

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-102614
(P2005-102614A)

(43) 公開日 平成17年4月21日(2005.4.21)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	2 G O 4 5
C 1 2 M 1/00	C 1 2 M 1/00	2 G O 5 4
C 1 2 M 1/34	C 1 2 M 1/34	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09	G O 1 N 21/77	4 B O 2 9
G O 1 N 21/77	G O 1 N 21/78	4 B O 6 3

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-341476 (P2003-341476)	(71) 出願人	501145295 独立行政法人食品総合研究所 茨城県つくば市観音台2丁目1番地12
(22) 出願日	平成15年9月30日(2003.9.30)	(71) 出願人	501167644 独立行政法人農業生物資源研究所 茨城県つくば市観音台2丁目1-2
		(74) 代理人	100059959 弁理士 中村 稔
		(74) 代理人	100067013 弁理士 大塚 文昭
		(74) 代理人	100082005 弁理士 熊倉 禎男
		(74) 代理人	100065189 弁理士 穴戸 嘉一

最終頁に続く

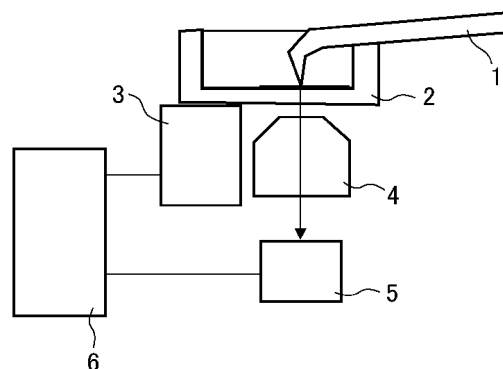
(54) 【発明の名称】 ゲノム物理地図作成方法及び作成装置

(57) 【要約】

【課題】 SNOMによりライブラリークローンやマーカーをパキテン期染色体上に高分解能で直接位置づけることにより位置情報を回復するゲノム物理地図作成方法及び装置。

【解決手段】 探針1の先端から蛍光色素で標識されたマーカーを励起する光が照射され、試料からの蛍光は、対物レンズ4を通して集光された後、検出器5において検出される。位置決め機構3をXY方向に2次元的に走査を行うことによって、試料表面の形状と蛍光像を取得し、試料上の蛍光標識を0.5 μm以下の分解能で検出することができる。検出された蛍光標識の信号は、制御装置および信号解析装置を兼ねたコントローラ6により、蛍光標識の染色体上での位置と染色体の形状データを解析し、マーカーの染色体上での相対位置関係または絶対位置を決定して、ゲノム物理地図を作成する。

【選択図】 図4



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

真核生物のゲノム物理地図を作成する方法であって、
 真核生物由来のDNA断片を蛍光標識する工程、
 蛍光標識した該DNA断片を、該真核生物から調製した染色体上のDNAとハイブリダイゼーションさせる工程、及び
 ハイブリダイゼーションされた蛍光標識DNAの染色体上の位置を、 $0.5\ \mu\text{m}$ 以下の分解能で検出する工程、
 を含む、前記ゲノム物理地図作成方法。

【請求項 2】

前記検出工程を、近接場光プローブ顕微鏡を用いて行う、請求項 1 記載のゲノム物理地図作成方法。

【請求項 3】

前記真核生物由来のDNA断片が、該真核生物から抽出したゲノムDNAを断片化し、断片化したゲノムDNAをクローニングベクターに挿入してクローニングすることにより作成したゲノムDNAライブラリーに含まれるクローンである、請求 1 項記載のゲノム遺物理地図作成方法。

【請求項 4】

前記真核生物由来のDNA断片が、該真核生物由来の遺伝子配列、cDNA、あるいは既知のゲノム塩基配列情報により人工的に合成されたDNA、または、既知のゲノム塩基配列あるいはランダムな配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして該真核生物のゲノムDNAからPCRにより増幅したDNAである、請求項 1 記載のゲノム物理地図作成方法。

【請求項 5】

前記染色体が、分裂期染色体またはパキテン期染色体である、請求項 1 記載のゲノム物理地図作成方法。

【請求項 6】

染色体上の蛍光標識DNAの位置を $0.5\ \mu\text{m}$ 以下の分解能で計測し得る計測手段、及び、該計測手段の位置決めを $0.5\ \mu\text{m}$ 以下の分解能ですることが可能な位置決め手段を備える、ゲノム物理地図作成装置。

