

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-524776

(P2013-524776A)

(43) 公表日 平成25年6月20日(2013.6.20)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 ZNAA	2G060
C12M 1/00 (2006.01)	C12M 1/00 A	4B024
G01N 27/00 (2006.01)	G01N 27/00 J	4B029
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4B063
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53 M	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 36 頁)

(21) 出願番号 特願2012-556595 (P2012-556595)
 (86) (22) 出願日 平成23年3月14日 (2011.3.14)
 (85) 翻訳文提出日 平成24年11月7日 (2012.11.7)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2011/050501
 (87) 国際公開番号 W02011/110873
 (87) 国際公開日 平成23年9月15日 (2011.9.15)
 (31) 優先権主張番号 1004147.3
 (32) 優先日 平成22年3月12日 (2010.3.12)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

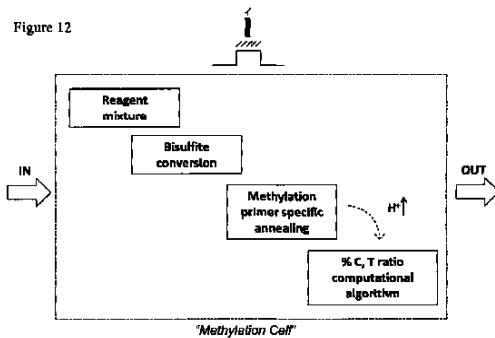
(71) 出願人 507012331
 ディ・エヌ・エイ・エレクトロニクス・リミテッド
 DNA ELECTRONICS LIMITED
 イギリス、ダブリュー・シー・1・エヌ 2・イー・ピー ロンドン、ジョン・ストリート、10
 (74) 代理人 110001195
 特許業務法人深見特許事務所
 (72) 発明者 トマーソー, クリストファー
 イギリス、ダブリュー・12 9・ティ・エフ ロンドン、エムリン・ロード、23

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 メチル化DNAの検出

(57) 【要約】

DNAサンプル中のメチル化ヌクレオチドを検出するための、イオン感応型電界効果トランジスタ (ISFET) の使用を説明する。DNAサンプル中のメチル化ヌクレオチドを検出する方法は、メチル化ヌクレオチドと非メチル化ヌクレオチドを識別する試薬を用いてDNAのサンプルを処理して、処理したDNAを提供するステップと、処理したDNAを増幅するステップと、増幅したDNAを任意にシークエンシングするステップとを含む。ISFETを用いて、増幅および/またはシークエンシングするステップの間に鎖伸長反応における1つ以上のdNTPの付加を監視する。適切な装置も提供される。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

DNA サンプル中のメチル化ヌクレオチドを検出するための、イオン感応型電界効果トランジスタ (ISFET) の使用。

【請求項 2】

DNA サンプル中のメチル化ヌクレオチドを検出する方法であって、
メチル化ヌクレオチドと非メチル化ヌクレオチドを識別する試薬を用いて DNA のサンプルを処理して、処理した DNA を提供するステップと、
処理した DNA を増幅するステップと、
増幅した DNA を任意にシーケンシングするステップとを備え、
ISFET が、増幅および / またはシーケンシングするステップの鎖伸長反応の間に DNA 鎖への 1 つ以上の dNTP の付加を監視する、方法。

10

【請求項 3】

試薬は、DNA サンプル中のメチル化ヌクレオチドのメチル基と選択的に結合する抗体である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

処理した DNA に対して免疫沈降を行い、それによって非抗体結合 DNA から抗体結合 DNA を分離する、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

試薬を用いた処理の前に、DNA サンプルに対して、DNA をより小さなフラグメントに分解するプロセスを行う最初のステップをさらに備える、請求項 3 または 4 に記載の方法。

20

【請求項 6】

プロセスはソニケーションである、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

試薬は、DNA サンプル中の非メチル化シトシンのみをウラシルに変換する重亜硫酸塩を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 8】

処理した DNA の増幅は PCR を用いて行われる、請求項 2 ~ 7 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 9】

PCR は、メチル化 DNA から生じる処理した DNA 鎖のみを増幅することができるメチル化特異的プライマーを用いて行われる、請求項 7 に従属する場合の請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

PCR は、非メチル化 DNA から生じる処理した DNA 鎖のみを増幅することができる非メチル化特異的プライマーを用いて行われる、請求項 7 に従属する場合の請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

DNA サンプル中のメチル化ヌクレオチドを検出する方法であって、
非メチル化シトシンをウラシルに変換する重亜硫酸塩を用いて DNA のサンプルを処理して、処理した DNA を提供するステップと、
メチル化特異的プライマーまたは非メチル化特異的プライマーを用いて、処理した DNA を PCR 増幅するステップとを備え、
ISFET が、PCR の間に鎖伸長反応への dNTP の付加を監視する、方法。

40

【請求項 12】

DNA メチル化を測定するための装置であって、
DNA を含有する第 1 のサンプルに露出可能な第 1 のイオン感応型電界効果トランジスタ (ISFET) と、
DNA を含有する第 2 のサンプルに露出可能な第 2 の ISFET と、

50

出力信号を提供する回路とを備え、出力信号は第 1 および第 2 の I S F E T の信号に由来する、装置。

【請求項 13】

第 1 のサンプルはメチル化サンプルであり、非メチル化サンプルである第 2 のサンプルと比較される、請求項 12 に記載の装置。

【請求項 14】

第 2 のサンプルは、既知量のメチル化を有する基準サンプルである、請求項 12 に記載の装置。

【請求項 15】

第 2 のサンプルは、請求項 12 に記載の装置。

10

【請求項 16】

出力信号は、第 1 および第 2 の I S F E T の信号の比率である、請求項 12 に記載の装置。

【請求項 17】

複数の第 1 の I S F E T をさらに備え、各 I S F E T は、異なるメチル化クラスタを見ているサンプルに露出可能である、請求項 12 に記載の装置。

【請求項 18】

I S F E T は、弱反転領域で動作するようにバイアスをかけられる、請求項 12 ~ 17 のいずれかに記載の装置。

【請求項 19】

I S F E T および回路は基板上に集積され、I S F E T のトランジスタは回路の一部を形成する、請求項 12 ~ 18 のいずれかに記載の装置。

20

【請求項 20】

I S F E T の信号は電流であり、回路の出力信号は前記電流の比率である、請求項 19 に記載の装置。

【請求項 21】

出力信号は閾値信号と比較され、対象部位の比較メチル化値と関連付けられるポテンシャルの診断または診療結果を示す、請求項 12 ~ 20 のいずれかに記載の装置。

【請求項 22】

請求項 1 において使用するため、または請求項 2 ~ 11 のいずれかに記載の方法で使用するための、請求項 12 ~ 21 のいずれかに記載の装置。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は検知装置および方法に関し、特にメチル化 DNA の検出に好適な検知装置および方法に関する。

【背景技術】

【0002】

背景

40

化学では、メチル化は、基質へのメチル基の付加、またはメチル基による原子もしくは基の置換を意味する。メチル化は、より大きな炭素鎖の代わりに特定のメチル基を用いて水素原子を置換するアルキル化の形態である。これらの用語は化学、生化学、土壌学および生物化学において一般的に用いられる。

【0003】

生体系では、メチル化は酵素によって触媒される。そのようなメチル化は重金属の修飾、遺伝子発現の調節、タンパク質機能の調節、および RNA 代謝に関連し得る。重金属のメチル化は生体系の外部でも起こり得る。組織サンプルの化学的メチル化も、一定の組織学的染色アーテファクトを減少させるための 1 つの方法である。

【0004】

50

脊椎動物におけるDNAメチル化は典型的に、CpG部位（シトシン - ホスフェート - グアニン部位、すなわちDNA配列中のシトシンのすぐ後にグアニンが続く部位）で起こる。このメチル化によって、シトシンが5 - メチルシトシンに変換される。Me - CpGの形成は、酵素DNAメチルトランスフェラーゼによって触媒される。大部分の哺乳類DNAのCpG部位の約40%はメチル化されているが、全くメチル化されていない、GCリッチな（約65%のGC残基からなる）CpGアイランドとして知られている一定の領域がある。これらは、遍在的に発現するすべての遺伝子を含む、哺乳類遺伝子の56%のプロモータに関連している。ヒトゲノムの1~2%はCpGクラスターであり、CpGメチル化と転写活性とは反比例する。

【0005】

DNAメチル化は、シトシンのピリミジン環の5位またはアデニンのプリン環の6位窒素へのメチル基の付加を伴う（シトシンおよびアデニンは、DNAの4種の塩基のうちの2種である）。この修飾は細胞分裂を経て受け継がれ得る。DNAメチル化は典型的に、接合体形成の間に除去され、発生の際に連続的な細胞分裂によって再建される。DNAメチル化は、高等生物における正常な生物発生と細胞分化において極めて重要な役割を担っている。DNAメチル化は、細胞が「自分がどこにいたのかを記憶」できるように細胞内の遺伝子発現パターンを安定的に変化させる。換言すれば、胚発生の際に隣島となるようにプログラムされた細胞は、島であり続ける必要があることを知らせるシグナルを受け続けなくても、生物の一生に渡って隣島であり続ける。さらに、DNAメチル化は、時間と共に宿主のゲノムに取込まれたウイルス遺伝子や他の有害な要素の発現を抑制する。DNAメチル化はまた、クロマチン構造の基礎を形成する。これによって、細胞は単一不変のDNA配列から多細胞生命に必要な無数の特徴を形成することができる。DNAメチル化はまた、ほとんどすべての種類の癌の発達において極めて重要な役割を果たしている。

【0006】

DNAメチル化は、たとえばシトシンのピリミジン環の5位炭素などのDNAへのメチル基の付加を伴い、この場合は、遺伝子発現を減少させるという特異的効果がある。成体の体細胞組織では、DNAメチル化は典型的にCpGジヌクレオチドの文脈で起こり、非CpGメチル化は、胚性幹細胞で普及している。

【0007】

重亜硫酸塩シークエンシングは、DNAを重亜硫酸塩で処理してそのメチル化パターンを特定する。DNAメチル化は最初に発見されたエピジェネティックマークであり、現在でも最も研究され続けている。DNAメチル化は、転写活性の抑制にも関係している。

【0008】

DNAを重亜硫酸塩で処理すると、シトシン残基がウラシルに変換されるが、5 - メチルシトシン残基は影響を受けない。このように、重亜硫酸塩処理は、個別のシトシン残基のメチル化状態に依存するDNA配列中の特異的な変化をもたらし、DNAのセグメントのメチル化状態に関する一塩基分解情報を生成する。この情報を得るために、変更された配列に対してさまざまな解析が行なわれ得る。したがって、この解析の目的は、重亜硫酸塩変換によって生じる一塩基多型（シトシンおよびチミン）同士の間での分化に要約される。

【0009】

シークエンシングは、サンガーシークエンシングとは異なるパイロシークエンシングによって行なうことができ、ジデオキシヌクレオチドを用いたチェーンターミネーションの代わりに、ヌクレオチドが取込まれるときに放出されるピロリン酸の検出に依存する。

【0010】

Infinium IIプラットフォームを用いるイルミナ社（Illumina）のメチル化（Methylation）アッセイは、重亜硫酸塩シークエンシングおよびパイロシークエンシングと同様に、ヒトDNAメチル化のゲノムワイドに包括的なプロファイリングを生成するためのBeadChip技術を用いる。Staaf et al.（2008）によると、「Infinium IIアッセイは、蛍光検出に用いる2つのチャンネル同士の間で染料強度バイアスを有しているように思われた。

10

20

30

40

50

さらに、このバイアスは、データがBeadStudioソフトウェアで用いる正規化アルゴリズムを経た後でも除去されなかった。」と記載されている。

【0011】

DNAメチル化バイオマーカの解析に用いるサンプルは通常、腫瘍からの高濃度のバックグラウンドDNAを含有している。しかし、腫瘍由来DNAは非常に低濃度で存在していることが多く、かつ健常細胞からのDNAが実質的に混入し得るため、検出が困難である。このため、体液中の異常メチル化された腫瘍由来DNAを同定するための、多量の非メチル化バックグラウンドDNA中のメチル化DNAの単一コピーを高感度に検出する機能を有する方法が必要であることが多い。

【0012】

サンプルDNAの異なる種類の前処理を組合せた後に、異なる解析工程を実行した結果、DNAメチル化パターンおよびプロファイルを特定するための多数の技術が得られている。

