

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4489347号
(P4489347)

(45) 発行日 平成22年6月23日 (2010. 6. 23)

(24) 登録日 平成22年4月9日 (2010. 4. 9)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)

C 1 2 Q 1/68 Z N A A

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 A

G O 1 N 33/53 (2006. 01)

G O 1 N 33/53 M

G O 1 N 33/566 (2006. 01)

G O 1 N 33/566

請求項の数 23 (全 24 頁)

(21) 出願番号 特願2002-504676 (P2002-504676)
 (86) (22) 出願日 平成13年6月19日 (2001. 6. 19)
 (65) 公表番号 特表2004-500892 (P2004-500892A)
 (43) 公表日 平成16年1月15日 (2004. 1. 15)
 (86) 国際出願番号 PCT/DE2001/002274
 (87) 国際公開番号 W02001/098528
 (87) 国際公開日 平成13年12月27日 (2001. 12. 27)
 審査請求日 平成18年4月20日 (2006. 4. 20)
 (31) 優先権主張番号 100 29 915.6
 (32) 優先日 平成12年6月19日 (2000. 6. 19)
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

(73) 特許権者 500247105
 エビゲノミクス アーゲー
 ドイツ国、1 0 1 7 8 ベルリン、クライ
 ネ プレジデントエンシュトラッセ 1
 (74) 代理人 100093735
 弁理士 荒井 鐘司
 (74) 代理人 100105429
 弁理士 河野 尚孝
 (74) 代理人 100108143
 弁理士 嶋崎 英一郎
 (72) 発明者 ベルリン、クルト
 ドイツ国、1 4 5 3 2 スターンスドルフ
 、マリーエンケーフェルヴェーク 4

審査官 飯室 里美

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 シトシン-メチル化の検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記の作業過程、すなわち、

a) ゲノム DNA 試料を濃度領域 0 . 1 ~ 6 モル / l の重亜硫酸塩 (= 亜硫酸水素塩、二亜硫酸塩) 溶液でインキュベートすることであって、その場合、DNA 変性溶媒および少なくとも 1 種類のラジカル捕捉剤を添加するが、該変性溶媒は下記の化合物または化合物種属のリスト、

ポリエチレングリコールジアルキルエーテル、ジオキサンおよび置換された誘導体、アセトニトリル、第 1 アルコール、第 2 アルコール、第 3 アルコール、ジエチレングリコールジアルキルエーテル、トリエチレングリコールジアルキルエーテル、テトラエチレングリコールジアルキルエーテル、ペンタエチレングリコールジアルキルエーテル、ヘキサエチレングリコールジアルキルエーテル、DMSO (ジメチルスルフォキシド) および THF (テトラヒドロフラン) から選択し、

b) 処理した前記 DNA 試料を水または水溶液で希釈することと、

c) 前記 DNA 試料をポリメラーゼ反応で増幅することと、

d) 過程 a) の前記処理によってシーケンスが前記ゲノム DNA 試料に比べてどの程度変化したかを検出し、前記ゲノム DNA 試料における少なくとも 1 つの部位のメチル化度を推定することと、

の各過程を実施することを特徴とする、DNA におけるシトシンのメチル化の検出のための方法。

【請求項 2】

前記ラジカル捕捉剤が下記の化合物グループ、すなわち、

ジヒドロキシベンジン、トリヒドロキシベンジン、緑茶エキス、ピクノジェノール、ギンクゴピロバエキス (EGb 761、登録商標)、様々な果物、野菜のエキスからのフラボノイド混合物 (GNLD社製品)、バイオ・ノーマライザー (Sun-O社、登録商標)、DPPH (1, 1 - ジフェニル - 2 - ピクリルヒドラジル)、NDGA (ノルジヒドログアヤレチック酸)、トロロックス (6 - ヒドロキシ - 2, 5, 7, 8 - テトラメチルクロマン - 2 - カルボン酸)、2, 6 - ジ - ターシャリー - ブチルフェノール、4 - メチル - ジ - ターシャリー - ブチルフェノール、4 - メトキシ - ジ - ターシャリー - ブチルフェノール、2, 6 - ジ - ターシャリー - ブチル - p - クレゾール、3, 4 - ジヒドロキシ安息香酸、ビタミンC、ビタミンE、ビタミンQ、ヒドロキノン、ウビキノン、リグナン、ヒドロキシテルペン、フラボノイド、クルクミン、タンニン、レチン酸化合物、Ge - 132 ビスベータカルボキシエチル - ゲルマニウム - セスキオキシド、スーパーオキシド - ジスムターゼ (SOD)、スーパーオキシド - カタラーゼ、アルファ - ナフトフラボン、ジ (2 - メチル - 5 - クロロフェニル) ジチオネートおよびCu (II) 誘導体、メベンダゾール、CS (クロロフォルム溶性) アルカロイドエキス、4 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 1, 2 ナフトキノン、4 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 1, 2 ナフトキノン、4 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 1, 2 ナフトキノン、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ブロム - 1, 4 ナフトキノン、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - クロル - 1, 4 ナフトキノン、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 1, 4 ナフトキノン、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 1, 4 ナフトキノン、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 1, 4 ナフトキノン、4 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 2 アンスラキノン、4 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 2 アンスラキノン、4 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 5, 5, 8, 8 テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 2 アンスラキノン、3 - ブロム - 4 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 5, 5, 8, 8 テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 2 アンスラキノン、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - オキソシクロヘキサ - 2, 5 - ジエニリデン) インダン - 1, 3 - ジオン、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - オキソシクロヘキサ - 2, 5 - ジエニリデン) 3, 4 - エポキシ - 3 - ヒドロキシ - 4 - メトキシ - 3, 4 - ジヒドロ - 2 H - ナフタリン - 1 - オン、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - オキソシクロヘキサ - 2, 5 - ジエニリデン) 3, 4 - エポキシ - 3, 4 - ジメトキシ - 3, 4 - ジヒドロ - 2 H - ナフタリン - 1 - オン、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - インダン - 1 - オン、3, 3 - ビ - [2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - インデン - 1 - オン] - 3 イル、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ブロム - 5, 5, 8, 8 テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 4 アンスラキノン、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - クロル - 5, 5, 8, 8 テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 4 アンスラキノン、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ 5, 5, 8, 8 テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 4 アンスラキノン、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5, 5, 8, 8 テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 4 アンスラキノン、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒド

10

20

30

40

50

ロキシフェニル) - 5, 5, 8, 8テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 4アンスラキノン、2 - ブロム - 3 - (3 - ブロム - 5 - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 5, 5, 8, 8テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 4アンスラキノン、2 - ブロム - 3 - (3, 5 - ジブロム - 4 - ヒドロキシフェニル) - 5, 5, 8, 8テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 4アンスラキノン、2 - ブロム - 3 - (3 - ブロム - 5 - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5, 5, 8, 8テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 4アンスラキノン、3 - ブロム - 2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 1, 4アンスラキノン、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 1, 4アンスラキノン、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 1, 4アンスラキノン、5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロナフタリン - 1, 3ジオール、3 - メトキシ - 5, 5, 8, 8テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロナフタリン - 1 - オール、4 - (3 - クロル - 5, 5, 8, 8テトラメチル - 1, 4 - ジオキソ - 1, 4, 5, 6, 7, 8 - ヘキサヒドロアンスラセン - 2 - イル) - 安息香酸、メチル - 4 - (3 - クロル - 5, 5, 8, 8テトラメチル - 1, 4 - ジオキソ 1, 4, 5, 6, 7, 8 - ヘキサヒドロアンスラセン - 2 - イル) 安息香酸塩、4 - (3 - ヒドロキシ - 1, 4 - ジオキソ - 1, 4 - ジヒドロナフタリン - 2 - イル) 安息香酸、メチル - (3 - メトキシ - 1, 4 - ジオキソ - 1, 4 - ジヒドロナフタリン - 2 - イル) 安息香酸、4 - (3 - ヒドロキシ - 5, 5, 8, 8テトラメチル - 1, 4 - ジオキソ 1, 4, 5, 6, 7, 8 - ヘキサヒドロアンスラセン - 2 - イル) 安息香酸、メチル - 4 - (3 - ヒドロキシ - 1, 4 - ジオキソ - 1, 4 - ジヒドロナフタリン - 2 - イル - アゾ) 安息香酸塩、4 - (3 - ヒドロキシ - 5, 5, 8, 8テトラメチル - 1, 4 - ジオキソ - 1, 4, 5, 6, 7, 8 - ヘキサヒドロアンスラセン - 2 - イル - アゾ) 安息香酸、3 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - オキソシクロヘキサ - 2, 5 - ジエニリデン) 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロシクロペンタ [b] ナフタリン - 1, 2 - ジオン、3 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - オキソシクロヘキサ - 2, 5 - ジエニリデン) 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロアンスラセン - 3 H 1, 2, 4 - トリオン、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 5, 8ジメチル - 1, 4 - ナフトキノン、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 6, 7 - ジメチル - 1, 4 - ナフトキノン、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 5メチル - 1, 4 - ナフトキノン、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - メトキシ - 5メチル - 1, 4 - ナフトキノン、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 6メチル - 1, 4 - ナフトキノン、3 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - メトキシ - 6メチル - 1, 4 - ナフトキノン、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 5, 6ジメチル - 1, 4 - ナフトキノン、3 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - メトキシ - 5, 6ジメチル - 1, 4 - ナフトキノン、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 5, 7ジメチル - 1, 4 - ナフトキノン、3 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - メトキシ - 5, 7ジメチル - 1, 4 - ナフトキノン、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - エチルチオ - 5メチル - 1, 4 - ナフトキノン、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - エチルチオ - 6メチル - 1, 4 - ナフトキノン、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5, 8ジメチル - 1, 4 - ナフトキノン、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 6, 7ジメチル - 1, 4 - ナフトキノン、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5メチル - 1, 4 -

