(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2018-522532
(P2018-522532A)
(43)公表日　平成30年8月16日(2018.8.16)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/09		2G045
C12Q 1/6806	(2018.01)	C12Q	1/6806		4B050
A61K 45/00	(2006.01)	C12N	15/09	200	4B063
A61P 35/00	(2006.01)	A61K	45/00		4B065
G01N 33/50	(2006.01)	A61P	35/00		4C084

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 59 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2017-559035 (P2017-559035)
(86)(22)出願日　平成28年5月12日 (2016.5.12)
(85)翻訳文提出日　平成29年12月26日 (2017.12.26)
(86)国際出願番号　PCT/US2016/032029
(87)国際公開番号　WO2016/183289
(87)国際公開日　平成28年11月17日 (2016.11.17)
(31)優先権主張番号　62/160,390
(32)優先日　平成27年5月12日 (2015.5.12)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　504018057
ウェイク・フォレスト・ユニバーシティ・ヘルス・サイエンシーズ
Wake Forest University Health Sciences
アメリカ合衆国２７１５７ノースカロライナ州ウィンストン・セイレム、メディカル・センター・ブールバード
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(74)代理人　100181674
弁理士　飯田　貴敏

最終頁に続く

(54)【発明の名称】遺伝子修飾の識別

(57)【要約】
特異的ＤＮＡグリコシラーゼを使用して標的の修飾された塩基を切除して、ＤＮＡ試料における修飾されたヌクレオチド塩基を検出する方法が記載されている。次に、ＤＮＡ分子は、３’→５’エキソヌクレアーゼ活性および鎖置換活性を欠くＤＮＡポリメラーゼを使用して標識される。本方法を使用して、エピジェネティック変化およびＤＮＡ損傷を検出することができる。修飾された塩基の検出に基づき、疾患または状態を診断するため、疾患または状態のリスクを決定するため、適切な処置を識別するため、処置の有効性をモニタリングするため、および対象における処置の副作用をモニタリングするための方法が提供される。ＤＮＡを含有する生物学的試料の環境曝露または環境曝露時間を決定するための方法も提供される。記載されている方法を行うためのキット、システムおよびデバイスも提供される。

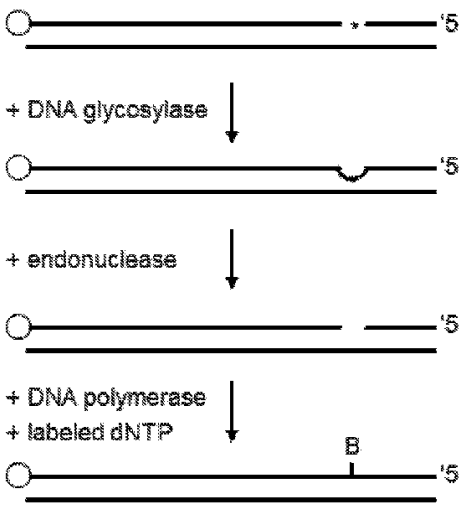


FIG. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＤＮＡ試料における修飾されたＤＮＡ塩基を検出する方法であって、
（ａ）断片化されたＤＮＡを含むＤＮＡ試料を、修飾されたヌクレオチドを切除するＤＮＡグリコシラーゼと共にインキュベートするステップであって、前記断片化されたＤＮＡにおける前記修飾されたヌクレオチドの部位に脱プリンまたは脱ピリミジン部位（ＡＰ部位）を形成するステップと、
（ｂ）ステップ（ａ）の前記断片化されたＤＮＡを、ＤＮＡポリメラーゼおよび前記ＡＰ部位の向かい側のヌクレオチドに相補的な標識されたヌクレオチドで処理するステップであって、これにより、前記標識されたヌクレオチドを前記断片化されたＤＮＡにおける前記ＡＰ部位に取り込むステップと、
（ｃ）前記標識されたヌクレオチドを含有する前記断片化されたＤＮＡを単離するステップと、
（ｄ）前記断片化されたＤＮＡにおける前記標識されたヌクレオチドの位置を検出ステップであって、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所を決定するステップ、前記断片化されたＤＮＡにおける標識されたヌクレオチドの量を定量するステップであって、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの量を決定するステップ、または前記断片化されたＤＮＡにおける前記標識されたヌクレオチドの位置の検出および量の定量の両方を行うステップであって、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所および量を決定するステップと
を含む方法。
【請求項２】
前記ＤＮＡ試料が、ゲノムＤＮＡ、ミトコンドリアＤＮＡまたはこれらの組合せである、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記ＤＮＡ試料が、約５０～２５０塩基対の長さのＤＮＡ断片を含む、請求項１または２に記載の方法。
【請求項４】
前記修飾されたヌクレオチドが、メチルシトシン（ｍＣ）、ヒドロキシメチルシトシン（ｈｍＣ）、カルボキシシトシン（ｃａＣ）、ホルミルシトシン（ｆＣ）、８－オキソ－７，８－ジヒドログアニン（８－ｏｘｏＧ）、ウラシル、メチルアデニン（ｍＡ）、８－オキソアデニン、Ｏ６－メチルグアニン、１－メチルアデニン、Ｏ４－メチルチミン、５－ヒドロキシシトシン、５－ヒドロキシウラシル、５－ヒドロキシメチルウラシルまたはチミンダイマーのうちの少なくとも１つである、前記請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項５】
前記修飾されたヌクレオチドが、表１に収載されているもののうちの少なくとも１つである、前記請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項６】
前記ＤＮＡグリコシラーゼが、表１に収載されているもののうちの少なくとも１つである、前記請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項７】
ステップ（ｂ）を行う前に、ステップ（ａ）の前記断片化されたＤＮＡをＡＰエンドヌクレアーゼと共にインキュベートするステップをさらに含む、前記請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項８】
前記ＤＮＡポリメラーゼが、３’→５’エキソヌクレアーゼ活性または鎖置換活性を有しない、前記請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項９】
前記ＤＮＡポリメラーゼが、３’→５’エキソヌクレアーゼ活性を欠く突然変異したＴ４　ＤＮＡポリメラーゼであり得る、前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項１０】
ステップ（ｂ）において使用されるＤＮＡポリメラーゼの量が、約１０Ｕ／ｐｍｏｌ～約３０Ｕ／ｐｍｏｌ総ＤＮＡであり得る、前記請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１１】
前記標識されたヌクレオチドが、ビオチン標識されたヌクレオチドである、前記請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１２】
前記標識されたヌクレオチドが、ビオチン標識されたヌクレオチドである場合、前記標識されたヌクレオチドを含有する前記断片化されたＤＮＡを単離するステップが、前記断片化されたＤＮＡを、固体支持体に付着されたストレプトアビジンと接触させるステップと、ストレプトアビジンに結合していない断片化されたＤＮＡを除去するステップとを含む、前記請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１３】
前記断片化されたＤＮＡにおける標識されたヌクレオチドの量を定量するステップが、標識されたヌクレオチドの量を、既知量の標識されたヌクレオチドを含有する参照試料における標識されたヌクレオチドの量と比較することをさらに含む、前記請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１４】
前記標識されたヌクレオチドの位置を検出するステップが、前記単離された断片化されたＤＮＡを配列決定することを含む、前記請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１５】
エピジェネティック修飾またはＤＮＡ損傷の型に関連することが知られる疾患または状態を有する対象を診断する方法であって、
（ａ）前記対象由来のＤＮＡ試料を提供するステップと、
（ｂ）前記ＤＮＡ試料におけるＤＮＡを断片化するステップであって、断片化されたＤＮＡを産生するステップと、
（ｃ）請求項１に記載の方法に従って、前記ＤＮＡ試料における修飾されたＤＮＡ塩基を検出するステップであって、これにより、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所または量のうちの少なくとも１つを識別するステップと、
（ｄ）１名または複数の健康な対象由来の１種または複数の参照試料における前記修飾された塩基の場所または量と比較して、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所または量の差を決定するステップと、
（ｅ）１名または複数の健康な対象由来の１種または複数の参照試料における前記修飾された塩基の場所または量と比較して、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所または量に差がある場合、前記対象が、前記疾患または状態を有することを示すステップと
を含む方法。
【請求項１６】
１名または複数の健康な対象由来の前記１種または複数の参照試料における前記修飾された塩基の量と比較して、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの量が増加した場合、前記対象が、前記疾患または状態を有することを示すステップを含む、請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
１名または複数の健康な対象由来の前記１種または複数の参照試料における前記修飾された塩基の量と比較して、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの量が減少した場合、前記対象が、前記疾患または状態を有することを示すステップを含む、請求項１５に記載の方法。
【請求項１８】
１名または複数の健康な対象由来の前記１種または複数の参照試料における前記修飾された塩基の場所と比較して、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所

に変化がある場合、前記対象が、前記疾患または状態を有することを示すステップを含む、請求項１５に記載の方法。

【請求項１９】

エピジェネティック修飾またはＤＮＡ損傷の型に関連することが知られる疾患または状態を発症するリスクがある対象を識別する方法であって、

（ａ）前記対象由来のＤＮＡ試料を提供するステップと、

（ｂ）前記ＤＮＡ試料におけるＤＮＡを断片化するステップであって、断片化されたＤＮＡを産生するステップと、

（ｃ）請求項１に記載の方法に従って、前記ＤＮＡ試料における修飾されたＤＮＡ塩基を検出するステップであって、これにより、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所または量のうちの少なくとも１つを識別するステップと、

（ｄ）１名または複数の健康な対象由来の１種または複数の参照試料における前記修飾された塩基の場所または量と比較して、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所または量のうちの少なくとも１つの差を決定するステップと、

（ｅ）１名または複数の健康な対象由来の１種または複数の参照試料における前記修飾された塩基の場所、量またはその両方と比較して、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所または量のうちの少なくとも１つに差がある場合、前記対象が、前記疾患または状態を発症するリスクがあることを示すステップと

を含む方法。

【請求項２０】

１名または複数の健康な対象由来の前記１種または複数の参照試料における前記修飾された塩基の量と比較して、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの量が増加した場合、前記対象が、前記疾患または状態を発症するリスクがあることを示すステップを含む、請求項１９に記載の方法。

【請求項２１】

１名または複数の健康な対象由来の前記１種または複数の参照試料における前記修飾された塩基の量と比較して、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの量が減少した場合、前記対象が、前記疾患または状態を発症するリスクがあることを示すステップを含む、請求項１９に記載の方法。

【請求項２２】

１名または複数の健康な対象由来の前記１種または複数の参照試料における前記修飾された塩基の場所と比較して、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所に変化がある場合、前記対象が、前記疾患または状態を発症するリスクがあることを示すステップを含む、請求項１９に記載の方法。

【請求項２３】

前記対象が、前記疾患または状態を発症する遺伝性リスクを有する、請求項１９～２２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２４】

前記対象が、前記疾患または状態を発症する環境リスクを有する、請求項１９～２２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２５】

１名または複数の健康な対象由来の１種または複数の参照試料における前記修飾された塩基の場所または量と比較して、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所または量に差がない場合、前記方法が、前記対象をモニタリングするために将来の時点で行われる、請求項１９～２４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２６】

疾患または状態のための処置に応答する対象の見込みを決定する方法であって、

（ａ）前記対象由来のＤＮＡ試料を提供するステップと、

（ｂ）前記ＤＮＡ試料におけるＤＮＡを断片化するステップであって、断片化されたＤＮＡを産生するステップと、

（ｃ）請求項１に記載の方法に従って、前記ＤＮＡ試料における修飾されたＤＮＡ塩基を検出するステップであって、これにより、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所または量のうちの少なくとも１つを識別するステップと、
（ｄ）前記疾患または状態を有し、前記処置に応答性であることが既知の対象の参照集団由来の試料における前記修飾された塩基の場所または量のうちの少なくとも１つと比較して、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所または量の差を決定するステップと、
（ｅ）前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所もしくは量のうちの少なくとも１つが、前記参照集団由来の前記試料における前記修飾された塩基の場所、量もしくはその両方と同様である場合、前記対象が前記処置に応答する可能性がより高いことを示すステップ、または前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所もしくは量のうちの少なくとも１つが、前記参照集団由来の前記試料における前記修飾された塩基の場所、量もしくはその両方と同様ではない場合、前記対象が前記処置に応答する可能性がより低いことを示すステップと
を含む方法。
【請求項２７】
処置に対する対象の応答性を評価する方法であって、
（ａ）前記処置を受けている対象由来のＤＮＡ試料を提供するステップと、
（ｂ）前記ＤＮＡ試料におけるＤＮＡを断片化するステップであって、断片化されたＤＮＡを産生するステップと、
（ｃ）請求項１に記載の方法に従って、前記ＤＮＡ試料における修飾されたＤＮＡ塩基を検出するステップであって、これにより、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所または量のうちの少なくとも１つを識別するステップと、
（ｄ）（ｉ）１名もしくは複数の健康な対象由来の１種もしくは複数の参照試料または（ｉｉ）前記疾患もしくは状態を有する１名もしくは複数の対象由来の１種もしくは複数の試料のうちの少なくとも１つにおける前記修飾された塩基の場所または量と比較して、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所または量のうちの少なくとも１つの差を決定するステップと、
（ｅ）前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所もしくは量のうちの少なくとも１つが、１名もしくは複数の健康な対象由来の前記１種もしくは複数の参照試料における前記修飾された塩基の場所、量もしくはその両方と同様である場合、前記対象が前記処置に応答していることを示すステップ、または前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所もしくは量のうちの少なくとも１つが、前記疾患もしくは状態を有する１名もしくは複数の対象由来の前記１種もしくは複数の試料における前記修飾された塩基の場所、量もしくはその両方と同様である場合、前記対象が前記処置に応答していないことを示すステップと
を含む方法。
【請求項２８】
前記方法が、前記処置に対する前記対象の応答性を経時的にモニタリングするために１または複数の将来の時点で行われる、請求項２７に記載の方法。
【請求項２９】
前記対象が前記処置を受ける前に前記対象から得られたＤＮＡ試料においてステップ（ｂ）および（ｃ）を行うステップをさらに含む、請求項２７または２８に記載の方法。
【請求項３０】
前記疾患または状態を有する１名または複数の対象由来の前記１種または複数の試料が、前記処置を受ける前に前記対象から得られた前記ＤＮＡ試料である、請求項２９に記載の方法。
【請求項３１】
処置に関連するＤＮＡ損傷の蓄積に関して対象をモニタリングする方法であって、
（ａ）前記処置の投与に先立ち、対象由来の第１のＤＮＡ試料を提供するステップと、

（ｂ）前記第１のＤＮＡ試料におけるＤＮＡを断片化するステップであって、断片化されたＤＮＡを産生するステップと、
（ｃ）請求項１に記載の方法に従って、前記第１のＤＮＡ試料における修飾されたＤＮＡ塩基を検出するステップであって、これにより、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所または量のうちの少なくとも１つを識別するステップと、
（ｄ）前記処置の投与後に、前記対象由来の第２のＤＮＡ試料を提供するステップと、
（ｅ）前記第２のＤＮＡ試料におけるＤＮＡを断片化するステップであって、断片化されたＤＮＡを産生するステップと、
（ｆ）請求項１に記載の方法に従って、前記第２のＤＮＡ試料における前記修飾されたＤＮＡ塩基を検出するステップと、
（ｇ）前記第２のＤＮＡ試料と比較して、前記第１のＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所または量のうちの少なくとも１つの差を決定するステップと、
（ｈ）前記第２のＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所もしくは量のうちの少なくとも１つが前記第１のＤＮＡ試料と比較して増加した場合、前記対象がＤＮＡ損傷を蓄積させていること、または前記第２のＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所もしくは量のうちの少なくとも１つが前記第１のＤＮＡ試料と同様である場合、前記対象がＤＮＡ損傷を蓄積させていないことを示すステップと
を含む方法。

【請求項３２】
ステップ（ｄ）～（ｈ）が、前記対象におけるＤＮＡ損傷の前記蓄積をモニタリングするために将来の時点で行われる、請求項３１に記載の方法。

【請求項３３】
前記処置が、放射線療法または化学療法のうちの少なくとも１つである、請求項３１または３２に記載の方法。

【請求項３４】
対象の遺伝子プロファイルを作成する方法であって、
（ａ）対象由来のＤＮＡ試料を提供するステップと、
（ｂ）前記ＤＮＡ試料におけるＤＮＡを断片化するステップであって、断片化されたＤＮＡを産生するステップと、
（ｃ）断片化されたＤＮＡを含むＤＮＡ試料を、複数の修飾されたヌクレオチドを切除する複数のＤＮＡグリコシラーゼと共にインキュベートするステップであって、前記断片化されたＤＮＡにおける前記修飾されたヌクレオチドの部位に脱プリンまたは脱ピリミジン部位（ＡＰ部位）を形成し、各ＤＮＡグリコシラーゼが、異なる種類の修飾されたヌクレオチドを切除するステップと、
（ｄ）ステップ（ｃ）の前記断片化されたＤＮＡを、ＤＮＡポリメラーゼおよび前記ＡＰ部位の向かい側のヌクレオチドに相補的な標識されたヌクレオチドで処理するステップであって、各種類の標識されたヌクレオチドが、異なる種類の標識を有し、これにより、前記断片化されたＤＮＡにおける前記ＡＰ部位に前記標識されたヌクレオチドを取り込むステップと、
（ｃ）前記標識されたヌクレオチドを含有する前記断片化されたＤＮＡを単離するステップと、
（ｄ）前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの配置場所を決定するために前記断片化されたＤＮＡにおける前記標識されたヌクレオチドの位置を検出するステップ、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの量を決定するために前記断片化されたＤＮＡにおける標識されたヌクレオチドの量を定量するステップ、または前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの配置場所および量を決定するために前記断片化されたＤＮＡにおける前記標識されたヌクレオチドの位置の検出および量の定量の両方を行うステップであって、これにより、前記対象の遺伝子プロファイルを生成する、方法。

【請求項３５】

前記ＤＮＡ試料が、ステップ（ｃ）において一度に１種のＤＮＡグリコシラーゼと共にインキュベートされる、請求項３４に記載の方法。
【請求項３６】
前記ＤＮＡ試料が、ステップ（ｃ）において複数の部分に分割され、各部分が、異なるＤＮＡグリコシラーゼと共にインキュベートされる、請求項３４に記載の方法。
【請求項３７】
前記方法を、１または複数の将来の時点で前記対象由来のＤＮＡ試料に対して行うステップをさらに含む、請求項３４～３６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３８】
ＤＮＡを含有する生物学的試料の環境曝露時間を決定する方法であって、
（ａ）環境条件に曝露されたＤＮＡ試料を提供するステップと、
（ｂ）前記ＤＮＡ試料におけるＤＮＡを断片化するステップであって、断片化されたＤＮＡを産生するステップと、
（ｃ）前記断片化されたＤＮＡを、ＤＮＡポリメラーゼおよびＡＰ部位の向かい側のヌクレオチドに相補的な標識されたヌクレオチドで処理するステップであって、これにより、前記断片化されたＤＮＡにおける前記ＡＰ部位に前記標識されたヌクレオチドを取り込むステップと
（ｃ）前記標識されたヌクレオチドを含有する前記断片化されたＤＮＡを単離するステップと、
（ｄ）前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの配置場所を決定するために前記断片化されたＤＮＡにおける前記標識されたヌクレオチドの位置を検出するステップ、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの量を決定するために前記断片化されたＤＮＡにおける標識されたヌクレオチドの量を定量するステップ、またはその両方のステップと、
（ｅ）前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所、量またはその両方を、前記環境条件に曝露された複数の参照試料と比較するステップであって、各参照試料が、異なる長さの時間で前記環境条件に曝露され、前記ＤＮＡ試料の前記環境曝露時間が、前記ＤＮＡ試料と比較した、修飾されたヌクレオチドの最も同様の場所、量またはその両方を有する前記参照試料によって決定されるステップと
を含む方法。
【請求項３９】
ＤＮＡ試料における修飾されたヌクレオチドの検出のためのキットであって、
ＤＮＡグリコシラーゼ、ＡＰエンドヌクレアーゼ、プルーフリーディングおよび鎖置換活性を欠くＤＮＡポリメラーゼ、またはＤＮＡリガーゼのうちの少なくとも１つから選択される酵素と、
少なくとも１種類の標識されたヌクレオチドと
を含むキット。
【請求項４０】
前記酵素のための緩衝液、少なくとも１種類の標識されていないヌクレオチド、または既知の量もしくは場所パターンの標識されたヌクレオチドを含む対照ＤＮＡオリゴヌクレオチドのうちの１つまたは複数をさらに含む、請求項３９に記載のキット。
【請求項４１】
各オリゴヌクレオチドが既知量の修飾されたヌクレオチドを含む複数のオリゴヌクレオチド。
【請求項４２】
前記オリゴヌクレオチドの少なくとも一部分が、既知量の第２の種類の修飾されたヌクレオチドを含む、請求項４１に記載の混合物。
【請求項４３】
オリゴヌクレオチドの前記混合物が、約５０～２５０塩基対の長さのＤＮＡ断片を含む、請求項４１または４２に記載の混合物。

【請求項４４】
ＤＮＡ試料における修飾されたヌクレオチドの検出のための試料デバイスであって、
固体表面と、
第１の前記固体表面と接触した第２の固体表面と、
入口と、
前記入口に接続され、（ｉ）塩基切除反応、（ｉｉ）ＤＮＡ標識反応、（ｉｉｉ）標識されたＤＮＡの単離または（ｉｖ）ＤＮＡ検出、定量もしくは配列決定のうちの少なくとも１つ、のうちの少なくとも１つを行うように構成された、少なくとも１個のチャンバーと
を含む試料デバイス。
【請求項４５】
ＤＮＡ試料における修飾されたヌクレオチドの検出のための分析デバイスであって、
請求項４４に記載の１個または複数の試料デバイスを受け入れるように構成されたレセプタクルと、
使用者入力デバイスと、
メモリおよびプロセッサを含む計算デバイスであって、前記メモリが、前記プロセッサに、（ｉ）塩基切除反応、（ｉｉ）ＤＮＡ標識反応、（ｉｉｉ）標識されたＤＮＡの単離または（ｉｖ）ＤＮＡ検出、定量もしくは配列決定のうちの少なくとも１つ、のうちの少なくとも１つを行うための１種または複数の機能を実行させるように構成されたソフトウェア命令を含む計算デバイスと
を含む分析デバイス。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
背景
メチル化および様々な形態のＤＮＡ損傷の産物は、種々の重要な生物学的過程に関係づけられてきた。メチル化パターンの変化および損傷したＤＮＡの出現は、多くの場合、様々な病状に観察される最初期の事象の１つである。
【背景技術】
【０００２】
エピジェネティック修飾は、正常な発生に必須である。例えば、最も広範に研究されているエピジェネティック修飾であるメチルシトシンは、ゲノムインプリンティング、Ｘ染色体不活性化、反復エレメントの抑制、および発癌を含む多数の重大な過程に関連する。例えば、シトシンの５位におけるＤＮＡメチル化は、遺伝子発現を低下させる特異的な効果を有し、試験したあらゆる脊椎動物に見出された。がんなどの多くの疾患過程において、遺伝子プロモーターＣｐＧアイランドは、異常な過剰メチル化を獲得し、これは、細胞分裂後に娘細胞が受け継ぐことができる転写サイレンシングをもたらす。さらに、ＤＮＡメチル化の変更は、がん発生の重要な構成要素として認識されている。低メチル化は一般に、より初期に生じ、染色体不安定性およびインプリンティング損失に関係づけられる一方で、過剰メチル化は、プロモーターに関連し、遺伝子（癌遺伝子サプレッサー）サイレンシングに対して二次的に生じ得る。その上、ヒドロキシメチルシトシンも、発生から加齢に及ぶ遺伝子発現における潜在的な調節的役割を有する、同様に重要なエピジェネティック修飾として現れた。様々ながんは、ヒドロキシメチルシトシン含量が、早期病変であっても、健康組織と比べて悪性組織において一貫してかつ有意に低下されることを示した。
【０００３】
ＤＮＡは、内在性および外来性のストレス源の両方から絶えずストレスにさらされている。塩基は、限られた化学的安定性を示し、酸化、アルキル化、放射線損傷および加水分解を含む、様々な種類の損傷による化学修飾の影響を受けやすい。ＤＮＡ塩基への損傷は、その塩基対の対合特性に影響を与え得る、したがって、変異原性となり得る。これらの

種類のＤＮＡ損傷に起因するＤＮＡ塩基修飾は、蔓延しており、生理的状態および疾患表現型への影響において重要な役割を果たす。例として、７，８－ジヒドロ－８－オキソグアニン（８－ｏｘｏＧ）（酸化的損傷）、８－オキソアデニン（酸化的損傷；加齢、アルツハイマー病、パーキンソン病）、１－メチルアデニン、Ｏ６－メチルグアニン（アルキル化；神経膠腫および結腸直腸癌）、ベンゾ［ａ］ピレンジオールエポキシド（ＢＰＤＥ）、ピリミジンダイマー（付加物形成；喫煙、産業用化学物質曝露、ＵＶ光曝露；肺および皮膚がん）、ならびに５－ヒドロキシシトシン、５－ヒドロキシウラシル、５－ヒドロキシメチルウラシルおよびチミングリコール（電離放射線損傷；慢性炎症性疾患、前立腺、乳および結腸直腸がん）が挙げられる。例えば、８－ｏｘｏＧは、ＤＮＡ酸化の高頻度産物である。８－ｏｘｏＧは、アデニンと塩基対を形成し、Ｇ・ＣからＴ・Ａへのトランスバージョン突然変異を生じる傾向がある。別の例は、シトシンおよび５－メチルシトシン（５－ｍｅＣ）の加水分解的脱アミノ化であり、これは、それぞれグアニンと誤対合したウラシルおよびチミンを生じ、修復されない場合、Ｃ・ＧからＴ・Ａへのトランジション突然変異の原因となる。別の例では、アルキル化は、６－ｍｅＧ、Ｎ７－メチルグアニン（７－ｍｅＧ）またはＮ３－メチルアデニン（３－ｍｅＡ）を含む、種々のＤＮＡ塩基傷害を生じ得る。６－ｍｅＧは、チミンと対形成するその特性によって原変異原性（promutagenic）であるが、７－ｍｅＧおよび３－ｍｅＡは、複製的ＤＮＡポリメラーゼを遮断し、したがって、細胞傷害性である。上述および多くの他の形態のＤＮＡ塩基傷害は、毎日何度も細胞において生じ、特殊化したＤＮＡ修復系の継続的な作用のみが、遺伝情報の急速な減衰を防止することができる。核ＤＮＡへの損傷に加えて、ミトコンドリアＤＮＡも、有意な酸化的損傷、ならびにアルキル化、加水分解および付加物由来の損傷を経験する。例えば、主としてミトコンドリアは、反応性酸素種（ＲＯＳ）の主要な細胞供給源であるため、酸化的損傷は、ミトコンドリアＤＮＡにおける最も蔓延した種類の損傷である。加えて、ミトコンドリアは、ＤＮＡを非酵素的にメチル化し得るＳ－アデノシルメチオニンの細胞プールのおよそ３０％を収容する。また、エストロゲン、煙草の煙およびある特定の化学物質などのある特定の作用物質への曝露は、ミトコンドリアＤＮＡの優先的な損傷をもたらす。

