列の少なくとも一部に、ハイブリダイズする、該標的配列の非繰り返し部分と相補的な配列を含むハイブリダイゼーションプローブであって、プラスミドおよびクロニングベクターの配列を含まないハイブリダイゼーションプローブを構築する段階と、を含んでいることを特徴とするハイブリダイゼーションプローブを作製する方法。

【請求項27】

前記プローブ作製方法が、該シングルコピーである配列の少なくとも一部を取得し、かつ該シングルコピー配列の一部を精製する段階を含むことを特徴とする請求項26に記載のプローブ作製方法。

【請求項28】

前記精製方法が、PCRの実行を含むことを特徴とする請求項27に記載のプローブ作製方法。

【請求項29】

前記ハイブリダイゼーションプローブを標識する段階を含んでいることを特徴とする請求項26に記載のプローブ作製方法。

【請求項30】

前記標的核酸配列および前記プローブが、DNAであることを特徴とする請求項26に記載のプローブ作製方法。

【請求項31】

前記ハイブリダイゼーションプローブが、該シングルコピー配列と、少なくとも80%の相同性を有することを特徴とする請求項26に記載のプローブ作製方法。

【請求項32】

前記ハイブリダイゼーションプローブが、シングルコピーである配列と相補性であることを特徴とする請求項26に記載のプローブ作製方法。

【請求項33】

前記核酸が、2倍化または3倍化した配列部分に由来することを特徴とする請求項1に記載のプローブ。

【請求項34】

2倍化または3倍化した配列領域にハイブリダイゼーションするシングルコピーである核酸を選択する段階を含むことを特徴とする請求項13に記載のハイブリダイゼーション方法。

【請求項35】

前記決定段階が、2倍化または3倍化した配列領域からのシングルコピーである配列を選択する段階を含んでいることを特徴とする請求項26に記載のプローブ作製方法。

【誤訳訂正2】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0005

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0005】

実験手法において、プローブから繰り返し配列を、物理的に除去することが提示されている(Craig et al., Hum. Genet., 100: 472-476 (1997); Durm et al., Biotech., 24: 820-825 (1998))。この検出手法では、DNA標的に対するプローブを加える前に、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)で増幅されたゲノムプローブを、過剰の精製した繰り返し配列を有するDNAとプレハイブリダイゼーションする過程を含んでいる。その結果、精製したプローブは、繰り返し配列を除去される。この手法は、本質的には、プローブ中の繰り返し配列のハイブリダイゼーションを不可能にする他の手法と非常に良く似ている、しかし、時間がかかることに加え、米国特許5447841および575696号明細書に記載されているプローブに対して、何ら進歩性がないものである。

【誤訳訂正3】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0006

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0006】

[発明の概要]

本発明は、前記の問題を解決し、既知の標的核酸のシングルコピーと推定される配列領域とハイブリダイゼーションする、標識されたシングルコピー核酸を含有する核酸(例えば、DNA)ハイブリダイゼーションプローブを提供するものである。概して、本発明のプローブは、標的核酸の配列を、標的がその一部分となっているゲノム中の既知の繰り返し配列と比較することにより、設計されている；標的中のシングルコピー配列(すなわち、特異性がないことにより、シングルコピー配列のハイブリダイゼーションシグナルをふさいでしまう可能性のあるような、繰り返し配列を全く含んでいない配列)と推定できる情報がある。想像されるように、この初期段階では、標的とゲノム上の繰り返し配列の知見が必要であり、これらの情報は、ヒトゲノム計画やそれに関連したバイオインフォマティクスの研究により、飛躍的に利用できるようになってきている。さらに、必要とするシングルコピー配列を検索するために、市販されているコンピュータソフトウェアを利用することができる。

【誤訳訂正 4】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0007

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0007】

ここでいうプローブとは、標的配列に相補性であるものが最も好ましい；即ち、プローブであるヌクレオチドと標的である配列が、100%相補性があるものである。さらに広く言えば、プローブが、標的である配列と適切にハイブリダイゼーションする限り、相補性が100%より低いものも使用することができる；すなわち、プローブと標的配列の相補鎖である配列とが、少なくとも80%の相同性があったほうがよい。より好ましくは、少なくとも約90%である。