【請求項 7】

前記計測手段が近接場光プローブ観察手段である、請求項 6 記載のゲノム物理地図作成装置。

【請求項 8】

さらに、前記計測手段により得られた前記染色体上の蛍光標識DNAの位置についてのデータ及び該染色体の形状についてのデータを解析し得る解析手段を備える、請求項 6 記載のゲノム物理地図作成装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、SNOM/AFMを用いて真核生物のゲノム物理地図を作成する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

従来、一般に行われている物理地図の作成手順を以下に示す。

まず、対象生物の組織から全ゲノムDNAを抽出し、細かく断片化し、BAC (bacterial artificial chromosome) やYAC (yeast artificial chromosome) などのベクターにクローニングしてゲノムDNAライブラリーを作成する。次に、ライブラリーに含まれるクローンを何種類かの制限酵素によって切断し、切断サイトのクローン上の位置を決定して制限酵素地図を作成する。その後、各クローン間で制限酵素地図を比較し、その切断パターンの解析から隣り合うクローンを決定する(フィンガープリント法)。複数のクローンについて隣接関係を特定し、ある程度の長さの領域をカバーするクローンのグループをコンテ

10

20

30

40

50

ィグと呼ぶ。

この作業と並行して、遺伝地図を参照して、得られたコンティグを染色体上に位置付ける。マーカーのうち配列情報を有するものを利用し、その塩基配列をもとにPCRプライマーないしハイブリダイゼーションプローブを作成して、ライブラリーの中から、そのマーカーの配列を有するものを特定する。あるコンティグに含まれるクローンのひとつが、このようにして染色体上に位置づけられれば、そのコンティグそのものの染色体上の位置も明らかになる。

以上の作業を繰り返して、染色体のほぼ全域にコンティグを位置づけることができれば物理地図が完成する。

一方、近接場光プローブ顕微鏡 (Scanning Near-field Optical Microscopy、SNOM) を用いて染色体にハイブリダイズさせた蛍光標識を観察した例は、J. Microsc. 182, 40-45 (1995)やJ. Microsc. 209, 22-33 (2003)などこれまでに少数があるが、いずれも染色体上に数百から数万ヶ所存在する反復配列を対象としており、ゲノムライブラリークローンや遺伝子マーカー (原則的に染色体上に1ヶ所のみ存在) の計測は行った例はない。また、従来例の計測分解能は300nm程度と低く、本発明に必要とされる条件を満たしていない。さらに、これまでに、ハイブリダイズした蛍光シグナルの位置と染色体形状の比較解析からゲノム上の物理位置を算出するような試みはいっさい行われていない。

【0003】

【非特許文献1】J. Microsc. 182, 40-45 (1995)

【非特許文献2】J. Microsc. 209, 22-33 (2003)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

しかしながら、従来の方法では、全ゲノムDNAを抽出し、断片化およびクローニングを行って、ゲノムDNAライブラリーを作成した時点で、位置情報を喪失し、それぞれのクローンが元の染色体 (あるいはゲノム) 上のどの位置にあったかは不明になるという問題があった。そのため、上記のようにフィンガープリント法によりクローンの隣接関係を調べてつなぎあわせて、染色体上の位置を決定し直す必要があった。この作業には長期間を要し、高等動植物のような大きなゲノムサイズを持つものでは、物理地図作成に数年以上を要していた。さらに、物理地図作成の前提として、個々のクローンやコンティグを染色体上に位置づける指標として、多数のマーカーが座乗した高密度の遺伝地図も必要となる。遺伝地図作成には対象生物の連鎖解析を行わなければならないが、このためには複数世代にわたる遺伝解析が必要となるため、非常に長い期間が必要である。これまでに物理地図作成が行われたヒト、イネなどの主要動植物は、過去の数十年間の研究の蓄積により、既にかなり詳細な遺伝地図が構築されていたため問題はなかった。しかし、今後、遺伝研究がほとんど行われていない動植物の物理地図の作成を行う場合には、遺伝地図の作成からスタートする必要がある、最終的に物理地図を完成させるには数年から十年という期間が必要になる可能性がある。