【０００４】

ＤＮＡ修復は、細胞が、そのゲノムをコードするＤＮＡ分子への損傷を識別し補正する一群の過程である。正常代謝活性および環境因子の両方が、ＤＮＡ損傷の原因となり得る。このような損傷した部位の多くは、ＤＮＡ分子への構造的損傷を引き起こし、影響を受けた遺伝子配列からの発現を変更または排除し得る。他の損傷は、細胞のゲノムにおいて潜在的に有害な突然変異を誘導し、これは、その娘細胞の生存に影響を与えるか、または病状の発症を促進する調節不全の原因となり得る。結果として、ＤＮＡ修復過程は、ＤＮＡ構造における損傷に応答するため、常に活性を有する。

【０００５】

ＤＮＡ損傷およびエピジェネティック修飾は、病状の最初期の徴候となる場合があるため、エピジェネティック修飾およびＤＮＡ損傷パターンの検出は、疾患の早期検出および介入に有用であり得る。しかし、検出方法は限界を抱える。例えば、メチル化状態に関して、分光光度法を使用して、標的ＤＮＡにおける修飾の網羅的含量を示すことができるが、これは、限られた特異性を有する。高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）および質量分析も使用されることが多いが、コストがかかり、相当な量の材料を必要とし、ＤＮＡを構成物であるヌクレオシドまたはヌクレオチドへと減じて、これにより、下流の解析のための配列情報を破壊する。モノクローナル抗体を使用した免疫沈降（ＩＰ）は、標的修飾を有するＤＮＡを濃縮することができるが、特異性に伴う限界が識別されている。制限消化プロファイリングは、修飾感受性制限エンドヌクレアーゼで処理したＤＮＡの断片解析を利用するが、大量の材料を必要とし、既知の感受性を有する制限部位を特色とする配列に限定される。バイサルファイト配列決定は、ＤＮＡメチル化の検出のための「ゴールドスタンダード」技法であると考慮されているが、重要な限界が存在する。第一に、化学的変換過程は、ＤＮＡに蔓延した非特異的損傷を引き起こすため、このアプローチは、大

量の出発材料を必要とする。第二に、この方法は、高価で時間がかかる場合があり、複数回の配列決定操作の実行を必要とする。最後に、そして重要なことに、これは一般に、メチルシトシン（ｍＣ）修飾にしか適用できない。限られた数の追加的な修飾型を標的とすることができる（メチルシトシン（ｍＣ）およびヒドロキシメチルシトシン（ｈｍＣ））変法が開発または示唆されているが、これらは低収率であり、依然として、上に挙げる他の限界を共有する。これらはまた、他の修飾に容易に適用することができず、相当に複雑である。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００６】

簡単な要旨

本発明の態様は、ＤＮＡ試料におけるエピジェネティック変化およびＤＮＡ損傷などの修飾されたヌクレオチドの検出を包含する。修飾された遺伝子配列の濃縮、検出および解析のためにその後に使用することができる標識されたヌクレオチドによる、多様なエピジェネティック修飾およびＤＮＡ損傷の特異的な標識のための新たなモジュラー戦略が開示されている。

【０００７】

一態様では、ＤＮＡ試料における修飾されたＤＮＡ塩基を検出する方法であって、

（ａ）断片化されたＤＮＡを含むＤＮＡ試料を、修飾されたヌクレオチドを切除するＤＮＡグリコシラーゼと共にインキュベートするステップであって、前記断片化されたＤＮＡにおける前記修飾されたヌクレオチドの部位に脱プリンまたは脱ピリミジン部位（ＡＰ部位）を形成するステップと、

（ｂ）ステップ（ａ）の前記断片化されたＤＮＡを、ＤＮＡポリメラーゼおよび前記ＡＰ部位の向かい側のヌクレオチドに相補的な標識されたヌクレオチドで処理するステップであって、これにより、前記標識されたヌクレオチドを前記断片化されたＤＮＡにおける前記ＡＰ部位に取り込むステップと、

（ｃ）前記標識されたヌクレオチドを含有する前記断片化されたＤＮＡを単離するステップと、

（ｄ）前記断片化されたＤＮＡにおける前記標識されたヌクレオチドの位置を検出ステップであって、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所を決定するステップ、前記断片化されたＤＮＡにおける標識されたヌクレオチドの量を定量するステップであって、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの量を決定するステップ、または前記断片化されたＤＮＡにおける前記標識されたヌクレオチドの位置の検出および量の定量の両方を行うステップであって、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所および量を決定するステップと

を含む方法が提供される。

【０００８】

一態様では、対象に医学的処置を提供するために有用な方法が提供される。例えば、本方法を使用して、エピジェネティック修飾またはＤＮＡ損傷の型に関連することが公知の疾患を有する対象を診断することができる。別の例では、本方法を使用して、疾患のための特定の処置に応答する可能性がより高いまたは低い対象を識別することができる。別の態様では、対象に適切な処置を決定するための方法が提供される。別の例では、本方法を使用して、対象における処置の効果をモニタリングして、副作用を最小化することができる。

【０００９】

別の態様では、対象の遺伝子プロファイルを作成する方法であって、

（ａ）対象由来のＤＮＡ試料を提供するステップと、

（ｂ）前記ＤＮＡ試料におけるＤＮＡを断片化するステップであって、断片化されたＤＮＡを産生するステップと、

（ｃ）断片化されたＤＮＡを含むＤＮＡ試料を、複数の修飾されたヌクレオチドを切除す

る複数のＤＮＡグリコシラーゼと共にインキュベートするステップであって、前記断片化されたＤＮＡにおける前記修飾されたヌクレオチドの部位に脱プリンまたは脱ピリミジン部位（ＡＰ部位）を形成し、各ＤＮＡグリコシラーゼが、異なる種類の修飾されたヌクレオチドを切除するステップと、
（ｄ）ステップ（ｃ）の前記断片化されたＤＮＡを、ＤＮＡポリメラーゼおよび前記ＡＰ部位の向かい側のヌクレオチドに相補的な標識されたヌクレオチドで処理するステップであって、各種類の標識されたヌクレオチドが、異なる種類の標識を有し、これにより、前記断片化されたＤＮＡにおける前記ＡＰ部位に前記標識されたヌクレオチドを取り込むステップと、
（ｃ）前記標識されたヌクレオチドを含有する前記断片化されたＤＮＡを単離するステップと、
（ｄ）前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの配置場所を決定するために前記断片化されたＤＮＡにおける前記標識されたヌクレオチドの位置を検出するステップ、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの量を決定するために前記断片化されたＤＮＡにおける標識されたヌクレオチドの量を定量するステップ、または前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの配置場所および量を決定するために前記断片化されたＤＮＡにおける前記標識されたヌクレオチドの位置の検出および量の定量の両方を行うステップであって、これにより、前記対象の遺伝子プロファイルを生成する、方法が提供される。

【００１０】

別の態様では、ＤＮＡを含有する生物学的試料の環境曝露時間を決定する方法であって、
（ａ）環境条件に曝露されたＤＮＡ試料を提供するステップと、
（ｂ）前記ＤＮＡ試料におけるＤＮＡを断片化するステップであって、断片化されたＤＮＡを産生するステップと、
（ｃ）前記断片化されたＤＮＡを、ＤＮＡポリメラーゼおよびＡＰ部位の向かい側のヌクレオチドに相補的な標識されたヌクレオチドで処理するステップであって、これにより、前記断片化されたＤＮＡにおける前記ＡＰ部位に前記標識されたヌクレオチドを取り込むステップと
（ｃ）前記標識されたヌクレオチドを含有する前記断片化されたＤＮＡを単離するステップと、
（ｄ）前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの配置場所を決定するために前記断片化されたＤＮＡにおける前記標識されたヌクレオチドの位置を検出するステップ、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの量を決定するために前記断片化されたＤＮＡにおける標識されたヌクレオチドの量を定量するステップ、またはその両方のステップと、
（ｅ）前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所、量またはその両方を、前記環境条件に曝露された複数の参照試料と比較するステップであって、各参照試料が、異なる長さの時間で前記環境条件に曝露され、前記ＤＮＡ試料の前記環境曝露時間が、前記ＤＮＡ試料と比較した、修飾されたヌクレオチドの最も同様の場所、量またはその両方を有する前記参照試料によって決定されるステップと
を含む方法が提供される。

【００１１】

システム、デバイス、キットおよび組成物も記載されている。

【００１２】

一態様では、ＤＮＡ試料における修飾されたヌクレオチドの検出のためのキットであって、
ＤＮＡグリコシラーゼ、ＡＰエンドヌクレアーゼ、プルーフリーディングおよび鎖置換活性を欠くＤＮＡポリメラーゼ、またはＤＮＡリガーゼのうちの少なくとも１つから選択される酵素と、

少なくとも１種類の標識されたヌクレオチドと
を含むキットが提供される。
【００１３】
別の態様では、各オリゴヌクレオチドが既知量の修飾されたヌクレオチドを含む複数のオリゴヌクレオチドが提供される。
【００１４】
別の態様では、ＤＮＡ試料における修飾されたヌクレオチドの検出のための試料デバイスであって、
固体表面と、
第１の前記固体表面と接触した第２の固体表面と、
入口と、
前記入口に接続され、（ｉ）塩基切除反応、（ｉｉ）ＤＮＡ標識反応、（ｉｉｉ）標識されたＤＮＡの単離または（ｉｖ）ＤＮＡ検出、定量もしくは配列決定のうちの少なくとも１つ、のうちの少なくとも１つを行うように構成された、少なくとも１個のチャンバーと
を含む試料デバイスが提供される。
【００１５】
別の態様では、ＤＮＡ試料における修飾されたヌクレオチドの検出のための分析デバイスであって、
請求項４４に記載の１個または複数の試料デバイスを受け入れるように構成されたレセプタクルと、
使用者入力デバイスと、
メモリおよびプロセッサを含む計算デバイスであって、前記メモリが、前記プロセッサに、（ｉ）塩基切除反応、（ｉｉ）ＤＮＡ標識反応、（ｉｉｉ）標識されたＤＮＡの単離または（ｉｖ）ＤＮＡ検出、定量もしくは配列決定のうちの少なくとも１つ、のうちの少なくとも１つを行うための１種または複数の機能を実行させるように構成されたソフトウェア命令を含む計算デバイスと
を含む分析デバイスが提供される。
【００１６】
上述の特色、ならびに本発明の多くの他の特色および付随する利点は、添付の図面と併せて考慮すると、次の詳細な説明を参照することにより明らかとなり、さらに理解され得る。
【図面の簡単な説明】
【００１７】
【図１】図１は、本開示の態様に従って目的の修飾塩基を含有するＤＮＡ分子を標識するステップを示す略図を示す。ＤＮＡ分子中に存在する修飾塩基（＊）は、特異的なＤＮＡグリコシラーゼおよび任意選択で脱プリンまたは脱ピリミジン部位（ＡＰ）エンドヌクレアーゼにより切除されて、ＤＮＡ分子の鎖にギャップを生じさせる。次いで、ＤＮＡ分子がＤＮＡポリメラーゼおよびギャップの向かい側のＤＮＡ鎖中の塩基に相補的な標識されたヌクレオチドとともにインキュベートされて、修飾塩基の元の位置における標識（Ｂ）の取り込みがもたらされる。
【００１８】
【図２】図２は、野生型または突然変異型Ｔ４　ＤＮＡポリメラーゼのいずれかを使用して本開示の態様に従いビオチン化ｄＵＴＰ（ｂｉｏ　ｄＵＴＰ）がそこへ取り込まれた、標識されたＤＮＡ分子のシーケンシングゲル分析の画像を示す。４０塩基対のｄｓＤＮＡ標的の１つの鎖からウラシル塩基を切除するために、ウラシルＤＮＡグリコシラーゼ（ＵＤＧ）が使用され、次いで、エンドヌクレアーゼＩＶ（ＥＮＤ　ＩＶ）で標的が処理され、２つの断片、すなわち、５’側の３３ヌクレオチド断片と、６ヌクレオチドの３’側断片との間に単一の塩基対ギャップを生じさせた。３３ヌクレオチド断片が各ゲル画像の左側レーンに示される。次いで、ｄｓＤＮＡ標的がビオチン化ｄＵＴＰ（ｂｉｏ　ｄＵＴＰ

）および野生型Ｔ４　ＤＮＡポリメラーゼ（ＷＴ　Ｔ４　ｐｏｌ）または３’→５’エキソヌクレアーゼ活性のない突然変異型Ｔ４　ＤＮＡポリメラーゼ（Ｔ４　ｐｏｌ　ｅｘｏ⁻）のいずれかで処理された。各ゲルの右側レーンは、結果として生じた取り込み産物を示す。

【００１９】

【図３】図３は、ＤＮＡ１ｎｍｏｌ当たり１単位～ＤＮＡ１ｐｍｏｌ当たり１単位にわたる多様な濃度のＴ４　ｐｏｌ　ｅｘｏ⁻を使用してビオチン化ｄＵＴＰがそこへ取り込まれた、標識されたＤＮＡ分子のシーケンシング用ゲルの分析の画像を示す。アッセイフォーマットは、概して図２について上記した通りであった。レーン１は完全長４０ヌクレオチドテンプレート鎖の泳動位置を示し、レーン２はウラシルの切除によって生じた３３ヌクレオチド断片の泳動位置を示す。アスタリスクは、３３ヌクレオチド鎖に組み込まれた１つのビオチン化ｄＵＴＰを有する３４ヌクレオチド断片の位置を示す。Ｔ４　ｐｏｌ　ｅｘｏ⁻の希釈係数がレーン３～１３についてゲル画像上部を横切って示される。

【００２０】

【図４Ａ】図４Ａは、本開示の態様に従って様々なＤＮＡグリコシラーゼを使用する、ＤＮＡ構築物中のウラシル、オキソグアニンおよびＴ：Ｇミスマッチの特異的な切断および標識化を示す変性ゲルを示す。各ゲルの最初のレーンは、インタクトな４０ｎｔＤＮＡ分子である。第２のレーンは、グリコシラーゼおよびエンドヌクレアーゼ対による標的塩基の切除後の最もより速く泳動する切断産物を示す（ウラシル：ＵＤＧおよびＥｎｄｏ　ＶＩ；オキソグアニン：ｈＯＯＧ１およびＥｎｄｏ　ＩＶ；Ｔ：Ｇミスマッチ：ＴＤＧおよびＥｎｄｏ　ＩＶ）。３番目のレーンは、より遅く泳動するＤＮＡ分子（＊でマークされた泳動位置）としての、非塩基部位におけるビオチン化塩基の取り込みを示す。

【００２１】

【図４Ｂ】図４Ｂは、本開示の態様に従って単一のｏｘｏＧ修飾を有する４０ｎｔＤＮＡ構築物に関する、ウラシルＤＮＡグリコシラーゼ（ＵＤＧ）、ヒトオキソグアニングリコシラーゼ（ｈＯＧＧ１）、およびチミンＤＮＡグリコシラーゼ（ＴＤＧ）の切除特異性を示す変性ゲルを示す。そこから修飾が切除されている鎖は、より速い速度で泳動する。

【００２２】

【図４Ｃ】図４Ｃは、本開示の態様に従ってＤＮＡグリコシラーゼＵＤＧ、ＴＤＧおよびｈＯＧＧ１の特異性を示す変性ゲルを示す。酵素はそれぞれ、Ｅｎｄｏ　ＩＶおよびＤＮＡグリコシラーゼが切除することが公知のものとは異なる単一のＤＮＡ修飾を含有する４０ｎｔのＤＮＡ分子とともに同時インキュベートされた。具体的には、ウラシルを含有するＤＮＡ構築物が（それぞれ、ｏｘｏＧおよびＴ：Ｇミスマッチに特異的な）ｈＯＧＧ１またはＴＤＧとともにインキュベートされ；ｏｘｏＧ含有ＤＮＡ構築物が（それぞれ、ウラシルおよびＴ：Ｇミスマッチに特異的な）ＵＤＧまたはＴＤＧとともにインキュベートされ；Ｔ：Ｇミスマッチ含有ＤＮＡ構築物が（それぞれ、ウラシルおよびｏｘｏＧに特異的な）ＵＤＧまたはｈＯＧＧ１とともにインキュベートされた。

【００２３】

【図５】図５は、チューブの中で実施された切除および標識化反応（１ポット反応）の変性ゲル分析を示す。左のレーンは、ウラシルを含有する出発ＤＮＡ構築物を示す。中央のレーンは、切除ステップ後で反応チューブへのＤＮＡポリメラーゼの添加前に反応混合物から採取されたアリコートにおいて評価されたＤＮＡ生成物を示す。右のレーンは、ＤＮＡポリメラーゼの添加およびそれとのインキュベーション後に生成された最終標識生成物を示す。標識生成物の位置が＊でマークされる。

【００２４】

【図６Ａ】図６Ａは、本開示の態様に従ってチミンＤＮＡグリコシラーゼ（ＴＤＧ）を使用する、多様な修飾ＤＮＡ塩基の検出のための経路を示す略図を示す。経路（１）では、修飾された塩基を含有するＤＮＡ試料がＴＤＧで処理され、続いて、カルボキシシトシン（ｃａＣ）およびホルミルシトシン（ｆＣ）（白丸）の位置を検出するためにビオチン化（ｂｉｏ）ｄＣＴＰ（三角）で標識される。経路（２）では、ＤＮＡ試料がＴＤＧで処理

され、続いて、非標識ヌクレオチドを使用するギャップ充填、次いで、メチルシトシン（ｍＣ、黒丸）およびヒドロキシメチルシトシン（ｈｍＣ、四角）をｃａＣ／ｆＣに（白丸）に脱メチル化するためのＴＥＴ酵素で、続いてｃａＣ／ｆＣを切除するためのＴＤＧで処理され、次いで、ｍＣおよびｈｍＣの位置を検出するためにｂｉｏ　ｄＣＴＰで標識される。経路（３）では、ＤＮＡ試料がＴＤＧで処理され、続いて非標識ヌクレオチドを使用するギャップ充填、続いて、ｈｍＣにグルコース部分を選択的に付着するためのβ－グルコシルトランスフェラーゼによる処理、続いて、ｍＣをｃａＣ／ｆＣに脱メチル化するためのＴＥＴ酵素、続いて、ｃａＣ／ｆＣを切除するためのＴＤＧによる処理、次いで、ｍＣおよびｈｍＣの位置を互いに識別するためのｂｉｏ　ｄＣＴＰにより標識される。

【００２５】

【図６Ｂ】図６Ｂは、本開示の態様に従ってチミンＤＮＡグリコシラーゼ（ＴＧＤ）およびウラシルＤＮＡグリコシラーゼ（ＵＤＧ）を使用する、多様な修飾ＤＮＡ塩基の検出のための経路を示す略図を示す。$KRuO_4$がｈｍＣをｃａＣ／ｆＣに酸化するために使用可能であり、次いでこれはＴＤＧにより切断可能であり、それによって標識ｄＣＴＰ（例えば、ビオチン化ｄＣＴＰ）でＤＮＡ試料中のｈｍＣの部位を標識する。図６Ａに示されるものに類似するアプローチ、β－グルコシルトランスフェラーゼによる処理が、グルコース部分を選択的にｈｍＣに付着することができ、それによってそれを酸化からブロックする。ＡＰＯＢＥＣ３ａ（または代替的に亜硫酸水素塩）がｍＣをウラシルに変換することができ、次いで、これはＵＤＧにより切断可能であり、標識ｄＣＴＰ（例えば、ビオチン化ｄＣＴＰ）で標識される。

【００２６】

【図７】図７は、本開示の態様に従って本明細書に記載の方法を実施するために有用な試料デバイスを示す。

【発明を実施するための形態】

【００２７】

詳細な説明

ＤＮＡ試料におけるエピジェネティック変化およびＤＮＡ損傷などの修飾されたヌクレオチドを検出する方法が、本明細書に記載されている。

【００２８】

Ｉ．修飾されたＤＮＡ塩基を検出する方法

一態様では、ＤＮＡ試料における修飾されたＤＮＡ塩基を検出するための方法が提供される。本方法の例示的な模式的概要は、図１に提示されている。本方法は、ＤＮＡ試料を得るステップと、ＤＮＡを断片化するステップとを含むことができる。続いて本方法は、断片化されたＤＮＡを、修飾されたヌクレオチドを切除するＤＮＡグリコシラーゼで処理して、断片化されたＤＮＡに脱プリンまたは脱ピリミジン部位（ＡＰ部位）を形成するステップが関与することができる。次に、断片化されたＤＮＡを、ＤＮＡポリメラーゼおよび切除された修飾ヌクレオチドに対応する標識されたヌクレオチドで処理して、標識されたヌクレオチドをＡＰ部位に取り込むことができる。次に、標識されたヌクレオチドを含有する断片化されたＤＮＡを単離し、断片化されたＤＮＡにおける標識されたヌクレオチドの位置を決定して、ＤＮＡ試料における修飾されたヌクレオチドの場所を識別することができる。一部の事例では、検出するステップは、代替的に、断片化されたＤＮＡにおける標識されたヌクレオチドの量を定量するステップが関与し、本方法は、標識されたヌクレオチドの量を、既知量の標識されたヌクレオチドを含有する参照試料における標識されたヌクレオチドの量と比較するステップをさらに含む。

【００２９】

一態様では、対象への医療ケアの提供に有用な方法が提供される。例えば、本方法を使用して、エピジェネティック修飾またはＤＮＡ損傷の型に関連することが公知の疾患または状態を有する対象を診断することができる。本明細書において使用される場合、エピジェネティック修飾は、根底にある遺伝子配列を変更することなく、その機能および／または調節に変化を生じるＤＮＡの共有結合性修飾を指す。エピジェネティック変化は、根底

にあるＤＮＡ配列への変化が関与しない遺伝子発現の遺伝性変化；遺伝子型の変化を伴わない表現型の変化である。別の例では、本方法を使用して、対象が、疾患または状態のための特定の処置に応答する可能性がより高いか低いかを決定することができる。別の例では、本方法を使用して、処置の有効性／効力；すなわち、処置に対する対象の応答性を評価することができる。別の例では、本方法を使用して、対象における処置の効果をモニタリングして、副作用を最小化することができる。さらに別の例では、本方法は、対象の遺伝子プロファイルを作成するステップを含むことができる。

【００３０】

一事例では、対象における疾患または状態を診断または検出する方法が提供される。本方法は、対象からＤＮＡ試料を得るステップと、ＤＮＡを断片化するステップと、断片化されたＤＮＡを、疾患に関連する修飾されたヌクレオチドを切除するＤＮＡグリコシラーゼで処理するステップであって、断片化されたＤＮＡに脱プリンまたは脱ピリミジン部位（ＡＰ部位）を形成するステップと、断片化されたＤＮＡを、ＤＮＡポリメラーゼおよびＡＰ部位の向かい側の塩基に相補的（complimentary）な標識されたヌクレオチド（例えば、標識されたヌクレオチドをＡＰ部位に取り込むための、切除された修飾ヌクレオチドに対応する）で処理するステップと、標識されたヌクレオチドを含有する断片化されたＤＮＡを単離するステップと、断片化されたＤＮＡにおける標識されたヌクレオチドの位置を検出するステップであって、ＤＮＡ試料における修飾されたヌクレオチドの場所を決定するステップとを含むことができる。一部の事例では、検出するステップは、代替的に、断片化されたＤＮＡにおける標識されたヌクレオチドの量を定量するステップが関与し、本方法は、標識されたヌクレオチドの量を、既知量の標識されたヌクレオチドを含有する参照試料における標識されたヌクレオチドの量と比較するステップをさらに含む。一部の事例では、エピジェネティック修飾は、対象が疾患または状態を有する場合は、健康な対象と比較して、パターンを増加、減少または変化させ得る。ある特定の場合では、対象は、対象が疾患または状態を有する場合は、健康な対象と比べて、増加した量のＤＮＡ損傷を有し得る。

【００３１】

別の事例では、疾患または状態を発症するリスクがある対象を識別する方法が提供される。本方法は、対象からＤＮＡ試料を得るステップと、ＤＮＡを断片化するステップと、断片化されたＤＮＡを、疾患に関連する修飾されたヌクレオチドを切除するＤＮＡグリコシラーゼで処理するステップであって、断片化されたＤＮＡに脱プリンまたは脱ピリミジン部位（ＡＰ部位）を形成するステップと、断片化されたＤＮＡを、ＤＮＡポリメラーゼおよび切除された修飾ヌクレオチドに対応する標識されたヌクレオチドで処理するステップであって、標識されたヌクレオチドをＡＰ部位に取り込むステップと、標識されたヌクレオチドを含有する断片化されたＤＮＡを単離するステップと、断片化されたＤＮＡにおける標識されたヌクレオチドの位置を検出するステップであって、ＤＮＡ試料における修飾されたヌクレオチドの場所を決定するステップとを含むことができる。一部の事例では、検出するステップは、代替的に、断片化されたＤＮＡにおける標識されたヌクレオチドの量を定量するステップが関与し、本方法は、標識されたヌクレオチドの量を、既知量の標識されたヌクレオチドを含有する参照試料における標識されたヌクレオチドの量と比較するステップをさらに含む。一部の事例では、対象のＤＮＡは、疾患に関連する修飾されたヌクレオチドに関して２回以上評価することができる。例えば、対象を、経時的にモニタリングして、修飾されたヌクレオチドが、対象のＤＮＡに蓄積しているかを決定することができる。一部の事例では、エピジェネティック修飾は、対象が疾患または状態を有するリスクがある場合は、健康な対象と比較して、パターンを増加、減少または変化させ得る。ある特定の場合では、対象は、対象が疾患または状態を有する場合は、健康な対象と比べて増加した量のＤＮＡ損傷を有することができる。一部の事例では、対象は、疾患または状態を発症する遺伝性リスクを有する。一部の場合では、対象は、疾患または状態を発症する環境リスクを有する。