【誤訳訂正 5】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0008

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0008】

シングルコピーと推定される配列に対応する核酸断片は、PCR増幅、精製したゲノム断片の制限酵素やエクソヌクレアーゼ処理、または直接核酸を合成する等、様々な方法により調製することができる。その後で、シングルコピー核酸断片は、潜在的に混入している繰り返し配列を除去するために、例えば、電気泳動や高速液体クロマトグラフィーにより精製する；この過程は、関係のないゲノム配列の偽陽性によるハイブリダイゼーションや検出を排除するために行うことが、特に好ましい。

【誤訳訂正 6】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0009

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0009】

それから、プローブ断片は、リコンビナントDNAベクターにクローニングしたり、直接ラベルを入れたりできる。プローブは、修飾された、または直接標識されたヌクレオチドを使って、ニックトランスレーションにより、標識されるのが好ましい。その後で、好ましくはマイクロスライド上に固定された染色体のプレパラート、そうでなければ、メンブラン、スライド、DNAチップ、または他の物体上に固相化した精製核酸と、標識されたプローブは変性され、ハイブリダイゼーションする。プローブは、米国特許5985549や5447841号明細書に記載されているように、従来からの蛍光染色 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) により、染色体へハイブリダイズする；または、米国特許5110920や5273881号明細書に記載された技術により、固相化した核酸と結合させることもできる。プローブのシグナルは、蛍光、免疫学的、または酵素反応溶液を使用する等、色々な方法により視覚化することができる。

【誤訳訂正 7】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0010

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0010】

本発明のプローブを使用すると、従来の *in situ* ハイブリダイゼーションでは、達成できなかった解像能で、染色体の切断点を、さらに正確に決定することができる。そのような解析を行うに当たり、最初に用いるプローブ群は、切断点の反対側にあると考

えられている領域を基に、調製することができる。切断点を決定する最初の実験の後で、シングルコピーの手法を使って、切断点の近傍に新たにプローブを設計することができる。この方法で、切断点の正確な領域を決定することが可能となる。

【誤訳訂正 8】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0011

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0011】

シングルコピーと推定されるプローブを使って、今まで未知であったゲノム中の繰り返し配列の存在を決定することができることが明らかとなった。従来未知であった繰り返し配列のファミリーは、連続した核酸配列のデータベースの中に追加され、その後、シングルコピープローブの設計に利用することができるようになる。

【誤訳訂正 9】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0012

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0012】

本発明のプローブは、標的配列の長くなった分、より強固にハイブリダイゼーションできるような、ゲノム中で2倍化または3倍化している配列を含んでいてもよいことが、明らかとなっている。また、このようなデュプリコンまたはトリプリコンは、例えば、シングルコピープローブを使用して確認することができ、上市されているプローブを用いた場合は困難である。

【誤訳訂正 10】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0013

【訂正方法】削除

【訂正の内容】

【誤訳訂正 11】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0014

【訂正方法】削除

【訂正の内容】

【誤訳訂正 12】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0015

【訂正方法】削除

【訂正の内容】

【誤訳訂正 13】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0016

【訂正方法】削除

【訂正の内容】

【誤訳訂正 14】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0017

【訂正方法】削除

【訂正の内容】

【誤訳訂正 15】

【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】0018
【訂正方法】削除
【訂正の内容】
【誤訳訂正16】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】0019
【訂正方法】削除
【訂正の内容】
【誤訳訂正17】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】0020
【訂正方法】削除
【訂正の内容】
【誤訳訂正18】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】0021
【訂正方法】削除
【訂正の内容】
【誤訳訂正19】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】0022
【訂正方法】削除
【訂正の内容】
【誤訳訂正20】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】0023
【訂正方法】削除
【訂正の内容】
【誤訳訂正21】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】0024
【訂正方法】削除
【訂正の内容】
【誤訳訂正22】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】0025
【訂正方法】削除
【訂正の内容】
【誤訳訂正23】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】0026
【訂正方法】削除
【訂正の内容】
【誤訳訂正24】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】0027
【訂正方法】削除
【訂正の内容】
【誤訳訂正25】