【0013】

特に、メチローム解析の方法は3つのグループに分けられる。すなわち、制限酵素に基づくもの、クロマチン免疫沈降（ChIP）またはアフィニティに基づくもの、および重亜硫酸塩変換（遺伝子に基づくもの）である。制限酵素に基づく方法では、メチル化感受性制限酵素を網羅的なメチル化解析用の実験的方法（RLGS、DMHなど）と組合せることによって、より小さな/大きなスケールのDNAメチル化解析のためにメチル化感受性制限酵素を使用し、DNA配列が分からないまま任意の遺伝子に適用される。しかし、多量のゲノムDNAが必要であるため、回復されたDNAが少量である場合には、この方法はサンプルの解析に適さない。他方、ChIPに基づく方法は、タンパク質に対する抗体を用いることによって、溶液からのタンパク質抗原の沈降から腫瘍の分化メチル化領域を同定するのに有用である。これらの方法はタンパク質に基づくものであり、癌の研究に広範に適用されている。

【0014】

いくつかの利点にも拘らず、タンパク質に基づく方法は、規定部位におけるメチル（CH₃）基の検出に限られており、制限酵素認識配列の頻度によって得られるデータに限られているため、抗体の付着後に余分な増幅が必要である場合は方法が複雑になる。

【0015】

MSPはその高い解析感度で知られているが、プライマーの設計およびPCRサイクルの数に影響され得る。このため、偽陽性結果が生じる危険性があり、これは癌の早期発見にメチル化技術を用いる際の最も重要な問題の1つであるとされている。したがって、メチル化検出の特異性を高めることは、適切な早期発見試験の発展における重要な一歩である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0016】

本願の発明者は、既存の方法では蛍光検出手段に多額のコストがかかり、CMOSプロセスなどの標準的な大量生産製造技術に概して対応していないことを認識した。

【課題を解決するための手段】

【0017】

発明の要約

本発明の第1の局面によると、DNAサンプル中のメチル化ヌクレオチドを検出するための、イオン感応型電界効果トランジスタ（ISFET）の使用が提供される。

【0018】

本発明の第2の局面によると、DNAサンプル中のメチル化ヌクレオチドを検出する方法であって、メチル化ヌクレオチドと非メチル化ヌクレオチドを識別する試薬を用いてDNAのサンプルを処理して、処理したDNAを提供するステップと、処理したDNAを増幅するステップと、増幅したDNAを任意にシーケンシングするステップとを含み、I

10

20

30

40

50

S F E T が、増幅および / またはシーケンシングするステップの鎖伸長反応の間に D N A 鎖への 1 つ以上の d N T P の付加を監視する方法が提供される。

【 0 0 1 9 】

増幅および合成によるシーケンシング (sequencing-by-synthesis) の間、イオンが放出または消費される。たとえば、ヌクレオチドが鎖伸長反応に取込まれると水素イオンが放出される。これらのイオンは I S F E T によって検出されて、出力される電気信号を変化させ得る。

【 0 0 2 0 】

試薬は、D N A サンプル中のメチル化ヌクレオチドのメチル基と選択的に結合する抗体であり得る。次に、サンプルに対して免疫沈降を行い、それによって非抗体結合フラグメント (すなわち非メチル化フラグメント) から抗体結合 D N A フラグメント (すなわちメチル化フラグメント) が分離され得る。

10

【 0 0 2 1 】

試薬を用いた処理の前に、D N A サンプルに対して、1 つ以上の付加的なプロセスが行われ得る。D N A 鎖をより小さなフラグメントに分解するために、D N A は精製または処理され得る。たとえば、D N A に対してソニケーションまたは制限酵素消化が行われ得る。

【 0 0 2 2 】

試薬は、メチル化または非メチル化ヌクレオチドと選択的に反応し得る。ある実施形態では、試薬は重亜硫酸塩を含み、これは D N A サンプル中の非メチル化シトシンのみをウ

20

【 0 0 2 3 】

D N A の増幅は P C R (ポリメラーゼ連鎖反応) または等温増幅を用いて行われ得る。メチル化ヌクレオチドは、処理した D N A 鎖に対して定量 P C R を行うことによって検出され得る。

【 0 0 2 4 】

D N A を重亜硫酸塩 (たとえば HSO_3^- イオン、重亜硫酸ナトリウム、 NaHSO_3) で処理する場合、P C R はメチル化特異的プライマーを用いて行われ得る。メチル化特異的プライマーは、オリジナルの D N A サンプル中のメチル化シトシンに対応する位置にグ

30

【 0 0 2 5 】

代替的に、非メチル化サンプルから処理した D N A 鎖のみを増幅することができる非メチル化特異的プライマーが用いられ得る。これらのプライマーは、オリジナルのサンプル中の非メチル化シトシンに対応する位置にグアニンの代わりにアデニンを取込む。非メチル化シトシンは重亜硫酸塩によってウラシルに変換されるため、アデニンはウラシルに相補的であり、プライマーを処理した D N A に結合させることができるので、非メチル化サ

40

【 0 0 2 6 】

特定の実施形態では、当該方法は、非メチル化シトシンをウラシルに変換する重亜硫酸塩を用いて D N A のサンプルを処理して、処理した D N A を提供するステップと、メチル化特異的プライマーまたは非メチル化特異的プライマーを用いて、処理した D N A を P C R 増幅するステップとを含み、I S F E T が、P C R の間に鎖伸長反応への d N T P の付加を監視する。

【 0 0 2 7 】

好都合なことに、この方法では、P C R 生成物のその後の解析 (たとえばシーケンシングによる解析) を必要とせずに、P C R 反応の間に直接的に D N A サンプル中のメチル

50

化を検出することができるが、必要であればシーケンシングも行なってよい。

【0028】

本発明はさらに、測定対象のサンプルを提供し、当該サンプルを、メチル化ヌクレオチドと非メチル化ヌクレオチドを識別する作業を行うプロセスで処理することによって、DNAサンプル中のメチル化ヌクレオチドを検出する使用および方法も含む。当該プロセスの直接的または間接的な結果は、イオン感応型電界効果トランジスタ（ISFET）を用いて検出される。

【0029】

当該結果は、化学反応の副生成物であり得る。

反応では典型的に、数千の分子のすべてが同時に同一の反応を経験する。

10

【0030】

反応はDNA合成であり得、イオン電荷の変動は、ジデオキシヌクレオチド三リン酸（ddNTP）およびデオキシヌクレオチド三リン酸（dNTP）の挿入を表わす。

【0031】

副生成物の種類または量は、1つ以上のヌクレオチドのメチル化に依存する。

検査対象のDNAのサンプルが重亜硫酸塩で処理されて、メチル化シトシンがウラシルに変えられ得る。

【0032】

処理した鎖に対して、ウラシルが存在する場合はウラシルがチミンによって置換されたDNA鎖を形成するプロセスが行われ得る。

20

【0033】

処理した鎖に対して、たとえばPCR増幅または等温増幅などの増幅が行われ得る。増幅の間、処理した鎖の多くのコピーが作られる。これらは多くのプロセスによってシーケンシング可能であり、その間、イオンが放出または消費される。たとえば、合成によるシーケンシングの間の鎖へのヌクレオチドの取込みの際に、水素イオンが放出され得る。これらのイオンはISFETによって検出されて、出力される電気信号を変化させ得る。

【0034】

メチル化ヌクレオチドは、処理した鎖に定量PCRを行なうことによって検出され得る。メチル化サンプルから処理した鎖のみを増幅することができるメチル化特異的プライマーが用いられ得る。代替的に、または別個に、非メチル化サンプルから処理した鎖のみを増幅することができる非メチル化特異的プライマーが用いられ得る。

30

【0035】

本方法では、生成物のその後の解析を必要とせずに、PCRの間に直接的に2、3の位置のメチル化状態を検出することができる。

【0036】

本発明の別の局面によると、DNA鎖中の1つ以上のメチル化ヌクレオチドの位置を特定する方法が提供される。

【0037】

本発明のさらなる局面によると、DNAサンプル中のメチル化ヌクレオチドの量を特定する方法が提供される。

40

【0038】

本発明のさらなる局面によると、メチル化DNAを検出するための装置であって、第1の基板上のISFETと、DNAサンプルをISFETに接触させるためのマイクロ流体チャンバを有する第2の基板とを含む装置が提供される。当該装置は重亜硫酸塩を含有し得る。

【0039】

当該装置は、PCRを行うためのサーモサイクラーをさらに含む得る。

当該装置は、単一の反応チャンバまたは複数の反応チャンバを含む得る。各チャンバがISFETを含む得る。特定の実施形態では4つのチャンバが提供され、各々がISFET

50

Tを含む。各チャンバは、PCR反応に用いる、異なるdNTPまたは異なるプライマーもしくはプローブを含み得る。

【0040】

本発明のある局面では、DNAメチル化を測定するための装置であって、DNAを含有する第1のサンプルに露出可能な第1のイオン感応型電界効果トランジスタ（ISFET）と、DNAを含有する第2のサンプルに露出可能な第2のISFETと、出力信号を提供する回路とを含み、出力信号は第1および第2のISFETの信号に由来する装置が提供される。

【0041】

第2のサンプルは、既知量のメチル化を有する基準サンプルであり得る。

第1のサンプルはメチル化サンプルであり得、非メチル化サンプルであり得る第2のサンプルと比較され得る。

【0042】

出力信号は、第1および第2のISFETの信号の比率であり得る。

当該装置は、複数の第1のISFETをさらに含み得、各ISFETは、異なるメチル化クラスタを見ているサンプルに露出可能である。

【0043】

ISFETは、弱反転領域で動作するようにバイアスをかけられ得る。

ISFETおよび回路は基板上に集積され得、ISFETのトランジスタは回路の一部を形成する。

【0044】

ISFETの信号は電流であり得、回路の出力信号は電流の比率であり得る。

上記装置の出力信号は閾値信号と比較され、対象部位の比較メチル化値と関連付けられるポテンシャルの診断または診療結果を示し得る。

【0045】

本発明のいずれの局面においても、鎖伸長および水素イオン放出が起こり、ISFETの電気出力および信号に離散的な変化が生じ得る。これは、たとえば本明細書に記載されているように制御と比較され得る。たとえば、ISFETの電気出力および信号は、プローブに相補的な標的配列の欠如と比較され得る。ISFETの電気出力信号は、dNTPの付加後に監視される。

【0046】

添付の図面を参照して、本発明の特定のな実施形態を例示としてのみ以下に説明する。

詳細な説明

【図面の簡単な説明】

【0047】

【図1a】従来のISFET構成に露出したサンプル溶液を示す図である。

【図1b】フローティングゲートISFETに露出したサンプル溶液を示す図である。

【図2a】ISFETマクロモデルを示す図である。

【図2b】CMOS ISFETマクロモデルを示す図である。

【図3】商用CMOS技術における典型的なプロセスフローを示す図である。

【図4】高度メチル化（hypermethylation）の頻度、異なる腫瘍抑制遺伝子、および異なる腫瘍の種類の間を三次元で表わした図である。

【図5】正常細胞および腫瘍細胞における転写に対するメチル化の影響を示す図である。

【図6】本発明の実施形態に係る、重亜硫酸塩処理の後にPCRを受けたDNAサンプル中のメチル化DNAおよび非メチル化DNAの変化をそれぞれ例示する図である。

【図7】本発明の実施形態に係る、DNAのサンプル中のメチル化を定量化するメトリクスを決定する際の一連のステップを示す図である。

【図8a】免疫沈降に基づくメチル化検出の方法を概略的に示す図である。

【図8b】重亜硫酸塩変換に基づくメチル化検出の方法を概略的に示す図である。

【図9】重亜硫酸塩処理を用いてDNA配列を検出するための方法のステップを示す図で

10

20

30

40

50

ある。

【図10】公知の解析法を用いてDNA配列を検出するための方法のステップを示す図である。

【図11】本発明の実施形態の方法を概略的に示す図である。

【図12】本発明の実施形態に係るメチル化細胞を概略的に示す図である。

【図13】本発明の実施形態に係る出力信号を提供するためのISFETを組み込んだ回路を示す図である。

【図14】出力信号を提供するための図13に示すような複数の回路を含むシステム回路を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0048】