【００３２】

別の事例では、対象に適切な処置を決定する方法が提供される。本方法は、対象からＤＮＡ試料を得るステップと、ＤＮＡを断片化するステップと、断片化されたＤＮＡを、処置に対する応答性または応答性欠如に関連する修飾されたヌクレオチドを切除するＤＮＡグリコシラーゼで処理するステップであって、断片化されたＤＮＡに脱プリンまたは脱ピリミジン部位（ＡＰ部位）を形成するための処理のステップと、断片化されたＤＮＡを、ＤＮＡポリメラーゼおよび切除された修飾ヌクレオチドに対応する標識されたヌクレオチドで処理するステップであって、標識されたヌクレオチドをＡＰ部位に取り込むステップと、標識されたヌクレオチドを含有する断片化されたＤＮＡを単離するステップと、断片化されたＤＮＡにおける標識されたヌクレオチドの位置を検出するステップであって、ＤＮＡ試料における修飾されたヌクレオチドの場所を決定するステップとを含むことができる。一部の事例では、検出するステップは、代替的に、断片化されたＤＮＡにおける標識されたヌクレオチドの量を定量するステップが関与し、本方法は、標識されたヌクレオチドの量を、既知量の標識されたヌクレオチドを含有する参照試料における標識されたヌクレオチドの量と比較するステップをさらに含む。一部の事例では、複数の処置を、疾患または状態、疾患または状態のサブタイプの処置に利用することができる。一部の場合では、対象由来のＤＮＡ試料において検出されるＤＮＡ修飾の種類、量、および／またはパターンは、対象が、疾患もしくは状態を有するか、または特定の処置に応答する可能性がより高い疾患もしくは状態の特定のサブタイプを有することを示す。

【００３３】

別の事例では、処置に対する対象の応答をモニタリングするための方法が提供される。本方法は、対象からＤＮＡ試料を得るステップと、ＤＮＡを断片化するステップと、断片化されたＤＮＡを、処置に対する応答性（病状の欠如）または応答性欠如（病状）に関連する修飾されたヌクレオチドを切除するＤＮＡグリコシラーゼで処理するステップであって、断片化されたＤＮＡに脱プリンまたは脱ピリミジン部位（ＡＰ部位）を形成するステップと、断片化されたＤＮＡを、ＤＮＡポリメラーゼおよび切除された修飾ヌクレオチドに対応する標識されたヌクレオチドで処理するステップであって、標識されたヌクレオチドをＡＰ部位に取り込むステップと、標識されたヌクレオチドを含有する断片化されたＤＮＡを単離するステップと、断片化されたＤＮＡにおける標識されたヌクレオチドの位置を検出するステップであって、ＤＮＡ試料における修飾されたヌクレオチドの場所を決定するステップとを含むことができる。一部の事例では、検出するステップは、代替的に、断片化されたＤＮＡにおける標識されたヌクレオチドの量を定量するステップが関与し、本方法は、標識されたヌクレオチドの量を、既知量の標識されたヌクレオチドを含有する参照試料における標識されたヌクレオチドの量と比較するステップをさらに含む。一部の事例では、対象のＤＮＡは、疾患に関連する修飾されたヌクレオチドに関して２回以上評価することができる。例えば、対象を、経時的にモニタリングして、対象のＤＮＡにおける修飾されたヌクレオチドのパーセント、またはその中における修飾されたヌクレオチドのパターンが、処置に対する応答において変化するかを決定することができる。例えば、対象が処置を受ける際に、修飾されたヌクレオチドの量もしくはそのパターンまたはそれらの両方が、経時的に変化しない場合、対象は、処置に応答していない可能性がある。代替的に、対象が処置を受ける際に、修飾されたヌクレオチドの量もしくはそのパターンまたはそれらの両方が、経時的に変化する場合、対象は、処置に応答している可能性がある。一例では、対象が処置を受けている間に、ＤＮＡ損傷の量が、縮小する場合、対象は、処置に応答している可能性がある。

【００３４】

一事例では、疾患または状態のための処置に関連する副作用に関して対象をモニタリングする方法が提供される。本方法は、対象からＤＮＡ試料を得るステップと、ＤＮＡを断片化するステップと、断片化されたＤＮＡを、疾患のための処置に関連する修飾されたヌクレオチドを切除するＤＮＡグリコシラーゼで処理するステップであって、断片化されたＤＮＡに脱プリンまたは脱ピリミジン部位（ＡＰ部位）を形成するステップと、断片化されたＤＮＡを、ＤＮＡポリメラーゼおよび切除された修飾ヌクレオチドに対応する標識さ

れたヌクレオチドで処理するステップであって、標識されたヌクレオチドをＡＰ部位に取り込むステップと、標識されたヌクレオチドを含有する断片化されたＤＮＡを単離するステップと、断片化されたＤＮＡにおける標識されたヌクレオチドの位置を検出するステップであって、ＤＮＡ試料における修飾されたヌクレオチドの場所を決定するステップとを含むことができる。一部の事例では、検出するステップは、代替的に、断片化されたＤＮＡにおける標識されたヌクレオチドの量を定量するステップが関与し、本方法は、標識されたヌクレオチドの量を、既知量の標識されたヌクレオチドを含有する参照試料における標識されたヌクレオチドの量と比較するステップをさらに含む。一部の事例では、対象のＤＮＡは、疾患に関連する修飾されたヌクレオチドに関して２回以上評価することができる。例えば、対象を、経時的にモニタリングして、修飾されたヌクレオチドが、対象のＤＮＡに蓄積しているかを決定することができる。一部の事例では、疾患のための処置に関連する修飾されたヌクレオチドは、処置の結果として対象のＤＮＡに蓄積するＤＮＡ損傷である。一部の事例では、本方法は、修飾されたヌクレオチドの量が、閾値近傍であるもしくはそれを上回るか、または処置に対し負の副作用に関連するパターンもしくはプロファイルを有することを示すステップと、一部の事例では、対象が、処置を受け続けるべきではない、そして／または代替処置を受けるべきであることを示すステップとをさらに含む。他の事例では、本方法は、修飾されたヌクレオチドの量が、閾値を下回る、または処置に対し負の副作用に関連しないパターンもしくはプロファイルを有することを示すステップと、一部の事例では、対象が、処置を受け続けることができることを示すステップとをさらに含む。一部の事例では、処置は、放射線療法または化学療法であってもよい。

【００３５】

対象のための適切な処置の決定、処置に対する対象の応答のモニタリングおよび疾患または状態のための処置に関連する副作用に関する対象のモニタリングに関する上述の方法については、様々な種類の処置が企図される。一部の事例では、処置は、医薬物であってもよい。医薬物の例として、コリンエステラーゼ阻害剤（ＣｈＥＩ）、Ｎ－メチル－Ｄ－アスパラギン酸（ＮＭＤＡ）受容体アンタゴニスト、カルビドパ／レボドパおよび関連化合物、ドーパミンアゴニスト、抗コリン薬、ＭＡＯ－Ｂ阻害剤、ＣＯＭＴ阻害剤、抗炎症性化合物（例えば、ステロイド、副腎皮質ステロイド、非ステロイド性抗炎症薬（ＮＳＡＩＤ））、免疫抑制薬、生物製剤（例えば、モノクローナル抗体、インスリン、インターフェロン、エリスロポエチン、Ｇ－ＣＳＦ）、鎮痛薬、疾患修飾性抗リウマチ薬（生物学的応答修飾物質を含む）、抗凝固薬、抗血小板化合物、アンジオテンシン変換酵素（ＡＣＥ）阻害剤、アンジオテンシンＩＩ受容体阻害剤、ベータ遮断薬、組み合わせたアルファおよびベータ遮断薬、カルシウムチャネル遮断薬、ジギタリス調製剤、利尿薬、血管拡張薬、ビタミン、膜浸透性抗酸化剤、ピルビン酸塩、抗ウイルス性化合物、抗細菌性化合物および抗真菌性化合物がとりわけ挙げられるがこれらに限定されない。一部の事例では、処置は、対象の食事、身体活動性の量、身体活動性の種類またはこれらの組合せのいずれかの変更を含むことができる。

【００３６】

別の事例では、対象の遺伝子プロファイルを作成する方法が提供される。本方法は、対象からＤＮＡ試料を得るステップと、ＤＮＡを断片化するステップと、断片化されたＤＮＡを、修飾されたヌクレオチドを切除する複数のＤＮＡグリコシラーゼで処理するステップであって、断片化されたＤＮＡに脱プリンまたは脱ピリミジン部位（ＡＰ部位）を形成するステップと、断片化されたＤＮＡを、ＤＮＡポリメラーゼおよび切除された修飾ヌクレオチドに対応する標識されたヌクレオチドで処理するステップであって、標識されたヌクレオチドをＡＰ部位に取り込むステップと、標識されたヌクレオチドを含有する断片化されたＤＮＡを単離するステップと、断片化されたＤＮＡにおける標識されたヌクレオチドの位置を検出するステップであって、ＤＮＡ試料における修飾されたヌクレオチドの場所を決定して、対象の遺伝子プロファイルを決定するステップとを含むことができる。一部の事例では、検出するステップは、代替的に、断片化されたＤＮＡにおける標識されたヌクレオチドの量を定量するステップが関与し、本方法は、標識されたヌクレオチドの量

を、既知量の標識されたヌクレオチドを含有する参照試料における標識されたヌクレオチドの量と比較するステップをさらに含む。一部の事例では、断片化されたＤＮＡは、複数のＤＮＡグリコシラーゼで逐次的に処理される。一部の事例では、断片化されたＤＮＡは、別々の容器にアリコートされ、複数のＤＮＡグリコシラーゼで並行して処理される。一部の事例では、対象の遺伝子プロファイルを未知起源のＤＮＡ試料と比較して、この未知起源のＤＮＡ試料が、対象に由来するかを決定することができる。一部の場合では、対象の２種以上の遺伝子プロファイルを複数の時点にわたって作成することができる。対象の遺伝子プロファイルは、ある時点から別の時点へと比較して、対象が、病状または状態（例えば、医療を提供する方法に関する上述のもの）を発症しているかを決定することができる。

【００３７】

医療ケアの提供に関する上述の方法について、対象は、様々な疾患および状態のうちの１つまたは複数を有することができる。一部の事例では、疾患または状態は、がんであってもよい。例えば、がんは、神経膠腫、結腸直腸がん、肺がん、皮膚がん、前立腺がんまたは乳がんであってもよい。一部の事例では、疾患または状態は、神経変性疾患であってもよい。例えば、一部の事例では、神経変性疾患は、アルツハイマー病またはパーキンソン病であってもよい。一部の事例では、疾患または状態は、慢性炎症性疾患であってもよい。例えば、一部の事例では、慢性炎症性疾患は、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）または関節リウマチ（ＲＡ）であってもよい。一部の事例では、疾患または状態は、代謝性疾患であってもよい。例えば、代謝性疾患は、糖尿病または肥満であってもよい。一部の事例では、疾患または状態は、心血管疾患であってもよい。例えば、心血管疾患は、粥状動脈硬化または動脈硬化であってもよい。一部の事例では、疾患または状態は、感染性疾患であってもよい。例えば、感染性疾患は、細菌感染、ウイルス感染または真菌感染であってもよい。一部の事例では、疾患または状態は、ミトコンドリア病であってもよい。例えば、ミトコンドリア病は、ミトコンドリアミオパチー；真性糖尿病および聴覚消失（ＤＡＤ）；レーベル遺伝性視神経症（ＬＨＯＮ）；リー症候群；ニューロパチー、運動失調、網膜色素変性症および下垂（ＮＡＲＰ）、筋神経原性（myonerogenic）胃腸脳症（ＭＮＧＩＥ）；赤色ぼろ線維を伴うミオクローヌスてんかん（ＭＥＲＲＦ）；ミトコンドリアミオパチー、脳筋症（encepalomyopathy）、乳酸アシドーシス、脳卒中様症状（ＭＥＬＡＳ）；またはミトコンドリアＤＮＡ枯渇であってもよい。一部の事例では、疾患または状態は、環境（外来性）作用因子への曝露から生じる疾患または状態である。環境作用因子の例として、煙草の煙、汚染、放射線（ＵＶ、Ｘ線、電離、核など）、農薬、毒性金属、化学的分散剤、産業用化学物質、石油・ガス製品および流出、化学療法薬ならびに生体毒素（真菌、微生物、植物、動物、短鎖（short）マイコトキシン、短鎖フィトトキシン）などの毒性化学物質または化合物、ならびに細菌、ウイルスおよび真菌を含む生物体が挙げられるがこれらに限定されない。一部の事例では、疾患または状態は、内在性作用因子から生じる疾患または状態である。内在性作用因子の例として、ＤＮＡを非酵素的にメチル化することができるＳ－アデノシルメチオニン、およびエストロゲンが挙げられるがこれらに限定されない。エピジェネティック修飾またはＤＮＡ損傷に関連する他の疾患および状態も、本明細書に提供される方法に関して企図される。

【００３８】

別の事例では、ＤＮＡを含有する生物学的試料の環境曝露時間を決定する方法が提供される。参照試料は、ＤＮＡに修飾を引き起こす環境条件に曝露された生物学的試料である。本方法は、生物学的試料からＤＮＡを得るステップと、ＤＮＡを断片化するステップと、断片化されたＤＮＡを、修飾されたヌクレオチドを切除するＤＮＡグリコシラーゼで処理するステップであって、断片化されたＤＮＡに脱プリンまたは脱ピリミジン部位（ＡＰ部位）を形成するステップと、断片化されたＤＮＡを、ＤＮＡポリメラーゼおよび切除された修飾ヌクレオチドに対応する標識されたヌクレオチドで処理するステップであって、標識されたヌクレオチドをＡＰ部位に取り込むステップと、標識されたヌクレオチドを含有する断片化されたＤＮＡを単離するステップと、断片化されたＤＮＡにおける標識され

たヌクレオチドの位置を検出するステップであって、ＤＮＡ試料における修飾されたヌクレオチドの場所を決定して、生物学的試料のＤＮＡ修飾プロファイルを決定するステップとを含むことができる。一部の事例では、検出するステップは、代替的に、断片化されたＤＮＡにおける標識されたヌクレオチドの量を定量するステップが関与し、本方法は、標識されたヌクレオチドの量を、既知量の標識されたヌクレオチドを含有する参照試料における標識されたヌクレオチドの量と比較するステップをさらに含む。断片化されたＤＮＡにおける標識されたヌクレオチドの量は、各参照試料が異なる期間曝露されている、ＤＮＡに修飾を引き起こす環境条件に曝露された複数の参照試料と比較して、ＤＮＡ試料の環境曝露時間を決定することができる。参照試料（単数または複数）とＤＮＡ試料との比較は、参照試料（単数または複数）におけるものと比較した、ＤＮＡ試料における修飾されたヌクレオチドの量、そのパターンまたはそれらの両方に基づき、生物学的試料の環境曝露時間を識別することができる。一部の事例では、環境条件として、屋外にあることを挙げることができるがこれに限定されない。一部の事例では、環境条件は、特定の屋外環境（例えば、水中、土に埋めるなど）である。一部の事例では、環境条件は、酸化剤、アルキル化剤、産業用化学物質、煙草の煙、汚染、放射線（ＵＶ、Ｘ線、電離、核など）、農薬、毒性金属、化学的分散剤、石油・ガス製品および流出、化学療法薬ならびに生体毒素（真菌、微生物、植物、動物、短鎖マイコトキシン、短鎖フィトトキシン）などの毒性化学物質または化合物、ならびに細菌、ウイルスおよび真菌を含む生物体への曝露であってもよい。一部の事例では、生物学的試料は、生きている対象から得ることができる。一部の事例では、生物学的試料は、死亡した対象から得ることができる。

【００３９】

一部の事例では、ＤＮＡ試料は、生物学的試料から得られるゲノムＤＮＡ、ミトコンドリアＤＮＡ、またはゲノムおよびミトコンドリアＤＮＡの両方である。

【００４０】

上述の方法のそれぞれについて、一部の事例では、修飾されたヌクレオチドは、メチルシトシン（ｍＣ）、ヒドロキシメチルシトシン（ｈｍＣ）、カルボキシシトシン（ｃａＣ）、ホルミルシトシン（ｆＣ）、８－オキソ－７，８－ジヒドロ（dihyro）グアニン（ｏｘｏＧ）、ウラシル、メチルアデニン（ｍＡ）または８－オキソアデニン、Ｏ６－メチルグアニン、１－メチルアデニン、Ｏ４－メチルチミン、５－ヒドロキシシトシン、５－ヒドロキシウラシル、５－ヒドロキシメチルウラシル、またはチミンダイマーのうちの少なくとも１つであってもよい。一部の事例では、これらの種類の修飾されたヌクレオチドの複数のいずれかの組合せを検出することができる。

【００４１】

また、一部の事例では、ＤＮＡグリコシラーゼは、表１に収載されている酵素の１種であってもよい。一部の事例では、ＤＮＡポリメラーゼは、３’→５’エキソヌクレアーゼ活性または鎖置換活性を有しない。一例では、ＤＮＡポリメラーゼは、３’→５’エキソヌクレアーゼ活性を欠く突然変異したＴ４　ＤＮＡポリメラーゼであってもよい。一部の事例では、標識されたヌクレオチドは、ビオチン標識されたヌクレオチドであってもよい。一部の事例では、本方法は、断片化されたＤＮＡをＤＮＡグリコシラーゼで処理した後に、断片化されたＤＮＡを、脱プリンまたは脱ピリミジン部位（ＡＰ）エンドヌクレアーゼと共にインキュベートするステップをさらに含む。一部の事例では、ＡＰエンドヌクレアーゼは、エンドヌクレアーゼＩＶであってもよい。一部の事例では、本方法は、標識されたヌクレオチドを含有する断片化されたＤＮＡをＤＮＡリガーゼと共にインキュベートするステップであって、断片化されたＤＮＡに存在するニックを閉鎖するステップをさらに含む。例示的なＤＮＡリガーゼは、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼおよびＥ．ｃｏｌｉ　ＤＮＡリガーゼを含む。一部の事例では、標識されたヌクレオチドを含有する断片化されたＤＮＡを単離するステップは、断片化されたＤＮＡを、固体支持体に付着されたストレプトアビジンと接触させるステップと、ストレプトアビジンに結合していない断片化されたＤＮＡを除去するステップとが関与することができる。一部の事例では、検出するステップは、単離された断片化されたＤＮＡを配列決定するステップが関与することができる。

【００４２】
上述の方法に関するさらなる詳細について以下に提供される。
【００４３】
試料調製
一態様では、生物学的試料由来のＤＮＡが得られるか、または提供される。生物学的試料から得られるか、または提供されるＤＮＡは、ゲノムＤＮＡ、ミトコンドリアＤＮＡ、またはゲノムおよびミトコンドリアＤＮＡの両方であってもよい。一部の事例では、ゲノムＤＮＡおよびミトコンドリアＤＮＡは、同じ生物学的試料または供給源から別々に得ることができる。ゲノムＤＮＡおよびミトコンドリアＤＮＡの単離のために、多くの異なる方法および技術を利用することができる。一般に、このような方法は、出発材料の破壊および溶解と、それに続くタンパク質および他の夾雑物の除去と、最後に、ＤＮＡの回収とが関与する。タンパク質の除去は、例えば、プロテイナーゼＫによる消化と、それに続く塩析、有機抽出、勾配分離、または固相支持体へのＤＮＡの結合（アニオン交換またはシリカ技術のいずれか）とによって達成することができる。ミトコンドリアＤＮＡは、最初のミトコンドリア単離の後に、同様に単離することができる。ＤＮＡは、エタノールまたはイソプロパノールを使用した沈殿によって回収することができる。核またはミトコンドリアＤＮＡの単離に利用することができる、市販のキットも存在する。方法の選択は、例えば、試料の量、ＤＮＡの要求される量および分子量、下流の用途に要求される純度、ならびに時間および費用を含む、多くの因子に依存する。
【００４４】
一部の事例では、単離されたＤＮＡは、複数のより短い二本鎖ＤＮＡ片へと断片化される。一般に、ＤＮＡの断片化は、物理的にまたは酵素的に行うことができる。
【００４５】
例えば、物理的断片化は、音響剪断、超音波処理、マイクロ波照射または水力学的剪断によって行うことができる。音響剪断および超音波処理は、ＤＮＡの剪断に使用される主要な物理的方法である。例えば、Ｃｏｖａｒｉｓ（登録商標）機器（Ｗｏｂｕｒｎ、ＭＡ）は、ＤＮＡを１００ｂｐ～５ｋｂに切断するための音響装置である。Ｃｏｖａｒｉｓは、メイトペア（Mate-Pair）ライブラリーのために６～２０ｋｂに試料を処理することができるチューブ（ｇＴｕｂｅ）も製造する。別の例は、クロマチン、ＤＮＡの剪断および組織の破壊に利用される超音波処理装置である、Ｂｉｏｒｕｐｔｏｒ（登録商標）（Ｄｅｎｖｉｌｌｅ、ＮＪ）である。少ない容量のＤＮＡは、１５０ｂｐ～１ｋｂの長さに剪断することができる。Ｄｉｇｉｌａｂ（Ｍａｒｌｂｏｒｏｕｇｈ、ＭＡ）製のＨｙｄｒｏｓｈｅａｒ（登録商標）は、別の例であり、流体力を利用してＤＮＡを剪断する。Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）によって製造されたものなど、ネブライザーを使用して、圧縮空気を使用して液体を微粒化し、ＤＮＡを１００ｂｐ～３ｋｂ断片に数秒で剪断することもできる。噴霧化は、試料の損失を生じ得るため、一部の事例では、これは、限られた分量の試料にとっては望ましい断片化方法ではない場合がある。超音波処理および音響剪断は、試料由来のＤＮＡの全量をより効率的に保持することができるため、より少ない試料容量にとってより良い断片化方法であってもよい。公知のまたは開発された他の物理的断片化装置および方法を使用することもできる。
【００４６】
様々な酵素的方法を使用して、ＤＮＡを断片化することもできる。例えば、ＤＮＡは、ＤＮａｓｅ Ｉ、またはマルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）－Ｔ７ Ｅｎｄｏ ＩおよびＶｉｂｒｉｏ ｖｕｌｎｉｆｉｃｕｓヌクレアーゼ（Ｖｖｎ）などの非特異的ヌクレアーゼの組合せで処理することができる。非特異的ヌクレアーゼおよびＴ７ Ｅｎｄｏの組合せは、相乗的に作用して、非特異的ニックおよびカウンターニックを産生し、ニック部位から８ヌクレオチドまたはそれ未満を解離する断片を生成する。別の例では、ＤＮＡは、ＮＥＢＮｅｘｔ（登録商標）ｄｓＤＮＡ Ｆｒａｇｍｅｎｔａｓｅ（登録商標）（ＮＥＢ、Ｉｐｓｗｉｃｈ、ＭＡ）で処理することができる。ＮＥＢＮｅｘｔ（登録商標）ｄｓＤＮＡ Ｆｒａｇｍｅｎｔａｓｅは、時間依存的様式でｄｓＤＮＡ切断を生成して、反応

時間に応じて５０～１，０００ｂｐ　ＤＮＡ断片を生じる。ＮＥＢＮｅｘｔ　ｄｓＤＮＡ　Ｆｒａｇｍｅｎｔａｓｅは、２種の酵素を含有し、その一方は、ｄｓＤＮＡにニックをランダムに生成し、他方は、ニックを入れた部位を認識し、ニックにわたって向かい側のＤＮＡ鎖をカットし、ｄｓＤＮＡ切断を産生する。その結果得られるＤＮＡ断片は、短いオーバーハング、５’－リン酸および３’－ヒドロキシル基を含有する。別の例は、Ｎｅｘｔｅｒａ（登録商標）Ｔａｇｍｅｎｔａｔｉｏｎ（登録商標）技術（Ｉｌｌｕｍｉｎａ、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）である。Ｔａｇｍｅｎｔａｔｉｏｎ（登録商標）技術は、トランスポサーゼを使用して、同時に、ｄｓＤＮＡを断片化し、アダプターを挿入する。トランスポソーム（Transoposome）は、遊離ＤＮＡ端を有し、「カットおよびペースト」反応においてＤＮＡにランダムに挿入する。ＤＮＡ端は遊離しているため、これは、アダプター配列に付加しつつ、ＤＮＡを有効に断片化する。アダプター配列が、その後の試料の識別、単離または操作に有用であり得る場合、この方法は、有用であり得る。

【００４７】

一部の事例では、ＤＮＡ試料は、特定のサイズ範囲に断片化される。例えば、ＤＮＡ試料は、約２５～１００ｂｐ、約２５～１５０ｂｐ、約５０～２００ｂｐ、約２５～２００ｂｐ、約５０～２５０ｂｐ、約２５～２５０ｂｐ、約５０～３００ｂｐ、約２５～３００ｂｐ、約５０～５００ｂｐ、約２５～５００ｂｐ、約１５０～２５０ｂｐ、約１００～５００ｂｐ、約２００～８００ｂｐ、約５００～１３００ｂｐ、約７５０～２５００ｂｐ、約１０００～２８００ｂｐ、約５００～３０００ｂｐ、約８００～５０００ｂｐの範囲内またはこれらの範囲内の任意の他のサイズ範囲の断片に断片化することができる。例えば、ＤＮＡ試料は、２５～１００ｂｐ、２５～１５０ｂｐ、５０～２００ｂｐ、２５～２００ｂｐ、５０～２５０ｂｐ、２５～２５０ｂｐ、５０～３００ｂｐ、２５～３００ｂｐ、５０～５００ｂｐ、２５～５００ｂｐ、１５０～２５０ｂｐ、１００～５００ｂｐ、２００～８００ｂｐ、５００～１３００ｂｐ、７５０～２５００ｂｐ、１０００～２８００ｂｐ、５００～３０００ｂｐ、８００～５０００ｂｐの範囲内またはこれらの範囲内の任意の他のサイズ範囲の断片に断片化することができる。例えば、ＤＮＡ試料は、約５０～２５０ｂｐの断片に断片化することができる。一例では、ＤＮＡ試料は、５０～２５０ｂｐの断片に断片化することができる。一部の事例では、断片は、約２５ｂｐだけさらに大きくまたは小さくなることができる。例えば、断片は、２５ｂｐだけさらに大きくまたは小さくなることができる。一部の事例では、相対的に短いＤＮＡ断片は、断片間の配列の重複を最小化することにより、解析を容易にすることができる。