【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】0028
【訂正方法】削除
【訂正の内容】
【誤訳訂正26】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】0029
【訂正方法】削除
【訂正の内容】
【誤訳訂正27】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】0030
【訂正方法】削除
【訂正の内容】
【誤訳訂正28】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】0031
【訂正方法】削除
【訂正の内容】
【誤訳訂正29】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】0032
【訂正方法】削除
【訂正の内容】
【誤訳訂正30】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】0033
【訂正方法】削除
【訂正の内容】
【誤訳訂正31】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】0034
【訂正方法】削除
【訂正の内容】
【誤訳訂正32】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】0035
【訂正方法】削除
【訂正の内容】
【誤訳訂正33】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】0036
【訂正方法】削除
【訂正の内容】
【誤訳訂正34】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】0037
【訂正方法】削除
【訂正の内容】
【誤訳訂正35】

【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】0038
【訂正方法】削除
【訂正の内容】
【誤訳訂正36】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】0039
【訂正方法】削除
【訂正の内容】
【誤訳訂正37】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】0040
【訂正方法】削除
【訂正の内容】
【誤訳訂正38】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】0041
【訂正方法】削除
【訂正の内容】
【誤訳訂正39】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】0042
【訂正方法】削除
【訂正の内容】
【誤訳訂正40】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】0043
【訂正方法】削除
【訂正の内容】
【誤訳訂正41】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】0044
【訂正方法】削除
【訂正の内容】
【誤訳訂正42】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】0045
【訂正方法】削除
【訂正の内容】
【誤訳訂正43】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】0046
【訂正方法】削除
【訂正の内容】
【誤訳訂正44】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】0047
【訂正方法】削除
【訂正の内容】
【誤訳訂正45】

- 【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】0048
【訂正方法】削除
【訂正の内容】
【誤訳訂正46】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】0049
【訂正方法】削除
【訂正の内容】
【誤訳訂正47】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】0050
【訂正方法】削除
【訂正の内容】
【誤訳訂正48】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】0115
【訂正方法】変更
【訂正の内容】
【0115】

米国特許5447841, 5663319および5756696号明細書に記載されているタイプのブロッキング核酸有無の条件で、標識したプローブ断片を使用し、変性した正常なヒトのメタフェーズ染色体を用いて、ハイブリダイゼーションの対照実験を実施した。溶解した標識プローブの20 μ lを凍結乾燥させ、10 μ lの脱イオン化したフォルムアミドに溶解し、一本鎖の核酸にするために70~75 $^{\circ}$ Cで5分間変性した。対照として、プローブは、Cot-1 DNA (Life Technologies)の10 μ gに対し、125ng (または20 μ l)の標識プローブを加えて、その混合溶液を凍結乾燥させることで、精製した繰り返しDNAと前反応させた。それから、この混合溶液を、70 $^{\circ}$ C、5分間変性させ、その後、プローブ中の一本鎖繰り返し配列を二重鎖核酸にするために、37 $^{\circ}$ C、30分間の前反応 (すなわちプレアニリング)を行った。これにより、繰り返し配列と標的の鋳型DNAのような染色体とのハイブリダイゼーションができなくなる。

- 【誤訳訂正49】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】0116
【訂正方法】変更
【訂正の内容】
【0116】