このように、従来法による物理地図作成に長期間を要する理由は、ライブラリー調製時にクローンの位置情報が失われ、そのためクローンを再び染色体上に位置づけるために膨大な労力が必要され、さらに、その位置づけの参照データとして、作成に長期の研究が必要な遺伝地図が必須となるためである。

そこで、本発明は、遺伝地図を必要とせず、フィンガープリント法等の生化学的手法も用いないで、SNOMによりライブラリークローンやマーカーをパキテン期染色体上に高分解能で直接位置づけることにより、位置情報を回復し、簡便かつ短時間で物理地図を作成するゲノム物理地図作成方法及び装置を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0005】

すなわち、本発明は、真核生物のゲノム物理地図を作成する方法であって、真核生物由来のDNA断片を蛍光標識する工程、蛍光標識した該DNA断片を、該真核生物から調製した染

10

20

30

40

50

染色体上のDNAとハイブリダイゼーションさせる工程、及びハイブリダイゼーションされた蛍光標識DNAの染色体上の位置を、 $0.5\ \mu\text{m}$ 以下、例えば $1\ \text{nm} \sim 0.5\ \mu\text{m}$ の分解能で検出する工程を含む、前記ゲノム物理地図作成方法を提供する。

本発明のゲノム物理地図作成方法においては、前記検出工程を、近接場光プローブ顕微鏡を用いて行うことができる。

本発明のゲノム物理地図作成方法において、前記真核生物由来のDNA断片は、該真核生物から抽出したゲノムDNAを断片化し、断片化したゲノムDNAをクローニングベクターに挿入してクローニングすることにより作成したゲノムDNAライブラリーに含まれるクローンであってよい。

また、本発明のゲノム物理地図作成方法において、前記真核生物由来のDNA断片は、該真核生物由来の遺伝子配列、cDNA、あるいは既知のゲノム塩基配列情報により人工的に合成されたDNA、または、既知のゲノム塩基配列あるいはランダムな配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして該真核生物のゲノムDNAからPCRにより増幅したDNAであってもよい。

10

本発明のゲノム物理地図作成方法において、前記染色体は、好ましくは分裂期染色体またはパキテン期染色体である。

本発明はまた、染色体上の蛍光標識DNAの位置を $0.5\ \mu\text{m}$ 以下、例えば $1\ \text{nm} \sim 0.5\ \mu\text{m}$ の分解能で計測し得る計測手段、及び、該計測手段の位置決めを $0.5\ \mu\text{m}$ 以下、例えば $1\ \text{nm} \sim 0.5\ \mu\text{m}$ の分解能ですることが可能な位置決め手段を備える、ゲノム物理地図作成装置を提供する。

20

本発明のゲノム物理地図作成装置においては、前記計測手段が近接場光プローブ観察手段であるのが望ましい。

本発明のゲノム物理地図作成装置は、さらに、前記計測手段により得られた前記染色体上の蛍光標識DNAの位置についてのデータ及び該染色体の形状についてのデータを解析し得る解析手段を備えてよい。

【発明を実施するための最良の形態】

【0006】

以下に、本発明の実施の形態を説明する。

対象生物の組織から全ゲノムDNAを抽出し、 100kb 程度の長さに断片化し、BAC (bacterial artificial chromosome)、YAC (yeast artificial chromosome)、PAC (P1 derived artificial chromosome) などのベクターにクローニングしてゲノムDNAライブラリーを作成する。原理的には、この中に対象生物のゲノムDNAが全て含まれている。

30

対象生物から染色体を調製し、スライドガラスやカバーガラスなどの基板上に固定して、ハイブリダイゼーション用の染色体試料とする。SNOM/AFMによる位置検出の分解能を高くするためには、長軸方向に伸長したパキテン期染色体を材料にすることが好ましいが、高分解能のSNOM装置が使用可能な場合や比較的分解能が要求されない場合は、通常の分裂期染色体を用いてもよい。

ライブラリーから任意のクローンを選んで、蛍光色素による標識またはビオチンなどの化学修飾を行ってFISH (fluorescent in situ hybridization) のプローブとする。この場合、標識ないし修飾はクローンそのものを対象にしても良いし、クローンをテンプレートとしランダムプライマーを含む任意のプライマーを用いたPCR産物またはクレノウフラグメント等のDNAポリメラーゼによる伸長反応産物を対象としてもよい。