ナフトキノン、3 - (3 , 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - ヒドロキシ - 5 メチル - 1 , 4 - ナフトキノン、2 - (3 , 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 6 メチル - 1 , 4 - ナフトキノン、3 - (3 , 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - ヒドロキシ - 6 メチル - 1 , 4 - ナフトキノン、2 - (3 , 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5 , 6 ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノン、2 - (3 - プロム - 5 - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5 , 6 ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノン、3 - (3 , 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - ヒドロキシ - 5 , 6 ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノン、2 - (3 , 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5 , 7 ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノン、3 - (3 , 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - ヒドロキシ - 5 , 7 ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノンのグループから選択されていることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記ゲノム DNA 試料を前記処理の前に熱変性させることを特徴とする、請求項 1 から 2 のうちのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4】

前記過程 c) を下記の 2 つの部分過程、すなわち、

a) 請求項 1 に従って前処理した DNA 試料に対して非特異的にハイブリッド化するため、PCR 過程で複数の増幅体を生み出す、シークエンスの異なる少なくとも 1 組のプライマー対による PCR 予備増幅、

20

b) 予備増幅で得られた産物に対して行う、請求項 1 に従って前処理した前記 DNA 試料の断片 [(+) 鎖または (-) 鎖] にそれぞれ同一または相補的であって、増幅対象の DNA を特異的にハイブリッド化する、シークエンスの異なるプライマーによる PCR 増幅、

の過程に分けて行うことを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

複数の DNA 断片について、前記増幅を反応容器中で行うことを特徴とする、請求項 1 から 4 のうちのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

30

前記ポリメラーゼ反応に耐熱性の DNA ポリメラーゼを使用することを特徴とする、請求項 1 から 5 のうちのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

請求項 1 に記載の過程 c) の前に DNA の脱スルホン化を行うことを特徴とする、請求項 1 から 6 のうちのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前処理した前記 DNA の検出のため、前記 PCR 産物をオリゴヌクレオチドのアレー上でハイブリッド化させ、続いて次の前記部分過程、すなわち、

a) 増幅させた前記ゲノム DNA を、前記アレー上に固定された少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドに対して複製体の形成下でハイブリッド化することであって、その場合、ハイブリッド化した前記オリゴヌクレオチドはその 3' 末端により直接、または 10 塩基までの距離を置いて、ゲノム DNA 試料におけるそのメチル化についての分析対象であるポジションと境を接しているものとし、

40

b) n 個の公知シークエンスを持つ前記アレー上に固定させた前記オリゴヌクレオチドをポリメラーゼにより少なくともヌクレオチド 1 個分延長させることであって、その場合前記ヌクレオチドは検証可能なマーキングが付けられ、また、前記延長はゲノム DNA 試料におけるそれぞれのシトシンのメチル化状態に影響されるものとする、

両部分過程を実施することを特徴とする、請求項 1 から 7 のうちのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

50

前処理した前記DNAの検出のため、前記PCR産物をオリゴヌクレオチドのアレー上でハイブリッド化させ、続いて次の前記部分過程、すなわち、

(a) アレー上に固定された1組のオリゴヌクレオチドを、増幅させたゲノムDNAに対してハイブリッド化して二重鎖を形成することであって、その場合、前記アレーに固定されたこの1組のオリゴヌクレオチドは2種類の種属から成っていて、ハイブリッド化された第1種属のオリゴヌクレオチドがその3'末端により直接、または10塩基までの距離を置いて、ゲノムDNA試料におけるそのメチル化についての分析対象であるポジションと境を接しており、また、第2種属の第2オリゴヌクレオチドは目標分子の第2領域に対してハイブリッド化し、その結果、前記第2種属のオリゴヌクレオチドの5'末端は、単一ヌクレオチドまたは10ヌクレオチドまでの大きさの間隙によって、前記選択ポジションのその位置で第1種ハイブリッド化オリゴヌクレオチドの3'末端から分離されているものとし、

10

(b) n個の公知シーケンスを持つ前記第1種属のオリゴヌクレオチドをポリメラーゼにより、多くとも、前記第1種属のオリゴヌクレオチドの前記3'末端と前記第2種属のオリゴヌクレオチドの前記5'末端との間に存在するのと同数のヌクレオチド分だけ延長させることであって、その場合、前記延長は前記ゲノムDNA試料におけるそれぞれのシトシンのメチル化状態に影響されるものとし、

(c) 前記オリゴヌクレオチドをリガーゼの存在下でインキュベートすることであって、その場合、前記ポリメラーゼ反応によって延長された前記境をなす第1種属のオリゴヌクレオチドと前記第2種属のオリゴヌクレオチドとを結合させ、それによって、前過程で前記第1種属のオリゴヌクレオチドの延長が、延長された前記オリゴヌクレオチドに備わった3'ヒドロキシ官能を持つ3'末端が直接前記第2種属の5'末端と境を接するように行われる限りは連結産物が得られるものとする、

20

部分過程を実施することを特徴とする、請求項1から8のうちのいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

使用した前記第1種属のオリゴヌクレオチドおよび/または使用した前記第2種属のオリゴヌクレオチドが、塩基T、AおよびCまたは塩基T、AおよびGだけを含んでいることを特徴とする、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

前処理した前記DNAの検出のため、前記PCR産物をオリゴヌクレオチドのアレー上でハイブリッド化させ、続いて次の前記部分過程、すなわち、

30

(a) 増幅されたゲノムDNAをn個の公知シーケンスを持つ少なくとも1つのオリゴヌクレオチドに対してハイブリッド化して二重鎖を形成することであって、その場合、ハイブリッド化された前記オリゴヌクレオチドは、その3'末端により、前記ゲノムDNA試料におけるそのメチル化についての分析対象であるポジションに対してハイブリッド化をなすものとし、

(b) 前記オリゴヌクレオチドが、予めその3'末端により、誤った塩基対合なく分析対象である前記ポジションに対してハイブリッド化をなす限り、そのオリゴヌクレオチドをポリメラーゼにより少なくともヌクレオチド1個分延長させることであって、その場合少なくとも1つのヌクレオチドは検証可能なマーキングが付けられ、また、前記延長は前記ゲノムDNA試料におけるそれぞれのシトシンのメチル化状態に影響されるものとする、

40

部分過程を実施することを特徴とする、請求項1～7のうちのいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

検出のため、前記のPCR産物および/または延長産物および/または連結産物に検証可能なマーキングを施すことを特徴とする、請求項1から11のうちのいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

50

前記マーキングが蛍光マーキングであることを特徴とする、請求項 1 から 12 のうちのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

前記マーキングが放射性核種であることを特徴とする、請求項 1 から 13 のうちのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

ヌクレオチドの前記マーキングが、質量分光計で検出できる分解可能な質量マーキングであることを特徴とする、請求項 1 ～ 12 のうちのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記の PCR 産物および / または延長産物および / または連結産物がすべて質量分光計で検出され、それらの質量によって明確に特徴付けされていることを特徴とする、請求項 1 ～ 12 のうちのいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 17】

前記の PCR 産物および / または延長産物および / または連結産物の断片がそれぞれ質量分光計で検出されることを特徴とする、請求項 1 ～ 12 のうちのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

前記の PCR 産物および / または延長産物および / または連結産物の前記断片が、単一または複数のエキソヌクレアーゼまたはエンドヌクレアーゼによる消化を通して生成されることを特徴とする、請求項 17 に記載の方法。

20

【請求項 19】

質量分光計による検出感度の改善のため、生成された前記断片に正または負の実効電荷を個別に付与することを特徴とする、請求項 17 および 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記の PCR 産物および / または延長産物および / または連結産物を、マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分光分析法 (MALDI-TOF) またはエレクトロスプレー質量分光分析法によって検出および視覚表示することを特徴とする、請求項 1 から 19 のうちのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

前記ゲノム DNA が DNA 試料から得られ、但し、DNA 源としては、細胞株、血液、痰、便、尿、脳脊髄液、パラフィンに埋め込まれた、目、腸、腎臓、脳、心臓、前立腺、肺、胸または肝臓の組織、組織学上の対象物担体およびこれらによる可能なすべての組み合わせが含まれる、請求項 1 から 20 のうちのいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 22】

細胞のタイプまたは組織の区別、あるいは細胞区分の研究を目的とする、請求項 1 から 21 のうちのいずれか一項に記載された方法の使用。

【請求項 23】

重亜硫酸塩含有試薬、変性溶媒、ラジカル捕捉剤、増幅体製造用プライマーおよび請求項 1 ～ 20 のうちのいずれか一項に記載された分析法の実施のための手引書からなるキットであって、前記変性溶媒が下記の化合物または化合物種属のリスト、すなわち、