【００４８】

ある特定の事例では、ＤＮＡ断片が処理されて、ニックまたはギャップがない平滑末端ＤＮＡ断片を生成する。これは、例えば、断片化されたＤＮＡをＤＮＡポリメラーゼおよび正準ヌクレオチドと共にインキュベートすることにより行うことができる。多数のＤＮＡポリメラーゼは、ＤＮＡオーバーハングを除去し得、そして／またはプライミングに利用できる３’ヒドロキシルが存在する場合、欠損塩基の補填に使用することができる。このような反応のためのポリメラーゼは、Ｔ４　ＤＮＡポリメラーゼ（鎖置換活性なし）、ＤＮＡポリメラーゼＩ、ＤＮＡポリメラーゼＩのクレノウ断片（クレノウ断片）、クレノウエキソマイナス（exo　minus）ポリメラーゼ、Ｔａｑ　ＤＮＡポリメラーゼ、Ｔｆｌ　ＤＮＡポリメラーゼ、Ｔｔｈ　ＤＮＡポリメラーゼ、Ｔｌｉ　ＤＮＡポリメラーゼおよびＰｆｕ　ＤＮＡポリメラーゼを含む。これらのポリメラーゼのそれぞれを使用して、３’オーバーハングを補填することができる一方で、ＤＮＡポリメラーゼＩ、クレノウ断片、Ｔ４　ＤＮＡポリメラーゼ、Ｔｌｉ　ＤＮＡポリメラーゼおよびＰｆｕ　ＤＮＡポリメラーゼは、５’オーバーハングを補填し、３’オーバーハングを除去することもできる。一部の事例では、例えば、Ｔ４　ＤＮＡポリメラーゼ（鎖置換活性なし）、Ｐｆｕ　ＤＮＡポリメラーゼ、Ｔｌｉ　ＤＮＡポリメラーゼおよびＤＮＡポリメラーゼＩのクレノウ断片を含む、ある特定のポリメラーゼが、平滑末端の生成に好ましい場合がある。一部の事例では、例えば、Ｔ４　ＤＮＡポリメラーゼおよびヒトＤＮＡポリメラーゼβを含む、ある特定のポリメラーゼが、内部ギャップの充填に好ましい場合がある。一部の事例では、２

種以上のＤＮＡポリメラーゼを使用して、ヌクレオチドをＤＮＡ断片に取り込むことができる。例えば、一部の事例では、Ｔａｑ　ＤＮＡポリメラーゼおよびＴ４　ＤＮＡポリメラーゼを使用して、ニックまたはギャップがない平滑末端ＤＮＡ断片を生成することができる。

【００４９】

一部の事例では、ＤＮＡ断片はさらに、リガーゼと共にインキュベートして、ＤＮＡ断片のリン酸骨格におけるニックを酵素的に閉鎖することができる。リガーゼは、二重鎖ＤＮＡまたはＲＮＡにおける並置された５’リン酸および３’ヒドロキシル末端の間のホスホジエステル結合の形成を触媒する。この酵素は、平滑末端および粘着末端の末端を連結すると共に、二重鎖ＤＮＡにおける一本鎖ニックを修復し得る。例示的なリガーゼは、クローニングに最も頻繁に使用される酵素であるＴ４リガーゼである。使用することができる別のリガーゼは、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＤＮＡリガーゼであり、これは、粘着末端の二本鎖ＤＮＡ末端を優先的に接続するが、フィコールまたはポリエチレングリコールの存在下で平滑末端ＤＮＡにも活性を有する。使用することができる別のリガーゼは、ミトコンドリアにおいて機能することが公知のＤＮＡリガーゼＩＩＩαである。

【００５０】

一部の事例では、ＤＮＡ断片は、５’または３’末端に取り込まれた試料識別子配列を有するように修飾することができる。例えば、これは、１回の反応での並行した複数の試料の解析およびその後の最終標識されたＤＮＡ試料の解析を可能にするであろう。例えば、標識されたＤＮＡ試料が、配列決定によって解析された場合、配列識別子は、複数の試料の同時の次世代配列決定を可能にするであろう。

【００５１】

一部の事例では、ＤＮＡ断片を、５’または３’末端に取り込まれた配列またはそこに付着された部分を有するように修飾して、本明細書に記載されている方法の間にＤＮＡ断片の単離または解析を支援することができる。例えば、フルオレセインアミダイト（amidite）（ＦＡＭ）標識を、ＤＮＡ分子のどちらかの端に取り込むことができ、これは、例えば、実施例１および２に記載されているものなど、蛍光を検出することにより、標識されたＤＮＡ産物の評価に使用することができる。使用することができる別の部分は、ストレプトアビジン（これは、固体支持体に付着されて、ＤＮＡ分子の単離を容易にすることができる）との強い相互作用により検出または単離に使用することができるビオチンである。別の例では、ＤＮＡ分子のそれぞれに取り込まれた配列を使用して、固体支持体に付着した相補的配列へのハイブリダイゼーションにより、これらを単離することができる。これらの目的に有用な他の部分は、ＤＮＡ分子への添付の容易さおよび記載されている方法の実施に使用される条件での安定性に基づき選択することができる。一部の事例では、本方法の標識ステップの前に行う代わりに、本方法の標識ステップ後に、配列または部分は、標識されたＤＮＡ断片に付着されることができる。

【００５２】

修飾されたヌクレオシドのグリコシラーゼ切除

一態様では、本方法は、ＤＮＡ試料をＤＮＡグリコシラーゼと共にインキュベートするステップであって、修飾された塩基を切除するステップを含む。配列ミスマッチおよび幅広い範囲のエピジェネティック修飾を含む、広範囲の特異的ＤＮＡ損傷エレメントを標的とする、多くのＤＮＡグリコシラーゼが識別された。記載されている方法によって検出可能な例示的な遺伝的修飾として、メチルシトシン（ｍＣ）、ヒドロキシメチルシトシン（ｈｍＣ）、カルボキシシトシン（ｃａＣ）、ホルミルシトシン（ｆＣ）、８－オキソ－７，８－ジヒドログアニン（ｏｘｏＧ）、ウラシル、メチルアデニン（ｍＡ）およびその他が挙げられるがこれらに限定されない。記載されている方法のモジュラー態様は、酵素選択により、多くの異なる特異的な修飾されたヌクレオシド塩基を独立して標的とすることができるものである。

【００５３】

ＤＮＡグリコシラーゼには２つの主要なクラス：単機能性および二機能性が存在する。

単機能性グリコシラーゼは、グリコシラーゼ活性のみを有するが、二機能性グリコシラーゼは、脱プリンまたは脱ピリミジン部位（ＡＰ）リアーゼ活性も保持し、この活性は、この酵素が、塩基傷害におけるＤＮＡのホスホジエステル結合をカットし、ＡＰエンドヌクレアーゼを必要とせずに一本鎖切断を作製することを可能にする。ＡＰ－リアーゼ活性は、ＡＰ部位に対して３’および５’を切断し、５’リン酸および３’リン酸を残す。β－リアーゼ活性（ＡＰ部位のβ－脱離）は、５’リン酸に隣接する３’α，β－不飽和アルデヒドを生じ、これは、ＡＰエンドヌクレアーゼ切断産物とは異なる。β－リアーゼ活性を有する酵素は、Ｉ型／クラスＩ　ＡＰエンドヌクレアーゼと称される。いくつかのグリコシラーゼ－リアーゼは、３’アルデヒドを３’リン酸に変換する、δ－リアーゼ活性も有する（δ－脱離を行うことができる）。β－リアーゼおよびδ－リアーゼ活性を有する酵素は、ＩＩ型／クラスＩＩ　ＡＰエンドヌクレアーゼと称される。例えば、Ｅ．ｃｏｌｉエンドヌクレアーゼＩＩＩ（Ｅｎｄｏ　ＩＩＩ）およびエンドヌクレアーゼＶＩＩＩ（Ｅｎｄｏ　ＶＩＩＩ）は、二本鎖ＤＮＡから損傷したピリミジンを切除し、Ｎ－グリコシラーゼおよびＡＰ－リアーゼ活性の両方を有する、二機能性グリコシラーゼである。Ｅｎｄｏ　ＩＩＩおよびＶＩＩＩによって認識され除去される損傷した塩基は、ウレア、５，６－ジヒドロキシチミン、チミングリコール、５－ヒドロキシ－５－メチルヒダントイン、ウラシルグリコール、６－ヒドロキシ－５，６－ジヒドロチミンおよびメチルタートロニルウレア（methyltartronylurea）を含む。Ｅｎｄｏ　ＶＩＩＩおよびＥｎｄｏ　ＩＩＩは同様のものであるが、Ｅｎｄｏ　ＶＩＩＩは、βおよびδリアーゼ活性を有する一方、Ｅｎｄｏ　ＩＩＩは、βリアーゼ活性を有する。いくつかの酵素は、ＤＮＡグリコシラーゼおよびＡＰエンドヌクレアーゼの両方である；その一例は、Ｅｎｄｏ　ＩＶである。

【００５４】

記載されている方法において有用な例示的なＤＮＡグリコシラーゼは、表１に収載されている。一部の事例では、表１に収載されているＤＮＡグリコシラーゼのうちの１つまたは複数を、記載されている方法において使用して、試料ＤＮＡから修飾された塩基を切除することができる。一部の事例では、表１に収載されているＤＮＡグリコシラーゼを使用して、ＤＮＡグリコシラーゼの基質として表１に収載されている修飾された塩基のうちの１つまたは複数を切除することができる。ＤＮＡグリコシラーゼの選択は、本開示において特異的に識別されているが、記載されている方法の切除ステップの実行において、いかなるＤＮＡグリコシラーゼを使用してもよいことが理解される。

【表１－１】

表 1.DNA グリコシラーゼ

塩基傷害/修飾の種類	名称	生理学的基質	Fxn
ss または ds DNA におけるウラシル	ウラシル-N グリコシラーゼ(glycoslyase)1 (UNG1/UDG1)*	U, 5-FU, ss および ds DNA	M
	一本鎖特異的単機能性(monofnctional)DNA グリコシラーゼ I	U, 5-hmU, 5-FU, ss および ds DNA	M
ミスマッチにおけるピリミジン誘導体	メチル結合ドメイングリコシラーゼ 4 (MBD4)	T, U, 5-FU, εC 対向 G, dsDNA	M
	チミン DNA グリコシラーゼ (TDG)	T, U, 5-FU, εC, 5-hmU, 5-fC, 5-caC;対向 G, dsDNA	M
酸化的塩基損傷	8-oxoG DNA グリコシラーゼ I (OGG1)*	8-oxoG, FaPy,対向 C, dsDNA	B
	MutY ホモログ DNA グリコシラーゼ(MYH/ MUTYH)*	A 対 8-oxoG, C または G,2-hA 対 G, ds DNA	M
アルキル化プリン	メチルプリングリコシラーゼ (MPG)	3-meA, 7-meG, 3-meG, ヒポキサンチン, εA, ss および ds DNA	M
酸化型、環断片化または飽和ピリミジン	エンドヌクレアーゼ III 様グリコシラーゼ 1 (NTHL1)*	Tg, FaPyG, 5-hC, 5-hU, dsDNA	B
	エンドヌクレアーゼ VIII 様グリコシラーゼ 1 (NEIL1)*	Tg, FaPyG, FaPyA, 8-oxoG, 5-hU, 5-hC, ss および ds DNA	B
	エンドヌクレアーゼ VIII 様グリコシラーゼ 2 (NEIL2)*	NTHL1 および NEIL1 に同じ	B
	エンドヌクレアーゼ VIII 様グリコシラーゼ 3 (NEIL3)	FaPyG, FaPyA, ssDNA を好む	B
cis-syn-シクロブタンピリミジンダイマー(例えば、UV 照射に起因するような)	T4 ピリミジンダイマーグリコシラーゼ(T4 PDG) / T4 エンドヌクレアーゼ V	cis-syn-シクロブタンピリミジンダイマー	B
ミスマッチにおけるピリミジン誘導体	Mug-DNA グリコシラーゼ (MUG)	U, T, εC, グアニンの向かい側	M
dsDNA 由来の損傷したプリン	FaPy-DNA グリコシラーゼ	7,8-ジヒドロ-8-オキソグアニン(8-オキソグアニン)、8-オキソアデニン、fapy-グアニン、メチル(methy)-fapy-グアニン、fapy-アデニン、アフラトキシン B1-fapy-グアニン、5-ヒドロキシ-シトシンおよび 5-ヒドロキシ-ウラシル	B
アルキル化プリン	3-メチルアデニン DNA グリコシラーゼ I (TagA)	3-mA, 3-ethA	M
アルキル化プリン	3-メチルアデニン DNA グリコシラーゼ II (AlkA)	3-m-プリン、7-m-プリン、3-eth-プリン、7-eth-プリン、εA、O^2-m-ピリミジン	M

【表１－２】

ssDNA および dsDNA におけるウラシル	SMUG DNA グリコシラーゼ（SMUG）	U, 5-hmU	M
損傷したピリミジン	エンドヌクレアーゼ III	ウレア、5,6-ジヒドロキシチミン、チミングリコール、5-ヒドロキシ-5-メチルヒダントイン、ウラシルグリコール、6-ヒドロキシ-5、6-ジヒドロチミンおよびメチルタートロニルウレア	B
損傷したピリミジン	エンドヌクレアーゼ VIII	ウレア、5,6-ジヒドロキシチミン、チミングリコール、5-ヒドロキシ-5-メチルヒダントイン、ウラシルグリコール、6-ヒドロキシ-5,6-ジヒドロチミン、メチルタートロニルウレア	B
説明:U、ウラシル;A、アデニン;T、チミン;C、シトシン;G、グアニン;ss、一本鎖;ds、二本鎖;5-h、5-ヒドロキシ;5-hm、5-ヒドロキシメチル;5-FU、5-フルオロ(fluor)ウラシル;ε エテノ;5-fC、5-ホルミルシトシン;5-caC、5-カルボキシルシトシン;8-oxoG、8-オキソ-7,8-ジヒドログアニン;Tg、チミングリコール;FaPy、2,6-ジアミノ-4-ヒドロキシ-5-N-メチルホルムアミドピリミジン(pyrimindine);m または me、メチル;h、ヒドロキシル;eth、エチル;Fxn、機能性;M、単機能性;B、二機能性;*ミトコンドリアにも見出される			

【００５５】
一部の事例では、ＤＮＡグリコシラーゼによってＡＰ部位が生成されると、次にＤＮＡ試料をＡＰエンドヌクレアーゼで処理して、切除された塩基の位置に隣接する３’ヒドロキシル基および５’デオキシリボース５’－リン酸を生成することができる。例えば、修飾された塩基の切除に使用されるＤＮＡグリコシラーゼが、単機能性である場合、ホスホジエステル骨格は、ＤＮＡ試料をＡＰエンドヌクレアーゼで処理することにより切断することができる。

【００５６】
上に記す通り、Ｉ型／クラス　ＡＰエンドヌクレアーゼ（ＡＰリアーゼ）は、ＡＰ部位の３’側におけるβ－脱離を触媒するが、ＩＩ型／クラス酵素は、ＡＰ部位の５’側における加水分解を触媒し、３’－ヒドロキシル末端を残す。ＩＩ型酵素は、Ｅ．ｃｏｌｉ　Ｅｎｄｏ　ＩＩＩ、Ｅｎｄｏ　ＩＶおよびＥｎｄｏ　ＶＩＩＩ、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ　Ａｐｎ１、Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ　ｍｅｌａｎｏｇａｓｔｅｒ　Ｒｒｐ１、Ｃａｅｎｏｒｈａｂｄｉｔｉｓ　ｅｌｅｇａｎｓ　ＣｅＡＰＮ１、ならびに主要な哺乳動物ＡＰエンドヌクレアーゼ、様々に命名されたＡＰＥ１（Ａｐｅ、ＡＰＥＩ、Ｈａｐ１、Ａｐｅｘ、ＲＥＦ１および線維芽細胞ＡＰエンドヌクレアーゼＩＩとしても公知）を含む。これらのＩＩ型酵素のいくつかは、３’→５’エキソヌクレアーゼ活性を保持するが、そのすべては、３’－ホスホジエステラーゼ活性を保持し、ＤＮＡの３’末端から、３’－ホスホグリコール酸（ＰＧ）、ホスホグリコアルデヒド、リン酸および／または末端ＡＰ部位を除去することが示された。一部の事例では、記載されている方法において使用されているＡＰエンドヌクレアーゼは、３’ホスホジエステラーゼ活性を有して、ＡＰ部位に残る３’リン酸を切除することもできる。

【００５７】
一部の事例では、切除ステップは、ＤＮＡにおける種々の酸化的損傷に作用することができるＥｎｄｏ　ＩＶを使用して行われる。Ｅｎｄｏ　ＩＶは、ｄｓＤＮＡ分子におけるインタクトなＡＰ部位を加水分解することができる脱プリン／脱ピリミジン（ＡＰ）エンドヌクレアーゼである。ＡＰ部位は、損傷に対し５’である第１のホスホジエステル結合において切断され、３’末端にヒドロキシル基および５’末端にデオキシリボース５’－

リン酸を残す。この酵素は、３’－ジエステラーゼ（diesterease）活性も有し、ＤＮＡの３’末端から、ホスホグリコアルデヒド、インタクトなデオキシリボース５－リン酸およびリン酸を放出することができる。一部の事例では、例えば、Ａｐｎ１、ＣｅＡＰＮ１またはＲｒｐ１を含むＥｎｄｏ　ＩＶのホモログを、記載されている方法において使用することができる。一部の事例では、ＡＰエンドヌクレアーゼは、ＡＰＥ１である。例えば、核またはミトコンドリアＤＮＡを解析する際に、ＡＰＥ１を使用することができる。

【００５８】

一部の事例では、ＤＮＡグリコシラーゼは、修飾された塩基または不正確な塩基を切除した後に、ＤＮＡ分子に結合したままであってもよい。このような事例では、ＤＮＡグリコシラーゼが結合したＤＮＡ分子は、ＤＮＡ分子からＤＮＡグリコシラーゼを放出させる試薬と共にインキュベートすることができる。ＤＮＡグリコシラーゼが放出されたら、非塩基部位を含むＤＮＡ分子は、後述および本開示の他の箇所に記載されている通りに標識することができる。例えば、チミンＤＮＡグリコシラーゼ（ＴＤＧ）は、不十分な触媒効率（酵素ターンオーバー）を有する。一部の事例では、記載されている方法においてＤＮＡグリコシラーゼとしてＴＤＧが使用される場合、切除反応のＤＮＡ産物（すなわち、非塩基部位を有するＤＮＡ分子）をさらに処理して、結合したＴＤＧを除去することができる。一例では、ＤＮＡ産物は、プロテイナーゼＫと共にインキュベートして、ＴＤＧを分解し、これにより、それを放出させることができる。別の例では、ＤＮＡ－ＴＤＧ混合物は、グリコシラーゼのＤＮＡ結合ドメインに競合的に結合するＳＵＭＯ１と同時インキュベートし、これにより、ＤＮＡ分子からのその解離をもたらすことができる。

【００５９】

一部の事例では、本方法を使用して、表１に収載されている修飾された塩基のいずれかを検出することができる。一部の事例では、次の修飾された塩基のうちの１つまたは複数は、本明細書に記載されている方法を使用して検出することができる：５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）；５－ヒドロキシメチル－フルオロウラシル（５－ｈｍＵ）；５－ホルミルシトシン（５－ｆＣ）；５－カルボキシルシトシン（５－ｃａＣ）；８－オキソ－７，８－ジヒドログアニン（８－ｏｘｏＧ）；２，６－ジアミノ－４－ヒドロキシ－５－Ｎ－メチルホルムアミドピリミジン（ＦａＰｙ）；２－ヒドロキシ－アデニン（２－ｈＡ）；７－メチル－グアニン（７－ｍｅＧ）；３－メチル－グアニン（３－ｍｅＧ）；ヒポキサンチン；チミングリコール（Ｔｇ）；ウラシルグリコール（Ｕｇ）；５－ヒドロキシ－シトシン（５－ｈＣ）；５－ヒドロキシ－ウラシル（５－ｈＵ）；ｃｉｓ－ｓｙｎ－シクロブタンピリミジンダイマー；８－オキソアデニン（８－ｏｘｏＡ）；ｆａｐｙ－グアニン（ＦａＰｙＧ）；ｍｅｔｈｙ－ｆａｐｙ－グアニン（ｍＦａＰｙＧ）；ｆａｐｙ－アデニン（ＦａＰｙＡ）；アフラトキシンＢ１－ｆａｐｙ－グアニン（ＡＦＢ１－ＦａＰｙＧ）；５－ヒドロキシ－シトシン（５－ｈＣ）；５－ヒドロキシ－ウラシル（５－ｈＵ）；３－メチル－アデニン（３－ｍＡ）；３－エチル－アデニン（３－ｅｔｈＡ）；３－メチル－プリン；７－メチル－プリン；３－エチル－プリン；７－エチル－プリン；エテノ－アデニン（εＡ）；エテノ－シトシン（εＣ）；Ｏ２－メチル－ピリミジン；ウレア；５，６－ジヒドロキシチミン；５－ヒドロキシ－５－メチルヒダントイン；および６－ヒドロキシ－５，６－ジヒドロチミン；メチルタートロニルウレア；メチルシトシン（ｍＣ）；およびヒドロキシメチルシトシン（ｈｍＣ）。一例では、本明細書に記載されている方法を使用して、８－オキソ－７，８－ジヒドログアニン（８－ｏｘｏＧ）を検出することができる。一部の事例では、本明細書に記載されている方法を使用して、５－ホルミルシトシン（５－ｆＣ）；５－カルボキシルシトシン（５－ｃａＣ）、メチルシトシン（ｍＣ）およびヒドロキシメチルシトシン（ｈｍＣ）のうちの１つまたは複数を検出することができる。

【００６０】

一例では、本方法を使用して、例えば、図４Ａに示す通り、ＤＮＡ試料におけるウラシルヌクレオチド、オキソグアニン（ｏｘｏＧ）ヌクレオチドまたはＴ：Ｇミスマッチのいずれかを検出することができる。例えば、標的ＤＮＡは、ｏｘｏＧ　ＤＮＡグリコシラー

ゼ（ｈＯＧＧ１）およびエンドヌクレアーゼＩＶ（ＥｎｄｏＩＶ）の組合せと共にインキュベートして、ｏｘｏＧを切除し、ポリメラーゼ活性に適したニックを誘導することができる。例えば、標的ＤＮＡは、ウラシルＤＮＡグリコシラーゼおよびエンドヌクレアーゼＩＶ（ＥｎｄｏＩＶ）の組合せと共にインキュベートして、ウラシルを切除し、ポリメラーゼ活性に適したニックを誘導することができる。例えば、標的ＤＮＡは、チミジンＤＮＡグリコシラーゼと共にインキュベートして、Ｔ：Ｇミスマッチを切除し、続いて、プロテイナーゼＫと共にインキュベートして、結合したＴＤＧを分解し、最後に、エンドヌクレアーゼＩＶ（ＥｎｄｏＩＶ）と共にインキュベートして、ポリメラーゼ活性に適したニックを誘導することができる。それぞれの例では、ＤＮＡグリコシラーゼは、個々の標的ヌクレオチドを選択的に標的とし、ＤＮＡのリン酸骨格からこれらを切除し、脱プリンまたは脱ピリミジン（ＡＰ）部位を残し得る。その後、二機能性グリコシラーゼに関して、この酵素のリアーゼ活性は、ＡＰ部位に対して３’を切断し、５’リン酸および３’－ホスホ－α，β－不飽和アルデヒドを産生し得る。ＥｎｄｏＩＶとの同時インキュベーションは、ＡＰ部位に対する５’の切断および３’末端のヒドロキシル化をもたらし、ポリメラーゼ活性の基質として作用する１ヌクレオチドギャップを残し得る。単機能性グリコシラーゼに関して、レムナントリン酸が、ＡＰ部位に対して５’に残り得る。これは、その後のポリメラーゼ活性に影響を与えない。本開示の次のセクションでさらに記述する通り、ＤＮＡは、ビオチン標識されたｄＮＴＰ（Ｎは、標的における正確な標準塩基の同一性にマッチする）ならびに３’→５’エキソヌクレアーゼ活性および鎖置換活性を欠くＴ４ポリメラーゼで処理することができる。このポリメラーゼのギャップ充填能力は、周囲の配列に関係なく、各ギャップ部位に取り込まれた単一のビオチン化ヌクレオチドのみをもたらす。その結果得られるＤＮＡ断片は、その本来の配列を保持するが、それぞれ各本来の標的修飾された塩基またはミスマッチの場所に単一のビオチン部分を有する。これらの例では、ＵＤＧおよびＴＤＧは、両者共に単機能性グリコシラーゼであるが、ｈＯＧＧ１は、二機能性であるため、両方のクラスのＤＮＡグリコシラーゼへのこの過程の適用性を実証する。加えて、ＤＮＡグリコシラーゼの使用は、標的塩基切除およびひいては標識の高い特異性をもたらす。一部の事例では、所定のＤＮＡグリコシラーゼは、その標的塩基を特異的に切除するが、他のＤＮＡグリコシラーゼは、そのように切除しない。例えば、図４Ｂに示す通り、ＵＤＧは、標的ＤＮＡ分子からｏｘｏＧを特異的に切除するが、ｈＯＧＧ１およびＴＤＧは、そのように切除しない。別の例では、図４Ｃに示す通り、ＵＤＧは、ｏｘｏＧまたはＴ：Ｇミスマッチを切除せず、ＴＤＧは、ｏｘｏＧまたはウラシルを切除せず、ｈＯＧＧ１は、ウラシルまたはＴ：Ｇミスマッチを切除しない。