40

【0007】

前記染色体試料を熱またはアルカリ溶液などにより変性し、2本鎖DNAを1本鎖にした後、プローブを含んだ溶液中で前記プローブとハイブリダズさせる。

プローブがビオチンなどの化学修飾されている場合は、蛍光色素結合アビジンなどによる2次修飾を行い、染色体試料上にハイブリダイズされているプローブを蛍光標識する。この処理によって、染色体試料上における前記クローンに含まれる塩基配列の存在位置が蛍光標識される。

ハイブリダイゼーション処理後、SNOM装置により蛍光シグナルの位置と染色体の全体形

50

状を計測し、両者を比較解析することにより、前記クローンが、どの染色体のどこに位置するかを決定する。現状では、SNOMの一種である走査型光プローブ原子間力顕微鏡 (SNOM/AFM) の蛍光シグナルの検出精度は、約30から100nmである。一方、試料としてパキテン期染色体を使用した場合は、染色体の長軸方向に100nmの長さに含まれるDNA量は約100kbである。一般に、ゲノムDNAライブラリー作成に用いられるBACまたはYACのインサート長は100kbないし300kbであるため、SNOM/AFMを用いてBACクローンまたはYACクロンの前後関係や重なり具合などの位置関係を計測することは十分可能である。

【0008】

以上の操作を繰り返して、順次、ライブラリーに含まれるクローンを染色体上に位置づけていく。上記の例では、1回の計測で1クローンの位置づけであるが、波長の異なる計測色素を標識として用い、分光手段を有するSNOMにより計測を行えば、複数のクローンを同時に位置づけることが可能である。

10

本発明により位置づけられたクローン間の距離は、連鎖距離ではなく実際の物理的距離 (塩基長に換算可能) であり、上記操作を繰り返して全染色体のほぼ全域にクローンをまんべんなく位置づけることができれば物理地図が完成する。

上記は、BACクローンまたはYACクローンを用いた物理地図作成を例に取り説明したが、位置づけの対象 (マーカー) は、これらクローンに限られず、遺伝子、EST (expressed sequence tag)、cDNA、PCR産物など、染色体へのFISHが可能なあらゆる種類のDNAを選ぶことができる。

また、場合によっては、特定のひとつの染色体のみ、あるいはひとつの染色体の一部のみの物理地図が必要となることや、マーカー密度が低くてもよいこともあるが、そのような場合には、目的領域に必要な数のマーカーが位置づけられた時点で操作を終了すればよい。

20

以下、本発明の実施例について図に基づいて説明する。

【実施例1】

【0009】

図1は本発明による物理地図作成の手順を示したフローチャートである。ここでは、例として、ゲノムライブラリークローンを用いて物理地図を作成する方法について説明する。

まず、工程1で従来と同様の手法により、対象生物の組織から全ゲノムDNAを抽出し、これを適当なベクターにクローニングし、ライブラリーを作成する。ここでは、BACを用いた例を示したが、他のYACやPACなど一般的に利用可能なベクターであればどのようなものを用いてもよい。

30

工程2では、作成したライブラリーの中から任意にひとつまたは複数のクローンを選択し、工程3で蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 用のプローブを作成する。一般には、クローンをテンプレートとして、ランダムプライマーとクレノウフラグメントなどのDNAポリメラーゼを使用してDNA伸長反応を行い、蛍光標識塩基やビオチン修飾塩基を取り込ませた短鎖DNA (100~500塩基) を合成してプローブとする。これ以外にも、PCRによってプローブを作成したり、BACクローンそのものあるいはその切断物を標識したものをプローブとしてもよい。ひとつのクローンを選択した場合には一種類の蛍光色素により標識すればよいが、複数のクローンを選択した場合には、それぞれのクローン由来のプローブを異なる波長を持つ複数の蛍光色素によって標識し、SNOM計測時に区別ができる用にしておく必要がある。