40

ポリエチレングリコールジアルキルエーテル、ジオキサンおよび置換された誘導体、尿素および誘導体、アセトニトリル、第 1 アルコール、第 2 アルコール、第 3 アルコール、ジエチレングリコールジアルキルエーテル、トリエチレングリコールジアルキルエーテル、テトラエチレングリコールジアルキルエーテル、ペンタエチレングリコールジアルキルエーテル、ヘキサエチレングリコールジアルキルエーテル、DMSO および THF

のリストから選択されているキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、DNA 内のシトシンメチル化の検出方法に関する。

【0002】

50

近年の方法論的開発により分子生物学においてよく研究されている観察レベルは、遺伝子自体と、この遺伝子のRNAへの翻訳と、そこから生ずるタンパク質である。個体の発現の経過の中でいつ、どの遺伝子がスイッチを入れられ、特定の細胞及び組織内の特定の遺伝子の活性及び阻害がどのように制御されるかは、遺伝子もしくはゲノムのメチル化の規模と特性によって相関関係をつけることができる。その限りにおいて、病源体の状態が個々の遺伝子又はゲノムの変化したメチル化パターンに現れる。

【0003】

5 - メチルシトシンは、真核細胞のDNA内で最も頻繁に共有結合で修飾される塩基である。この塩基は、例えば転写の調節、遺伝子刷込み及び腫瘍形成においてある役割を果たしている。従って、遺伝子情報の構成要素としての5 - メチルシトシンの同定が非常に重要である。ところが、5 - メチルシトシン位置は、5 - メチルシトシンがシトシンと同じ塩基対挙動を有するため、配列決定によって同定することができない。さらに、PCR増幅において5 - メチルシトシンを有する後成情報が完全に失われてしまう。

10

【0004】

比較的新規の、この間に頻繁に適用されている5 - メチルシトシン上のDNAの調査方法は、シトシンと重亜硫酸塩の特異的反応に基づき、それに続くアルカリ性加水分解によって、ウラシルの塩基対挙動でチミジンに相当するウラシルに転換される。それに対し、5 - メチルシトシンは前記条件下に修飾されない。それにより原初のDNAは、原初にそのハイブリッド形成挙動によってシトシンから区別できないメチルシトシンが、今や「常法の」分子生物学の技術によって唯一残留するシトシンとして、例えば増幅及びハイブリッド形成又は配列決定によって検出できるように転換される。これらの技術は全て現在全面的に利用される塩基対に基づく。感受性に関する先行技術は、被検DNAをアガロース・マトリックス内に封じ込める方法によって定義され、それによりDNAの拡散及び復元（重亜硫酸塩は一本鎖DNAにのみ反応する）を妨害し、全ての沈降ステップ及び洗浄ステップが迅速な透析に置換される（Olek, A.ら、Nucleic Acids Res. 1996, 24, 5064 - 5066）。この方法によって個々の細胞を調査することができ、この方法の可能性が具体的に説明されている。確かに、従来個々の領域のみが約3000塩基対長まで調査されているが、可能なメチル化解析の数千にわたる細胞の全体的な調査は不可能である。しかし、この方法も少ないサンプル量からなる非常に小さいフラグメントを確実に解析することができない。これはマトリックスによる拡散防止にも関わらず失われる。

20

30

【0005】

5 - メチルシトシンを検出する別の公知の可能性に関する概要は、次の概要論文から読み取ることができる：Rein, T., DePamphilis, M. L., Zorbas, H., Nucleic Acids Res. 1998, 26, 2255。

【0006】

重亜硫酸塩技術は、従来幾つかの例外（例えばZechnick, M.ら、Eur. J. Hum. Gen. 1997, 5, 94 - 98）を除き研究の中でのみ使用されている。しかし、常に既知の遺伝子の短い特異的部分を重亜硫酸塩処理によって増幅し、完全に配列決定（Olek, A.及びWalter, J., Nat. Genet. 1997, 17, 275 - 276）するか、又は個々のシトシン位置を「プライマー伸長反応」（Primer-Extension-Reaktion）（Gonzalgo, M. L.及びJones, P. A., Nucleic Acids Res. 1997, 25, 2529 - 2531, WO-Patent 9500669）によって、又は酵素切断（Xiong, Z.及びLaird, P. W., Nucleic Acids Res. 1997, 25, 2532 - 2534）によって検出されている。特に、ハイブリッド形成による検出も記載されている（Olekら、WO 9928498）。

40

【0007】

50

個々の遺伝子におけるメチル化検出のための重亜硫酸塩技術の適用を取り上げているその他の出版物は次のとおりである：Xiong, Z. 及び Laird, P. W. (1997), Nucl. Acids Res. 25, 2532; Gonzalgo, M. L. 及び Jones, P. A. (1997), Nucl. Acids Res. 25, 2529; Grigg, S. 及び Clark, S. (1994), Bioassays 16, 431; Zeschnek, M. 及び Teil, R. (1994), Nucl. Acids Res. 22, 695; Martin, V. (1995), Gene 157, 261; WO 9746705、WO 9515373 及び WO 45560.

10

【0008】

オリゴマー配列の製造における先行技術に関する展望は、1999年1月に発行された自然発生学特別号 (Nature Genetics Supplement, Volume 21, January 1999) から、そこで引用されている文献及び低減された非特異的バックグラウンド信号によるオリゴヌクレオチドのような標的分子のための固体担体の製造方法に関する米国特許第5994065号から読み取ることができる。

【0009】

不動態DNA配列の走査のために、多くは蛍光標識プローブが使用されている。蛍光標識に特に好適なのは、各プローブの5' OHにCy3及びCy5色素の簡単な取り込みである。ハイブリッドプローブの蛍光の検出は、例えば共焦点顕微鏡を介して行われる。色素Cy3及びCy5は、その他の多くの色素と並んで商業的に入手することができる。

20

【0010】

マトリックス助レーザー脱着/イオン化質量分析法 (MALDI-TOF) は、生体分子を解析するための非常に高性能の開発である (Karas, M. 及び Hillenkamp, F. (1988), Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons. Anal. Chem. 60: 2299-2301)。解析体が吸光マトリックス内へ埋め込まれる。短レーザーパルスによってマトリックスが蒸発され、解析体分子がこのようにフラグメント化されずに気相中へ輸送される。マトリックス分子との衝突によって、解析体のイオン化が達成される。印加した電圧が無磁界の飛行管内へイオンを加速する。前記イオンの質量が異なるために、イオンが様々な強さで加速される。より小さいイオンは、より大きいイオンよりも速く検出器に到達する。

30

【0011】

MALDI-TOF分光法は、ペプチド類とタンパク質類の解析に非常に良く適している。核酸の解析は多少困難である (Gut, I. G. 及び Beck, S. (1995), DNA and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. Molecular Biology: Current Innovations and Future Trends 1: 147-157)。核酸の場合は、感受性がペプチドよりも約100倍悪くなり、フラグメントサイズの増加とともに過度に減少する。多量に負に帯電したバックボーンを有する核酸の場合、マトリックスによるイオン化プロセスは本質的に非効率である。MALDI-TOF分光法の場合、マトリックスの選択が顕著に重要な役割を果たす。ペプチド類の脱着については、非常に微細な結晶化を生じる幾つかの非常に高性能のマトリックス類が見い出されている。DNAの場合は、確かにこの間に幾つかの興味をひくマトリックス類が存在するが、それによって感受性の差異は縮小されなかった。この感受性の差異は、DNAがペプチドに類似するように、前記DNAが化学的に修飾されることによって縮小させることができる。通常のバックボーンのリン酸塩がチオリン酸塩と置換されたホスホロチオエート核酸は、簡単なアルキル置換化学によって中性電荷のDNAに転換することができる (Gut, I. G. 及び Beck, S.

40

50

(1995), A procedure for selective DNA alkylation and detection by mass spectrometry. Nucleic Acids Res. 23: 1367-1373)。この修飾DNAへの「電荷標識」(charge tags)のカップリングは、総量がペプチドの場合で見い出されるものと同じ量分の感受性の向上で生じる。charge tagging のもう1つの長所は、非修飾基質の検出を非常に困難にする不純物に対する解析の安定性が向上することである。

【0012】

ゲノムDNAは、細胞 - 、組織 - 又はその他の実験プローブのDNAから標準方法で得られる。この標準方法は、「フリッチ及びマニアティス編、分子クローニング：実験マニュアル、1989年」(Fritsch und Maniatis eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989)のような参考文献に見い出される。

10

【0013】

尿素は、ゲノムDNA内の5 - メチルシトシンの配列決定前の重亜硫酸塩処理の効率を改善する(Paulin R, Grigg GW, Davey MW, Piper AA, (1998), Nucleic Acids Res. 26: 5009 - 5010)。