ある実施形態では、図11を参照して、

・試験対象のDNAサンプルを提供し、精製し、マイクロ流体チャンバに入れて、ISFETと接触させる。

【0049】

・非メチル化シトシンの位置がウラシルになるように、重亜硫酸塩処理によってDNAサンプルを変化させる。

【0050】

・処理したサンプルをPCRを用いて増幅する。結果として生じるDNAコピーにおいて、ウラシルの位置はチミンになる。

【0051】

・コピーを変性させ、プローブを対象区域（たとえば腫瘍プロモータ領域）までハイブリダイズする。

【0052】

・合成によるシーケンシングを行い、異なるdNTPをチャンバに1つずつ付加する。特定対象の位置におけるdNTPの取込みの間、水素イオンが放出される。グアニンはメチル化シトシンと合体（incorporate）し、アデニンは、オリジナルのチミン、および非メチル化シトシンに対応するウラシルに対応するチミンの両方と合体する。各々の公知のdNTP付加の間、ISFETの電気出力信号を監視する。

【0053】

代替的な実施形態では、

・試験対象のサンプルを提供し、精製し、マイクロ流体チャンバに入れて、ISFETと接触させる。

【0054】

・非メチル化シトシンの位置がウラシルになるように、重亜硫酸塩処理によってサンプルを変化させる。

【0055】

・処理したサンプルをPCRを用いて増幅する。結果として生じるDNAコピーにおいて、ウラシルの位置はチミンになる。

【0056】

・メチル化シトシンを検出することが目標の位置にグアニン、または非メチル化シトシン（ウラシル）を検出することが目標の位置にアデニンを有するように設計されたプローブをハイブリダイズし、増幅したDNAの一本鎖コピーを変性させる。

【0057】

・複数のdNTPをまとめて、または1つずつチャンバに付加する。プローブの3'末端における複数のdNTPの取込み、または鎖伸長の間に水素イオンが放出される。プローブに相補的な標的配列の存在下で、鎖伸長および水素イオン放出が起こる結果、ISFETの電気出力信号に離散的な変化が生じる。これは、プローブに相補的な標的配列の欠如と比較され得る。ISFETの電気出力信号を、dNTPの付加後に監視する。

【0058】

10

20

30

40

50

さらに別の実施形態では、

・試験対象のサンプルを提供し、精製し、マイクロ流体チャンバに入れて、I S F E T およびチャンバのサーモサイクリング用装置と接触させる。

【0059】

・非メチル化シトシンの位置がウラシルになるように、重亜硫酸塩処理によってサンプルを変化させる。

【0060】

・メチル化シトシン（ウラシル）を検出することが目標の位置にグアニン、または非メチル化シトシン（ウラシル）を検出することが目標の位置にアデニンを有するように設計された増幅プライマーのセットを、増幅試薬、ポリメラーゼ酵素および過剰な d N T P と共にチャンバに付加する。

【0061】

・サンプルに対してサーモサイクリングを行って P C R を実行し、サーモサイクリングが進行するにつれて I S F E T の電気出力信号を監視する。プローブの 3 末端における複数の d N T P の取込み、または P C R の鎖伸長段階の間に水素イオンが放出される。プローブに相補的な標的配列の存在下で、鎖伸長および水素イオン放出が起こる結果、I S F E T の電気出力信号に離散的な変化が生じる。これは、プローブに相補的な標的配列の欠如と比較され得る。しかし、増幅混合物によって水素イオンの放出が緩衝されるため、標的 D N A の存在下の増幅時に鎖伸長から生じる p H の変化に応じて電気出力信号を生成するためには、増幅を、サンプルの緩衝能力を克服するようにサイクルの閾値数を超過して

【0062】

上述の実施形態のいずれも、異なる順序でステップを組合せたり、試薬を導入することができる。

【0063】

変化が生じる時、および変化の大きさを監視することによって D N A のシーケンシングが可能になり、これによってオリジナルのサンプル中のメチル化または非メチル化シトシンの位置が特定される。電気信号は、基準 I S F E T を有する制御チャンバの基準信号、または基準電極と比較され得る。信号の差は、配列中のある位置における公知のヌクレオチドの取込み対非取込みを表わす。

【0064】

処理したサンプルの配列を制御配列または以前のサンプルと比較して、サンプル中のメチル化シトシンの量および位置を特定することができる。たとえば、シトシンの代わりにチミンが存在すること（それぞれグアニンの代わりにアデニンを取込むことによって）は、オリジナルのサンプルが特定の位置に非メチル化シトシンを含んでいたことを表わし得る。

【0065】

メッセンジャー R N A のプロモータとして公知の領域に発生するサンプル D N A のメチル化は、D N A の発現に影響を及ぼし得る。

【0066】

メチル化される D N A の量、およびサンプル中のオリジナルの D N A のメチル化のパーセントは、I S F E T から出力される信号の大きさに影響を与える。この信号は、メチル化の量、およびそれが起こっている位置の両方を提供するため、たとえば、存在する腫瘍の可能性の予測を提供する。

【0067】

本方法は、サーモサイクリングと共に、またはサーモサイクリングなしで用いられ得る。たとえば、サーモサイクリングは、T a q ポリメラーゼまたは組換え型 T 7 ポリメラーゼなどのシーケンシング酵素を用いて、最適化を促進するのに用いられ得る。T 7 ポリメラーゼを用いる場合、ヌクレオチド挿入を監視する速度が上がり、精度が向上し得る。たとえば、試薬混合物の p H は調節可能である。p H が減少するとより多くの水素イオン

10

20

30

40

50

が生成されるが、反応も全滅する傾向にある。試験によって、 $pH 6.8$ が有用な pH 値であることがわかっている。マグネシウムを試薬混合物に付加して酵素を発動させる。試薬の濃度は変更可能である。

【0068】

典型的なサーモサイクリングシーケンスを表1に示す。

【0069】

【表1】

表1. サイクルシーケンス

温度	期間	機能
95°C	30 秒	DNA 鋳型の変性
55°C	30 秒	プライマーのアニーリング
72°C	60 秒	DNA 伸長および終端

10

【0070】

サーマルサイクラーの内部で作業することによって、最小限の操作でシーケンスプロセスを複数回反復することができる。これによってノイズブースティングに対するシグナルが可能になり、GCリッチ領域または単一ヌクレオチド反復領域などの読取が困難な領域の描写が容易になる。

【0071】

ISFETはソース/ドレイン領域のMOSFET構造に基づくものであって、下部の装置のチャンネルに容量結合された化学的に敏感な絶縁体と接触している電解質溶液に露出した基準電極によって与えられるリモートゲートを有する。このように説明されることもあるが、ISFETの定義は、図1aに示されるような金属ゲートを有しない構造に限定されない。より一般的に、ISFETは、その閾値電圧がイオン濃度の変化によって変調されるイオン感応型ゲート構造を有する任意のFETと定義される。イオン感応型ゲート構造は、図1aに示されるような無機または有機絶縁膜のみで、またはイオン感応型絶縁膜に覆われた1つ以上の金属層に接続された電氣的に浮遊状態のポリシリコンゲートを含む積層ゲート構造のみで、構成され得る。

20

【0072】

好ましい実施形態では、窒化シリコン絶縁層を有する pH 感応型ISFETは、後者の積層ゲート構造に従って標準的なCMOSプロセスで作製される。これは文献[1-4]において広範に報告されている確立された技術であり、改良したプロセスフロー、さらなるマスク工程または任意のプロセス後工程を必要とせず、標準的な半導体製造工場で大規模生産できるという利点を有する。CMOSベースの pH -ISFET構造は、その pH が測定対象である電解質溶液と接触している絶縁層として、一般的に窒化シリコンまたは酸窒化シリコンであるパッシベーション層と、下部の電界効果トランジスタのポリシリコンゲートとパッシベーション層との間に接続された所与のCMOSプロセスで使用可能な1つ以上の金属層のフローティングゲート積層体とを用いる(図1b)。

30

【0073】

基準電極に印加される電圧はすべて、電解質を介して絶縁体表面に容量結合されており、この界面上のイオンからの pH 依存電荷がチャンネル電流を変調する。これによって、ISFET ID-VGSの転移特性に目に見える変化が生じ、これはその閾値電圧(V_{th})の変調として表わすことができる。CMOS ISFETでは、パッシベーション面に蓄積される pH 依存電荷はその下のフローティングゲート構造に容量結合され、フローティングゲート構造は、下部の電界効果トランジスタのソース端子とドレイン端子との間のチャンネルにゲート酸化物を横切って容量結合される。このため、基準電極によってISFETにバイアスをかけると(典型的に異なる用途におけるAg/AgClまたはPt偽電極)、絶縁体表面におけるイオン濃度の変化によってISFETの電気信号が変調される。CMOS製造工程の標準的な処理ステップ(図3)を用いることができる。

40

50

【 0 0 7 4 】

基準電極に印加される電圧はすべて、電解質を介して絶縁体表面に容量結合されており、この界面上のイオンからの pH 依存電荷がチャネル電流を変調する。これによって、ISFET 転移特性に目に見える変化が生じ、これはその閾値電圧 V_{th} の変調として表わすことができる。ISFET の閾値電圧をそのリモートゲート (G)、つまり基準電極に対して規定すると、それに矛盾する (believes) 装置の真性 MOSFET 閾値電圧と、ポリシリコンゲートと接触している上部金属層と基準電極との電位差との組合せとして表わすことができる (図 2 b)。

【 0 0 7 5 】

【 数 1 】

$$V_{th(ISFET)} = V_{th(MOSFET)} + V_{chem} \quad (1)$$

10

【 0 0 7 6 】

【 数 2 】

$$V_{chem} = \gamma + 2.3\alpha U_T pH \quad (2)$$

【 0 0 7 7 】

式中、ガンマはすべての pH 独立化学ポテンシャルのグルーピングであり、 U_T は [5] に記載されるように熱電圧 kT/q または RT/F である。

【 0 0 7 8 】

20

より詳しくは、

【 0 0 7 9 】

【 数 3 】

$$V_{th(MOSFET)} = \phi_{ms} + 2\phi_f - (Q_{ss} + Q_{sc})/C_{ox} \quad (3)$$

【 0 0 8 0 】

および

【 0 0 8 1 】

【 数 4 】

$$V_{chem} = E_{ref} + \phi_{lj} + \chi_{eo} - \phi_{eo} - \frac{\phi_{ms}}{q} \quad (4)$$

30

【 0 0 8 2 】

であり、式中、従来の MOSFET パラメータは、金属半導体仕事関数 ϕ_{ms} の差、半導体のフェルミポテンシャル ϕ_f 、固定表面状態電荷密度 Q_{ss} 、半導体表面電荷密度 Q_{sc} 、および単位面積当たりの絶縁体容量 C_{ox} である。

【 0 0 8 3 】

V_{chem} はポテンシャルのグルーピングであり、この内、 ϕ_{eo} は唯一の pH 依存項である。 E_{ref} は、真空に対する銀 / 塩化銀基準電極の絶対電極ポテンシャルであり、標準的な水素電極に正規化された標準的な電極ポテンシャルに 4.44 V を加えることによって見つけることができ [99]、 ϕ_{lj} は基準溶液と電解質との液体接合部電位差であり、 χ_{eo} は電解質 - 絶縁体界面のポテンシャルであり、 ϕ_{eo} は電解質 - 絶縁体双極子ポテンシャルであり、 ϕ_{ms}/q は、ISFET のゲートには金属がないため、 $V_{th(MOSFET)}$ から減算すべき V_{chem} に含まれる金属仕事関数である。

40

【 0 0 8 4 】

電解質 - 絶縁体界面ポテンシャル χ_{eo} の pH に対する依存は、部位結合理論と Gouy-Chapman-Stern 二重層モデルとの組合せを用いてモデル化される。

【 0 0 8 5 】

メチル化 DNA は、生物学に基づいた方法を用いて (重亜硫酸塩変換およびメチル化特

50

異的プライマー伸長を用いて)処理され、回路は I_{ref} を定義し、トランスリニア細胞 (translinear cell) を介して I_{out} を I_{ref} と比較する。

【0086】

本明細書中で「メチル化細胞」と称されるシステム(図12)は、ISFETの標準的な回路技術との統合能力のために知能センサ設計を利用して、リアルタイムに連続的に働き得る。より詳細には、システムの化学的フロントエンドは、a) 1つ以上の CpGジヌクレオチドを含むDNA配列、または重亜硫酸塩試薬で処理した配列のいずれか一方を参照して、1つ以上の CpG の非メチル化配列からメチル化配列を識別するための手段として、試薬混合物と、b) 反応の pH に依存して、加水分解反応を通じたDNAサンプルの標的相補的領域でのみハイブリダイゼーション反応が起こるようにプライマー対を用いるメチル化特異的アニーリングのプロセスとを用いる。