その後、精製した繰り返しDNA (例えば、Cot-1)と混合した、または混合していない変性したプローブは、等量のあらかじめ温めておいたハイブリダイゼーション溶液 (4 \times SSC/2mg/mlヌクレアーゼフリーの牛血清アルブミン/20%デキストランサルフェイト/30%滅菌した脱イオン水)と混ぜて、変性した標的DNA上にかけた。顕微鏡用のスライドに固定された染色体の標的DNAは、50%ホルムアミド/2 \times SSC中で、72 $^{\circ}$ C、5分間変性した。カバースライドを、スライドのプローブハイブリダイゼーション混合溶液上において、蒸発を防ぐためにマニキュア液でシールし、一晚39%の湿気のある入れ物の中に静置した。

- 【誤訳訂正50】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】0132
【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0132】

プローブ断片は、ジゴキシゲニン-dUTPやbiotin-dUTP (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) のような修飾ヌクレオチドを用いて、ニックトランスレーションにより標識された。標識したプローブを変性し、前記条件下 (Knoll and Lichter, Current Protocol in Human Genetics, Vol. 1, Unit 4.3, Green-Wiley, New York, (1994)、プローブを (Cot-1 DNA のような) 繰り返しDNAとプレアニリングする手法を、一連のハイブリダイゼーションにおいて使用しなかったことを除く) で、顕微鏡のスライドに固定した染色体プレパラートにハイブリダイゼーションさせた。非特異的な結合を除去するために、約100 kbまでの片方の染色体領域由来のプローブを、個々または組み合わせて使用しても、ハイブリダイゼーションした。ハイブリダイゼーション後の洗浄は、2×SSCで50%のホルムアミド中、42℃で行われ、続いてさらに39℃ 2×SSCで1回、室温の1×SSCで1回行われた。ゲノム中に至る所にある類似の関係配列への、プローブのハイブリダイゼーションを排除するために、必要に応じて、洗浄条件を厳しくした。ハイブリダイゼーションしたプローブは、修飾ヌクレオチドに対する (ローダミンやフルオロセインのような) 蛍光色素が結合した抗体で検出された。染色体の同定は、細胞性のDNAを4', 6'-ジアミチノ-2-フェニルインドール (DAPI) で対比染色することで行われた。ハイブリダイゼーションした染色体は、ディスプレイが付属し、複数の励起蛍光フィルター機器を備えた蛍光顕微鏡 (Olympus, Melville, NY) で視覚化された。Cot-1 DNA とのプレアニリング有無の条件ごとに、個々のプローブまたはそれらの組み合わせについて、少なくとも20のメタフェーズ細胞 (50~100の核) へのハイブリダイゼーション像を計数した。細胞は、CCDカメラ (Cohu, Inc, San Diego, CA) およびCytoVision ChromoFluor ソフトウェア (Applied Imaging, Santa Clara, CA) を使用して映像化された。

【誤訳訂正51】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0152

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0152】

核小体形成領域と呼ばれる、染色体ドメインは、連続して一列に並んだ何千ものコピーのリボソームRNAを含んでいることが知られている (Sylvester et al., Hum. Genet., ; 73: 193-8 (1986))。ヒトゲノムの配列決定されたゲノム配列には、染色体領域由来の連続配列が欠けている。国際シーケンス会議は、このような配列や、その他の連続した繰り返し配列 (例えば、ヘテロクロマチン) を含むクローンを、シーケンス当初の事情を配慮して排除している。何故なら、そのようなクローンからの配列を集めても、不明瞭で、信頼できないと認識しているからである。同じ位置にあるが、リボソームRNA遺伝子とは区別される他の配列も、恐らく染色体の核小体形成領域中に、一列に並んで存在している。このような部分についての配列情報がないので、ゲノム中のどこかにある配列に関係した領域内の配列の分布を、あらかじめ予測することはできない。このようなプローブを用いたシングルコピーFISHは、予測通りにユークロマチン部分への局在化を示しているが、さらに、末端動原体を有する染色体の短腕への、注目すべきハイブリダイゼーションが観察される。ハイブリダイゼーションの前にCot-1 DNA を添加すると、繰り返し配列へのクロスハイブリダイゼーションを除去できた。このような付随的なシグナルは、末端動原体を有する染色体の短腕上のプローブと関係して、一列に並んだマルチコピーの配列と一致している。