【0014】

従って、本発明の課題は、先行技術の欠点を克服するDNA内のシトシン - メチル化の検出方法を提供することである。

20

【0015】

この課題は、DNA内のシトシン - メチル化の検出方法が提供されるものにおいて、次の作業ステップが実施されることによって解決される：

a) ゲノムDNAプローブが濃度範囲0.1 mol/l及び6 mol/lの間で重亜硫酸塩(=亜硫酸水素、二亜硫化物)の溶液でインキュベートされるものにおいて、変性試薬及び/又は溶剤ならびに少なくとも1種の遊離基捕捉剤が存在する作業ステップ。

b) 処理DNAプローブが水又は水溶液で希釈される作業ステップ。

c) DNAプローブがポリメラーゼ反応で増幅される作業ステップ。

d) ステップa)による処理によって配列がゲノムDNAプローブに対してどの程度まで変化したかが検出され、かつゲノムDNAプローブ内の少なくとも1個の座のメチル化状態を推論する作業ステップ。

30

【0016】

本発明にしたがって、この場合に変性試薬及び/又は溶剤が次の化合物群又は化合物類の目録から選択されていることが有利である：

ポリエチレングリコールジアルキルエーテル、ジオキサン及び置換誘導体、尿素又は誘導体、アセトニトリル、第1級アルコール、第2級アルコール、第3級アルコール、ジエチレングリコールジアルキルエーテル、トリエチレングリコールジアルキルエーテル、テトラエチレングリコール - ジアルキルエーテル、ペンタエチレングリコールジアルキルエーテル、ヘキサエチレングリコールジアルキルエーテル、DMSO、THF。

40

【0017】

さらに、この場合に遊離基捕捉剤が次の化合物群から選択されていることが有利である：ジ - 、トリヒドロキシベンゼン、緑茶エキス(green tea extract)、ピクノゲノール(pine bark extract)、銀杏二葉エキス(EGb761)、種々の果実エキス及び野菜エキスのフラボノイド混合物(GNLD)、バイオノーマライザ(Sun-O社)、DPPH(1,1 - ジフェニル - 2 - ピクリルヒドラジル)、NDGA(ノルジヒドログアヤレート酸)、トロロクス(6 - ヒドロキシ - 2, 5, 7, 8 - テトラメチルクロマン - 2 - カルボン酸)、2, 6 - ジ - tert - ブチルフェノール、4 - メチル - ジ - tert - ブチルフェノール、4 - メトキシ - ジ - tert - ブチルフェノール、2, 6 - ジ - tert - ブチル - p - クレゾール、3, 4 - ジヒドロキ

50

シ安息香酸、ビタミンC、ビタミンE、ビタミンQ、ヒドロキノン、ウビキノン、リグナン、ヒドロキシテルペン、フラボノイド、クルクミン、タンニン、レチン酸化合物、Ge-132ビスベータカルボキシエチル-ゲルマニウム-セスキオキシド、過酸化ジスムターゼ(SOD)、過酸化カタラーゼ、アルファ-ナフトフラボン、ジ(2-メチル-5-クロロフェニル)ジチオネート及びCu(II)誘導体、メベンダゾール、CS(クロロホルム溶解性)アルカロイド-エクス、

4-(3,5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-3-ヒドロキシ-1,2-ナフトキノ、

4-(3,5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-3-メトキシ-1,2-ナフトキノ、

4-(3,5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-1,2-ナフトキノ、

2-(3,5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-3-ブロム-1,4-ナフトキノ、

2-(3,5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-3-クロル-1,4-ナフトキノ、

2-(3,5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-3-メトキシ-1,4-ナフトキノ、

2-(3,5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-3-ヒドロキシ-1,4-ナフトキノ、

2-(3,5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-1,4-ナフトキノ、

4-(3,5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-3-ヒドロキシ-5,5,8,8-テトラメチル-5,6,7,8-テトラヒドロ-1,2-アントラキノ

、

4-(3,5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-3-メトキシ-5,5,8,8-テトラメチル-5,6,7,8-テトラヒドロ-1,2-アントラキノ、

4-(3,5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-5,5,8,8-テトラメチル-5,6,7,8-テトラヒドロ-1,2-アントラキノ、

3-ブロム-4-(3,5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-5,5,8,8-テトラメチル-5,6,7,8-テトラヒドロ-1,2-アントラキノ、

2-(3,5-ジ-tert-ブチル-4-オキソシクロヘキサ-2,5-ジエニリデン)-インダン-1,3-ジオン、

2-(3,5-ジ-tert-ブチル-4-オキソシクロヘキサ-2,5-ジエニリデン)-3,4-エポキシ-3-ヒドロキシ-4-メトキシ-3,4-ジヒドロ-2H-ナフタリン-1-オン、

2-(3,5-ジ-tert-ブチル-4-オキソシクロヘキサ-2,5-ジエニリデン)-3,4-エポキシ-3,4-ジメトキシ-3,4-ジヒドロ-2H-ナフタリン-1-オン、

2-(3,5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-インダン-1-オン、3,3-ビ-[2-(3,5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-インデン-1-オン]-3-イル、

2-(3,5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-3-ブロム-5,5,8,8-テトラメチル-5,6,7,8-テトラヒドロ-1,4-アントラキノ、

2-(3,5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-3-クロル-5,5,8,8-テトラメチル-5,6,7,8-テトラヒドロ-1,4-アントラキノ、

2-(3,5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-3-メトキシ-5,5,8,8-テトラメチル-5,6,7,8-テトラヒドロ-1,4-アントラキノ、

2-(3,5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-3-ヒドロキシ-5,5,8,8-テトラメチル-5,6,7,8-テトラヒドロ-1,4-アントラキノ

10

20

30

40

50

- 、
 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 5 , 5 , 8 , 8 - テ
 トラメチル - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - 1 , 4 - アントラキノン、
 2 - ブロム - 3 - (3 - ブロム - 5 - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 5
 , 5 , 8 , 8 - テトラメチル - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - 1 , 4 - アントラキノン
 、
 2 - ブロム - 3 - (3 , 5 - ジブロム - 4 - ヒドロキシフェニル) - 5 , 5 , 8 , 8 - テ
 トラメチル - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - 1 , 4 - アントラキノン、
 2 - ブロム - 3 - (3 - ブロム - 5 - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3
 - ヒドロキシ - 5 , 5 , 8 , 8 - テトラメチル - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - 1 , 4 10
 - アントラキノン、
 3 - ブロム - 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 1 , 4
 - アントラキノン、
 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 1 ,
 4 - アントラキノン、
 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 1
 , 4 - アントラキノン、
 5 , 5 , 8 , 8 - テトラメチル - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロナフタリン - 1 , 3 - ジ
 オール、
 3 - メトキシ - 5 , 5 , 8 , 8 - テトラメチル - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロナフタリ 20
 ン - 1 - オール、
 4 - (3 - クロル - 5 , 5 , 8 , 8 - テトラメチル - 1 , 4 - ジオキソ - 1 , 4 , 5 , 6
 , 7 , 8 - ヘキサヒドロアントラセン - 2 - イル) - 安息香酸、
 メチル - 4 - (3 - クロル - 5 , 5 , 8 , 8 - テトラメチル - 1 , 4 - ジオキソ - 1 , 4
 , 5 , 6 , 7 , 8 - ヘキサヒドロアントラセン - 2 - イル) - 安息香酸塩、
 4 - (3 - ヒドロキシ - 1 , 4 - ジオキソ - 1 , 4 - ジヒドロナフタリン - 2 - イル) -
 安息香酸、
 メチル - (3 - メトキシ - 1 , 4 - ジオキソ - 1 , 4 - ジヒドロナフタリン - 2 - イル)
 - 安息香酸、
 4 - (3 - ヒドロキシ - 5 , 5 , 8 , 8 - テトラメチル - 1 , 4 - ジオキソ - 1 , 4 , 5 30
 , 6 , 7 , 8 - ヘキサヒドロアントラセン - 2 - イル) - 安息香酸、
 メチル - 4 - (3 - ヒドロキシ - 1 , 4 - ジオキソ - 1 , 4 - ジヒドロナフタリン - 2 -
 イル - アゾ) - 安息香酸塩、
 4 - (3 - ヒドロキシ - 5 , 5 , 8 , 8 - テトラメチル - 1 , 4 - ジオキソ - 1 , 4 , 5
 , 6 , 7 , 8 - ヘキサヒドロアントラセン - 2 - イル - アゾ) - 安息香酸、
 3 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - オキソシクロヘキサ - 2 , 5 - ジエニリデン
) - 5 , 5 , 8 , 8 - テトラメチル - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロシクロペンタ [b]
 ナフタリン - 1 , 2 - ジオン、
 3 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - オキソシクロヘキサ - 2 , 5 - ジエニリデン
) - 5 , 5 , 8 , 8 - テトラメチル - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロアントラセン - 3 H 40
 - 1 , 2 , 4 - トリオン、
 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 5 ,
 8 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノ、
 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 6 ,
 7 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノ、
 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 5 -
 メチル - 1 , 4 - ナフトキノ、
 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - メトキシ - 5 -
 メチル - 1 , 4 - ナフトキノ、
 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 6 - 50