10

【0087】

さらに、プラットフォームシステムの化学的部分から得られる情報は、ISFETに基づいたセンサフロントエンドの実行を通じて電気的部分によって解析される。このような相互作用によって、pH形態で取得され、調製したDNAサンプルから得られる、ISFETに基づいたセンサの出力としてのレシオメトリック信号が決定され、メチル化/非メチル化情報の比率が得られるため、病原性遺伝子と正常メチル化遺伝子との差異を特定できる。このような比率は、予め定義された閾値を上回って呈示されるメチル化アリコットの割合に基づいて得られる。取得した比率を解析することによって、ISFETが含まれる場合、知的処理アルゴリズムから得られる向上した精度で癌の早期発見が可能になり得る。

20

【0088】

患者のサンプル対基準サンプルの相対的なメチル化を表わす出力信号を提供する2つのISFETを集積した集積回路を図13に示す。当該回路は、各ISFETの上方のウェルと、サンプルおよび/または試薬を送出するチャンネルとを提供するマイクロ流体構成で覆われ得る。試薬はサンプルと混合して、サンプル中のメチル化の量に依存して水素イオンを生成する。

【0089】

サンプルをISFETセンサX1に露出し、特異的遺伝子プロモータ(CDKN2A/p16-INK4、RASSF1、DAPキナーゼ、H-カドヘリン、APCおよびO⁶-MGMTなど)の異常メチル化の証拠があるか否かを試験する。回路1は基準電流(I_{ref})を規定し、2つのカレントミラー(M8-M9, M12-M13)およびCMOSインバータ(M10, M11)からなる電流比較器によって、出力電流(I_{out})を基準電流と比較する。第2のISFETセンサX2を、「非メチル化サンプル」とラベル付けした正常メチル化サンプル(健常対照群)に露出する。

30

【0090】

当該回路は、メチル化された、重亜硫酸塩変換されたDNA患者サンプル、および重亜硫酸塩変換された非メチル化サンプルによって与えられるドレイン電流(I_{meth} および I_{unmeth})同士の分割を計算可能なトランスリニア細胞(MOSFET M1, M2, M3, M4)をさらに含む。電流分割のため、カレントミラーを用いて(M5, M6, M7)、電流の方向を回転させ、電流の比率をトランジスタをほとんど用いなくても計算できるようにトランスリニアループに適合させる。

40

【0091】

出力電流(I_{out})と基準電流(I_{ref})との比較に基づいて、CMOSインバータは、電流が I_{ref} によって設定された所望の閾値を超える場合はスイッチングに寄与することによって、臨界比率値と特定のCpGから得られる正常比率値を区別する。式(4)から得られるメチル化比率の計算は、遺伝子の全体的なメチル化に対する対象の腫瘍抑制因子内に存在するメチル化の異常レベルを表わすため、メチル化のレベルに相関するそのような遺伝子の機能の正常性の破壊に基づく疫学因子を規定する。

【0092】

50

2つのISFETであるX1およびX2によって与えられるドレイン電流間の分割を計算可能なトランスリニア細胞を示す。トランスリニア回路は、殆どの場合電流信号に対する乗算および除算を行なうために用いられる弱反転MOSトランジスタの電流と電圧の指数関数関係を利用する。

【0093】

誤差によって示されるループに対してキルヒホッフの電圧ループを実行することによって、以下の式が与えられる。

【0094】

【数5】

$$V_{GS1} + V_{GS4} = V_{GS2} + V_{GS3} \quad (2)$$

10

【0095】

したがって、弱反転ドレイン電流を置換した後は、

【0096】

【数6】

$$nUt \ln\left(\frac{I_{meth}}{I_0}\right) + nUt \ln\left(\frac{I_{gain}}{I_0}\right) = nUt \ln\left(\frac{I_{meth} + I_{unmeth}}{I_0}\right) + nUt \ln\left(\frac{I_{out}}{I_0}\right) \quad (3)$$

【0097】

となり、自然対数を加える基本関係を用いることによって、比率について以下の最終的な式が得られる。

20

【0098】

【数7】

$$I_{out} = I_{gain} \frac{I_{meth}}{I_{meth} + I_{unmeth}} \quad (4)$$

【0099】

これによって、 I_{gain} は比率に対する予め定義されたゲインの項であり、 I_{out} は出力電流であり、 I_{meth} および I_{unmeth} の両方は、弱反転バイアスをかけられた、ISFET装置X1およびX2の一般化されたドレイン電流(I_D)であり、以下のように定義される。

30

【0100】

【数8】

$$I_{D_{meth}}(X1) = I_0 e^{nUt} K_{meth} [meth]^{\frac{2_{meth}}{n}} \quad (5)$$

【0101】

【数9】

$$I_{D_{unmeth}}(X2) = I_0 e^{nUt} K_{unmeth} [unmeth]^{\frac{2_{unmeth}}{n}} \quad (6)$$

【0102】

40

式中の対象値を置換した後、

【0103】

【数10】

$$I_D = I_0 e^{nUt} K_{chem} [ionX]^{\frac{2_X}{n}} \quad (7)$$

【0104】

となり、これによって、 V_{GS} は装置のゲートソース電圧であり、 I_0 は固有電流であり、 n は弱反転傾斜係数であり、 U_t は熱電圧であり、 K_{chem} は一定の化学ポテンシャルのグルーピングであり、 X は感度パラメータであり、 $[ionX]$ は溶液中のイオン濃度である。

50

【0105】

上記のメチル化は、複数の遺伝子中のメチル化を検出する無修飾CMOS技術における実現の統合、スケラビリティおよびコストの低さという利点を利用してスケール変更可能である。たとえば、遺伝子1のメチル化を回路1のX1に露出しつつ、健常遺伝子1を回路1のX2に露出する。N番目の遺伝子を回路NのセンサX1およびX2に露出するまで、これを反復する。

【0106】

増幅したDNAサンプルを、ISFETであるX1のセットの上方のいくつかの別個のウェルに入れる。増幅したDNA鎖を、ISFETであるX2の第2のセットの上方のいくつかの別個のウェルに入れる。異なる対象CpGアイランドの前の点でアニールするように設計された異なるプローブを、各ウェルに別個に追加する。これによって、いくつかの対象遺伝子の相対的なメチル化を標準と比較する。各メチル化遺伝子の比率を、どの種類の腫瘍を検査中であるかに応じて重み付けし、出力診断信号を生成する。

10

【0107】

たとえば、研究によれば、肝腫瘍の検出はP15 (ink4b)、CDH1、APCおよびP14 (arf) 腫瘍抑制遺伝子と最も大きく関連していることがわかっている(図4参照)。このため、腫瘍の可能性の複雑な表示は、これらの遺伝子の関連メチル化の重み付け合計に基づき得る。

【0108】

1つの実施形態では、たとえば合成電流Imethを提供する複数のセンサX1に平行なISFETセンサを追加することによって、複数の電流を処理可能である。複数の非メチル化サンプルを、合成電流Iunmethを提供するX2に平行な複数のセンサに露出する。

20

【0109】

図14に示す代替的な実施形態では、各々が図13の回路と同様の複数の回路1がプロセッサ2に接続されて、出力信号3を提供する。プロセッサは、各回路1のデジタル出力(すなわちVout)またはメチル化比率を表わすアナログ信号(すなわちIout)を使用し得る。プロセッサは、CMOS内でセンサ回路1とさらに一体化したコンピュータまたは回路であり得る。

【0110】

本発明を上述のように好ましい実施形態の観点から説明したが、これらの実施形態は例示的なものに過ぎず、請求項はこれらの実施形態に限定されないことを理解すべきである。当業者であれば、開示内容に鑑みて、添付の請求項の範囲内に収まると考えられる変更および代替案を加えることができるであろう。本明細書に開示または図示される各特徴は、単独でも、ここに開示または図示されるいずれかの他の特徴と適切に組合されても、本発明に組込むことができる。