40

一方、これらの作業と並行して、工程1'で対象生物から、必要とされる数のパキテン期染色体を調製しておく。染色体は基板上に固定する必要があるが、SNOM/AFMは蛍光を検出するため、透明でなくてはならない。通常はガラス基板を用いるが、蛍光観察が可能であれば、樹脂など他の材料であっても構わない。上述のように波長の異なる複数の蛍光色素を用いて同時に複数のクローンの位置づけも可能であるため、染色体試料の数は必ずしも位置づけるべきクローンの数と同数は必要ない。図2は、カイコ卵巣から調製したパキテン期染色体のAFM像である。パキテン期染色体は、減数分裂時に形成される染色体で、

50

長軸方向に長く伸びた形状をしている。この染色体を使用した場合には、長軸方向の1nmの距離が約1kbの塩基長に相当する。BACクローンのインサート長は約100kbため、ひとつのBACクローンはパキテン期染色体上で約100nmの領域を占めるため、SNOM/AFMの分解能(現状約30nm)で隣接したクローンの順番や重複の程度を十分計測可能になる、一方、通常の分裂期染色体を用いた場合は、塩基長に換算したときの分解能が低くなるが、必要とする物理地図上のクローンやマーカーの密度が低くてよい場合には、それでも問題はない。

次に、工程2'では、染色体試料を酢酸溶液で洗浄したり、酵素処理(プロテアーゼやRNaseなど)による処理を行う。従来の方で作成した染色体試料は、表面が夾雑物により被覆されている場合が多い。これらの夾雑物は極めて薄く、透明なため通常の光学顕微鏡による観察の支障にはならないが、SNOM/AFMによる高分解能観察を行う場合には、探針の吸着を起したり、正確な表面形状の計測ができなかったりという問題がある。そこで、このような処理により夾雑物を完全に除去し、清浄な表面を持つ染色体試料を作成する必要がある。

10

【0010】

工程4では、通常のFISH処理により、染色体試料に工程3で作成した蛍光標識プローブをハイブリダイズさせる。この操作により、工程2で選択したBACクローンが元々存在していた染色体上の位置に蛍光標識プローブが結合する。工程5で、SNOM/AFMによって蛍光標識プローブの染色体上での位置を正確に計測する。図3は、染色体上の蛍光シグナルの位置を実際にSNOM/AFMにより計測した例である。100nm以下のサイズのシグナルが検出されていることがわかる。また、蛍光シグナルと同時に、染色体全体の3次元形状データもSNOM/AFMにより取得する。染色体のDNAは1本の線状であるが、染色体の中ではタンパク質との複合体を形成し、複雑な高次構造をとっているため、染色体の幅や高さは、実際には図2に示されるように場所によって異なる。物理地図は、染色体を1本の直線と見なし、クローンをその上に塩基長を単位として位置づけていって作成する。そこで、工程6において、蛍光標識プローブの位置、即ち、クローンの存在位置を、染色体の立体構造上での位置から塩基長を単位とした物理地図上の位置へと変換する。簡易的には、たとえば単位体積あたりのDNA量を一定として、染色体のそれぞれの場所について、長軸方向の単位距離が何塩基に相当するかを換算するなどして、クローンの位置を決定する。実際には、染色体の立体形状と塩基長の関係は、生物種によって異なる可能性があるため、例えばDNAに非特異的に結合する蛍光試薬などを使用し、染色体の様々な場所の立体形状とDNA量の

20

30

関係SNOM/AFM、AFM、蛍光顕微鏡などを使って予め計測し、キャリブレーションを行っておく必要がある。

以上の工程2~6を必要とする数のクローンが物理地図上に位置づけられるまで繰り返す。物理地図に必要なクローンの数は、目的によって異なる。全ゲノムの塩基配列解読を目的とする場合は、全ゲノムをなるべく隙間なく覆うだけの数が必要となるが、染色体の一部分の解析であれば、対象領域のみがほぼ覆われるだけでよい。また、遺伝解析などの指標に用いる場合は、ゲノム全体で百から千個程度で十分な場合もある。

また、上述したのは、ゲノムライブラリーのクローンを使用した物理地図作成であるが、位置づけるのはクローンに限らず、遺伝子及びその一部、EST(expressed sequence tag)、cDNA、PCR産物、ランダムな配列を持つ任意の塩基配列など、染色体へのFISHが可能ならゆる種類のDNAを選ぶことができる。