メチル - 1 , 4 - ナフトキノ、
 3 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - メトキシ - 6 -
 メチル - 1 , 4 - ナフトキノ、
 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 5 ,
 6 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノ、
 3 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - メトキシ - 5 ,
 6 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノ、
 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 5 ,
 7 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノ、
 3 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - メトキシ - 5 , 10
 7 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノ、
 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - エチルチオ - 5
 - メチル - 1 , 4 - ナフトキノ、
 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - エチルチオ - 6
 - メチル - 1 , 4 - ナフトキノ、
 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5
 , 8 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノ、
 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 6
 , 7 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノ、
 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5 20
 - メチル - 1 , 4 - ナフトキノ、
 3 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - ヒドロキシ - 5
 - メチル - 1 , 4 - ナフトキノ、
 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 6
 - メチル - 1 , 4 - ナフトキノ、
 3 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - ヒドロキシ - 6
 - メチル - 1 , 4 - ナフトキノ、
 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5
 , 6 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノ、
 2 - (3 - プロム - 5 - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ 30
 - 5 , 6 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノ、
 3 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - ヒドロキシ - 5
 , 6 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノ、
 2 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5
 , 7 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノ、
 3 - (3 , 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - ヒドロキシ - 5
 , 7 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノ、

【 0 0 1 8 】

本発明にしたがって、この場合にゲノムDNAプローブが処理前に熱的に変性されることが有利である。

【 0 0 1 9 】

特に、本発明にしたがって、ステップc)が、

a) 請求項1による前処理DNAプローブに非特異的にハイブリッドし、そこからPCRステップで1個以上の増幅体が生じる様々な配列の少なくとも1個のプライマー対によるPCR前増幅の部分ステップと、

b) それぞれ請求項1による前処理DNAプローブ[(+) 鎖又は (-) 鎖] の一部分と同じか又は逆相補的であり、被増幅DNAに特異的にハイブリッドする様々な配列のプライマーによる前増幅で形成された生成物のPCR増幅の部分ステップとで実施されることが有利である。

【 0 0 2 0 】

さらに、本発明にしたがって、複数のＤＮＡ部分の増幅が反応容器内で実施されることが有利である。

【００２１】

さらに、本発明にしたがって、ポリメラーゼ反応のために耐熱性ＤＮＡポリメラーゼが使用されることが有利である。

【００２２】

特に、本発明にしたがって、本発明による方法のステップｃ）の前にＤＮＡの脱スルホン化が実施されることが有利である。

【００２３】

また、前処理ＤＮＡの検出のためにＰＣＲ生成物がオリゴヌクレオチド配列上でハイブリッドされ、それに続き次の部分ステップが実施されることが有利である：

【００２４】

ａ）増幅ゲノムＤＮＡが二重鎖の形成下に少なくとも１個のオリゴヌクレオチドにハイブリッドされ、前記ハイブリッド化オリゴヌクレオチドが前記オリゴヌクレオチドの３'末端で直接的に又は１０塩基までの間隔で前記オリゴヌクレオチドのメチル化に関してゲノムＤＮＡプローブ内で調査されるべき位置に隣接する部分ステップ。

（ｂ）ｎヌクレオチドの既知の配列を有するオリゴヌクレオチドがポリメラーゼを利用して少なくともヌクレオチド１個分だけ伸長され、このヌクレオチドが検出可能の標識を有し、前記伸長がゲノムＤＮＡプローブ内の各シトシンのメチル化状態に依存する部分ステップ。

【００２５】

本発明にしたがって、前処理ＤＮＡの検出のためにＰＣＲ生成物がオリゴヌクレオチド配列上でハイブリッドされ、それに続き次の部分ステップが実施されることが有利である：

ａ）オリゴヌクレオチドの１セットが二重鎖の形成下に増幅ゲノムＤＮＡにハイブリッドされ、このオリゴヌクレオチドのセットが２種類の種からなり、かつ第１種のハイブリッド化オリゴヌクレオチドが前記オリゴヌクレオチドの３'末端で直接的に又は１０塩基までの間隔でゲノムＤＮＡプローブ内の前記オリゴヌクレオチドのメチル化に関して調査されるべき位置に隣接し、かつ第２種の第２オリゴヌクレオチドが標的分子の第２領域にハイブリッドされ、その結果第２種のオリゴヌクレオチドの５'末端が個々のヌクレオチドの大きさ又は１０ヌクレオチドまでの隙間によって前記選択位置の箇所で第１種のハイブリッド化オリゴヌクレオチドの３'末端から分離されている部分ステップ。

（ｂ）ｎヌクレオチドの既知の配列を有する第１種のオリゴヌクレオチドがポリメラーゼを利用して最大でも第１種のオリゴヌクレオチドの３'末端と第２種のオリゴヌクレオチドの５'末端との間にあるヌクレオチドの個数分だけ伸長され、前記伸長がゲノムＤＮＡプローブ内の各シトシンのメチル化状態に依存する部分ステップ。

（ｃ）オリゴヌクレオチドがリガーゼの存在下にインキュベートされ、隣接するポリメラーゼ反応によって伸長された第１種のオリゴヌクレオチドと、第２種のオリゴヌクレオチドとが結合され、それによって、ここで伸長されたオリゴヌクレオチドの既存の３'ヒドロキシ機能を有する３'末端が直接第２種のオリゴヌクレオチドの５'末端に隣接するように、先行ステップで第１種のオリゴヌクレオチドの伸長が行われた場合に連結生成物が得られる部分ステップ。

【００２６】

この場合、本発明にしたがって、使用した第１種のオリゴヌクレオチド及び／又は使用した第２種のオリゴヌクレオチドが塩基Ｔ、Ａ及びＣのみ又は塩基Ｔ、Ａ及びＧのいずれかを含有することが特に有利である。

【００２７】

さらに、本発明にしたがって、前処理ＤＮＡの検出のためにＰＣＲ生成物がオリゴヌクレオチド配列上でハイブリッドされ、それに続き次の部分ステップが実施されることが有利である：

（ａ）増幅ゲノムＤＮＡが二重鎖の形成下にｎヌクレオチドの既知の配列を有する少なく

10

20

30

40

50

とも1個のオリゴヌクレオチドにハイブリッドされ、前記ハイブリッド化オリゴヌクレオチドが前記オリゴヌクレオチドの3'末端で一部又は全部前記オリゴヌクレオチドのメチル化に関してゲノムDNAプローブ内で調査されるべき位置にハイブリッドされる部分ステップ。

(b)オリゴヌクレオチドが、前記オリゴヌクレオチドの3'末端であらかじめ塩基欠損対なしに被検位置にハイブリッドされる場合に、ポリメラーゼを利用して少なくともヌクレオチド1個分だけ伸長され、少なくとも1個のヌクレオチドが検出可能な標識を有し、前記伸長がゲノムDNAプローブ内の各シトシンのメチル化状態に依存する部分ステップ。

【0028】

10

また、本発明にしたがって、PCR生成物及び/又は伸長生成物及び/又は連結生成物が検出のために検出可能な標識を有することも有利である。この場合、標識が蛍光標識であり及び/又は標識が放射性核種であることが特に有利である。この場合、ヌクレオチドの標識が、質量分析計で検出可能である分離可能な質量標識であることが特に有利である。

【0029】

特に、PCR生成物及び/又は伸長生成物及び/又は連結生成物が全体で質量分析計で検出され、それによって前記生成物の質量により明確に特徴づけられることも有利である。本発明にしたがって、PCR生成物及び/又は伸長生成物及び/又は連結生成物の各1個のフラグメントが質量分析計で検出されることも有利である。

【0030】

20

本発明による方法は、PCR生成物及び/又は伸長生成物及び/又は連結生成物のフラグメントが1個又は複数個のエキソヌクレアーゼ又はエンドヌクレアーゼによる消化によって生成されることを特徴とすることも有利である。

【0031】

さらに、質量分析計でのより良い検出性のために生成されたフラグメントが個々の正又は負の実効電荷を有することが有利である。

【0032】

PCR生成物及び/又は伸長生成物及び/又は連結生成物がマトリックス介助レーザー脱着/イオン化質量分析法(MALDI-TOF)を利用して、又は電子スプレー質量分析法(ESI)を利用して検出され、かつ可視化されることが申し分なく特に有利である。

30

【0033】

本発明による方法は、ゲノムDNAがDNAプローブから得られ、DNAの由来源が、例えば細胞株、血液、痰、便、尿、脳脊髄液、パラフィン植込み組織、例えば眼、腸、腎臓、脳、心臓、前立腺、肺、乳房又は肝臓の組織、組織スライド及びそれら全ての可能な組合せを包含することも有利である。

【0034】

本発明のもう1個の目的は、患者又は個体にとり不利な結果の診断及び/又は予測のための本発明による方法の使用において、前記不利な結果が次のカテゴリ：望ましくない薬剤作用；癌罹患；CNS機能不全、障害又は疾病；攻撃性症候群又は挙動障害；脳障害の臨床的、心理学的及び社会的な帰結；精神性障害及び人格性障害；老年痴呆及び/又は連想症候群；心臓血管病、機能不全及び障害；胃腸域の機能不全、障害又は疾病；呼吸系の機能不全、障害又は疾病；負傷、炎症、感染、免疫及び/又は予後；发育過程中的異常としての身体の機能不全、障害又は疾病；皮膚、筋肉、結合組織又は骨の機能不全、障害又は疾病；内分泌及び代謝機能不全、障害又は疾病；頭痛又は性的機能不全の少なくとも1つに属している方法の使用である。