【００６１】

ＤＮＡ試料は、本方法の切除ステップにおいて使用される酵素および他の試薬から単離または精製することができる。カラムクロマトグラフィー、フェノール－クロロホルム処理とエタノール沈殿、塩化セシウム密度勾配、アニオン交換ろ過およびシリカ吸着が挙げられるがこれらに限定されない、様々な方法を使用して、ＤＮＡ試料を単離することができる。単離後に、ＤＮＡ試料は、貯蔵のため、または後述する方法の標識ステップにおける使用のための緩衝液に懸濁することができる。

【００６２】

切除位置における標的ＤＮＡの標識

一態様では、記載されている方法は、修飾された塩基が切除されたＤＮＡ断片をＤＮＡポリメラーゼおよび１種または複数の標識されたヌクレオチドと共にインキュベートするステップであって、標識されたヌクレオシド塩基をＤＮＡ試料に、修飾された塩基が最初に位置していた位置で取り込むステップが関与する。一部の事例では、ＤＮＡポリメラーゼは、ギャップ充填活性を有し、３’→５’エキソヌクレアーゼまたは鎖置換活性を有さない。例示的なＤＮＡポリメラーゼとして、３’→５’エキソヌクレアーゼ（プルーフリーディング）活性を欠く突然変異したＴ４　ＤＮＡポリメラーゼ（例えば、Ｌｕｃｉｇｅｎによって販売されているＴ４　ｐｏｌ　ｅｘｏ⁻）、Ｔａｅ　Ｐｏｌ　Ａ、Ｓｃｅ　Ｐｏｌ　Ｉ、Ｔ２　ｐｏｌ、ＡＳＦＶ　ｐｏｌ　Ｘ、ヒトＰｏｌラムダ、ヒトＰｏｌミュー

、ヒトＰｏｌベータ、ヒトＰｏｌアルファおよびＳｃｅ　Ｐｏｌアルファが挙げられるがこれらに限定されない。一部の事例では、Ｔ４　ｐｏｌ　ｅｘｏ⁻を使用して、標識されたヌクレオチドを、標的とされた修飾された塩基の切除によって標的ＤＮＡに作製されたギャップに取り込むことができる。例えば、一部の事例では、図２に示す通り、Ｔ４　ｐｏｌ　ｅｘｏ⁻による標的ＤＮＡの標識は、標識されたヌクレオシドが、修飾された塩基が特異的に切除された位置で標的ＤＮＡに取り込まれた所望の反応産物を主にもたらす。一部の事例では、ギャップ充填活性を有し、３’→５’エキソヌクレアーゼ活性または鎖置換活性を有しないＤＮＡポリメラーゼの使用は、図２に示す通り、３’→５’エキソヌクレアーゼ活性を有するＤＮＡポリメラーゼの使用と比較して、所望の標識された産物の収率増加をもたらす。いずれか特定の理論に縛られることはないが、標識反応が、３’→５’エキソヌクレアーゼ活性を有するＤＮＡポリメラーゼを使用して行われる場合、標識反応は、１種類のみの標識されたヌクレオチドを含むため、３’→５’方向での分解は、ポリメラーゼに、（ｉ）標的から５’の塩基において永続的に休止させ、標識取り込みが起こらないか、または（ｉｉ）標的された修飾された塩基から５’の部位において標識されたヌクレオシドを取り込ませ、ギャップを残し、修飾された塩基の位置を誤識別させる、のいずれかを行わせる可能性がある。一部の事例では、所望の標識された産物の収率は、標識反応における標的ＤＮＡの総量の少なくとも約５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％またはほぼ１００％である。例えば、所望の標識された産物の収率は、標識反応における標的ＤＮＡの総量の少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％またはほとんど１００％であってもよい。一例では、所望の標識された産物の収率は、少なくとも８０％であってもよい。一例では、所望の標識された産物の収率は、少なくとも８５％であってもよい。別の例では、所望の標識された産物の収率は、少なくとも９０％であってもよい。別の例では、所望の標識された産物の収率は、少なくとも９５％であってもよい。別の例では、標識反応に先立ち切除反応中間体産物を精製することなく、切除および標識反応が、単一の反応容器内で行われる場合、所望の標識された産物の収率は、少なくとも９０％であってもよい。別の例では、標識反応に先立ち切除反応中間体産物を精製することなく、切除および標識反応が、単一の反応容器内で行われる場合、所望の標識された産物の収率は、少なくとも９５％であってもよい。一部の事例では、プルーフリーディング活性を欠くＤＮＡポリメラーゼの使用は、標識されたヌクレオシドが取り込まれないか、または過剰な標識されたヌクレオチドが偽場所で取り込まれたＤＮＡ分子をもたらす。

【００６３】

一部の事例では、本方法の標識ステップにおいて使用されるＤＮＡポリメラーゼの量は、限定的であり得、これにより、所望の産物の収率低下および望まれない産物の生成を回避することができる。一部の事例では、標識反応において使用されるＤＮＡポリメラーゼの量は、標識反応における約１０Ｕ／ｐｍｏｌ～約３０Ｕ／ｐｍｏｌ総ＤＮＡであってもよい。例えば、標識反応におけるＤＮＡポリメラーゼの量は、約１０Ｕ／ｐｍｏｌ総ＤＮＡ、約１５Ｕ／ｐｍｏｌ総ＤＮＡ、約２０Ｕ／ｐｍｏｌ総ＤＮＡ、約２５Ｕ／ｐｍｏｌ総ＤＮＡ、約３０Ｕ／ｐｍｏｌ総ＤＮＡ、約３５Ｕ／ｐｍｏｌ総ＤＮＡ、またはこれらの量の２～３Ｕ／ｐｍｏｌ以内の量であってもよい。一部の事例では、標識反応におけるＤＮＡポリメラーゼの量は、１０Ｕ／ｐｍｏｌ総ＤＮＡ、１５Ｕ／ｐｍｏｌ総ＤＮＡ、２０Ｕ／ｐｍｏｌ総ＤＮＡ、２５Ｕ／ｐｍｏｌ総ＤＮＡ、３０Ｕ／ｐｍｏｌ総ＤＮＡ、３５Ｕ／ｐｍｏｌ総ＤＮＡ、またはこれらの量の２～３Ｕ／ｐｍｏｌ以内の量であってもよい。一例では、ＤＮＡポリメラーゼの量は、標識反応における約２０Ｕ／ｐｍｏｌ総ＤＮＡである。一部の事例では、ＤＮＡポリメラーゼの量は、標識反応における２０Ｕ／ｐｍｏｌ総ＤＮＡであってもよい。一部の事例では、５０Ｕ／ｐｍｏｌまたはそれを超えるＤＮＡポリメラーゼ濃度を使用して実行される標識反応は、図３に示す通り、標的ＤＮＡにおける１種または複数の非相補的な標識されたヌクレオシドを有する産物、標識されたヌクレオシドが取り込まれていない産物、またはその両方を含む、可変的な標識された産物を生じ得る。一部の事例では、１０Ｕ／ｐｍｏｌ未満のＤＮＡポリメラーゼを使用して実行され

る標識反応は、切除された塩基の位置に単一の標識されたヌクレオシドが取り込まれた所望の標識された産物の収率低下をもたらし得る。一部の事例では、本方法の標識ステップにおける所望の標識された産物の収率は、処理された標的ＤＮＡの総量の少なくとも約５０％、５５％、６０　５、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％またはほとんど１００％である。例えば、標識反応における所望の標識された産物の収率は、処理された標的ＤＮＡの総量の少なくとも５０％、５５％、６０　５、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％またはほとんど１００％であってもよい。例えば、所望の標識された産物の収率は、少なくとも８０％であってもよい。一部の事例では、１ユニット（Ｕ）は、ある一定量の酵素活性を産生する酵素の量、すなわち、毎分１マイクロモルの基質の変換を触媒する量として定義されている。例えば、Ｔ４　ＤＮＡポリメラーゼに関して、１ユニットは、５０ｍＭグリシン－ＮａＯＨ（ｐＨ８．８）、１６．６ｍＭ（NH_4）$_2SO_4$、６ｍＭ　$MgCl_2$、６．５μＭ　ＥＤＴＡ、１０ｍＭ　２－メルカプトエタノール、０．１６５ｍｇ／ｍｌ　ＢＳＡ、１．６ｍｇ／ｍｌ　ＤＮａｓｅ　Ｉでニックが入れられたサケ精巣ＤＮＡ、０．３３ｍＭ　ｄＣＴＰ、０．３３ｍＭ　ｄＡＴＰ、０．３３ｍＭ　ｄＧＴＰ、０．３３ｍＭ　ｄＴＴＰ、７６ｎＭ　［^{3}Ｈ］ｄＴＴＰおよび酵素を０．１ｍｌ中で３０分間３７℃などの条件下で、鋳型・プライマーとしてＤＮａｓｅ　Ｉでニックが入れられたＤＮＡを使用して、３７℃にて３０分間で１０ｎｍｏｌの総デオキシリボヌクレオチドを酸沈殿可能な材料に取り込むことができる。

【００６４】

様々な標識を、本方法の標識ステップにおける使用のために、ヌクレオチドに付着またはコンジュゲートすることができる。一部の事例では、標識は、標識されたＤＮＡ産物の所望の解析方法に基づき選択される。一部の事例では、標識は、ビオチンであってもよい。よって、本方法の標識ステップは、ビオチン化ヌクレオチドを使用して行うことができる。例えば、実施例１～３に記載されている通り、および図１～４に示す通り、ビオチン化ｄＵＴＰは、ＤＮＡ試料からチミン（またはその修飾型）が切除された標識反応において使用することができる。様々な固体支持体に付着され得るストレプトアビジンとのその強い相互作用により、ビオチン標識を使用して、標識されたＤＮＡ分子を特異的に単離することができる。

【００６５】

本方法の標識ステップにおいて使用することができる他の例示的な標識は、それぞれ様々な抗ジゴキシゲニン抗体および抗フルオレセイン抗体によって高い親和性および特異性で結合されるジゴキシゲニンおよび／またはフルオレセインであり、これらは、ビオチンおよびストレプトアビジンに関する上述と同様の様式で使用することができる。

【００６６】

本方法の標識ステップにおいて使用することができる別の例示的な標識は、クリックケミストリー概念内の最も一般的な反応の１つであるアジド－アルキンヒュスゲン環化付加反応に基づく。このクリックケミストリー反応は、室温で銅（Ｃｕ）触媒を使用して、アジドおよび末端または内部アルキンの間に１，３－双極子環付加を引き起こして、１，２，３－トリアゾールを得る。Ｃｕ（Ｉ）種は、予め形成された錯体として導入することができるか、さもなければ、様々な仕方の１つによって反応ポットそれ自体において生成される。一部の事例では、アジド化学基が付着されたヌクレオチドは、反応の標識ステップにおいて使用することができる。標識ステップ後に、クリックケミストリーを行って、単離および精製のための環化付加により、アルキン標識された分析物または基質に共有結合を作製することができる。このような場合、基質または分析物は、標識されたＤＮＡを共有結合によって連結し、単離することができる、カラムまたはアルキンビーズなど、固体支持体となるであろう。連結はその後に切断されて、標識されたＤＮＡを放出するであろう。

【００６７】

本方法の標識ステップにおいて使用することができる別の例示的な標識は、例えば、ＮＨＳエステル（Ｎ－ヒドロキシサクシニミドエステル）およびイミドエステルなどのアミ

ン反応性化学基である。ＮＨＳエステルは、カルボン酸塩分子のカルボジイミド活性化によって形成された反応基である。ＮＨＳエステル活性化架橋剤および標識化合物は、生理的からややアルカリ性の条件（ｐＨ７．２～９）において一級アミンと反応して、安定なアミド結合を生じ、Ｎ－ヒドロキシサクシニミド（ＮＨＳ）を放出する。イミドエステル架橋剤は、一級アミンと反応して、アミジン結合を形成する。イミドエステル架橋剤は、アルカリ性ｐＨでアミンと急速に反応するが、短い半減期を有する。このようにして、共有結合は、その後の単離および精製のために分析物または基質におけるアミン基により選択的に形成することができる。このような場合、架橋剤は、標識されたＤＮＡを共有結合によって連結し、単離することができる、カラムまたはアルキンビーズなどの固体支持体に付着され得る。連結はその後に切断されて、標識されたＤＮＡを放出することができる。

【００６８】

本方法の標識ステップにおいて使用することができる別の例示的な標識は、ジチオールホスホラミダイト（ＤＴＰＡ）などのジチオールリンカーである。ＤＴＰＡは、ＤＮＡ分子中の任意の位置に挿入することができる。Ｔｒｉｓ（２－カルボキシエチル）ホスフィン（pophine）（ＴＣＥＰ）またはジチオスレイトール（ＤＴＴ）による還元後に、各挿入は、リガンドまたは表面とのカップリングのための２個のチオール（ＳＨ）官能基をもたらす。ジチオール修飾を使用して、例えば、金などの、リガンドまたは固体表面にＤＮＡ断片をカップリングすることができる。これを使用して、マレイミド、ハロゲン、ヨードアセトアミド（iodacetamide）、ピリジルジスルフィド、または西洋わさびペルオキシダーゼもしくはアルカリホスファターゼなどのタンパク質にＤＮＡ断片を連結することもできる。次に、ビオチン／ストレプトアビジン、ジゴキシゲニンおよびフルオレセインに関する上述と同様の様式で、ＤＰＴＡを使用することができる。

【００６９】

一部の事例では、標識が行われた後に、ＤＮＡ断片をＤＮＡリガーゼで処理して、ホスホジエステル骨格中の任意のニックを塞ぐことができる。これは、一部の事例では、切断を剪断する傾向が少なくなり、解析に使用される増幅および他の酵素的過程により適している場合がある、近接した分子をもたらし得る。

【００７０】

一部の事例では、所定の試料由来のＤＮＡ断片を別々の部分に分割し、各部分を別々に解析することができる。一部の事例では、各部分は、異なる種類のＤＮＡグリコシラーゼを使用して解析することができる。一部の事例では、さらに後述する通り、少なくともいくつかの部分は、１種または複数の修飾酵素で処理し、続いてＤＮＡグリコシラーゼで処理することができる。

【００７１】

一部の事例では、酵素の逐次添加は、グリコシラーゼ、エンドヌクレアーゼおよびポリメラーゼの活性に適した緩衝液を含有する単一の反応ポット内で行うことができる。単一の反応容器内でステップのそれぞれを行うことは、各ステップ間のＤＮＡ精製の必要をなくすことにより、解析されるＤＮＡ材料の損失を低下させることができる。例えば、図５に示す通り、ＵＤＧ、Ｅｎｄｏ　ＩＶおよびＴ４　ＤＮＡ　ｐｏｌ　ｅｘｏ⁻を使用して、ＤＮＡ分子からウラシルを特異的に切除し、標識されたｄＵＴＰを非塩基部位に取り込むことができる。別の例では、ｈＯＧＧ１、Ｅｎｄｏ　ＩＶおよびＴ４　ＤＮＡ　ｐｏｌ　ｅｘｏ⁻を使用して、ＤＮＡ分子からｏｘｏＧを特異的に切除し、標識されたｄＧＴＰを非塩基部位に取り込むことができる。一部の事例では、実施例４に記載されている通り、単一の反応容器内で行われる切除および標識反応の効率は、切除および標識反応を別々に行った場合の効率を超えることができる。別の例では、標識反応に先立ち切除反応中間体産物を精製することなく、単一の反応容器内で切除および標識反応が行われる場合、所望の標識された産物の収率は、少なくとも９０％であってもよい。別の例では、標識反応に先立ち切除反応中間体産物を精製することなく、単一の反応容器内で切除および標識反応が行われる場合、所望の標識された産物の収率は、少なくとも９５％であってもよい。

【００７２】
グリコシラーゼ標的化の変更
一部の事例では、１種のＤＮＡグリコシラーゼを使用して、異なる種類の修飾された塩基の切除および標識化を容易にすることができる。一部の事例では、本方法は、追加のステップを含むことができ、それによると、ＤＮＡ断片は、所定のＤＮＡグリコシラーゼによるそれらの切除に影響するＤＮＡ断片の塩基への修飾を触媒する１種または複数の酵素で処理される。一部の事例では、修飾酵素によるＤＮＡ断片の修飾は、典型的には認識および切除を行うＤＮＡグリコシラーゼによってもはや認識および切除されないように、塩基を変更することができる。一部の事例では、修飾酵素によるＤＮＡの修飾は、典型的には認識および切除を行わないＤＮＡグリコシラーゼによって認識および切除されるように、塩基を変更することができる。
【００７３】
一例では、実施例５に記載されている通り、および図６Ａに示す通り、チミンＤＮＡグリコシラーゼ（ＴＤＧ）を使用して、カルボキシシトシン（ｃａＣ）およびホルミルシトシン（ｆＣ）のその既知の標的を切除することができ、ＤＮＡ試料における塩基を修飾する追加的なステップにより、これを使用して、これが特異的に認識しない修飾された塩基である、メチルシトシン（ｍＣ）およびヒドロキシメチルシトシン（ｈｍＣ）を識別することができる。一例では、ｃａＣまたはｆＣ修飾された塩基を有するＤＮＡにおける位置を標識するために、ＤＮＡグリコシラーゼとしてＴＤＧを使用して、これらの修飾された塩基の位置にＡＰ部位を生成することができ、続いて、標識されたｄＴＴＰまたはｄＵＴＰを取り込んで、図６Ａにおける経路（１）に示す通り、これらの位置を標識することができる。別の例では、ｍＣおよびｈｍＣ修飾された塩基の位置を標識および検出するために、ＴＤＧおよび修飾酵素ＴＥＴを使用した複数のステップは、図６Ａの経路（２）に示す通りに使用することができる。例えば、ＴＤＧを使用して、ＤＮＡに存在する任意の現存ｃａＣおよびｆＣ修飾された塩基を切除することができ、その結果得られるＡＰ部位は、標準（標識されていない）ｄＴＴＰまたはｄＵＴＰで充填することができる。続いて、ＤＮＡをＴＥＴ酵素で処理して、ｍＣおよびｈｍＣ修飾された塩基をｃａＣおよびｆＣに脱メチル化および変換することができる。次に、ＤＮＡを再度ＴＤＧで処理することができ、これは、変換された塩基の位置にＡＰ部位を生成し、続いてこれらの部位は、標識されたｄＴＴＰまたはｄＵＴＰで標識することができる。別の例では、ｍＣとｈｍＣとの間を区別するために、ＤＮＡ試料の一部分を、経路（２）に記載されている通りに処理することができ、図６Ａの経路（３）に示す通り、別の部分を並行して処理して、ｍＣ部位を識別することができる。ｍＣ部位の識別に使用される部分は、ＴＤＧで処理して、ＤＮＡに存在する任意の現存ｃａＣおよびｆＣ修飾された塩基を切除することができ、その結果得られるＡＰ部位は、標準（標識されていない）ｄＴＴＰまたはｄＵＴＰで充填することができる。次に、ＤＮＡをβ－グルコシルトランスフェラーゼで処理して、ＤＮＡに存在するｈｍＣにグルコース部分を選択的に付着し、続いて、ＴＥＴ酵素で処理して、ｍＣのみをｃａＣ／ｆＣに変換することができる。次に、ＤＮＡを再度ＴＤＧで処理して、変換されたｃａＣ／ｆＣ部位（以前にｍＣ部位）を切除することができ、続いてこれは、標識されたｄＴＴＰまたはｄＵＴＰで標識することができる。経路（２）および経路（３）に従って処理されたＤＮＡ試料の部分の比較は、ＤＮＡ試料に存在するｈｍＣ部位を識別し得る。
【００７４】
修飾された塩基の選択的切除を変更するための他の匹敵する方法が可能である。例えば、同様の方法を行って、図６Ｂに示す通り、チミンＤＮＡグリコシラーゼ（ＴＤＧ）およびウラシルＤＮＡグリコシラーゼ（ＵＤＧ）を使用して、同じ塩基を検出することができる。ｆＣ／ｃａＣを検出するための経路（１）は、上述と同じである。経路（２）においてｈｍＣを特異的に標識および検出するために、$KRuO_4$を使用して、ｈｍＣをｃａＣ／ｆＣに酸化することができ、これを続いてＴＤＧによって切断し、これにより、標識されたｄＣＴＰ（例えば、ビオチン化ｄＣＴＰ）でＤＮＡ試料におけるｈｍＣの部位を標識

することができる。経路（３）において、図６Ａに示すものと同様のアプローチを使用して、特異的にｍＣを検出することができる。β－グルコシルトランスフェラーゼを使用して、ｈｍＣにグルコース部分を選択的に付着し、これにより、これが酸化するのを遮断することができる。ＡＰＯＢＥＣ３ａまたは亜硫酸水素塩のいずれかは、ｍＣをウラシルに変換することができ、これを続いて、ＵＤＧによって切断し、標識されたｄＣＴＰ（例えば、ビオチン化ｄＣＴＰ）で標識することができる。

【００７５】

別の例では、本方法の塩基切除ステップは、１個または複数の修飾された塩基（すべて同じ種類または２種類以上）を含有する標識されていない競合体オリゴヌクレオチドの存在下で行うことができる。例えば、特定のＤＮＡグリコシラーゼが、２型以上の修飾された塩基を切除する能力を有する（すなわち、２型以上の修飾された塩基に対し特異性を有する）場合、このようなオリゴヌクレオチドが、有用であり得る。標識されていない競合体オリゴヌクレオチドは、断片化されたＤＮＡおよびＤＮＡグリコシラーゼと組み合わせることができ、標識されていない競合体オリゴヌクレオチドは、ＤＮＡグリコシラーゼによって認識される第１の型の修飾された塩基を含有することができる。一部の事例では、標識されていない競合体オリゴヌクレオチドの存在は、第１の型の修飾された塩基に対するＤＮＡグリコシラーゼの親和性を優先的に低下させ、断片化されたゲノムＤＮＡに存在する第２の型の修飾された塩基に対するＤＮＡグリコシラーゼの親和性を増加させることができる。

【００７６】

一部の事例では、逐次様式で２種以上のＤＮＡグリコシラーゼでＤＮＡ試料を処理して、異なる修飾された塩基を鑑別的に標識することが所望され得る。例えば、本方法は、第１の修飾された塩基に対する特異性を有する第１のＤＮＡグリコシラーゼによる第１の切除ステップと、第１の標識されたヌクレオチドがＤＮＡ断片に取り込まれる第１の標識ステップを含むことができる。本方法は、第２の修飾された塩基に対する特異性を有する第２のＤＮＡグリコシラーゼによる第２の切除ステップと、第２の標識されたヌクレオチドがＤＮＡ断片に取り込まれる第２の標識ステップを含むこともできる。第１および第２の標識されたヌクレオチドに付着された標識は、異なる標識であってもよい。本方法は、異なる特異性を有するＤＮＡグリコシラーゼによる追加的な切除ステップと、第１および第２の標識されたヌクレオチドとは異なる標識を有する標識されたヌクレオチドによる標識ステップを含むことができる。一部の事例では、切除および標識の逐次ラウンドは、単一のＤＮＡ試料における複数の型の修飾された塩基の検出を可能にすることができる。一部の事例では、ＤＮＡ試料は、複数の部分に分割することができ、切除ステップは、異なるＤＮＡグリコシラーゼによりそれぞれにおいて並行して行われる。一部の事例では、試料の各部分における標識されたＤＮＡ分子が、別々に検出および解析される場合、同じ標識は、別々の部分毎に標識されたヌクレオチドにおいて使用することができる。一部の事例では、部分を組み合わせて、同時に解析することができるように、部分毎に異なる標識を使用することが所望され得る。

【００７７】

標識されたＤＮＡの濃縮

一部の事例では、標識されたＤＮＡ断片は、標識検出に先立ち総ＤＮＡ試料から単離または濃縮することができる。上述の通り、ＤＮＡ断片に取り込まれる標識を使用することができる。例えば、ストレプトアビジンを使用して、ビオチンで標識されたＤＮＡを単離することができ、抗体を使用して、ジゴキシゲニンまたはフルオレセインで標識されたＤＮＡを単離することができ、例えば金を使用して、ＤＴＰＡで標識されたＤＮＡを単離することができる。アジド修飾された分子は、アルキン－アガロース樹脂カラムを使用して単離することができ、アミン化学を使用して、ガラスビーズによりこのような分子を濃縮することができる。

【００７８】

簡略化するために、ビオチン標識されたＤＮＡに関して、濃縮ステップについて記載す

る。しかし、類似の方法は、本方法の標識ステップにおいて使用される標識の型に基づき容易に明らかである。一例では、ＤＮＡ断片は、ビオチン化ヌクレオシドで標識することができる。本方法の標識ステップ後に、標識された塩基を含有する（出発ＤＮＡ試料において修飾された塩基が存在した場所に）断片が、親和性捕捉されることができるように、ＤＮＡ断片は、ストレプトアビジン磁気ビーズと共にインキュベートすることができる。次に、磁場を使用して、溶液中の標識されていないＤＮＡ断片は洗い流しつつ、ビーズをプルダウンすることができる。次に、標識されたＤＮＡ断片は、高温で９５％ホルムアミドおよび１０ｍＭ　ＥＤＴＡ（ｐＨ８．２）による処理を使用して、ストレプトアビジンビーズから切断し、磁場下で上清をデカントすることにより単離することができる。

【００７９】

一部の事例では、標識は、濃縮されたＤＮＡ断片から除去される。例えば、標的ＤＮＡに取り込んだ後に、これが、標識された標的ＤＮＡに取り込まれた塩基に着脱可能に付着されるように、標識は、標識に使用されるヌクレオチドに着脱可能に付着することができる。一例では、標識は、光切断可能リンカーを介してヌクレオチド（塩基）に付着することができる。次に、塩基を露光（例えば、レーザーによってもたらされる）によって除去して、標識を放出することができる。別の例では、標識は、化学的に切断可能なリンカーを介して付着することができる。例えば、化学的に切断可能なリンカーは、酸、塩基、酸化、還元、熱、光、金属イオン触媒作用、変位または脱離化学によって切断可能な部分であってもよい。