40

【実施例2】

【0011】

次に、本発明のゲノム物理地図作成装置について説明する。

図4は、SNOM/AFM、試料位置決め機構、データ解析装置を組み合わせたゲノム物理地図作成装置の例を示したものである。図4において、透明な試料セル2は、XYZ方向に変位可能な位置決め機構3によって保持されており、その下には、対物レンズ4が配置されている。光ファイバー製探針1の先端から蛍光色素で標識されたマーカーを励起する光が照射され、試料からの蛍光は、対物レンズ4を通して集光された後、検出器5において検出される。位置決め機構3をXY方向に2次元的に走査を行うことによって、試料表面の形状

50

と蛍光像を取得し、試料上の蛍光標識を0.5 μm以下の分解能で検出することができる。光ファイバー製探針1の先端の光照射用の穴径は数nm以上数百nm以下、位置決め機構3の動作精度は数オングストローム以上数nm以下である。検出された蛍光標識の信号は、制御装置および信号解析装置を兼ねたコントローラ6により、蛍光標識の染色体上での位置と染色体の形状データを解析し、マーカーの染色体上での相対位置関係または絶対位置を決定して、ゲノム物理地図を作成する。

図4は、途中で曲がったAFM方式の光ファイバー製探針について示したが、ストレートタイプの光ファイバー製探針を用いるシアーフォース方式も適用可能である。また、図4は、光ファイバー製探針によって励起されたマーカーの蛍光を、透明な試料セル2を通して検出する例を示したが、試料から励起された蛍光を、光ファイバー製探針自体で検出する反射モードや光ファイバー製探針側に設置した対物レンズで集光するイルミネーション・コレクションモードも適用可能である。

また、移動距離の大きなXY位置決め機構を設け、試料面を移動させることによって、数百μm四方以上の大きな範囲を走査することが可能になり、同一試料基板上の多数の試料を同時に解析することも可能である。

検出器5は、同時に多数の蛍光色素を検出するため、特定の波長を順次透過または遮断するためのフィルターセットや高感度の分光装置と組み合わせることもできる。

【産業上の利用可能性】

【0012】

本発明によれば、従来法に比べ、飛躍的に短期間かつ省労力で物理地図を作成することが可能になり、ゲノム塩基配列の解読、遺伝子機能解析などの基礎研究の加速化から、有用遺伝子の単離や分子育種などの遺伝子工学の産業上への利用促進まで、広く貢献が期待できる。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】本発明の操作手順を示すフローチャートである。

【図2】カイコから調製されたパキテン期染色体のAFM像である。

【図3】蛍光in situハイブリダイゼーション処理した染色体上の蛍光シグナルの位置をSNOM/AFMにより計測した例である。位置分解能100 nm以下で蛍光が検出されている。

【図4】本発明のゲノム物理地図作成装置を示す模式図である。

【符号の説明】

【0014】

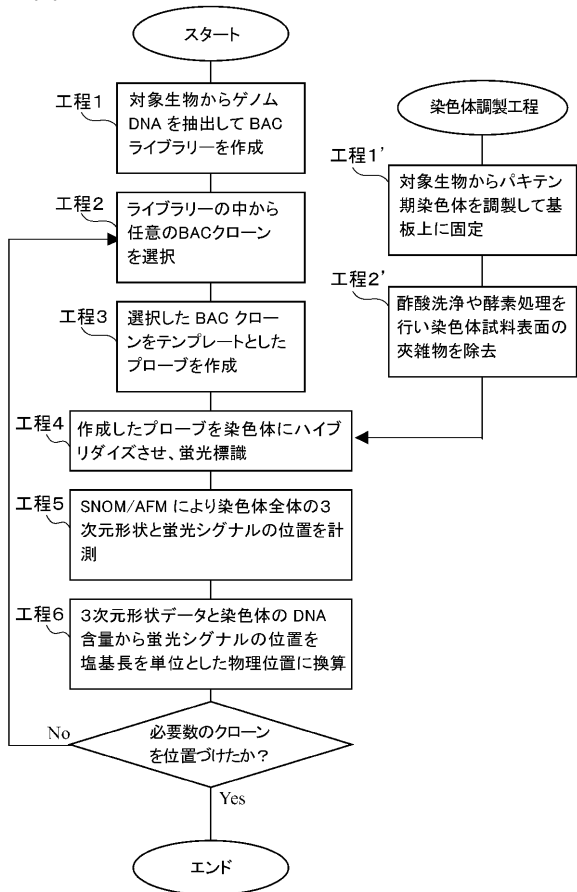
- 1 光ファイバー製探針
- 2 試料セル
- 3 位置決め機構
- 4 対物レンズ
- 5 検出器
- 6 コントローラ