40

【0035】

また、本発明の目的は、細胞型又は組織の区別又は細胞差異化の調査のための本発明による方法の使用である。

【0036】

最後に、本発明のもう1つの目的は、重亜硫酸塩を含有する試薬と、変性試薬又は溶剤と

50

、増幅体の製造のための遊離基捕捉剤及びプライマーと、本発明による方法によるアッセイの実施のための手引書とからなるキットである。

【 0 0 3 7 】

本発明は、ピペット測定ステップのみを含むメチルシトシンの自動化可能の検出方法を提供する。それによって、既存の方法の効率が処理の簡便性、品質、コスト及び特にスループットに関して改善される。

【 0 0 3 8 】

ゲノム DNA プローブ内のメチルシトシンの自動化可能の検出方法を記載する。

【 0 0 3 9 】

被解析ゲノム DNA は、有利にはゲノム DNA が DNA の常法の由来源、例えば細胞株、血液、痰、便、尿、脳脊髄液、パラフィン植込み組織、例えば眼、腸、腎臓、脳、心臓、前立腺、肺、乳房又は肝臓の組織、組織スライド及びそれら全ての可能な組合せから得られる。

10

【 0 0 4 0 】

この方法の第 1 ステップで、使用した DNA が有利には重亜硫酸塩 (= 二亜流化物、亜硫酸水素) により、塩基対挙動に関して様々な塩基が発生し、他方、5 位メチル化シトシンが変化しないで残るように、塩基の 5 位にメチル化しない全てのシトシンが変化されるように処理される。

【 0 0 4 1 】

ゲノム DNA プローブは、特に有利には処理前に熱的に変性される。

20

【 0 0 4 2 】

反応のために濃度範囲 0 . 1 m o l / l 及び 6 m o l / l の間で重亜硫酸塩が使用される場合、非メチル化シトシン塩基に付加が行われる。本発明による方法の場合は、特に変性試薬又は溶剤ならびに遊離基捕捉剤が存在しなければならない。

【 0 0 4 3 】

この場合、変性試薬又は溶剤として有利には次の化合物群又は化合物類が対象となる。

【 0 0 4 4 】

ポリエチレングリコールジアルキルエーテル、ジオキサン及び置換誘導体、尿素又は誘導体、アセトニトリル、第 1 級アルコール、第 2 級アルコール、第 3 級アルコール、ジエチレングリコールジアルキルエーテル、トリエチレングリコールジアルキルエーテル、テトラエチレングリコール - ジアルキルエーテル、ペンタエチレングリコールジアルキルエーテル、ヘキサエチレングリコールジアルキルエーテル、D M S O 又は T H F。

30

【 0 0 4 5 】

遊離基捕捉剤として、目録 1 に列挙した化合物群又はその誘導体群が好ましく適している。それに続きアルカリ性加水分解が次にウラシル内の非メチル化シトシン - ヌクレオベースの転換を生ぜしめる。

【 0 0 4 6 】

第 2 方法ステップで、処理 DNA プローブが水又は水溶液で希釈される。有利には、それに続きアルカリ性 pH 値で DNA の脱スルホン化 (1 0 - 3 0 分、9 0 - 1 0 0) が実施される。

40

【 0 0 4 7 】

この方法の第 3 ステップで、DNA プローブがポリメラーゼ連鎖反応、有利には耐熱性 DNA ポリメラーゼで増幅される。複数個の DNA 部分の増幅は、好ましくは反応容器の中で行われる。

【 0 0 4 8 】

この方法ステップは、好ましくは 2 部分ステップで実施される。これは前処理 DNA プローブを非特異的にハイブリッドし、そこから PCR ステップで 1 個以上の増幅体を得る様々な塩基配列の少なくとも 1 個のプライマー対を用いる PCR 前増幅によって開始される。その後、前増幅で形成された生成物の PCR 増幅が様々な塩基配列のプライマーによって実施され、これがそれぞれ前処理 DNA プローブ [(+) 鎖又は (-) 鎖] の部分と同

50

じか又は逆相補的であり、被増幅DNAを特異的にハイブリッドする。

【0049】

この場合、前記のような前増幅がしばしばPCR反応としてではなく、耐熱性ポリメラーゼを必要としないプライマー伸長反応として実施されることは明確である。

【0050】

最後の方法ステップで、配列が重亜硫酸塩を含有する試薬による処理によってゲノムDNAプローブに対してどの程度まで変化したかが検出され、ゲノムDNAプローブ内の少なくとも1個の座のメチル化状態が推論される。

【0051】

検出のためにPCR生成物が特に有利にはオリゴヌクレオチド配列上にハイブリッドされる。

10

【0052】

この方法の有利な変形態様において、オリゴヌクレオチド配列上のハイブリッド後に次の部分ステップが実施される：

a) 増幅ゲノムDNAが二重鎖の形成下に少なくとも1個のオリゴヌクレオチドにハイブリッドされ、前記ハイブリッド化オリゴヌクレオチドが前記オリゴヌクレオチドの3'末端で直接的に又は10塩基までの間隔で前記オリゴヌクレオチドのメチル化に関してゲノムDNAプローブ内で調査されるべき位置に隣接する部分ステップ。

(b) nヌクレオチドの既知の配列を有するオリゴヌクレオチドがポリメラーゼを利用して少なくともヌクレオチド1個分だけ伸長され、このヌクレオチドが検出可能の標識を有し、前記伸長がゲノムDNAプローブ内の各シトシンのメチル化状態に依存する部分ステップ。

20

【0053】

この方法のもう1つの有利な変形態様において、オリゴヌクレオチド配列上にハイブリッド後に次の部分ステップが実施される：

a) オリゴヌクレオチドの1セットが二重鎖の形成下に増幅ゲノムDNAにハイブリッドされ、このオリゴヌクレオチドのセットが2種類の種からなり、かつ第1種のハイブリッド化オリゴヌクレオチドが前記オリゴヌクレオチドの3'末端で直接的に又は10塩基までの間隔でゲノムDNAプローブ内の前記オリゴヌクレオチドのメチル化に関して調査されるべき位置に隣接し、かつ第2種の第2オリゴヌクレオチドが標的分子の第2領域にハイブリッドされ、その結果第2種のオリゴヌクレオチドの5'末端が個々のヌクレオチドの大きさ又は10ヌクレオチドまでの隙間によって前記選択位置の箇所第1種のハイブリッド化オリゴヌクレオチドの3'末端から分離されている部分ステップ。

30

(b) nヌクレオチドの既知の配列を有する第1種のオリゴヌクレオチドがポリメラーゼを利用して最大でも第1種のオリゴヌクレオチドの3'末端と第2種のオリゴヌクレオチドの5'末端との間にあるヌクレオチドの個数分だけ伸長され、前記伸長がゲノムDNAプローブ内の各シトシンのメチル化状態に依存する部分ステップ。

(c) オリゴヌクレオチドがリガーゼの存在下にインキュベートされ、隣接するポリメラーゼ反応によって伸長された第1種のオリゴヌクレオチドと、第2種のオリゴヌクレオチドとが結合され、ここで伸長されたオリゴヌクレオチドの既存の3'ヒドロキシ機能を有する3'末端が直接第2種の有利にはホスホル化して存在するオリゴヌクレオチドの5'末端に隣接するように、先行ステップで第1種のオリゴヌクレオチドの伸長が行われた場合、それによって連結生成物が得られる部分ステップ。

40

【0054】

使用した第1種のオリゴヌクレオチド及び/又は使用した第2種のオリゴヌクレオチドが特に有利には塩基T、A及びCのみ又は塩基T、A及びGのいずれかを含有する。

【0055】

この方法のさらに有利な変形態様において、オリゴヌクレオチド配列上のハイブリッド後に次の部分ステップが実施される：

(a) 増幅ゲノムDNAが二重鎖の形成下にnヌクレオチドの既知の配列を有する少なく

50

とも1個のオリゴヌクレオチドにハイブリッドされ、前記ハイブリッド化オリゴヌクレオチドが前記オリゴヌクレオチドの3'末端で一部又は全部前記オリゴヌクレオチドのメチル化に関してゲノムDNAプローブ内で調査されるべき位置にハイブリッドされる部分ステップ。

(b)オリゴヌクレオチドが、前記オリゴヌクレオチドの3'末端であらかじめ塩基欠損対なしに被検位置にハイブリッドされる場合に、ポリメラーゼを利用して少なくともヌクレオチド1個分だけ伸長され、少なくとも1個のヌクレオチドが検出可能な標識を有し、前記伸長がゲノムDNAプローブ内の各シトシンのメチル化状態に依存する部分ステップ。

【0056】

10

PCR生成物及び/又は伸長生成物及び/又は連結生成物が検出のために特に有利には検出可能な標識を有する。

【0057】

好ましくは、PCR生成物及び/又は伸長生成物及び/又は連結生成物の標識が蛍光標識、放射性核種又は質量分析計で検出される分離可能な質量標識である。

【0058】

PCR生成物及び/又は伸長生成物及び/又は連結生成物が好ましくは全体で質量分析計で検出することができ、それによって前記生成物の質量により明確に特徴づけられる。

【0059】

特に、有利にはPCR生成物及び/又は伸長生成物及び/又は連結生成物の各1個のフラグメントが質量分析計で検出される。

20

【0060】

PCR生成物及び/又は伸長生成物及び/又は連結生成物のフラグメントが、有利には1個又は複数個のエキソヌクレアーゼ又はエンドヌクレアーゼによる消化によって生成される。