【００８０】

標識されたＤＮＡの解析

一部の事例では、標的の修飾が、上述の通り一旦標識されると、多数の確立された技法および新興の技法により評価することができ、そのようなものとして、それらの全体を参照により本明細書に組み込む、米国特許出願公開第２０１３／０１９６３２３号、同第２０１３／０２０３０５０号および同第２０１４／０３１９３３９号に記載されている、ディープシーケンシング、次世代配列決定およびナノポア技術が挙げられるがこれらに限定されない。例えば、解析方法は、識別のために選択された標識に基づくことができる。いくつかの方法は、他のものよりも定量的である。一例では、配列決定解析を使用して、標識されたＤＮＡ分子を解析することができる。単離された標識ＤＮＡは、ランダムヘキサマーを使用して増幅し、配列決定することができ、すべての捕捉された配列を識別し、相対的存在量を割り当てることができるように、配列は、参照ライブラリーと比較される。別の例では、ナノポアを使用して、標識されたＤＮＡ分子を解析することができる。短い長さ（≧５００ｂｐ）の標識されたＤＮＡ配列は、ナノメートルスケール開口部を通って選択的に転位置させ、増幅することなく標識されたＤＮＡを直接定量するために使用することができる、測定されたトランスーポアイオン電流に特徴変動をもたらすことができる。

【００８１】

一部の事例では、１個または複数の修飾された（同じ種類または異なる種類の）塩基を含有する対照ＤＮＡオリゴヌクレオチドを使用して、単離された標識ＤＮＡにおける修飾された塩基の量を定量することができる。対照ＤＮＡオリゴヌクレオチドは、既知濃度のものであってもよく、ＤＮＡ分子または濃度当たりの既知量の修飾された塩基を有することもできる。一部の事例では、対照ＤＮＡオリゴヌクレオチドは、単離された標識ＤＮＡ断片と同様のサイズであってもよい。一部の事例では、記載されている塩基切除および標識反応は、単離された標識ＤＮＡおよび対照ＤＮＡオリゴヌクレオチドについて並行して行うことができる。対照ＤＮＡオリゴヌクレオチドの標識の量の解析を使用して、単離された標識ＤＮＡに取り込まれた標識の量、したがって、単離された標識ＤＮＡにおける特定の修飾塩基の量を定量することができる。一例では、複数の量の対照ＤＮＡオリゴヌクレオチドに取り込まれた標識に基づき、検量線を作成することができ、単離された標識ＤＮＡに取り込まれた標識の量を検量線と比較して、単離された標識ＤＮＡに存在する修飾された塩基の量を決定することができる。一部の事例では、解析は、複数の対照ＤＮＡオ

リゴヌクレオチドを単離された標識ＤＮＡと比較して行うことができ、各対照ＤＮＡオリゴヌクレオチドは、既知量の異なる修飾された塩基を有する。別の例では、対照ＤＮＡオリゴヌクレオチドは、定量のために既知量（スパイクされた）で、単離された標識ＤＮＡと組み合わせることができる。

【００８２】

非限定的な実施形態として、次のものが挙げられる：

【００８３】

実施形態１．　ＤＮＡ試料における修飾されたＤＮＡ塩基を検出する方法であって、

（ａ）断片化されたＤＮＡを含むＤＮＡ試料を、修飾されたヌクレオチドを切除するＤＮＡグリコシラーゼと共にインキュベートするステップであって、前記断片化されたＤＮＡにおける前記修飾されたヌクレオチドの部位に脱プリンまたは脱ピリミジン部位（ＡＰ部位）を形成するステップと、

（ｂ）ステップ（ａ）の前記断片化されたＤＮＡを、ＤＮＡポリメラーゼおよび前記ＡＰ部位の向かい側のヌクレオチドに相補的な標識されたヌクレオチドで処理するステップであって、これにより、前記標識されたヌクレオチドを前記断片化されたＤＮＡにおける前記ＡＰ部位に取り込むステップと、

（ｃ）前記標識されたヌクレオチドを含有する前記断片化されたＤＮＡを単離するステップと、

（ｄ）前記断片化されたＤＮＡにおける前記標識されたヌクレオチドの位置を検出ステップであって、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所を決定するステップ、前記断片化されたＤＮＡにおける標識されたヌクレオチドの量を定量するステップであって、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの量を決定するステップ、または前記断片化されたＤＮＡにおける前記標識されたヌクレオチドの位置の検出および量の定量の両方を行うステップであって、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所および量を決定するステップと

を含む方法。

【００８４】

実施形態２．　前記ＤＮＡ試料が、ゲノムＤＮＡ、ミトコンドリアＤＮＡまたはこれらの組合せである、実施形態１に記載の方法。

【００８５】

実施形態３．　前記ＤＮＡ試料が、約５０～２５０塩基対の長さのＤＮＡ断片を含む、実施形態１または２に記載の方法。

【００８６】

実施形態４．　前記修飾されたヌクレオチドが、メチルシトシン（ｍＣ）、ヒドロキシメチルシトシン（ｈｍＣ）、カルボキシシトシン（ｃａＣ）、ホルミルシトシン（ｆＣ）、８－オキソ－７，８－ジヒドログアニン（８－ｏｘｏＧ）、ウラシル、メチルアデニン（ｍＡ）、８－オキソアデニン、Ｏ６－メチルグアニン、１－メチルアデニン、Ｏ４－メチルチミン、５－ヒドロキシシトシン、５－ヒドロキシウラシル、５－ヒドロキシメチルウラシルまたはチミンダイマーのうちの少なくとも１つである、実施形態１～３のいずれかに記載の方法。

【００８７】

実施形態５．　前記修飾されたヌクレオチドが、表１に収載されているもののうちの少なくとも１つである、前記請求項のいずれかに記載の方法。

【００８８】

実施形態６．　前記ＤＮＡグリコシラーゼが、表１に収載されているもののうちの少なくとも１つである、実施形態１～５のいずれかに記載の方法。

【００８９】

実施形態７．　ステップ（ｂ）を行う前に、ステップ（ａ）の前記断片化されたＤＮＡをＡＰエンドヌクレアーゼと共にインキュベートするステップをさらに含む、実施形態１～６のいずれかに記載の方法。

【００９０】
実施形態８．　前記ＤＮＡポリメラーゼが、３’→５’エキソヌクレアーゼ活性または鎖置換活性を有しない、実施形態１～７のいずれかに記載の方法。
【００９１】
実施形態９．　前記ＤＮＡポリメラーゼが、３’→５’エキソヌクレアーゼ活性を欠く突然変異したＴ４　ＤＮＡポリメラーゼであり得る、実施形態１～８のいずれかに記載の方法。
【００９２】
実施形態１０．　ステップ（ｂ）において使用されるＤＮＡポリメラーゼの量が、約１０Ｕ／ｐｍｏｌ～約３０Ｕ／ｐｍｏｌ総ＤＮＡであり得る、実施形態１～９のいずれかに記載の方法。
【００９３】
実施形態１１．　前記標識されたヌクレオチドが、ビオチン標識されたヌクレオチドである、実施形態１～１０のいずれかに記載の方法。
【００９４】
実施形態１２．　前記標識されたヌクレオチドが、ビオチン標識されたヌクレオチドである場合、前記標識されたヌクレオチドを含有する前記断片化されたＤＮＡを単離するステップが、前記断片化されたＤＮＡを、固体支持体に付着されたストレプトアビジンと接触させるステップと、ストレプトアビジンに結合していない断片化されたＤＮＡを除去するステップとを含む、実施形態１～１１のいずれかに記載の方法。
【００９５】
実施形態１３．　前記断片化されたＤＮＡにおける標識されたヌクレオチドの量を定量するステップが、標識されたヌクレオチドの量を、既知量の標識されたヌクレオチドを含有する参照試料における標識されたヌクレオチドの量と比較することをさらに含む、実施形態１～１２のいずれかに記載の方法。
【００９６】
実施形態１４．　前記標識されたヌクレオチドの位置を検出するステップが、前記単離された断片化されたＤＮＡを配列決定することを含む、前記実施形態１～１３のいずれかに記載の方法。
【００９７】
実施形態１５．　エピジェネティック修飾またはＤＮＡ損傷の型に関連することが知られる疾患または状態を有する対象を診断する方法であって、
（ａ）前記対象由来のＤＮＡ試料を提供するステップと、
（ｂ）前記ＤＮＡ試料におけるＤＮＡを断片化するステップであって、断片化されたＤＮＡを産生するステップと、
（ｃ）請求項１に記載の方法に従って、前記ＤＮＡ試料における修飾されたＤＮＡ塩基を検出するステップであって、これにより、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所または量のうちの少なくとも１つを識別するステップと、
（ｄ）１名または複数の健康な対象由来の１種または複数の参照試料における前記修飾された塩基の場所または量と比較して、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所または量の差を決定するステップと、
（ｅ）１名または複数の健康な対象由来の１種または複数の参照試料における前記修飾された塩基の場所または量と比較して、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所または量に差がある場合、前記対象が、前記疾患または状態を有することを示すステップと
　を含む方法。
【００９８】
実施形態１６．　１名または複数の健康な対象由来の前記１種または複数の参照試料における前記修飾された塩基の量と比較して、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの量が増加した場合、前記対象が、前記疾患または状態を有することを示すステッ

プを含む、実施形態１５に記載の方法。
【００９９】
実施形態１７．　１名または複数の健康な対象由来の前記１種または複数の参照試料における前記修飾された塩基の量と比較して、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの量が減少した場合、前記対象が、前記疾患または状態を有することを示すステップを含む、実施形態１５に記載の方法。
【０１００】
実施形態１８．　１名または複数の健康な対象由来の前記１種または複数の参照試料における前記修飾された塩基の場所と比較して、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所に変化がある場合、前記対象が、前記疾患または状態を有することを示すステップを含む、実施形態１５に記載の方法。
【０１０１】
実施形態１９．　エピジェネティック修飾またはＤＮＡ損傷の型に関連することが知られる疾患または状態を発症するリスクがある対象を識別する方法であって、
（ａ）前記対象由来のＤＮＡ試料を提供するステップと、
（ｂ）前記ＤＮＡ試料におけるＤＮＡを断片化するステップであって、断片化されたＤＮＡを産生するステップと、
（ｃ）請求項１に記載の方法に従って、前記ＤＮＡ試料における修飾されたＤＮＡ塩基を検出するステップであって、これにより、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所または量のうちの少なくとも１つを識別するステップと、
（ｄ）１名または複数の健康な対象由来の１種または複数の参照試料における前記修飾された塩基の場所または量と比較して、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所または量のうちの少なくとも１つの差を決定するステップと、
（ｅ）１名または複数の健康な対象由来の１種または複数の参照試料における前記修飾された塩基の場所、量またはその両方と比較して、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所または量のうちの少なくとも１つに差がある場合、前記対象が、前記疾患または状態を発症するリスクがあることを示すステップと
　を含む方法。
【０１０２】
実施形態２０．　１名または複数の健康な対象由来の前記１種または複数の参照試料における前記修飾された塩基の量と比較して、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの量が増加した場合、前記対象が、前記疾患または状態を発症するリスクがあることを示すステップを含む、実施形態１９に記載の方法。
【０１０３】
実施形態２１．　１名または複数の健康な対象由来の前記１種または複数の参照試料における前記修飾された塩基の量と比較して、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの量が減少した場合、前記対象が、前記疾患または状態を発症するリスクがあることを示すステップを含む、実施形態１９に記載の方法。
【０１０４】
実施形態２２．　１名または複数の健康な対象由来の前記１種または複数の参照試料における前記修飾された塩基の場所と比較して、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所に変化がある場合、前記対象が、前記疾患または状態を発症するリスクがあることを示すステップを含む、実施形態１９に記載の方法。
【０１０５】
実施形態２３．　前記対象が、前記疾患または状態を発症する遺伝性リスクを有する、実施形態１９～２２のいずれか一項に記載の方法。
【０１０６】
実施形態２４．　前記対象が、前記疾患または状態を発症する環境リスクを有する、実施形態１９～２２のいずれか一項に記載の方法。
【０１０７】

実施形態２５．　１名または複数の健康な対象由来の１種または複数の参照試料における前記修飾された塩基の場所または量と比較して、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所または量に差がない場合、前記方法が、前記対象をモニタリングするために将来の時点で行われる、実施形態１９～２４のいずれか一項に記載の方法。

【０１０８】

実施形態２６．　疾患または状態のための処置に応答する対象の見込みを決定する方法であって、

（ａ）前記対象由来のＤＮＡ試料を提供するステップと、

（ｂ）前記ＤＮＡ試料におけるＤＮＡを断片化するステップであって、断片化されたＤＮＡを産生するステップと、

（ｃ）請求項１に記載の方法に従って、前記ＤＮＡ試料における修飾されたＤＮＡ塩基を検出するステップであって、これにより、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所または量のうちの少なくとも１つを識別するステップと、

（ｄ）前記疾患または状態を有し、前記処置に応答性であることが既知の対象の参照集団由来の試料における前記修飾された塩基の場所または量のうちの少なくとも１つと比較して、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所または量の差を決定するステップと、

（ｅ）前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所もしくは量のうちの少なくとも１つが、前記参照集団由来の前記試料における前記修飾された塩基の場所、量もしくはその両方と同様である場合、前記対象が前記処置に応答する可能性がより高いことを示すステップ、または前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所もしくは量のうちの少なくとも１つが、前記参照集団由来の前記試料における前記修飾された塩基の場所、量もしくはその両方と同様ではない場合、前記対象が前記処置に応答する可能性がより低いことを示すステップと

を含む方法。

【０１０９】

実施形態２７．　処置に対する対象の応答性を評価する方法であって、

（ａ）前記処置を受けている対象由来のＤＮＡ試料を提供するステップと、

（ｂ）前記ＤＮＡ試料におけるＤＮＡを断片化するステップであって、断片化されたＤＮＡを産生するステップと、

（ｃ）請求項１に記載の方法に従って、前記ＤＮＡ試料における修飾されたＤＮＡ塩基を検出するステップであって、これにより、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所または量のうちの少なくとも１つを識別するステップと、

（ｄ）（ｉ）１名もしくは複数の健康な対象由来の１種もしくは複数の参照試料または（ｉｉ）前記疾患もしくは状態を有する１名もしくは複数の対象由来の１種もしくは複数の試料のうちの少なくとも１つにおける前記修飾された塩基の場所または量と比較して、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所または量のうちの少なくとも１つの差を決定するステップと、

（ｅ）前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所もしくは量のうちの少なくとも１つが、１名もしくは複数の健康な対象由来の前記１種もしくは複数の参照試料における前記修飾された塩基の場所、量もしくはその両方と同様である場合、前記対象が前記処置に応答していることを示すステップ、または前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所もしくは量のうちの少なくとも１つが、前記疾患もしくは状態を有する１名もしくは複数の対象由来の前記１種もしくは複数の試料における前記修飾された塩基の場所、量もしくはその両方と同様である場合、前記対象が前記処置に応答していないことを示すステップと

を含む方法。

【０１１０】

実施形態２８．　前記方法が、前記処置に対する前記対象の応答性を経時的にモニタリングするために１または複数の将来の時点で行われる、実施形態２７に記載の方法。

【０１１１】
実施形態２９．　前記対象が前記処置を受ける前に前記対象から得られたＤＮＡ試料においてステップ（ｂ）および（ｃ）を行うステップをさらに含む、実施形態２７または２８に記載の方法。
【０１１２】
実施形態３０．　前記疾患または状態を有する１名または複数の対象由来の前記１種または複数の試料が、前記処置を受ける前に前記対象から得られた前記ＤＮＡ試料である、実施形態２９に記載の方法。
【０１１３】
実施形態３１．　処置に関連するＤＮＡ損傷の蓄積に関して対象をモニタリングする方法であって、
（ａ）前記処置の投与に先立ち、対象由来の第１のＤＮＡ試料を提供するステップと、
（ｂ）前記第１のＤＮＡ試料におけるＤＮＡを断片化するステップであって、断片化されたＤＮＡを産生するステップと、
（ｃ）請求項１に記載の方法に従って、前記第１のＤＮＡ試料における修飾されたＤＮＡ塩基を検出するステップであって、これにより、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所または量のうちの少なくとも１つを識別するステップと、
（ｄ）前記処置の投与後に、前記対象由来の第２のＤＮＡ試料を提供するステップと、
（ｅ）前記第２のＤＮＡ試料におけるＤＮＡを断片化するステップであって、断片化されたＤＮＡを産生するステップと、
（ｆ）請求項１に記載の方法に従って、前記第２のＤＮＡ試料における前記修飾されたＤＮＡ塩基を検出するステップと、
（ｇ）前記第２のＤＮＡ試料と比較して、前記第１のＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所または量のうちの少なくとも１つの差を決定するステップと、
（ｈ）前記第２のＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所もしくは量のうちの少なくとも１つが前記第１のＤＮＡ試料と比較して増加した場合、前記対象がＤＮＡ損傷を蓄積させていること、または前記第２のＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所もしくは量のうちの少なくとも１つが前記第１のＤＮＡ試料と同様である場合、前記対象がＤＮＡ損傷を蓄積させていないことを示すステップと
を含む方法。
【０１１４】
実施形態３２．　ステップ（ｄ）～（ｈ）が、前記対象におけるＤＮＡ損傷の前記蓄積をモニタリングするために将来の時点で行われる、実施形態３１に記載の方法。
【０１１５】
実施形態３３．　前記処置が、放射線療法または化学療法のうちの少なくとも１つである、実施形態３１または３２に記載の方法。
【０１１６】
実施形態３４．　対象の遺伝子プロファイルを作成する方法であって、
（ａ）対象由来のＤＮＡ試料を提供するステップと、
（ｂ）前記ＤＮＡ試料におけるＤＮＡを断片化するステップであって、断片化されたＤＮＡを産生するステップと、
（ｃ）断片化されたＤＮＡを含むＤＮＡ試料を、複数の修飾されたヌクレオチドを切除する複数のＤＮＡグリコシラーゼと共にインキュベートするステップであって、前記断片化されたＤＮＡにおける前記修飾されたヌクレオチドの部位に脱プリンまたは脱ピリミジン部位（ＡＰ部位）を形成し、各ＤＮＡグリコシラーゼが、異なる種類の修飾されたヌクレオチドを切除するステップと、
（ｄ）ステップ（ｃ）の前記断片化されたＤＮＡを、ＤＮＡポリメラーゼおよび前記ＡＰ部位の向かい側のヌクレオチドに相補的な標識されたヌクレオチドで処理するステップであって、各種類の標識されたヌクレオチドが、異なる種類の標識を有し、これにより、前記断片化されたＤＮＡにおける前記ＡＰ部位に前記標識されたヌクレオチドを取り込むス

テップと、
（ｃ）前記標識されたヌクレオチドを含有する前記断片化されたＤＮＡを単離するステップと、
（ｄ）前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの配置場所を決定するために前記断片化されたＤＮＡにおける前記標識されたヌクレオチドの位置を検出するステップ、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの量を決定するために前記断片化されたＤＮＡにおける標識されたヌクレオチドの量を定量するステップ、または前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの配置場所および量を決定するために前記断片化されたＤＮＡにおける前記標識されたヌクレオチドの位置の検出および量の定量の両方を行うステップであって、これにより、前記対象の遺伝子プロファイルを生成する、方法。
【０１１７】
実施形態３５．　前記ＤＮＡ試料が、ステップ（ｃ）において一度に１種のＤＮＡグリコシラーゼと共にインキュベートされる、実施形態３４に記載の方法。
【０１１８】
実施形態３６．　前記ＤＮＡ試料が、ステップ（ｃ）において複数の部分に分割され、各部分が、異なるＤＮＡグリコシラーゼと共にインキュベートされる、実施形態３４に記載の方法。
【０１１９】
実施形態３７．　前記方法を、１または複数の将来の時点で前記対象由来のＤＮＡ試料に対して行うステップをさらに含む、実施形態３４～３６のいずれか一項に記載の方法。
【０１２０】
実施形態３８．　ＤＮＡを含有する生物学的試料の環境曝露時間を決定する方法であって、
（ａ）環境条件に曝露されたＤＮＡ試料を提供するステップと、
（ｂ）前記ＤＮＡ試料におけるＤＮＡを断片化するステップであって、断片化されたＤＮＡを産生するステップと、
（ｃ）前記断片化されたＤＮＡを、ＤＮＡポリメラーゼおよびＡＰ部位の向かい側のヌクレオチドに相補的な標識されたヌクレオチドで処理するステップであって、これにより、前記断片化されたＤＮＡにおける前記ＡＰ部位に前記標識されたヌクレオチドを取り込むステップと
（ｃ）前記標識されたヌクレオチドを含有する前記断片化されたＤＮＡを単離するステップと、
（ｄ）前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの配置場所を決定するために前記断片化されたＤＮＡにおける前記標識されたヌクレオチドの位置を検出するステップ、前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの量を決定するために前記断片化されたＤＮＡにおける標識されたヌクレオチドの量を定量するステップ、またはその両方のステップと、
（ｅ）前記ＤＮＡ試料における前記修飾されたヌクレオチドの場所、量またはその両方を、前記環境条件に曝露された複数の参照試料と比較するステップであって、各参照試料が、異なる長さの時間で前記環境条件に曝露され、前記ＤＮＡ試料の前記環境曝露時間が、前記ＤＮＡ試料と比較した、修飾されたヌクレオチドの最も同様の場所、量またはその両方を有する前記参照試料によって決定されるステップと
を含む方法。
【０１２１】
ＩＩ．キット
別の態様では、本明細書に記載の方法を実施するための試薬を含むキットが提供される。多様な酵素がキットに含まれ得る。一部の場合では、キットは１種または複数のＤＮＡグリコシラーゼを含む。各ＤＮＡグリコシラーゼは、１種もしくは複数の異なる種類の修飾された塩基または１種もしくは複数のタイプの塩基修飾に対する特異性を有し得る。一

部の場合では、キットはＡＰエンドヌクレアーゼも含む。一部の場合では、キットは、３’→５’エキソヌクレアーゼ活性および鎖置換活性のないＤＮＡポリメラーゼも含んでもよい。一部の場合では、キットはＤＮＡリガーゼも含んでもよい。

【０１２２】

一部の場合では、キットは、１種または複数の標識されたヌクレオチドをさらに含んでもよいか、あるいは、標識およびヌクレオチドに標識を付加するための試薬を含んでもよい。キットに含まれる標識されたヌクレオチドは、標識されたｄＡＴＰ、ｄＵＴＰ、ｄＴＴＰ、ｄＣＴＰ、ｄＧＴＰおよび有用なその修飾を含み得る。一部の場合では、切除されるべき修飾された塩基の向かい側に取り込まれる塩基に相補的な標識されたヌクレオチドのみがキットに含まれてもよく；すなわち、キットは特定の修飾された塩基の検出のためにデザインされてもよい。一部の場合では、キットは、１種または複数の基準の（非標識）ヌクレオチドも含んでもよい。

【０１２３】

一部の場合では、キットは、所定のＤＮＡグリコシラーゼを使用して検出可能なタイプの修飾された塩基を変更するために有用な酵素および試薬を含んでもよい。例えば、キットは、塩基がもはや認識されず、典型的にはそれをするＤＮＡグリコシラーゼによって切除されないように、塩基を変化させる修飾酵素を含んでもよい。別の例では、キットは、塩基が認識され、典型的にはそうしないＤＮＡグリコシラーゼによって切除されるように、塩基を変化させる修飾酵素を含んでもよい。一例では、チミンＤＮＡグリコシラーゼ（ＴＤＧ）とともに使用するために有用な酵素および試薬としては、ＴＥＴ酵素、β－グルコシルトランスフェラーゼおよびグルコース、またはなんらかのそれらの組合せが挙げられる。

【０１２４】

一部の場合では、キットは、方法の切除または標識ステップを実施するための１種または複数の緩衝液および／または反応成分を含んでもよい。例えば、キットは、ＤＮＡグリコシラーゼ緩衝液、リガーゼ緩衝液、ＤＮＡポリメラーゼ緩衝液のうちの１種もしくは複数、またはそれらの任意の組合せを含んでもよい。キットは、塩、カチオンまたは洗剤などの試薬も含んでもよい。

【０１２５】

一部の場合では、キットは、ＤＮＡ試料の断片化のための試薬および説明書を含む。例えば、キットは、ＤＮＡを断片化するための１種または複数の酵素を含んでもよい。例えば、キットは、ＤＮＡｓｅ　Ｉ、マルトース結合タンパク質－Ｔ７　Ｅｎｄｏ　ＩおよびＶｉｂｒｉｏ　ｖｕｌｎｉｆｉｃｕｓヌクレアーゼ（Ｖｖｎ）またはＮＥＢＮｅｘｔ（登録商標）ｄｓＤＮＡ　Ｆｒａｇｍｅｎｔａｓｅ（登録商標）のような非特異的ヌクレアーゼのいずれかを含んでもよい。

【０１２６】

一部の場合では、キットは、１種または複数の修飾された塩基（例えば、異なるタイプの修飾された塩基、異なる塩基修飾、またはその両方）を含有する対照ＤＮＡオリゴヌクレオチドをさらに含んでもよい。対照ＤＮＡオリゴヌクレオチドは、既知濃度で提供されてよく、ＤＮＡ分子当たり既知量または濃度の修飾された塩基を有する。一部の場合では、対照ＤＮＡオリゴヌクレオチドのサイズは、特定のサイズ範囲にあってもよい。一部の場合では、対照ＤＮＡオリゴヌクレオチドは、約２５～１００ｂｐ、約２５～１５０ｂｐ、約５０～２００ｂｐ、約２５～２００ｂｐ、約５０～２５０ｂｐ、約２５～２５０ｂｐ、約５０～３００ｂｐ、約２５～３００ｂｐ、約５０～５００ｂｐ、約２５～５００ｂｐ、約１５０～２５０ｂｐ、約１００～５００ｂｐ、約２００～８００ｂｐ、約５００～１３００ｂｐ、約７５０～２５００ｂｐ、約１０００～２８００ｂｐ、約５００～３０００ｂｐ、約８００～５０００ｂｐの範囲にあってもよい。例えば、対照ＤＮＡオリゴヌクレオチドは、２５～１００ｂｐ、２５～１５０ｂｐ、５０～２００ｂｐ、２５～２００ｂｐ、５０～２５０ｂｐ、２５～２５０ｂｐ、５０～３００ｂｐ、２５～３００ｂｐ、５０～５００ｂｐ、２５～５００ｂｐ、１５０～２５０ｂｐ、１００～５００ｂｐ、２００～８