30

【図 1 a】

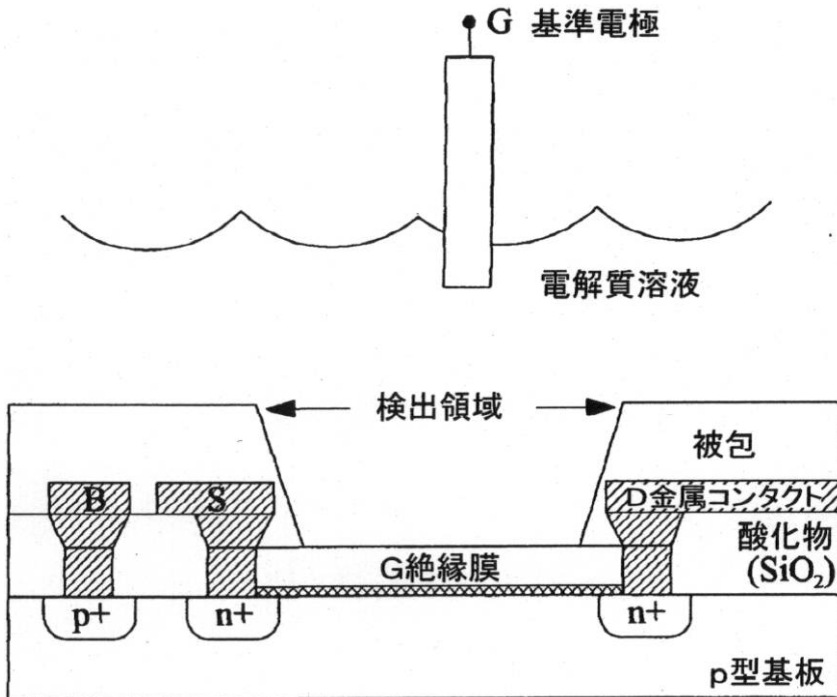


Figure 1a

【図 1 b】

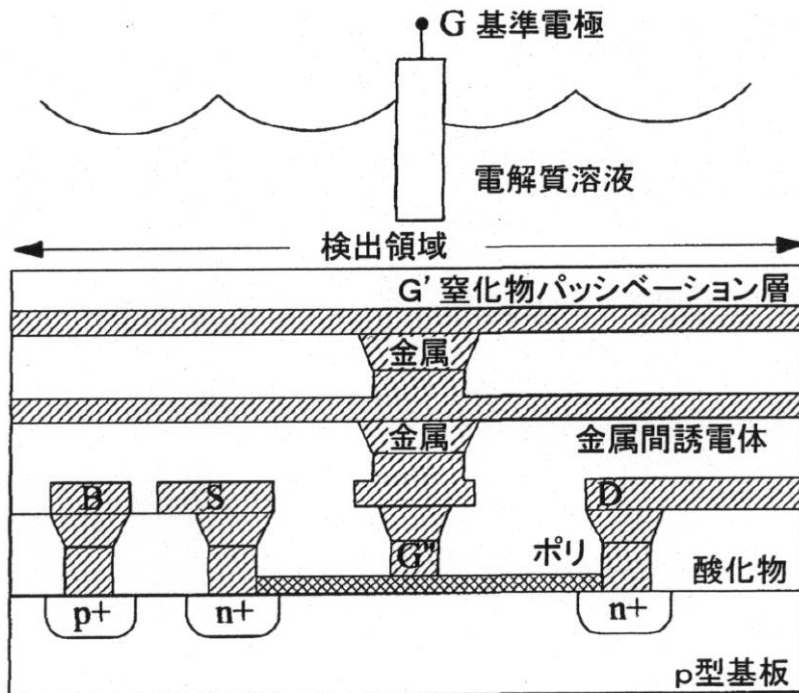


Figure 1b

【 図 2 a 】

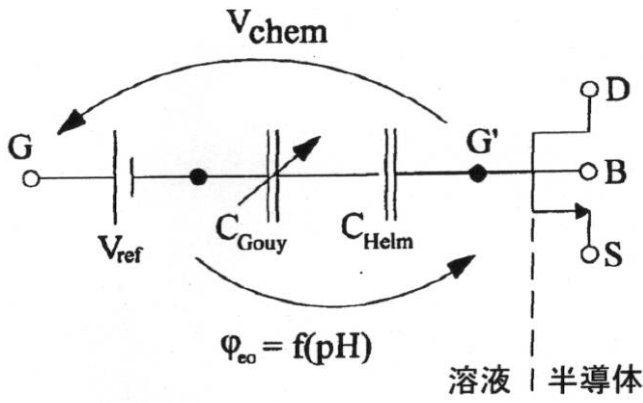


Figure 2a: ISFETマクロモデル

【 図 2 b 】

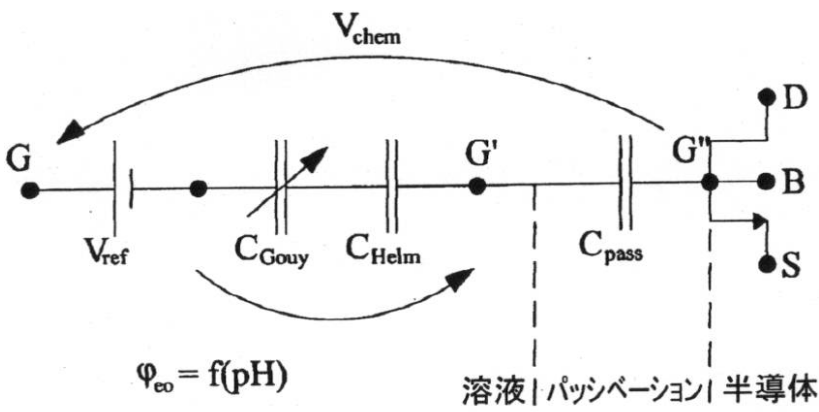


Figure 2b: CMOS ISFETマクロモデル

【図3】

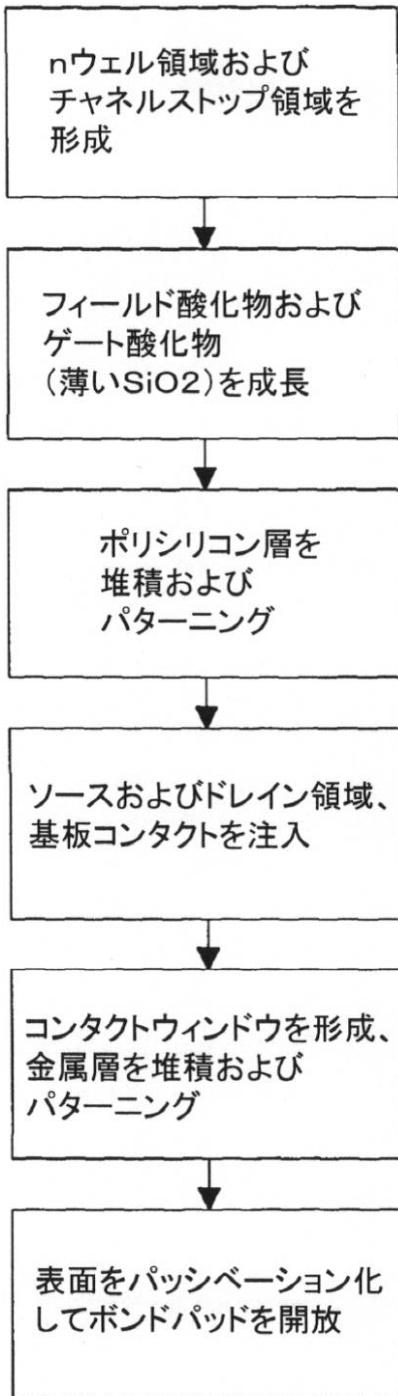


Figure 3

【 図 4 】

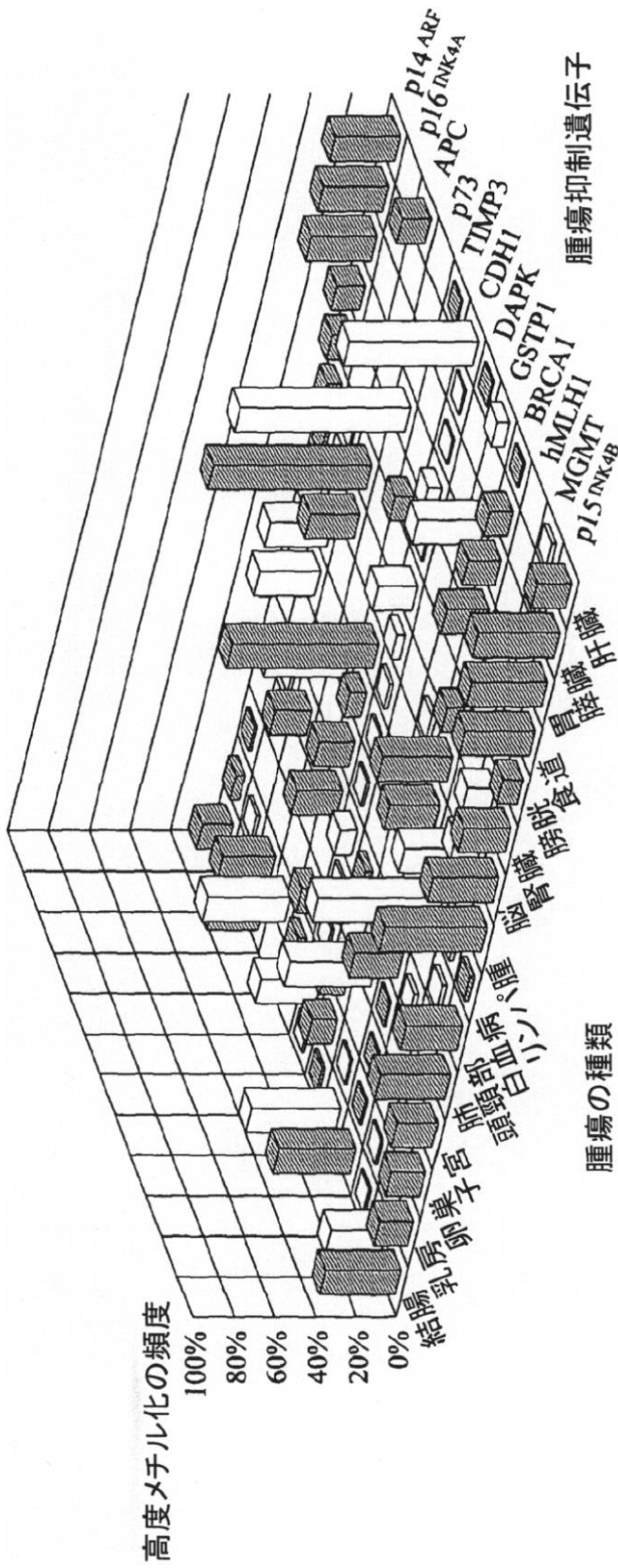


Figure 4

【 図 5 】

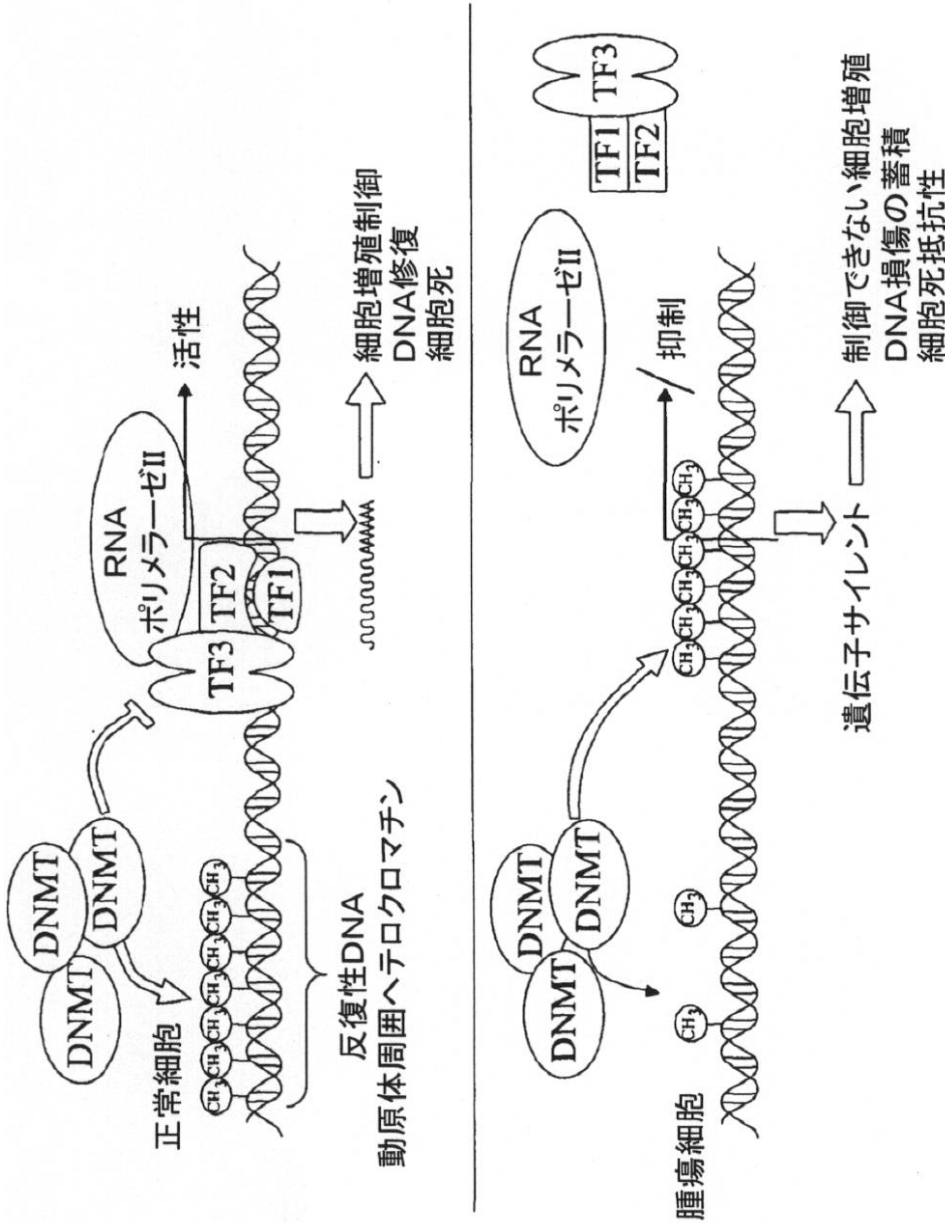


Figure 5

【 図 6 】

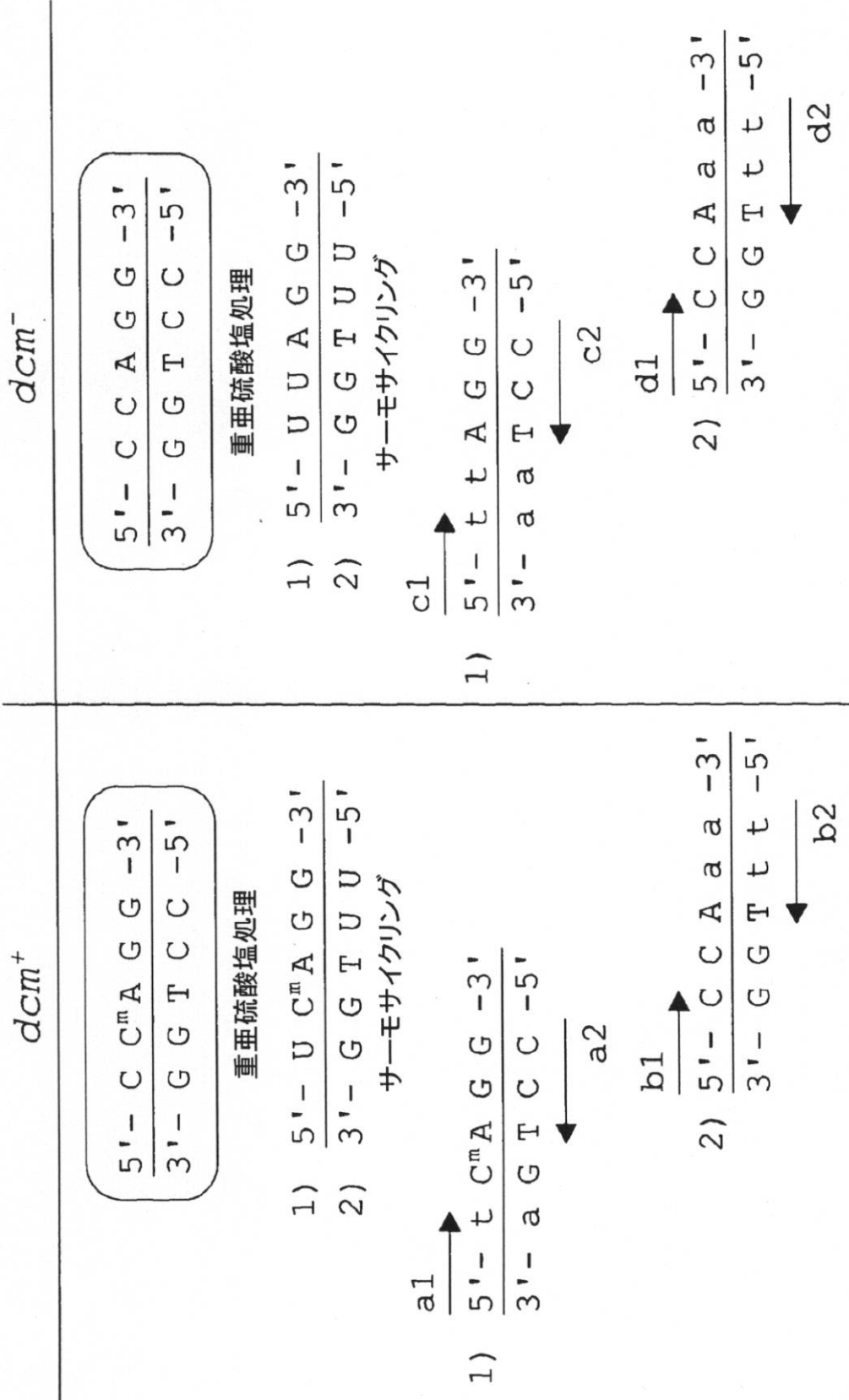


Figure 6b

Figure 6a

【図7】

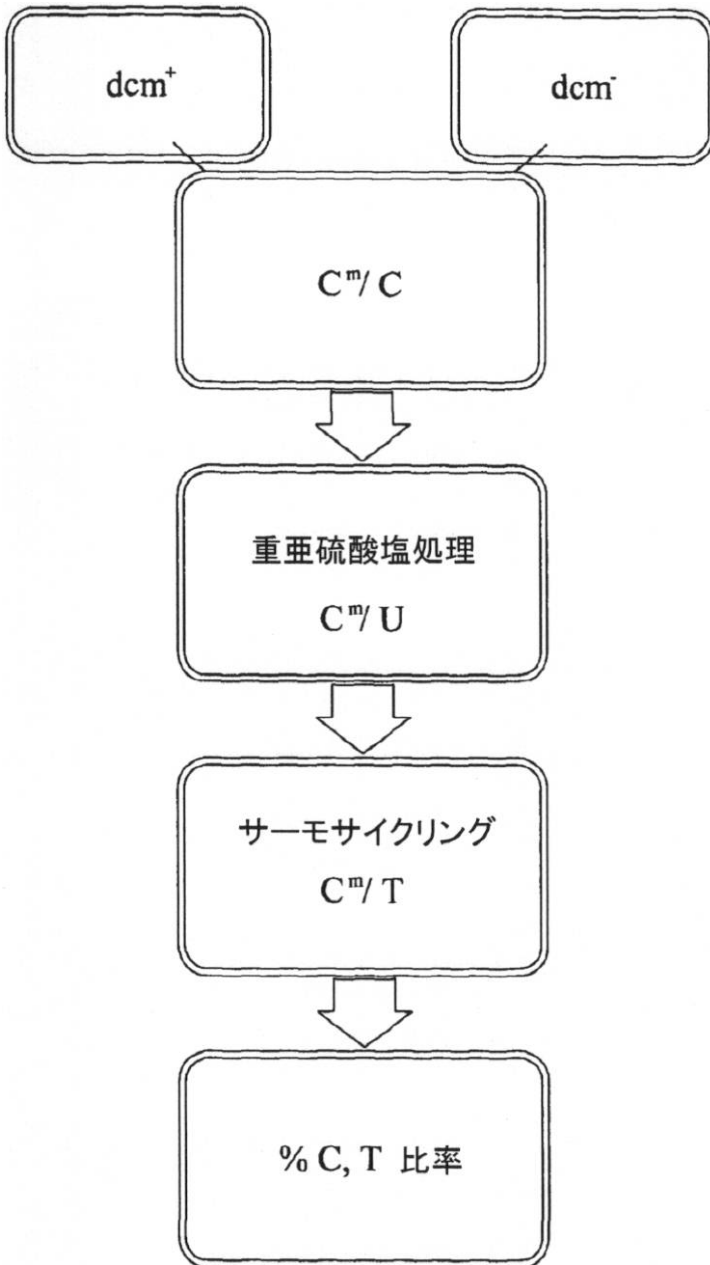


Figure 7

【図 8 a】

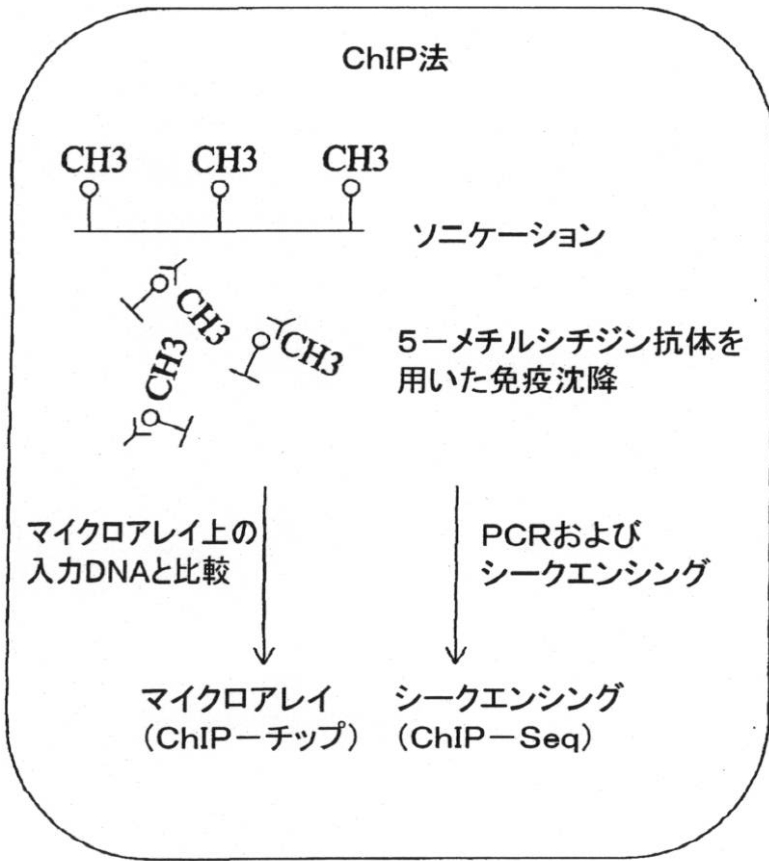


Figure 8a

【図 8 b】

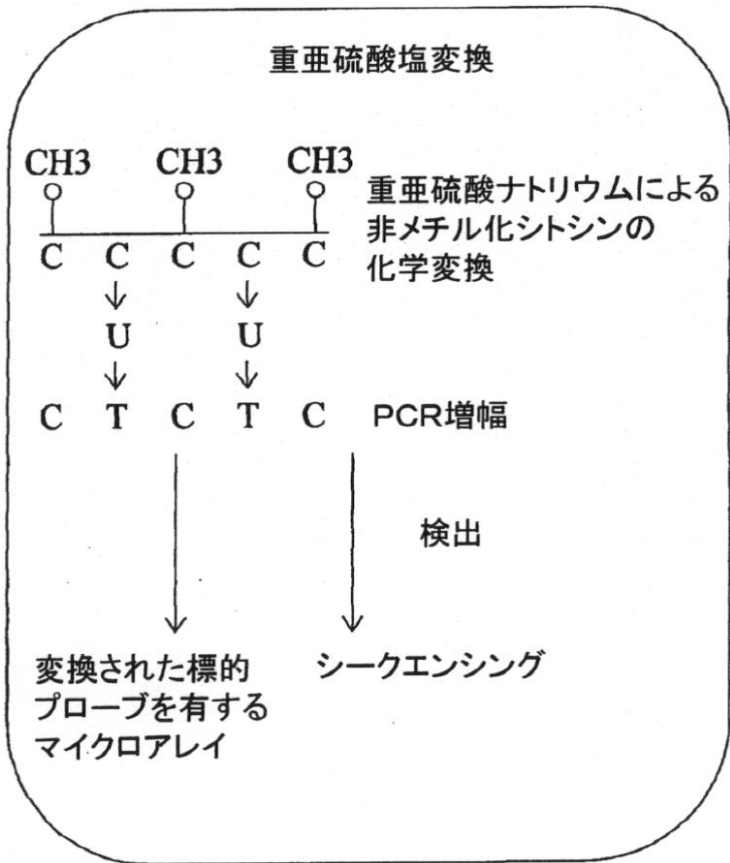


Figure 8b

【 図 9 】

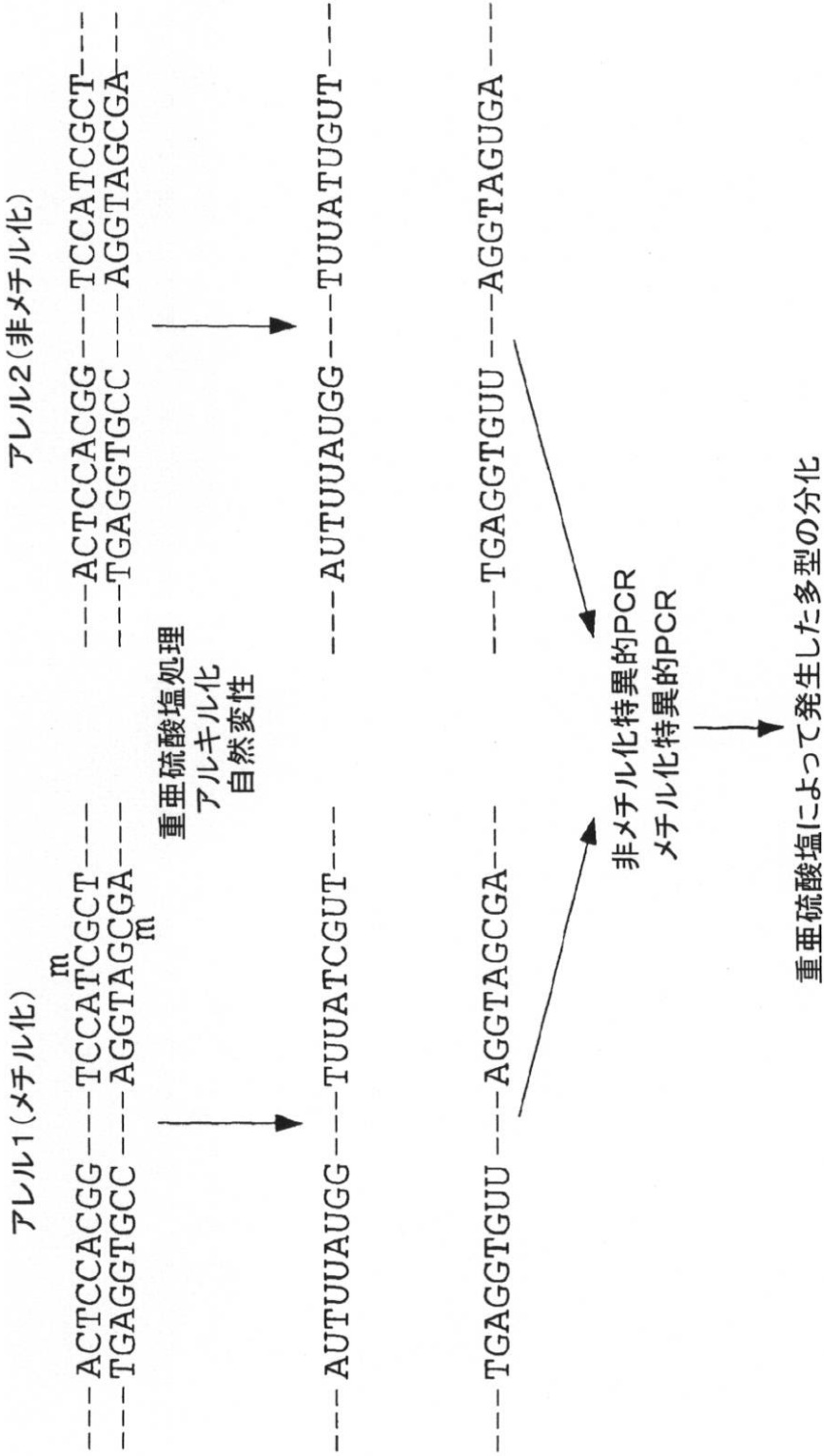


Figure 9

【 図 1 0 】

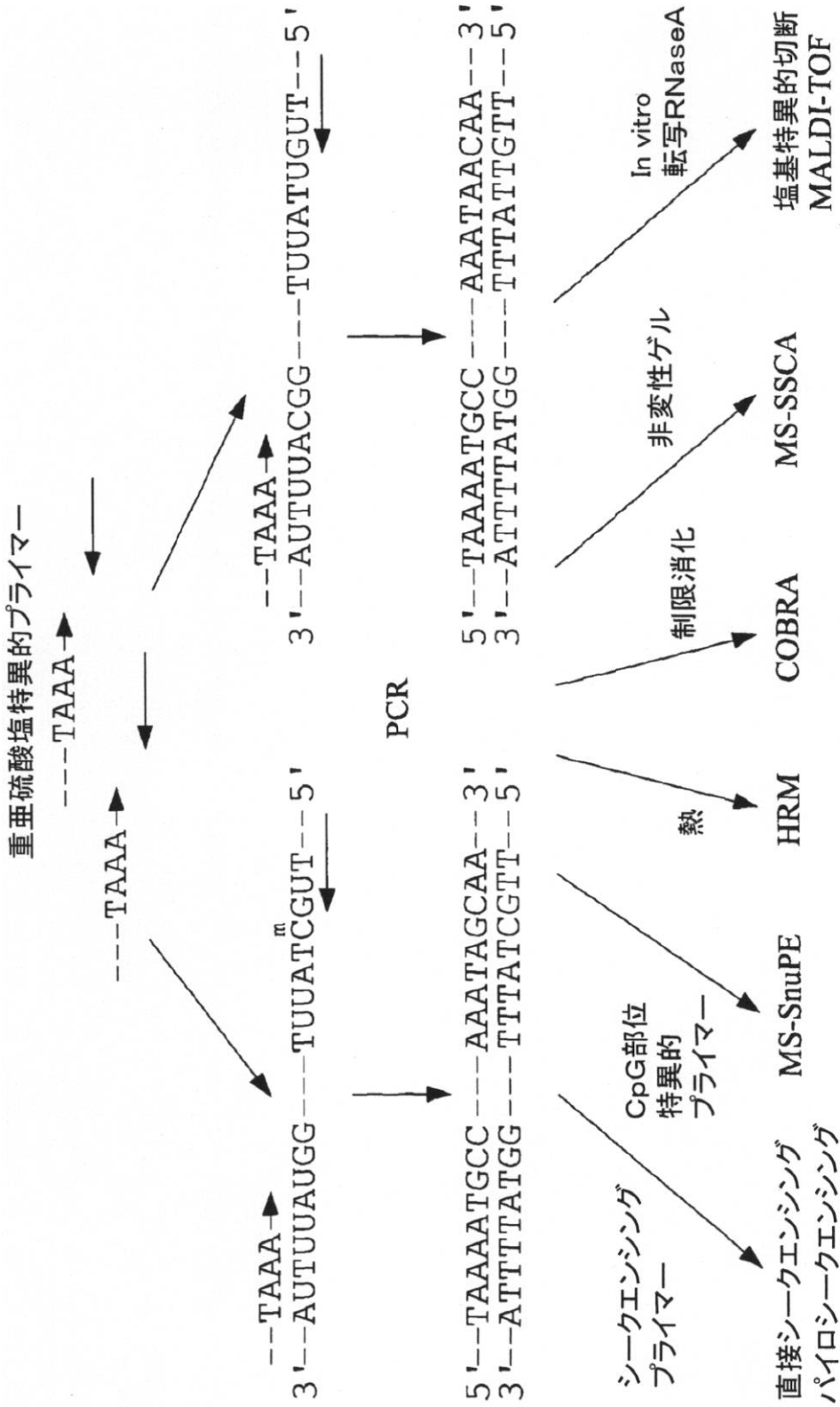


Figure 10

【図 11】

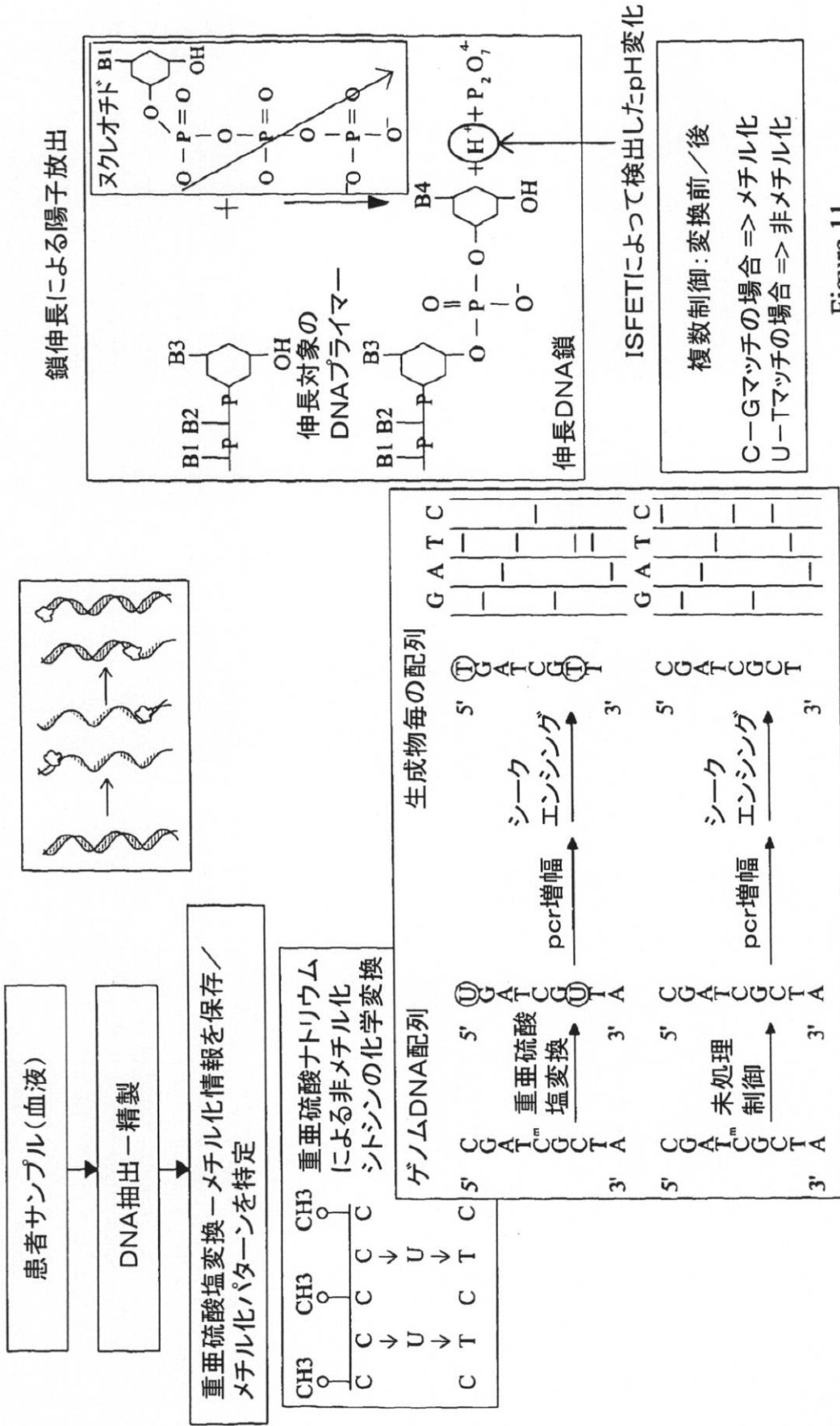


Figure 11

【図 12】

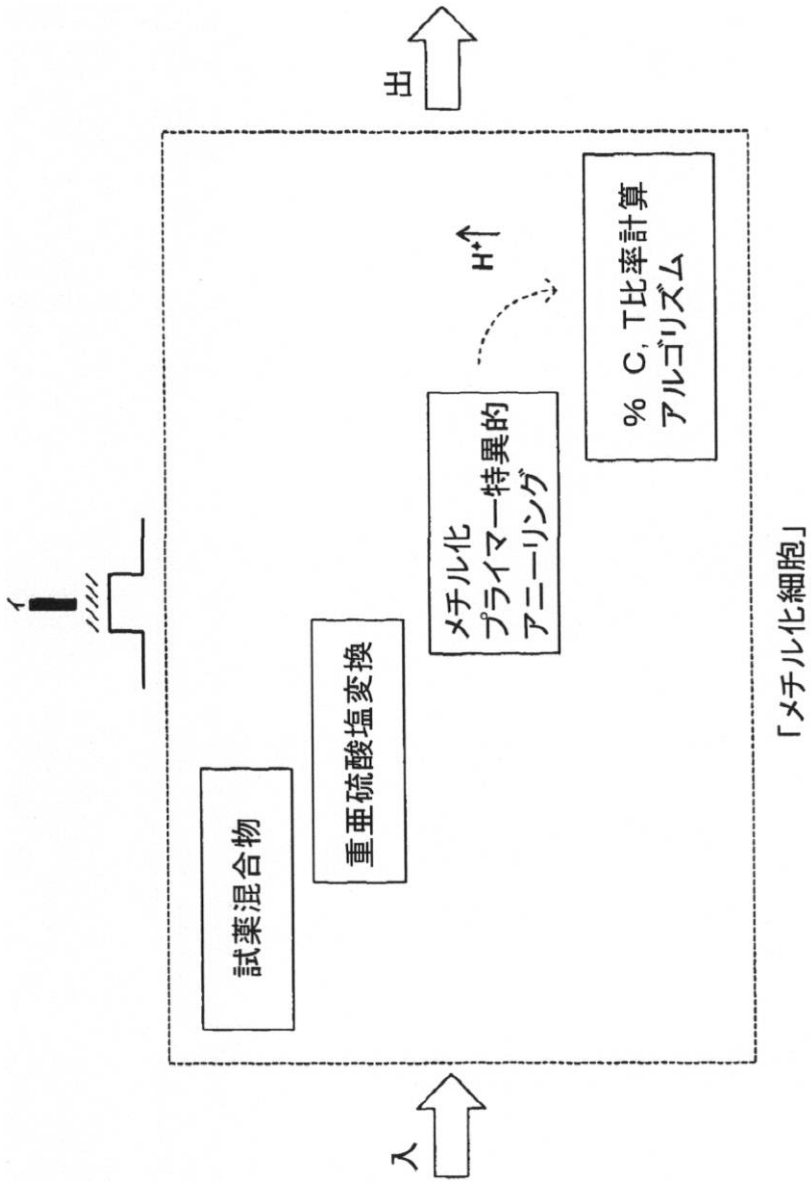


Figure 12

【図 14】

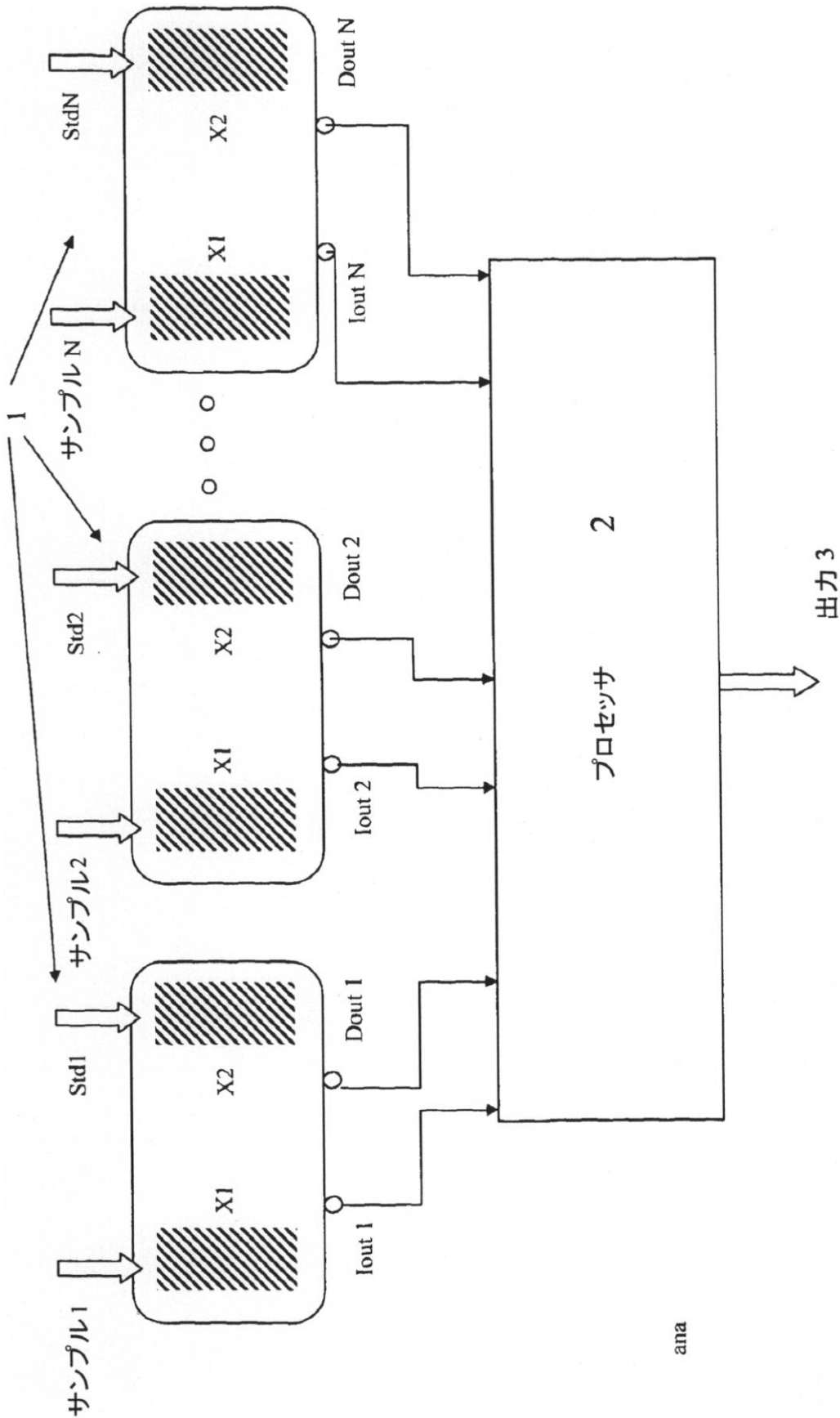


Figure 14

【手続補正書】

【提出日】平成24年11月13日(2012.11.13)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

DNA サンプル中のメチル化ヌクレオチドを検出するための、フローティングゲートを有するイオン感応型電界効果トランジスタ (I S F E T)の使用。

【請求項 2】

DNA サンプル中のメチル化ヌクレオチドを検出する方法であって、
メチル化ヌクレオチドと非メチル化ヌクレオチドを識別する試薬を用いてDNAのサンプルを処理して、処理したDNAを提供するステップと、
処理したDNAを増幅するステップと、
増幅したDNAを任意にシークエンシングするステップとを備え、
フローティングゲートを有する I S F E Tが、増幅および/またはシークエンシングするステップの鎖伸長反応の間にDNA鎖への1つ以上のdNTPの付加を監視する、方法。

【請求項 3】

試薬は、DNA サンプル中のメチル化ヌクレオチドのメチル基と選択的に結合する抗体である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

処理したDNAに対して免疫沈降を行い、それによって非抗体結合DNAから抗体結合DNAを分離する、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

試薬を用いた処理の前に、DNA サンプルに対して、DNAをより小さなフラグメントに分解するプロセスを行う最初のステップをさらに備える、請求項 3 または 4 に記載の方法。

【請求項 6】

プロセスはソニケーションである、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