【0061】

質量分析計でのより良い検出性のために、生成されたフラグメントが特に有利には個々の正又は負の実効電荷を有する。

【0062】

PCR生成物及び/又は伸長生成物及び/又は連結生成物が、好ましくはマトリックス assistedレーザー脱着/イオン化質量分析法(MALDI-TOF)を利用して、又は電子スプレー質量分析法(ESI)を利用して検出され、かつ可視化される。

30

【0063】

本方法は、有利には患者又は個体にとり不利な結果の診断及び/又は予測のために使用され、前記不利な結果が次のカテゴリ：望ましくない薬剤作用；癌罹患；CNS機能不全、障害又は疾病；攻撃性症候群又は挙動障害；脳障害の臨床的、心理学的及び社会的な帰結；精神性障害及び人格性障害；老年痴呆及び/又は連想症候群；心臓血管病、機能不全及び障害；胃腸域の機能不全、障害又は疾病；呼吸系の機能不全、障害又は疾病；負傷、炎症、感染、免疫及び/又は予後；発育過程中的異常としての身体の機能不全、障害又は疾病；皮膚、筋肉、結合組織又は骨の機能不全、障害又は疾病；内分泌及び代謝機能不全、障害又は疾病；頭痛又は性的機能不全の少なくとも1つに属している。

40

【0064】

さらに、この新規の方法は、特に有利には細胞型、組織の区別又は細胞差異化の調査に利用される。

【0065】

さらに、本発明の目的は、重亜硫酸塩を含有する試薬と、変性試薬又は溶剤と、目録1記載の遊離基捕捉剤、増幅体の製造のためのプライマーと、アッセイの実施のための手引書とを含むキットである。

【0066】

目録1：

50

ジ -、トリヒドロキシベンゼン、緑茶エキス (green tea extract)、
 ピクノゲノール (pine bark extract)、銀杏二葉エキス (EGb76
 1)、種々の果実エキス及び野菜エキスのフラボノイド混合物 (GNLD)、バイオノー
 マライザ (Sun-O社)、

DPPH (1, 1 - ジフェニル - 2 - ピクリルヒドラジル)、NDGA (ノルジヒドロゲ
 アヤレート酸)、

トロロクス (6 - ヒドロキシ - 2, 5, 7, 8 - テトラメチルクロマン - 2 - カルボン酸
)、

2, 6 - ジ - tert - ブチルフェノール、4 - メチル - ジ - tert - ブチルフェノー
 ル、4 - メトキシ - ジ - tert - ブチルフェノール、2, 6 - ジ - tert - ブチル -
 p - クレゾール、3, 4 - ジヒドロキシ安息香酸、ビタミンC、ビタミンE、ビタミンQ
 、ヒドロキノン、ウビキノン、リグナン、ヒドロキシテルペン、フラボノイド、クルクミ
 ン、タンニン、レチン酸化合物、Ge - 132 ビスベータカルボキシエチル - ゲルマニウ
 ム - セスキオキシド、過酸化ジスムターゼ (SOD)、過酸化カタラーゼ、アルファ - ナ
 フトフラボン、ジ (2 - メチル - 5 - クロロフェニル) ジチオネート及びCu (II) 誘
 導体、メベンダゾール、CS (クロロホルム溶解性) アルカロイド - エクス、

4 - (3, 5 - ジ - tert - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 1
 , 2 - ナフトキノン、

4 - (3, 5 - ジ - tert - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 1,
 2 - ナフトキノン、

4 - (3, 5 - ジ - tert - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 1, 2 - ナフトキノ
 ン、

2 - (3, 5 - ジ - tert - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ブロム - 1, 4
 - ナフトキノン、

2 - (3, 5 - ジ - tert - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - クロル - 1, 4
 - ナフトキノン、

2 - (3, 5 - ジ - tert - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 1,
 4 - ナフトキノン、

2 - (3, 5 - ジ - tert - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 1
 , 4 - ナフトキノン、

2 - (3, 5 - ジ - tert - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 1, 4 - ナフトキノ
 ン、

4 - (3, 5 - ジ - tert - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5
 , 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 2 - アントラキノン
 、

4 - (3, 5 - ジ - tert - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 5,
 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 2 - アントラキノン、

4 - (3, 5 - ジ - tert - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 5, 5, 8, 8 - テ
 トラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 2 - アントラキノン、

3 - ブロム - 4 - (3, 5 - ジ - tert - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 5, 5
 , 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 2 - アントラキノン、

2 - (3, 5 - ジ - tert - ブチル - 4 - オキソシクロヘキサ - 2, 5 - ジエニリデン
) - インダン - 1, 3 - ジオン、

2 - (3, 5 - ジ - tert - ブチル - 4 - オキソシクロヘキサ - 2, 5 - ジエニリデン
) - 3, 4 - エポキシ - 3 - ヒドロキシ - 4 - メトキシ - 3, 4 - ジヒドロ - 2H - ナフ
 タリン - 1 - オン、

2 - (3, 5 - ジ - tert - ブチル - 4 - オキソシクロヘキサ - 2, 5 - ジエニリデン
) - 3, 4 - エポキシ - 3, 4 - ジメトキシ - 3, 4 - ジヒドロ - 2H - ナフタリン - 1
 - オン、

2 - (3, 5 - ジ - tert - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - インダン - 1 - オン

10

20

30

40

50

- 、 3, 3 - ビ - [2 - (3, 5 - ジ - tert - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - インデン - 1 - オン] - 3 - イル、
- 2 - (3, 5 - ジ - tert - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ブロム - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 4 - アントラキノン、
- 2 - (3, 5 - ジ - tert - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - クロル - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 4 - アントラキノン、
- 2 - (3, 5 - ジ - tert - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 4 - アントラキノン、
- 2 - (3, 5 - ジ - tert - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 4 - アントラキノン 10
- 、
- 2 - (3, 5 - ジ - tert - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 4 - アントラキノン、
- 2 - ブロム - 3 - (3 - ブロム - 5 - tert - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 4 - アントラキノン
- 、
- 2 - ブロム - 3 - (3, 5 - ジブロム - 4 - ヒドロキシフェニル) - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 4 - アントラキノン、
- 2 - ブロム - 3 - (3 - ブロム - 5 - tert - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 4 - アントラキノン、 20
- 3 - ブロム - 2 - (3, 5 - ジ - tert - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 1, 4 - アントラキノン、
- 2 - (3, 5 - ジ - tert - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 1, 4 - アントラキノン、
- 2 - (3, 5 - ジ - tert - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 1, 4 - アントラキノン、
- 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロナフタリン - 1, 3 - ジオール、
- 3 - メトキシ - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロナフタリン - 1 - オール、 30
- 4 - (3 - クロル - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 1, 4 - ジオキソ - 1, 4, 5, 6, 7, 8 - ヘキサヒドロアントラセン - 2 - イル) - 安息香酸、
- メチル - 4 - (3 - クロル - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 1, 4 - ジオキソ - 1, 4, 5, 6, 7, 8 - ヘキサヒドロアントラセン - 2 - イル) - 安息香酸塩、
- 4 - (3 - ヒドロキシ - 1, 4 - ジオキソ - 1, 4 - ジヒドロナフタリン - 2 - イル) - 安息香酸、
- メチル - (3 - メトキシ - 1, 4 - ジオキソ - 1, 4 - ジヒドロナフタリン - 2 - イル) - 安息香酸、
- 4 - (3 - ヒドロキシ - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 1, 4 - ジオキソ - 1, 4, 5, 6, 7, 8 - ヘキサヒドロアントラセン - 2 - イル) - 安息香酸、 40
- メチル - 4 - (3 - ヒドロキシ - 1, 4 - ジオキソ - 1, 4 - ジヒドロナフタリン - 2 - イル - アゾ) - 安息香酸塩、
- 4 - (3 - ヒドロキシ - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 1, 4 - ジオキソ - 1, 4, 5, 6, 7, 8 - ヘキサヒドロアントラセン - 2 - イル - アゾ) - 安息香酸、
- 3 - (3, 5 - ジ - tert - ブチル - 4 - オキソシクロヘキサ - 2, 5 - ジエニリデン) - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロシクロペンタ [b] ナフタリン - 1, 2 - ジオン、
- 3 - (3, 5 - ジ - tert - ブチル - 4 - オキソシクロヘキサ - 2, 5 - ジエニリデン) - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロアントラセン - 3 H 50