10

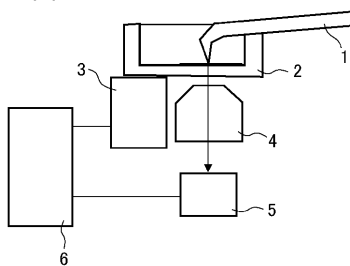
20

30

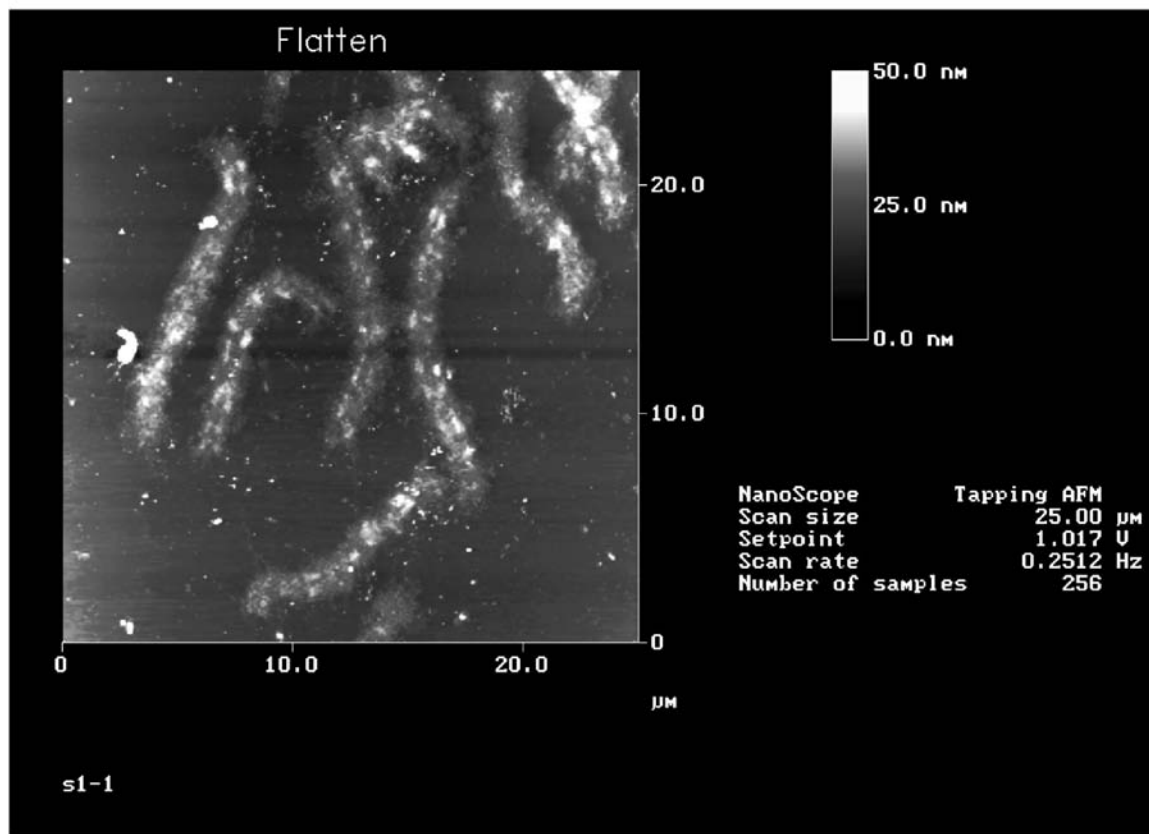
【 図 1 】



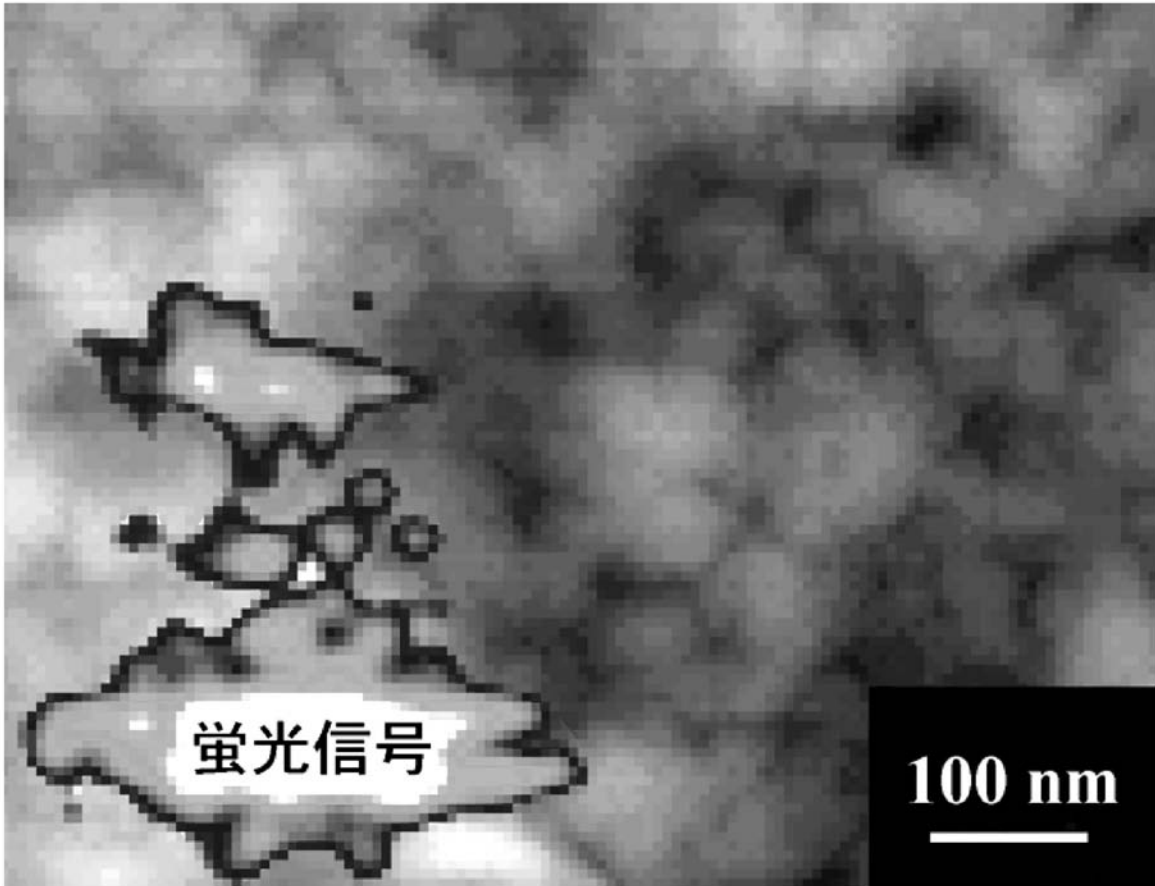
【 図 4 】



【 図 2 】



【图 3】



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

(74)代理人 100074228

弁理士 今城 俊夫

(74)代理人 100084009

弁理士 小川 信夫

(74)代理人 100082821

弁理士 村社 厚夫

(74)代理人 100086771

弁理士 西島 孝喜

(74)代理人 100084663

弁理士 箱田 篤

(72)発明者 大谷 敏郎

千葉県我孫子市我孫子 1 4 4 - 3 - 9 0 6

(72)発明者 山本 公子

茨城県つくば市高野台 2 - 1 3 - 1 0

(72)発明者 杉山 滋

茨城県つくば市高野台 2 - 1 3 - 1 0

F ターム(参考) 2G045 AA35 BB50 BB51 DA13 FA11 FA16 FB02 FB12 GC15 JA01
 JA07
 2G054 CA22 CE02 EA03 FA16 FA17
 4B024 AA11 AA19 AA20 CA01 CA09 CA11 CA20 HA11 HA13 HA14
 HA19 HA20
 4B029 AA07 AA23 BB20 CC03 CC08 FA15
 4B063 QA13 QA20 QQ07 QQ08 QQ09 QQ20 QQ42 QR08 QR32 QR35
 QR40 QR42 QR56 QR62 QS20 QS25 QS34 QS36 QS39 QX01
 QX02