試薬は、DNA サンプル中の非メチル化シトシンのみをウラシルに変換する重亜硫酸塩を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 8】

処理したDNAの増幅はPCRを用いて行われる、請求項 2 ~ 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

PCRは、メチル化DNAから生じる処理したDNA鎖のみを増幅することができるメチル化特異的プライマーを用いて行われる、請求項 7 に従属する場合の請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

PCRは、非メチル化DNAから生じる処理したDNA鎖のみを増幅することができる非メチル化特異的プライマーを用いて行われる、請求項 7 に従属する場合の請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

DNA サンプル中のメチル化ヌクレオチドを検出する方法であって、
非メチル化シトシンをウラシルに変換する重亜硫酸塩を用いてDNAのサンプルを処理して、処理したDNAを提供するステップと、
メチル化特異的プライマーまたは非メチル化特異的プライマーを用いて、処理したDNAをPCR増幅するステップとを備え、
フローティングゲートを有する I S F E Tが、PCRの間に鎖伸長反応へのdNTPの付加を監視する、方法。

【請求項 1 2】

DNAメチル化を測定するための装置であって、
DNAを含有する第1のサンプルに露出可能な、フローティングゲートを有する第1のイオン感応型電界効果トランジスタ(I S F E T)と、
DNAを含有する第2のサンプルに露出可能な、フローティングゲートを有する第2のI S F E Tと、
出力信号を提供する回路とを備え、出力信号は第1および第2のI S F E Tの信号に由来する、装置。

【請求項 1 3】

第1のサンプルはメチル化サンプルであり、非メチル化サンプルである第2のサンプルと比較される、請求項12に記載の装置。

【請求項 1 4】

第2のサンプルは、既知量のメチル化を有する基準サンプルである、請求項12に記載の装置。

【請求項 1 5】

出力信号は、第1および第2のI S F E Tの信号の比率である、請求項12に記載の装置。

【請求項 1 6】

複数の第1のI S F E Tをさらに備え、各I S F E Tは、フローティングゲートを有し、異なるメチル化クラスタを見ているサンプルに露出可能である、請求項12に記載の装置。

【請求項 1 7】

I S F E Tは、弱反転領域で動作するようにバイアスをかけられる、請求項12～16のいずれかに記載の装置。

【請求項 1 8】

I S F E Tおよび回路は基板上に集積され、I S F E Tのトランジスタは回路の一部を形成する、請求項12～17のいずれかに記載の装置。。

【請求項 1 9】

I S F E Tの信号は電流であり、回路の出力信号は前記電流の比率である、請求項18に記載の装置。

【請求項 2 0】

出力信号は閾値信号と比較され、対象部位の比較メチル化値と関連付けられるポテンシャルの診断または診療結果を示す、請求項12～19のいずれかに記載の装置。

【請求項 2 1】

請求項1において使用するため、または請求項2～11のいずれかに記載の方法で使用するための、請求項12～20のいずれかに記載の装置。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2011/050501

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/68 G01N27/414 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q G01N		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MAKI ET AL: "Nanowire-transistor based ultra-sensitive DNA methylation detection", BIOSENSORS AND BIOELECTRONICS, ELSEVIER BV, NL, vol. 23, no. 6, 20 December 2007 (2007-12-20), pages 780-787, XP022396668, ISSN: 0956-5663, DOI: DOI:10.1016/J.BIOS.2007.08.017	1,12-22