００ｂｐ、５００～１３００ｂｐ、７５０～２５００ｂｐ、１０００～２８００ｂｐ、５００～３０００ｂｐ、８００～５０００ｂｐの範囲にあってもよい。例えば、対照ＤＮＡオリゴヌクレオチドは、約５０～２５０ｂｐであってもよい。一例では、対照ＤＮＡオリゴヌクレオチドのサイズは、５０～２５０ｂｐの範囲にあってもよい。一部の場合では、対照ＤＮＡオリゴヌクレオチドは、任意の規定された範囲よりも約２５ｂｐ大きいかまたは小さくてもよい。一部の場合では、対照ＤＮＡオリゴヌクレオチドは、キットを使用して分析されるべきＤＮＡ分子とおよそ同じサイズ範囲にあってもよい。一部の場合では、記載された塩基切除および標識反応は、ＤＮＡ試料および対照ＤＮＡオリゴヌクレオチドに対して並行して実施されてもよい。対照ＤＮＡオリゴヌクレオチドの標識の量の分析は、ＤＮＡ試料に取り込まれた標識の量、ひいては、試料中の特別な修飾された塩基の量を定量するために使用されてもよい。例えば、複数の対照ＤＮＡオリゴヌクレオチド量に取り込まれた標識に基づいて標準曲線が作製され、ＤＮＡ試料中に存在する修飾された塩基の量を決定するために、ＤＮＡ試料に取り込まれた標識の量が標準曲線と比較され得る。別の例では、対照ＤＮＡオリゴヌクレオチドは、定量のために既知量（スパイクされた）で、単離された標識ＤＮＡと組み合わせることができる。一部の場合では、キットは、対照ＤＮＡオリゴヌクレオチドの複数のアリコートであって、各対照ＤＮＡオリゴヌクレオチドが既知量の異なる修飾された塩基を有するものを含んでもよい。

【０１２７】

一部の場合では、キットは説明書をさらに含んでもよい。説明書は、ＤＮＡ単離ステップ、ＤＮＡ断片化ステップ、記載された方法の切除ステップ、記載された方法の標識ステップまたは記載された方法の標識されたＤＮＡの単離ステップのうちの１つまたは複数をどのように実施するかを特定し得る。ＤＮＡ試料に取り込まれた標識の量を定量するためにどのように対照ＤＮＡオリゴヌクレオチドを使用するかを記載する説明書がキットに含まれてもよい。

【０１２８】

非限定的な実施形態として以下が挙げられる：

【０１２９】

実施形態３９．　ＤＮＡ試料における修飾されたヌクレオチドの検出のためのキットであって、

ＤＮＡグリコシラーゼ、ＡＰエンドヌクレアーゼ、プルーフリーディングおよび鎖置換活性を欠くＤＮＡポリメラーゼ、またはＤＮＡリガーゼのうちの少なくとも１つから選択される酵素と、

少なくとも１種類の標識されたヌクレオチドと

を含むキット。

【０１３０】

実施形態４０．　前記酵素のための緩衝液、少なくとも１種類の標識されていないヌクレオチド、または既知の量もしくは場所パターンの標識されたヌクレオチドを含む対照ＤＮＡオリゴヌクレオチドのうちの１つまたは複数をさらに含む、実施形態３９に記載のキット。

【０１３１】

ＩＩＩ．組成物

別の態様では、１種または複数の修飾された塩基を含有するＤＮＡオリゴヌクレオチドが提供される。一部の場合では、ＤＮＡオリゴヌクレオチドは修飾された塩基を含有する。一部の場合では、ＤＮＡオリゴヌクレオチドは、複数の同じ種類の修飾された塩基を含有する。一部の場合では、ＤＮＡオリゴヌクレオチドは、少なくとも２種の異なるタイプの修飾された塩基（例えば、異なる塩基または異なる塩基修飾）を含有する。一部の場合では、対照ＤＮＡオリゴヌクレオチドのサイズは特定のサイズ範囲にあってもよい。例えば、対照ＤＮＡオリゴヌクレオチドは、約２５～１００ｂｐ、約２５～１５０ｂｐ、約５０～２００ｂｐ、約２５～２００ｂｐ、約５０～２５０ｂｐ、約２５～２５０ｂｐ、約５０～３００ｂｐ、約２５～３００ｂｐ、約５０～５００ｂｐ、約２５～５００ｂｐ、約１

５０～２５０ｂｐ、約１００～５００ｂｐ、約２００～８００ｂｐ、約５００～１３００ｂｐ、約７５０～２５００ｂｐ、約１０００～２８００ｂｐ、約５００～３０００ｂｐ、約８００～５０００ｂｐの範囲にあってもよく、または約２５ｂｐから５０００ｂｐの間の他のサイズ範囲にあってもよい。例えば、対照ＤＮＡオリゴヌクレオチドは、２５～１００ｂｐ、２５～１５０ｂｐ、５０～２００ｂｐ、２５～２００ｂｐ、５０～２５０ｂｐ、２５～２５０ｂｐ、５０～３００ｂｐ、２５～３００ｂｐ、５０～５００ｂｐ、２５～５００ｂｐ、１５０～２５０ｂｐ、１００～５００ｂｐ、２００～８００ｂｐ、５００～１３００ｂｐ、７５０～２５００ｂｐ、１０００～２８００ｂｐ、５００～３０００ｂｐ、８００～５０００ｂｐの範囲にあってもよく、または２５ｂｐから５０００ｂｐの間の他のサイズ範囲にあってもよい。例えば、ＤＮＡオリゴヌクレオチドは、約５０～２５０ｂｐであってもよい。一例では、対照ＤＮＡオリゴヌクレオチドのサイズは、５０～２５０ｂｐの範囲にあってもよい。一部の場合では、ＤＮＡオリゴヌクレオチドは、任意の規定された範囲よりも約２５ｂｐ大きいかまたは小さくてもよい。一部の場合では、ＤＮＡオリゴヌクレオチドは、記載された方法においてＤＮＡ断片に取り込まれた標識されたヌクレオチドの量を分析することにおける使用のための対照試薬として有用であり得る。一部の場合では、ＤＮＡオリゴヌクレオチドは、対照ＤＮＡオリゴヌクレオチドとして本明細書に記載のキットに含まれてもよい。一部の場合では、ＤＮＡオリゴヌクレオチドは、ＤＮＡ試料中の修飾された塩基の定量を促進するための対照オリゴヌクレオチドとして、本明細書に記載の方法において使用されてもよい。一部の場合では、対照ＤＮＡオリゴヌクレオチドは、記載されたキットを使用して分析されるべきＤＮＡ分子と同じおよそのサイズ範囲にあってもよい。一部の場合では、記載された塩基切除および標識反応は、ＤＮＡ試料および対照ＤＮＡオリゴヌクレオチドに対して並行して実施されてもよい。対照ＤＮＡオリゴヌクレオチドの標識の量の分析は、ＤＮＡ試料に取り込まれた標識の量、ひいては、試料中の特別な修飾された塩基の量を定量するために使用されてもよい。一例では、複数の対照ＤＮＡオリゴヌクレオチド量に取り込まれた標識に基づいて標準曲線が作製され、ＤＮＡ試料中に存在する修飾された塩基の量を決定するために、ＤＮＡ試料に取り込まれた標識の量が標準曲線と比較され得る。別の例では、対照ＤＮＡオリゴヌクレオチドは、定量のために既知量（スパイクされた）で、単離された標識ＤＮＡと組み合わせることができる。

【０１３２】

非限定的な実施形態として以下が挙げられる：

【０１３３】

実施形態４１．　各オリゴヌクレオチドが既知量の修飾されたヌクレオチドを含む複数のオリゴヌクレオチド。

【０１３４】

実施形態４２．　前記オリゴヌクレオチドの少なくとも一部分が、既知量の第２の種類の修飾されたヌクレオチドを含む、実施形態４１に記載の混合物。

【０１３５】

実施形態４３．　オリゴヌクレオチドの前記混合物が、約５０～２５０塩基対の長さのＤＮＡ断片を含む、実施形態４１または４２に記載の混合物。

【０１３６】

ＩＶ．システムおよびデバイス

別の態様では、上記方法を実施するためのデバイスおよびシステムが提供される。

【０１３７】

デバイス

本開示のシステムは、修飾された塩基のためのＤＮＡ試料の自動分析のためのデバイスを含んでもよい。

【０１３８】

一態様では、修飾された塩基に関するＤＮＡ試料の自動分析のための分析デバイスが提供される。別の態様では、ＤＮＡ試料の分析のためにＤＮＡ試料を受容するように構成さ

れた試料デバイスが提供される。一例では、試料デバイスは、微小流体試料デバイスであってもよい。例えば、試料デバイスは、ラボオンチップ微小流体デバイスであってもよい。一部の場合では、分析デバイスは、１つまたは複数の試料デバイスを受容するように構成される。

【０１３９】

一部の場合では、分析デバイスは、以下に記載の通り、１つまたは複数の試料デバイスを受容するための容器を含んでもよい。

【０１４０】

一部の場合では、分析デバイスはディスプレイを含んでもよい。ディスプレイは、１種または複数のグラフィックオブジェクトを出力するように構成されてもよい。一部の場合では、ディスプレイは、タッチスクリーンディスプレイを含んでもよい。タッチスクリーンディスプレイは、タッチスクリーンディスプレイとユーザーのインタラクションを検出し、プロセッサへ（例えば、分析デバイスの内部へ）１種または複数の関連するセンサーシグナルを送信するように構成されてもよい。センサーシグナルは、ユーザーインタラクションの位置、方向および／または圧力のようなユーザーインタラクションに関連するデータを含んでもよい。

【０１４１】

分析デバイスは、さらにまたはその代わりに、ユーザー入力デバイスを含んでもよい。ユーザー入力デバイスは、タッチスクリーンディスプレイ；タッチパッド；キーボード；１つまたは複数のボタン、ノブもしくはスイッチ；またはそのようなユーザー入力デバイスのいずれかの任意の組合せを含んでもよい。ユーザー入力デバイスは、ユーザー入力を受信し、関連するセンサーシグナルをプロセッサに送信するように構成されてもよい。

【０１４２】

一部の場合では、分析デバイスは、コンピュータデバイスをさらに含んでもよい。例えば、コンピュータデバイスは、メモリおよびプロセッサを含んでもよい。メモリは、ＲＡＭ、ＲＯＭ、ＥＥＰＲＯＭなどの、任意の好適なタンジブル（かつ持続的）コンピュータ読取り可能媒体を含んでもよく、分析デバイスのオペレーションを構成するプログラム構成要素を実装してもよい。一部の場合では、メモリは、プロセッサに１つまたは複数の機能を実行させるように構成されたソフトウェア命令を含んでもよい。例えば、ソフトウェア命令は、分析デバイス内に置かれた試料デバイスの１つまたは複数のチャンバーまたはコンパートメント中への特定の時点における試薬の注入をプロセッサに調整させるように構成されてもよい。例えば、ソフトウェア命令は、分析デバイス内に含有された１つまたは複数の試料デバイスへの試薬の時限および／または連続添加を含んでもよい。別の例では、ソフトウェア命令は、分析デバイス内に含有された１つまたは複数の試料デバイスへの時限のおよび／または連続的な物理的、機械的または電気化学的調整を引き起こしてもよい。一部の場合では、メモリは、本開示全体に記載された方法のいずれかを実施するように構成されたソフトウェア命令を含んでもよい。

【０１４３】

一部の場合では、分析デバイスはネットワークインターフェースを含んでもよい。ネットワークインターフェースは、ネットワーク接続を促進するかまたはそうでなければデバイス間の通信を促進する任意の構成要素を含んでもよい。例としては、Ｅｔｈｅｒｎｅｔ（登録商標）、ＵＳＢ、ＩＥＥＥ　１３９４のような有線インターフェースおよび／またはＩＥＥＥ　８０２．１１、Ｂｌｕｅｔｏｏｔｈ（登録商標）、近距離無線通信（ＮＦＣ）インターフェース、ＲＦＩＤインターフェースのようなワイアレスインターフェース、あるいは携帯電話ネットワークにアクセスするための無線インターフェース（例えば、ＣＤＭＡ、ＧＳＭ（登録商標）、ＵＭＴＳまたは他の移動通信ネットワークにアクセスするためのトランシーバー／アンテナ）が挙げられるが、それに限定されない。分析デバイスは、ＤＮＡ試料についての情報を受信し、または遠隔デバイスに送信するためのネットワークインターフェースを使用してもよい。

【０１４４】

一部の場合では、分析デバイスは、その内部で記載された方法の１つまたは複数のステップが実施される試料デバイスを受容するように構成される。

【０１４５】

一態様では、その内部で記載された方法の１つまたは複数のステップが実施され得る試料デバイスが提供される。代表的な試料デバイスが図７に示され、これは、第１の固体表面、第１の固体表面と接触する第２の固体表面、入口、第１のチャンバー、第２のチャンバー、第３のチャンバー、出口、緩衝液コンパートメント、出口および多様な構成要素を互いに接続する複数のチャネルを含む。試料デバイスは、そこへ試料ＤＮＡが導入される入口を有してもよい。

【０１４６】

一部の場合では、試料デバイスは第１の固体表面および第１の固体表面と接触する第２の固体表面を含む。第１および第２の固体表面は、例えば、正方形、長方形、円形、楕円形、三角形またはなんらかの他の形状のような多様な幾何学形状を有し得る。一部の場合では、固体基板の形状は変化してもよい。例えば、固体表面の１つの部分は長方形であってよく、別の部分は異なる形状を有してもよい。試料デバイスは、互いに同じ形状または異なる形状の第１および第２の固体基板を含んでもよい。固体基板の寸法は、試料デバイスの所望の全体構成によって決まり得る。一部の場合では、第１および第２の固体表面は、実質的に同じ寸法を有してもよい。

【０１４７】

一部の場合では、入口は、第１の固体表面、第２の固体表面または第１および第２の固体表面の間の接合部に形成される。試料デバイスは、複数のチャンバーおよびチャネルをさらに含んでもよい。試料デバイスは、記載された方法のステップを実施するための１種または複数の試薬を含有する複数のチャンバーを有してもよい。チャンバーおよびチャネルは、すべて第１の固体表面または第２の固体表面に形成されてもよく、または一部のチャンバーおよびチャネルが第１の固体表面に形成され、他のチャンバーおよびチャネルが第２の固体表面に形成されてもよい。

【０１４８】

一例では、第１のチャンバー（１）は凍結乾燥されたＤＮＡグリコシラーゼを含有してもよい。ＤＮＡ試料は、第１のチャネルを介して入口から第１のチャンバーへ移動してよく、そこでインキュベートされて、ＤＮＡグリコシラーゼが目的の修飾ヌクレオチドを切除することを可能とする。チャンバー（１）は、ＡＰエンドヌクレアーゼをさらに含有してもよい。あるいは、試料デバイスは、凍結乾燥されたＡＰエンドヌクレアーゼを含有する別個のチャンバー（示されない）を含んでもよい。ＤＮＡ試料は、側部チャネルを介して第１のチャンバーからＡＰエンドヌクレアーゼチャンバーに移動し、そこでインキュベートされて、ＡＰ部位の位置においてエンドヌクレアーゼがＤＮＡ試料中にギャップを生じさせることを可能とする。

【０１４９】

一部の場合では、試料デバイスは、ＤＮＡ試料のためのアフィニティー構成要素を含有する第２のチャンバー（２）をさらに含んでもよい。ＤＮＡ試料は、第１のチャンバーまたはＡＰエンドヌクレアーゼチャンバーから、第２のチャネルを介して第２のチャンバーへ移動し得る。第２のチャンバーは、そこへＤＮＡ試料が結合するシリカビーズまたはイオン交換ビーズのようなアフィニティー構成要素を含有してもよい。試料デバイスは、第２のチャンバーを洗浄緩衝液コンパートメントおよび／または溶出緩衝液コンパートメントに接続するチャネルも含んでもよい。アフィニティー構成要素に結合したＤＮＡ試料は、洗浄緩衝液コンパートメントから第２のチャンバーへ導入された洗浄緩衝液によって洗浄されて、溶出緩衝液コンパートメントから第２のチャンバーへ導入された溶出緩衝液によってアフィニティー構成要素から溶出されてもよい。一部の場合では、洗浄緩衝液コンパートメントおよび／または溶出緩衝液コンパートメントを第２のチャンバーに接続するチャネルは、第２のチャンバーへの緩衝液の制御された導入を許容する弁（灰色のＸ付き正方形）を有してもよい。

【０１５０】
一部の場合では、溶出されたＤＮＡ試料は、第３のチャネルを介して第２のチャンバーから第３のチャンバーへ移動してもよい。第３のチャネルは、凍結乾燥されたＤＮＡポリメラーゼおよび標識されたヌクレオチドを含有してもよい。一部の場合では、ＤＮＡ試料は、ＤＮＡ試料中に存在するギャップへの標識されたヌクレオチドの取り込みを許容するために、第３のチャンバー内に保持される。一部の場合では、次いで、標識されたＤＮＡ試料が出口を通って試料デバイスから押し出されてもよい。
【０１５１】
他の場合では、試料デバイスは、精製チャネル（示されない）を介して第３のチャンバーに接続された精製チャンバー（示されない）をさらに含んでもよい。精製チャンバーは、第２のチャンバーに類似して構成されてもよい。精製チャンバーは、そこへ標識されたＤＮＡ試料が結合するアフィニティー構成要素を含有してもよく、側部チャネルを介して洗浄緩衝液コンパートメントおよび／または溶出緩衝液コンパートメントに接続されてもよい。アフィニティー構成要素に結合したＤＮＡ試料は、洗浄緩衝液コンパートメントから第２のチャンバー中へ導入された洗浄緩衝液によって洗浄され、溶出緩衝液コンパートメントから第２のチャンバー中へ導入された溶出緩衝液によってアフィニティー構成要素から溶出されてもよい。一部の場合では、洗浄緩衝液コンパートメントおよび／または溶出緩衝液コンパートメントを第２のチャンバーに接続するチャネルは、第２のチャンバーへの緩衝液の制御された導入を許容する弁（灰色のＸ付き正方形）を有してもよい。例えば、標識がビオチンである場合、精製チャネルはストレプトアビジンコーティングされたビーズを含有してもよく、溶出緩衝液はビオチン標識されたＤＮＡ試料のストレプトアビジンコーティングされたビーズからの溶出を促進するために処方されてもよい。一部の場合では、次いで、標識されたＤＮＡ試料が出口を通って試料デバイスから押し出されてもよい。
【０１５２】
一部の場合では、試料デバイスは、第３のチャンバーに（または先のパラグラフにおいて述べた精製チャンバーに）検出チャネル（示されない）を介して接続された検出チャンバー（示されない）をさらに含んでもよい。検出チャンバーは、ＤＮＡ試料に取り込まれた標識の検出のための試薬を含有するように構成されてもよい。検出チャンバーは、ＤＮＡ試料に取り込まれた１種または複数の標識の量の定量を許容するように構成されてもよい。
【０１５３】
一部の場合では、試料デバイスは、その中で他の酵素反応が起こり得るチャンバーを含むために他の構成を有してもよい。例えば、試料デバイスは、それぞれが異なるＤＮＡグリコシラーゼを含有する複数のチャンバーを含んでもよい。試料デバイスは、同時に複数のＤＮＡグリコシラーゼとのＤＮＡ試料のインキュベーションを許容するために、試料を別個の部分に分割するかまたは複数の入口を有してもよい。別の例では、試料デバイスは、ＤＮＡ試料が連続的にあるものから別のものへと移動するように試料デバイス内に整列された、異なるＤＮＡグリコシラーゼをそれぞれが含有する複数のチャンバーを含んでもよい。一部の場合では、追加のアフィニティーチャンバー、洗浄緩衝液コンパートメントおよび溶出緩衝液コンパートメントが含まれ、試料が次のチャンバーに移動する前に、ＤＮＡ試料の洗浄および先行するチャンバーからの試薬の除去を許容する。別の例では、試料デバイスは、上記の通りにＤＮＡグリコシラーゼによって検出された修飾塩基を修飾するための酵素および試薬を含有するチャンバーを含有してもよい。一部の場合では、試料デバイスの多様なチャンバーおよび構成要素がチャネルを介して接続される。一部の場合では、チャネルは、１つのチャンバーまたはコンパートメント内の流体の別のチャンバーまたはコンパートメントへのアクセスを制御する弁を含有する。
【０１５４】
一部の場合では、試料デバイスは、試料デバイスの識別を促進するために識別構成要素を含んでもよい。一部の場合では、識別構成要素は、試料デバイス内に含有されるＤＮＡ

試料についての情報を含んでもよい。例えば、識別構成要素は、ＤＮＡ試料と関連し得る固有の通し番号であってもよい。別の例では、識別構成要素は、その上にユーザーがＤＮＡ試料またはそれに対して実施される方法についての情報を書いてもよい試料デバイス上の場所である。別の例では、識別構成要素は、ＤＮＡ試料の供給源の身元、ＤＮＡ試料に関する他の情報およびＤＮＡ試料に対して実施されるべき方法のような、しかしそれに限定されない情報がそこに記憶されてもよいメモリ構成要素またはメモリデバイスであってもよい。

【０１５５】

一部の場合では、記載された試料デバイスは多様な材料から作られ得る。一般に、材料は核酸に対して非反応性であり、核酸、タンパク質、ヌクレオチドまたは標識されたヌクレオチドのために使用される標識に実質的に結合しない。代表的な材料としては、ポリプロピレン、シリコーン化ポリプロピレンならびにガラス、ポリエチレングリコールで官能化された（コーティングされた）ポリジメチルシロキサン、ＰＯＰ－６（商標）ポリマー（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ．）または他のブロッキング層が挙げられるが、それに限定されない。

【０１５６】

非限定的な実施形態としては、以下が挙げられる：

実施形態４４．　ＤＮＡ試料における修飾されたヌクレオチドの検出のための試料デバイスであって、

固体表面と、

第１の前記固体表面と接触した第２の固体表面と、

入口と、

前記入口に接続され、（ｉ）塩基切除反応、（ｉｉ）ＤＮＡ標識反応、（ｉｉｉ）標識されたＤＮＡの単離または（ｉｖ）ＤＮＡ検出、定量もしくは配列決定のうちの少なくとも１つ、のうちの少なくとも１つを行うように構成された、少なくとも１個のチャンバーと

を含む試料デバイス。

【０１５７】

システム

一態様では、ＤＮＡ試料中の修飾塩基の存在を評価するために有用なシステムが提供される。システムは、多様な構成要素を含む。本明細書中で使用される通り、用語「構成要素」は、広く定義され、記載された方法を実行するのに適した任意の好適な器具または器具のコレクションを含む。構成要素は、いかなる特別な方法でも互いに対して一体的に接続されまたは位置付けられる必要はない。実施形態は、構成要素の任意の好適な互いに対する場所を含む。例えば、構成要素は同じ部屋にある必要はない。しかしながら、一部の場合では、構成要素は一体的なユニットに互いに接続される。一部の場合では、同じ構成要素が複数の機能を実施し得る。

【０１５８】

システムは、本明細書に記載の分析デバイスを含んでもよい。システムは、システムの多様な構成要素が分析デバイスからの情報を送信または受信するように構成されてもよい。例えば、システムは、例えば、タッチスクリーンディスプレイのようなユーザー入力デバイスから受信した通りの情報を分析デバイスから受信するように構成されてもよい。システムは、プロセッサを介するなど、例えば、ユーザー入力デバイスのような分析デバイスから送信された１種または複数の関連するセンサーシグナルを受信するように構成されてもよい。システムは、分析デバイスのプロセッサが、システムの他の構成要素からの情報を送信および／または受信するように構成されてもよい。

【０１５９】

システムは、１つまたは複数の本明細書に記載の試料デバイスも含んでもよい。システムは、１つの試料デバイスを別の試料デバイスから識別できるように、試料デバイスの１つまたは複数の識別構成要素を検出するように構成されてもよい。

【０１６０】
システムは、１つまたは複数のコンピュータデバイスを含んでもよい。コンピュータデバイスの典型例としては、汎用コンピュータ、プリンター、プログラムされたマイクロプロセッサ、マイクロコントローラ、周辺集積回路素子および本技術の方法を構成するステップを実装することのできる他のデバイスまたはデバイスの場所が挙げられる。
【０１６１】
コンピュータデバイスはメモリを含む。メモリとしては、ランダムアクセスメモリ（ＲＡＭ）およびリードオンリメモリ（ＲＯＭ）ならびに可換型媒体装置、メモリーカード、フラッシュカードなどが挙げられ得る。コンピュータデバイスは、記憶デバイスをさらに含んでもよい。コンピュータデバイスは、プロセッサも含む。プロセッサは、入力データを処理するために、１つまたは複数の記憶要素（例えば、メモリまたは記憶デバイス）に記憶される命令のセットを実行する。一部の実施形態では、コンピュータデバイスは、単一のプロセッサを含んでもよい。他の実施形態では、コンピュータデバイスは、２つまたはそれ超のプロセッサを含む。記憶要素は、データまたは他の所望の情報も保持することもできる。記憶要素は、情報供給源またはプロセシング機械中に存在する物理的メモリ要素の形態にあってもよい。
【０１６２】
コンピュータデバイスは、典型的に、そのコンピュータデバイスの一般管理およびオペレーションのための実行可能なプログラム命令を提供するオペレーティングシステムを含み、典型的に、プロセッサにより実施された場合にコンピュータデバイスがその目的の機能を実行することを可能とする命令を記憶しているコンピュータ読取り可能な記憶媒体（例えば、ハードディスク、ランダムアクセスメモリ、リードオンリメモリなど）を含むことになる。オペレーティングシステムのための好適な実装およびコンピュータデバイスの一般的な機能は、公知であるかまたは市販されており、本分野の当業者によって特に本開示に照らして容易に実装される。
【０１６３】
プロセッサは、通信バスに接続される。通信バスは１種または複数の他の構成要素、例えば、プロセッサ、入力デバイス（例えば、マウス、キーボード、コントローラ、タッチスクリーンまたはキーパッド）および出力デバイス（例えば、ディスプレイ、プリンターまたはスピーカー）に接続されてもよい。通信バスは、分析デバイスに接続されてもよい。
【０１６４】
コンピュータデバイスは、ネットワーク構成要素も含むことができる。ネットワーク構成要素は、コンピュータデバイスがＩ／Ｏインターフェースを通じて１つまたは複数のネットワークおよび／または他のデータベース（例えば、データベース）に接続することを可能とする。ネットワーク構成要素は、ネットワークインターフェースを含んでもよい。一部の実施形態では、ネットワークインターフェースは、有線またはワイアレス通信リンクを介する通信のために構成される。
【０１６５】
コンピュータデバイスは、コンピュータ読取り可能な記憶媒体読取り装置も含むことができる。コンピュータ読取り可能な記憶媒体読取り装置は、遠隔、局所、固定および／または取り外し可能な記憶デバイスを代表するコンピュータ読取り可能な記憶媒体ならびに一時的および／またはより永久的にコンピュータ読取り可能な情報を含有し、記憶し、送信しおよび回収するための記憶媒体と接続され、またはそれを受容するように構成され得る。システムおよび多様なデバイスは、典型的に、多数のソフトウェアアプリケーション、モジュール、サービスまたはオペレーティングシステムおよびクライアントアプリケーションもしくはウエブブラウザのようなアプリケーションプログラムを含む、少なくとも１つの作業メモリデバイス内に位置する他の要素も含む。別の実施形態が上記のものからの多くの変更を有し得ることは理解されるべきである。コードまたはコードの一部を含有するための記憶媒体およびコンピュータ読取り可能な媒体は、本分野で公知または使用さ