- 1, 2, 4 - トリオン、
- 2 - (3, 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 5 ,
- 8 - ジメチル - 1, 4 - ナフトキノン、
- 2 - (3, 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 6 ,
- 7 - ジメチル - 1, 4 - ナフトキノン、
- 2 - (3, 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 5 -
- メチル - 1, 4 - ナフトキノン、
- 2 - (3, 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - メトキシ - 5 -
- メチル - 1, 4 - ナフトキノン、
- 2 - (3, 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 6 - 10
- メチル - 1, 4 - ナフトキノン、
- 3 - (3, 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - メトキシ - 6 -
- メチル - 1, 4 - ナフトキノン、
- 2 - (3, 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 5 ,
- 6 - ジメチル - 1, 4 - ナフトキノン、
- 3 - (3, 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - メトキシ - 5 ,
- 6 - ジメチル - 1, 4 - ナフトキノン、
- 2 - (3, 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 5 ,
- 7 - ジメチル - 1, 4 - ナフトキノン、
- 3 - (3, 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - メトキシ - 5 , 20
- 7 - ジメチル - 1, 4 - ナフトキノン、
- 2 - (3, 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - エチルチオ - 5
- メチル - 1, 4 - ナフトキノン、
- 2 - (3, 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - エチルチオ - 6
- メチル - 1, 4 - ナフトキノン、
- 2 - (3, 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5
- , 8 - ジメチル - 1, 4 - ナフトキノン、
- 2 - (3, 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 6
- , 7 - ジメチル - 1, 4 - ナフトキノン、
- 2 - (3, 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5 30
- メチル - 1, 4 - ナフトキノン、
- 3 - (3, 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - ヒドロキシ - 5
- メチル - 1, 4 - ナフトキノン、
- 2 - (3, 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 6
- メチル - 1, 4 - ナフトキノン、
- 3 - (3, 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - ヒドロキシ - 6
- メチル - 1, 4 - ナフトキノン、
- 2 - (3, 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5
- , 6 - ジメチル - 1, 4 - ナフトキノン、
- 2 - (3 - ブロム - 5 - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ 40
- 5, 6 - ジメチル - 1, 4 - ナフトキノン、
- 3 - (3, 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - ヒドロキシ - 5
- , 6 - ジメチル - 1, 4 - ナフトキノン、
- 2 - (3, 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5
- , 7 - ジメチル - 1, 4 - ナフトキノン、
- 3 - (3, 5 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - ヒドロキシ - 5
- , 7 - ジメチル - 1, 4 - ナフトキノン、

【 0 0 6 7 】

次の例が本発明を説明する。

【 0 0 6 8 】

例：

自動化された重亜硫酸塩反応の実施。

【 0 0 6 9 】

本例において、抑制エンドヌクレアーゼを用いて製造者の指示にしたがって処理したゲノム DNA プローブの第 V I I I 遺伝子因子内のシトシンのメチル化状態の検出方法の適用を説明する。この方法は、交叉汚染を除外する交換可能なピペット測定先端部用に 4 つの独立した垂直移動式アダプトを備えた自動ピペット測定システム (M W G R o b o S e q 4 2 0 4) の使用に基づく。このピペット測定システムは、 $\pm 2 \mu l$ 以下の誤差を有する $100 \mu l$ のピペット測定を可能にする。自動ピペット測定システムの作業パレットは、ピペット測定先端部用の 6 架台と、8 ピペット測定位置のうち 2 つが冷却できる前記 8 ピペット測定位置と、冷却式試薬架台と、10 微量滴定パレット用の積層システムと、ピペット測定先端部監視ステーションと、アダプタからピペット測定先端部の分離用の装置とを装備している。自動ピペット測定システムは、シリアルインタフェースを介してコンピュータと接続されており、この方法の適用に必要な全てのピペット測定ステップの自由プログラミングを可能にするソフトウェアプログラムを介して制御される。

10

【 0 0 7 0 】

第 1 方法ステップで、手動で DNA プローブの部分標本が微量滴定プレートの自由選択可能な 96 位置に滴定される。微量滴定プレートがそれに続きエッペンドルフ パターンサイクラーの使用下に前処理 DNA プローブの変性のために 96 に加熱される。次に微量滴定プレートを自動ピペット測定システム内へ移す。DNA を含む全ての位置で、プログラム制御されて順次試薬架台から変性試薬 (ジオキサン)、ナトリウムヒドロゲンサルファイト溶液 3 . 3 モルの部分標本及び遊離基捕捉剤溶液の部分標本が使用した変性試薬内に加えてピペット測定される。それに続き、微量滴定プレートがエッペンドルフ パターンサイクラー内で DNA プローブ内にナトリウムヒドロゲンサルファイトの作用下に全ての非メチル化シトシン残基が重亜硫酸塩付加物に転換されるまでインキュベートされる。

20

【 0 0 7 1 】

重亜硫酸塩処理後、微量滴定プレートをサーモサイクラーから自動ピペット測定システム内へ移す。同じ型式の第 2 微量滴定プレートを前置きする。チャンバの第 1 微量滴定プレート上と同等の位置に重亜硫酸塩処理 DNA プローブを含む全てのチャンバ内に、初めに塩基性トリス - H C l バッファ (p H 9 . 5) を移し入れ、それに続き重亜硫酸塩処理 DNA の部分標本を第 2 微量滴定プレートの対応する位置へ移し入れる。塩基性溶液内で非メチル化シトシン残基の重亜硫酸塩付加物がウラシル残基に転換される。

30

【 0 0 7 2 】

重亜硫酸塩処理 DNA の鎖 (本例ではセンス鎖) の標的とした増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) によって行った。第 1 型 (A G G G A G T T T T T T A G G G A A T A G A G G G A (S E Q - I D : 1) 及び T A A T C C C A A A A C C T C T C C A C T A C A A C A A A (S E Q - I D : 2)) のプライマー対が使用されており、これは成功を収めた重亜硫酸塩処理 DNA 鎖の特異的増幅を可能にするが、DNA 鎖の非メチル化シトシン残基がウラシル残基に転換されず、又は不完全に転換された前記 DNA 鎖の特異的増幅は可能にしない。P C R 反応のために、自動ピペット測定システムで同じ型式の第 3 微量滴定プレートが前置きされる。チャンバの第 1 微量滴定プレート上と同等の位置に重亜硫酸塩処理 DNA プローブを含む全てのチャンバ内で、初めに P C R バッファ、DNA ポリメラーゼ及び第 1 型のプライマーを含む原液の部分標本が自動的にピペット測定される。その後、自動的に第 2 微量滴定プレートの各位置から希釈した重亜硫酸塩処理 DNA の部分標本が、前記部分標本が P C R 反応の実施のためにサイクラー内へ移される前に、対応する第 3 微量滴定プレートの位置へ移される。P C R 生成物は、アガロースゲル電気泳動と、それに続き臭化エチジウムによる着色とによって同定される (図 1)。図 1 は、重亜硫酸塩処理 DNA 鎖の P C R 増幅したゲル図である (左図：分子量マーカー、右：P C R 生成物)。

40

【図面の簡単な説明】

50

【図 1】 図 1 は、重亜硫酸塩処理 DNA 鎖の PCR 増幅したゲル図である。

【配列表】

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Epigenomics AG

<120> Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierungen

<130> E01/1204/WO

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 28

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 1

agggagtttt ttttagggaa tagagga

28

<210> 2

<211> 28

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 2

taatccaaa acctctccac tacaaca

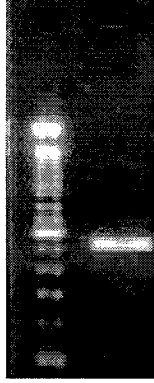
28

10

20

30

【図 1】



フロントページの続き

(56)参考文献 国際公開第99/028498(WO,A1)

Science, 1988年, Vol.241, p.1077-1080

Nucleic Acids Research, 1997年, Vol.25, No.12, p.2529-2531

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996年, Vol.93, p.9821-9826

Nucleic Acids Research, 1995年, Vol.23, No.4, p.675-682

Nucleic Acids Research, 1998年, Vol.26, No.21, p.5009-5010

Nucleic Acids Research, 1994年, Vol.22, No.15, p.2990-2997

Cancer Research, 1997年, Vol.57, p.5619-2622

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/68

C12N 15/09 - 15/90

G01N 33/53

G01N 33/566

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

专利名称(译)	检测胞嘧啶甲基化的方法		
公开(公告)号	JP4489347B2	公开(公告)日	2010-06-23
申请号	JP2002504676	申请日	2001-06-19
[标]申请(专利权)人(译)	埃皮吉諾米克斯股份公司		
申请(专利权)人(译)	外延基因组学公司		
当前申请(专利权)人(译)	外延基因组学公司		
[标]发明人	ベルリンクルト		
发明人	ベルリン,クルト		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 G01N33/53 G01N33/566 G01N27/62 C12Q1/6827 C12Q1/6858 G01N33/58		
CPC分类号	C12Q1/6827 C12Q1/6858 C12Q2533/101 C12Q2531/125 C12Q2527/125 C12Q2523/125		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12N15/00.A G01N33/53.M G01N33/566		
优先权	10029915 2000-06-19 DE		
其他公开文献	JP2004500892A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及检测DNA中胞嘧啶甲基化的方法。一种检测DNA中胞嘧啶甲基化的方法，包括：a) 变性试剂和/或溶剂以及至少一种基因组DNA探针与亚硫酸氢盐 (=亚硫酸氢盐，亚硫酸氢盐) 溶液一起孵育，浓度范围为0.1 mol / l和6 mol / l存在一种自由基清除剂的工作步骤; b) 用水或水溶液稀释处理过的DNA探针的工作步骤; c) 在聚合酶反应中扩增DNA探针的工作步骤; d) 根据步骤a) 的处理检测序列相对于基因组DNA探针的变化程度，并推断基因组DNA探针中至少一个基因座的甲基化状态;它是一种方法。