Y	page 782, paragraph 2 - page 783 -----	2-11
X	WO 2009/046110 A1 (UNIV SOUTHERN CALIFORNIA [US]; ZHOU CHONGWU [US]; THOMPSON MARK E [US]) 9 April 2009 (2009-04-09) examples 11,17,18 ----- -/--	1,12-22
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
25 May 2011	07/06/2011	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Reuter, Uwe	

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2011/050501

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2010/028288 A2 (AUEON INC [US]; STEPHAN DIETRICH [US]; NORVIEL VERN [US]; WARRINGTON J) 11 March 2010 (2010-03-11) paragraph [0077] paragraph [0086] -----	2-11
Y	WO 03/073088 A2 (TOUMAZOU CHRISTOFER [GB]; PURUSHOTHAMAN SUNIL [GB]) 4 September 2003 (2003-09-04) claims -----	2-11
A	WO 2008/076406 A2 (ION TORRENT SYSTEMS INC [US]; ROTHBERG JONATHAN M [US]; HINZ WOLFGANG) 26 June 2008 (2008-06-26) figure 1 -----	1-22
A	WO 2008/107014 A1 (DNA ELECTRONICS LTD [GB]; TOUMAZOU CHRISTOFER [GB]; PURUSHOTHAMAN SUNI) 12 September 2008 (2008-09-12) the whole document -----	1-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2011/050501

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009046110 A1	09-04-2009	CA 2701380 A1	09-04-2009
		CA 2701401 A1	09-04-2009
		CA 2701447 A1	09-07-2009
		CN 102016570 A	13-04-2011
		EP 2205714 A1	14-07-2010
		EP 2210093 A2	28-07-2010
		US 2010292348 A1	18-11-2010
		US 2010260745 A1	14-10-2010
		WO 2009046136 A2	09-04-2009
		WO 2009085356 A2	09-07-2009
		WO 2010028288 A2	11-03-2010
GB 2467691 A	11-08-2010		
WO 03073088 A2	04-09-2003	EP 1379863 A2	14-01-2004
		EP 2211173 A1	28-07-2010
		GB 2389424 A	10-12-2003
		JP 4063770 B2	19-03-2008
		JP 2005518541 T	23-06-2005
		US 2004134798 A1	15-07-2004
		US 2008032295 A1	07-02-2008
		US 2010151479 A1	17-06-2010
WO 2008076406 A2	26-06-2008	AU 2007334393 A1	26-06-2008
		CA 2672315 A1	26-06-2008
		EP 2092322 A2	26-08-2009
		GB 2457851 A	02-09-2009
		JP 2010513869 T	30-04-2010
		US 2009127589 A1	21-05-2009
		US 2010188073 A1	29-07-2010
		US 2010197507 A1	05-08-2010
WO 2008107014 A1	12-09-2008	AT 479780 T	15-09-2010
		CN 101743319 A	16-06-2010
		EP 2129792 A1	09-12-2009
		EP 2251435 A1	17-11-2010
		JP 2010519914 T	10-06-2010

フロントページの続き

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

(72)発明者 カロフォノー, メルポメニ

イギリス、ダブリュ・シィ・１・エヌ ２・イー・ビィ ロンドン、ジョン・ストリート、１０、
ディ・エヌ・エイ・エレクトロニクス・リミテッド内

Fターム(参考) 2G060 AA07 AA15 AD06 AG06 AG08 DA12 HC13

4B024 AA11 CA01 CA09 HA12 HA19 HA20

4B029 AA07 BB20 FA15

4B063 QA01 QA05 QA17 QQ42 QR32 QR42 QR62 QS25 QS39 QX04

专利名称(译)	检测甲基化DNA		
公开(公告)号	JP2013524776A	公开(公告)日	2013-06-20
申请号	JP2012556595	申请日	2011-03-14
申请(专利权)人(译)	NA迪电子有限公司		
[标]发明人	トマーソークリストファー カロフォノーメルポメニ		
发明人	トマーソー,クリストファー カロフォノー,メルポメニ		
IPC分类号	C12Q1/68 C12M1/00 G01N27/00 C12N15/09 G01N33/53		
CPC分类号	G01N27/4145 C12Q1/6825 C12Q1/6827 C12Q1/6858 C12Q1/6869		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12M1/00.A G01N27/00.J C12N15/00.A G01N33/53.M		
F-TERM分类号	2G060/AA07 2G060/AA15 2G060/AD06 2G060/AG06 2G060/AG08 2G060/DA12 2G060/HC13 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/HA12 4B024/HA19 4B024/HA20 4B029/AA07 4B029/BB20 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA17 4B063/QQ42 4B063/QR32 4B063/QR42 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS39 4B063/QX04		
优先权	2010004147 2010-03-12 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

描述了使用离子敏感场效应晶体管 (ISFET) 来检测DNA样品中的甲基化核苷酸。检测DNA样品中甲基化核苷酸的方法可包括用试剂处理DNA样品的步骤, 该试剂区分甲基化和非甲基化核苷酸以提供处理的DNA, 扩增处理的DNA并任选地对扩增的DNA进行测序。ISFET用于在扩增和/或测序步骤期间监测链延伸反应中一种或多种dNTP的添加。还提供了合适的装置。