れる任意の適切な媒体を含むことができる。

【０１６６】

一部の実施形態では、システムは、１つまたは複数のアプリケーションを実行し得る。１つまたは複数のアプリケーションは、任意の数の上記コンピュータデバイスにおいて実行されてもよい。例えば、システムは、分析デバイスのためのプロトコルを起動するように構成されたアプリケーションを実行してもよい。そのようなプロトコルとしては、時限の、連続的な試薬の添加または分析デバイスとともに含有される１つまたは複数の試料デバイスへの調整が挙げられ得る。システムはまた、データベースに問い合わせするように構成されたアプリケーションを実行してもよい。一部の実施形態では、システムは、試験結果の報告を送信し得る。一部の実施形態では、システムは、試験報告をコンピュータデバイスに送信し得る。一部の実施形態では、システムは、試験結果の報告を１人または複数の受信者に送信し得る。一部の実施形態では、受信者は、対象またはヘルスケア提供者であってもよい。一部の実施形態では、システムは、試験結果の報告をｅメール（例えば、対象のヘルスケア提供者に関連するｅメールアカウントに）、ＳＭＳまたはテキストメッセージで送信してもよい。一部の実施形態では、システムは、試験結果の報告をデータベースに保存し得る。さらに、システムは、コンピュータデバイスに電子通知を提供し得る。コンピュータデバイスは、対象に関連し得るヘルスケア提供者に関連してもよい。一部の実施形態では、電子通知は、ｅメール、テキストメッセージまたはプッシュ通知を含んでもよい。電子通知は、試験報告が利用可能であること、例えば、データベースからのダウンロードが可能であることを指摘してもよい。

【０１６７】

非限定的な実施形態として以下が挙げられる：

【０１６８】

実施形態４５．　ＤＮＡ試料における修飾されたヌクレオチドの検出のための分析デバイスであって、

請求項４４に記載の１個または複数の試料デバイスを受け入れるように構成されたレセプタクルと、

使用者入力デバイスと、

メモリおよびプロセッサを含む計算デバイスであって、前記メモリが、前記プロセッサに、（ｉ）塩基切除反応、（ｉｉ）ＤＮＡ標識反応、（ｉｉｉ）標識されたＤＮＡの単離または（ｉｖ）ＤＮＡ検出、定量もしくは配列決定のうちの少なくとも１つ、のうちの少なくとも１つを行うための１種または複数の機能を実行させるように構成されたソフトウェア命令を含む計算デバイスと

を含む分析デバイス。

【実施例】

【０１６９】

以下の実施例は、請求項に係る発明を限定するためでなく、例解するために提供される。

【０１７０】

（実施例１）

遺伝子配列中のメチル化または損傷されたヌクレオチド塩基を標識するために有用なＤＮＡポリメラーゼの性質を識別するために研究を実施した。具体的な目的は、３’→５’プルーフリーディングエキソヌクレアーゼ活性を欠くＤＮＡポリメラーゼを使用することによって標識反応が改善され得るかであった。３’→５’エキソヌクレアーゼ活性が、取り込まれた標識塩基の切除をもたらし、これが標識反応の効率を減少させ得ると仮定した。そのようなエキソヌクレアーゼ活性は、切除された塩基から５’方向における追加のヌクレオシド塩基の切除ももたらし得る。ポリメラーゼには（ビオチンにコンジュゲートした）ヌクレオシドが１つだけ供給されるため、これは、ポリメラーゼに（ｉ）永久的に標的から５’側の塩基で休止して、標識の取り込みをもたらさないか、または（ｉｉ）標的とされた修飾塩基から５’側の部位で標識ヌクレオシドを取り込み、ギャップを残し、修

飾塩基の位置を誤って識別することのいずれかをさせる可能性が最も高い。したがって３’→５’エキソヌクレアーゼ活性を欠くＤＮＡポリメラーゼを使用することが、標識反応の効率を増大させるために提案される。この仮説を試験するために、実験を行って、野生型Ｔ４　ＤＮＡポリメラーゼ（ＷＴ　Ｔ４　ｐｏｌ；Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）および３’→５’エキソヌクレアーゼ活性を欠く突然変異型Ｔ４　ＤＮＡポリメラーゼ（Ｔ４　ｐｏｌ　ｅｘｏ$^{-}$；Ｌｕｃｉｇｅｎ、ＤＮＡ２０ｐｍｏｌ当たり１Ｕ）を比較した。

【０１７１】

２つの４０塩基対の相補的ＤＮＡ分子を、Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから注文し、１：１の比率で一緒に混合することによって一緒にアニーリングし、９５℃まで加熱し、約１時間にわたってゆっくりと冷却して、図１に概略的に示す通りに二本鎖ＤＮＡ構築物を形成した。ＤＮＡ構築物のうちの１本の鎖は、３’フルオレッセインアミダイト（ＦＡＭ）標識およびウラシルを塩基位置３４に含有した。構築物中に他のウラシル塩基は存在しなかった。

【０１７２】

第１のステップでは、約４μｇのＤＮＡ構築物を、ウラシルＤＮＡグリコシラーゼ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、ＤＮＡ４００ｎｇ当たり１Ｕ）およびエンドヌクレアーゼＩＶ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、ＤＮＡ２００ｎｇ当たり１Ｕ）とともに５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、１００ｍＭ　ＮａＣｌ、１０ｍＭ　$MgCl_2$および１ｍＭ　ＤＴＴ（総体積＝５０μＬ）を含有する緩衝液中、３７℃において１時間、同時インキュベートした。グリコシラーゼは、構築物からウラシル塩基を切断することによって非塩基部位を作り出し、エンドヌクレアーゼはこの部位の３’および５’側両方を切断し、完全長４０塩基対の相補鎖（各画像のレーン１）にアニールした３３塩基対の鎖と６塩基対断片をもたらす。結果として生じたＤＮＡを市販のキット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して精製した。

【０１７３】

第２のステップでは、精製したＤＮＡ構築物をビオチン化ｄＵＴＰ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、１５ｐｍｏｌ）およびＴ４　ｐｏｌ　ｅｘｏ$^{-}$またはＷＴ　Ｔ４　ｐｏｌ（２０Ｕ／ｐｍｏｌのＤＮＡ）のいずれかにより、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．９）、１０ｍＭ　$MgCl_2$、５０ｍＭ　ＮａＣｌおよび１ｍＭ　ＤＴＴを含有する緩衝液中、１時間、３７℃で処理した。このステップでは、ＤＮＡポリメラーゼが、ビオチン化ｄＵＴＰを、ＦＡＭ標識された鎖へ相補鎖中のアデニン塩基の反対側に取り込む。

【０１７４】

最終的な反応生成物を、変性シーケンシング用ゲル（１６％ゲルマトリックス、０．０９％ＡＰＳ、０．０６％ＴＥＭＥＤ、３ＸＴＢＥ中で流す）に流し、ＦＡＭの発光を検出するために５２０ｎｍで撮像した。代表的なゲル画像を図２に示す。３’ＦＡＭ標識を含有する生成物のみが検出可能である。各レーンは、およそ４０ｎｇの総ＤＮＡを含有する。

【０１７５】

各ゲル画像の左側レーンは、上記第１のステップ後の中間反応生成物を示す。両方のゲルが、３３ヌクレオチドのＦＡＭ標識分子を示す。各ゲル画像の右側レーンは、上記第２のステップ後の最終反応生成物を示す。

【０１７６】

ＷＴ　Ｔ４　ｐｏｌを使用する反応は、単一のビオチン化ｄＵＴＰが切除されたウラシル塩基の位置に取り込まれた、所望の３４ヌクレオチドの生成物をもたらしたが、ＷＴ　Ｔ４　ｐｏｌの５’→３’エキソヌクレアーゼ活性によってＦＡＭ標識された鎖からのヌクレオシドの切断から生じた数種の分解生成物ももたらした。いかなる特別な理論に固執するものではないが、これらの望ましくない標識生成物が、休止した伸長および相補鎖のアデニン塩基の位置におけるビオチン化ウラシルの誤った取り込みの両方を含むことが提

案される。結果として、所望の３４ヌクレオチドバンドの全収率は、多くても全ＤＮＡの２０～２５％である。

【０１７７】

対照的に、Ｔ４　ｐｏｌ　ｅｘｏ⁻を使用する反応は、主に、切除されたウラシル塩基の位置へ単一のビオチン化ｄＵＴＰが取り込まれた所望の３４ヌクレオチドの生成物を、全収率約８９％でもたらした。

【０１７８】

この研究からの結論は、標識反応の効率および精度は、３’→５’エキソヌクレアーゼ活性を欠くＤＮＡポリメラーゼを使用することによって実質的に増大するということである。

【０１７９】

（実施例２）

遺伝子配列中のメチル化または損傷されたヌクレオチド塩基を標識するために有用なＤＮＡポリメラーゼの濃度を識別するために研究を実施した。具体的な目的は、ＤＮＡポリメラーゼの利用可能性を制限することによって標識反応が改善され得るか否かであった。これは、制限しすぎた利用可能性が低収率をもたらし得る（すなわち、大量の非標識ＤＮＡ）一方、過剰のポリメラーゼ濃度が、高いエラー率（誤った取り込み）、鋳型のない（untemplated）取り込み、および活性を低下させ得る干渉を含む偽りの効果を有し得るからである。この仮説を試験するために、多様なＤＮＡポリメラーゼ濃度を評価する滴定実験を実施した。

【０１８０】

実施例１に記載されたものと同じＤＮＡ構築物をこの研究のために使用した。ウラシル塩基の切除も実施例１に記載された通りに、全部で約５０μｇのＤＮＡ構築物に対して実施した。得られた材料を、市販のキット（Ｑｕｉａｇｅｎ）を使用して精製し、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ８．５に懸濁し、およそ２μｇのＤＮＡ構築物を含有する１３個のアリコートに分割した。各アリコートは、１５ｐｍｏｌのビオチン化ｄＵＴＰ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）および以下の表２に記載の通りの多様な濃度のＴ４　ｐｏｌ　ｅｘｏ⁻（Ｌｕｃｉｇｅｎ）を受容した。反応条件は、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．９）、１０ｍＭ　$MgCl_2$、５０ｍＭ　ＮａＣｌおよび１ｍＭ　ＤＴＴを含有する緩衝液中、３７℃において１時間であった。

【表２】

表 2.標識反応における DNA ポリメラーゼの滴定

レーン	DNA pol / DNA 構築物 (U/mol)	DNA pol 希釈率	DNA pol (mU)
1	---	---	---
2	---	---	---
3	1 U/nmol	1X	78.5
4	500 U/pmol	1/2	39.2
5	250 U/pmol	1/4	19.6
6	125 U/pmol	1/8	9.8
7	66.7 U/pmol	1/15	5.2
8	50 U/pmol	1/20	3.9
9	33.3 U/pmol	1/30	2.6
10	20 U/pmol	1/50	1.6
11	10 U/pmol	1/100	0.78
12	5 U/pmol	1/200	0.39
13	1 U/pmol	1/500	0.16

【０１８１】

変性シーケンシング用ゲル（１６％ゲルマトリックス、０．０９％ＡＰＳ、０．０６％ＴＥＭＥＤ、３：１の１ｘＴＢＥ中で流す）において分析を実施し、ＦＡＭ標識されたＤＮＡに関して撮像した。代表的なゲル画像を図３に示す。各レーンは２０ｎｇの総ＤＮＡを含有する。レーン１は、完全長４０ヌクレオチドのＦＡＭ標識された鎖の泳動パターンを示し；レーン２は、ウラシル切除ステップ後の中間の３３ヌクレオチドのＦＡＭ標識された鎖の泳動パターンを示す。

【０１８２】

高いＤＮＡポリメラーゼ濃度を使用して行った反応は、過剰の取り込み－すなわち、より高い／より大きなバンドにより反映されるＦＡＭ標識された鎖への１つまたは複数の非相補性ビオチン化ｄＵＴＰの取り込み－、および失われた材料－すなわち、より低い／より小さなバンドに反映される、いかなるビオチン化ｄＵＴＰの添加によっても伸長されなかったＦＡＭ標識された鎖を含む、変わりやすい活性を生じさせる。非常に低濃度のＤＮＡポリメラーゼを使用して行われる反応は、切除されたウラシル塩基の位置に単一のビオチン化ｄＵＴＰが取り込まれた所望の３４ヌクレオチドの生成物の収率の顕著な減少をもたらした。望ましくない生成物が最小量である所望の生成物の最大収率は、全ＤＮＡのうちの所望の生成物が約８９％であった。これは、ＤＮＡ１ｐｍｏｌ当たり約２０ＵのＤＮＡポリメラーゼ濃度で観察された。

【０１８３】

この研究からの結論は、標識反応の効率および精度は、約１０～３０Ｕ／ｐｍｏｌの範囲にある制限された量のＤＮＡポリメラーゼを使用することによって実質的に増大するということである。

【０１８４】

（実施例３）

実施例１および２においてうまくいった条件を使用して、ウラシル、オキソグアニンおよびＴ：Ｇミスマッチを特異的に切除し、標識するために、本開示の検出方法を使用した。各構築物が単一のウラシル、オキソグアニンまたはＴ：Ｇミスマッチを含有する３種のＤＮＡ構築物を調製した。図４Ａは、各ＤＮＡ構築物の泳動パターンを示す（各ゲルの左レーン）。グリコシラーゼおよびエンドヌクレアーゼのペアリングは：（１）ウラシル：ＵＤＧおよびＥｎｄｏ　ＶＩ；（２）オキソグアニン：ｈＯＯＧ１およびＥｎｄｏ　ＩＶ；ならびに（３）Ｔ：Ｇミスマッチ：ＴＤＧおよびＥｎｄｏ　ＩＶであった。すべての試料を最初にグリコシラーゼおよびエンドヌクレアーゼで処理し、次いで、ポリメラーゼステップの前にカラムろ過により精製した。ＴＤＧ反応生成物を、ＴＤＧインキュベーション後にプロテイナーゼＫにより処理して、ＵＤＧおよびｈＯＧＧ１に関する追加の精製ステップを必要とする後続のエンドヌクレアーゼおよびポリメラーゼステップの前にカラムろ過により精製した。ＤＮＡ構築物とそれぞれのグリコシラーゼ／エンドヌクレアーゼのペアリングの同時インキュベーションは、標的塩基の切断および非塩基部位の生成をもたらした。短縮された生成物を、図４Ａに示す（各ゲルの真ん中のレーン）。上記ＤＮＡポリメラーゼを使用してビオチン化ｄＵＴＰ、ｄＧＴＰおよびｄＣＴＰを非塩基部位に取り込んで、各ＤＮＡ分子への標識塩基の取り込みをもたらした（図４Ａの各ゲルの右レーン）。ＵＤＧおよびＴＤＧは両方とも一官能性グリコシラーゼであり、ｈＯＧＧ１は二官能性グリコシラーゼであるため、この実験は、記載された方法のすべてのクラスのＤＮＡグリコシラーゼへの適用性を実証している。

【０１８５】

標的ＤＮＡ修飾の特異的切断はＤＮＡ分子における正確かつ信頼できる標識を保証するために重要であるので、数種のＤＮＡグリコシラーゼの特異性を評価した。

【０１８６】

１つの実験では、単一のｏｘｏＧ修飾を含有するＤＮＡ構築物を調製した。この構築物を、並行してＵＤＧ、ｈＯＯＧ１および（Ｅｎｄｏ　ＩＶと同時インキュベートした）ＴＤＧとともにインキュベートした。図４Ｂに示す通り、出発ＤＮＡ構築物に比べて変更されたその反応生成物の泳動パターンに反映される通り、ｈＯＧＧ１のみがＤＮＡ構築物か

らｏｘｏＧを切除することができた。対照的に、ＵＤＧおよびＴＤＧによる切断反応からの生成物は、出発材料と同じ泳動パターンを有し、それらがＤＮＡ構築物から非特異的にｏｘｏＧを切除しなかったことを示している。

【０１８７】

別の実験では、ＵＤＧ、ＴＤＧおよびｈＯＧＧ１がそれらの既知の特異性以外のＤＮＡ修飾に関するなんらかの切断を示したか否かを決定するために、ＵＤＧ、ＴＤＧおよびｈＯＧＧ１を評価した。ＵＤＧは、ウラシル修飾を切除することが知らており、ＴＤＧはＴ：Ｇミスマッチを切除することが知られており、ｈＯＧＧ１はｏｘｏＧ修飾を切除することが知られている。３種のＤＮＡ構築物：単一のウラシル修飾を含有するもの、単一のｏｘｏＧ修飾を含有するものおよび単一のＴ：Ｇミスマッチを含有するものを調製した。各ＤＮＡ構築物のアリコートを、ＤＮＡ構築物中に存在するものとは異なるタイプの修飾に対する特異性を有する２種のＤＮＡグリコシラーゼとともに別個にインキュベートした。具体的には、ウラシルＤＮＡ構築物をｈＯＧＧ１またはＴＤＧとともにインキュベートし；ｏｘｏＧ構築物をＵＤＧまたはＴＤＧとともにインキュベートし；Ｔ：Ｇミスマッチ構築物をＵＤＧまたはｈＯＧＧ１とともにインキュベートした。各場合では、ＤＮＡ構築物をＤＮＡグリコシラーゼおよびＥｎｄｏ　ＩＶとともに同時インキュベートした。ＴＤＧ反応のためには、結合したＴＤＧを分解するためにプロテイナーゼＫ処理を実施し、Ｅｎｄｏ　ＩＶインキュベーションの前にカラムろ過によって材料を精製した。図４Ｃに示す通り、被験ＤＮＡ分子中に存在する修飾を切断したＤＮＡグリコシラーゼはなく、それらの標的である修飾についてのグリコシラーゼの特異性を実証した。よって、所定のＤＮＡグリコシラーゼは、特定のＤＮＡ修飾を特異的に切除し、標識するために記載された方法において使用可能であり、同じ反応中の他のタイプの修飾を誤って標識することは最小であるかまたは非存在であるはずである。

【０１８８】

（実施例４）

切除および標識反応の有用性および効率性も、ワンポット設定で評価した。ＵＤＧおよびＥｎｄｏＩＶを、単一のウラシル修飾を有する４０ｎｔのＤＮＡ分子とともに、５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、１０ｍＭ　$MgCl_2$、１ｍＭ　ＤＴＴを含有する緩衝液、ｐＨ７．９中で同時インキュベートした。切除反応のためのインキュベーション後、後の分析のためにアリコートを採取した。次いで、標識反応のためにＴ４　ＤＮＡ　ｐｏｌ　ｅｘｏ⁻およびビオチン化ｄＵＴＰを添加した。４０ｎｔのＤＮＡ分子、中間点試料および最終生成物を変性ゲルに流した。図５に示す通り、ウラシルは、中間点試料（真ん中のレーン）におけるＤＮＡのより早い泳動パターンにより示されるように、４０ｎｔの分子から効率的に切除され、重要なことに、より遅い泳動パターン（右レーン；＊でマークした）により示されるように、ビオチン化ｄＵＴＰのＤＮＡ分子への取り込みも効率的であった。ｈＯＧＧ１、ＥｎｄｏＩＶおよびｏｘｏＧ修飾を含有するＤＮＡ分子を使用して、類似の結果を得た。ワンポット反応は、わずかに１時間の全インキュベーションを必要とするに過ぎず、中間の精製ステップを必要としないと同時に、マルチステッププロセスよりも収率が高い（約９５％）。

【０１８９】

（実施例５）

ＤＮＡグリコシラーゼの選択性を適合させることによって複数のＤＮＡ修飾を標的とする方法の例を提供し、図６Ａおよび図６Ｂに例解する。カルボキシシトシン（ｃａＣ）およびホルミルシトシン（ｆＣ）（白丸）、メチルシトシン（ｍＣ、黒丸）およびヒドロキシメチルシトシン（ｈｍＣ，四角）の遺伝的修飾を含有するＤＮＡ試料が示される。チミンＤＮＡグリコシラーゼ（ＴＤＧ）は、ｃａＣおよびｆＣについて選択性を有する。

【０１９０】

図６Ａに示す通り、ＴＤＧグリコシラーゼはｍＣおよびｈｍＣを識別するために使用可能であり、（実施例１に記載の）切除ステップ後に実施される場合、標的ＤＮＡは、修飾を導入するための追加の酵素によりさらに処理される。単純化するために、以下の議論は

、標識されたヌクレオチドとしてビオチン化ｄＣＴＰ（三角）に言及する。しかしながら、使用するグリコシラーゼおよび目的の検出方法次第で、他の標識方法および他のヌクレオチドが使用可能であることは理解される。

【０１９１】

反応経路（１）は、標的ＤＮＡ中のｃａＣ／ｆＣ修飾の識別のための方法の例を示す。ｃａＣ／ｆＣを切除するためにＴＤＧグリコシラーゼが使用可能であり、標識反応は、ｃａＣ／ｆＣが存在した位置のみを標識するためにビオチン化ｄＣＴＰを使用して実施可能である。この反応経路は、標的ＤＮＡ中のｃａＣ／ｆＣ修飾の識別を可能とする。

【０１９２】

反応経路（２）は、標的ＤＮＡ中のｍＣおよびｈｍＣの識別のための方法の例を示す。最初に、ｃａＣ／ｆＣを切除するためにＴＤＧグリコシラーゼが使用可能であり、基準のｄＣＴＰによってギャップ充填が実施可能である。次いで、脱メチル化し、ｍＣおよびｈｍＣの両方をｃａＣ／ｆＣに変換するためにＴＥＴ酵素を使用してもよい。次いで、ｃａＣ／ｆＣを切除するためにＴＤＧグリコシラーゼを使用可能であり、ｍＣおよびｈｍＣが標的ＤＮＡ中に存在していた位置に取り込まれるビオチン化ｄＣＴＰを使用して標識反応を実施可能である。

【０１９３】

反応経路（３）は、標的ＤＮＡ中のｍＣの識別のための方法の例を示す。ｃａＣ／ｆＣを切除するためにＴＤＧグリコシラーゼが使用可能であり、基準のｄＣＴＰによってギャップ充填が実施可能である。次いで、ｈｍＣにグルコース部分を選択的に付着するために、β－グルコシルトランスフェラーゼを使用可能である。次いで、ＴＥＴ酵素による標的ＤＮＡの処理が、脱メチル化し、ｍＣのみをｃａＣ／ｆＣに変換する。ｍＣが標的ＤＮＡ中に存在していた位置に取り込まれるビオチン化ｄＣＴＰを使用して標識反応を実施可能である。ｍｃ＋ｈｍＣ標的集団からｍＣ標的集団を差し引いて、ｈｍＣのみを含有する標的集団を識別する。

【０１９４】

図６Ｂは、ＴＤＧおよびウラシルＤＮＡグリコシラーゼ（ＵＤＧ）を使用してＤＮＡ試料中のｃａＣ、ｆＣ、ｍＣおよびｈｍＣを特異的に標識し、検出する別の手段を示す

【０１９５】

反応経路（１）は、上記のようなｆＣ／ｃａＣを検出する方法の例を示す。

【０１９６】

反応経路（２）は、ｈｍＣを検出する方法の例を示す。最初に、ｃａＣ／ｆＣを切除するためにＴＤＧグリコシラーゼが使用可能であり、基準のｄＣＴＰによってギャップ充填が実施可能である。ｈｍＣをｃａＣ／ｆＣに酸化するために$KRuO_4$が使用可能であり、次いでこれはＴＤＧにより切断可能であり、それによってＤＮＡ試料中のｈｍＣの部位を標識ｄＣＴＰ（例えば、ビオチン化ｄＣＴＰ）で標識する。

【０１９７】

反応経路（３）は、ｍＣを検出する方法の例を示す。ｃａＣ／ｆＣを切除するためにＴＤＧグリコシラーゼが使用可能であり、基準のｄＣＴＰによってギャップ充填が実施可能である。ｈｍＣにグルコース部分を選択的に付着するために、β－グルコシルトランスフェラーゼを使用可能であり、それによってｈｍＣを酸化からブロックする。次いで、ＡＰＯＢＥＣ３ａまたは亜硫酸水素塩のいずれかがｍＣをウラシルに変換可能であり、これは次いで、ＵＤＧによって切断し、標識ｄＣＴＰ（例えばビオチン化ｄＣＴＰ）で標識可能である。

【０１９８】

本開示において議論されるすべての特許、特許公開、特許出願、雑誌論文、書籍、技術参考文献などは、すべての目的のために参照によりそれらの全体として本明細書に組み込まれる。

【０１９９】

本発明の図面および説明は、本発明の明確な理解に関連する要素を例解するために単純

化されていると理解されるべきである。図面は、構造図としてではなく、例示の目的のために表されることは理解されるべきである。省略された詳細および改変または代替の実施形態は、本分野の当業者の範囲内にある。

【０２００】

本発明のある特定の態様では、要素もしくは構造を提供するためまたは所定の機能（単数または複数）を実施するために、　単一の構成要素が複数の構成要素で置き換え可能であり、複数の構成要素が単一の構成要素で置き換え可能であることは理解され得る。本発明のある特定の実施形態を実行するためにそのような置換が有効でない場合を除いて、そのような置換は本発明の範囲内にあると考えられる。

【０２０１】

本明細書に表される例は、本発明の可能性のある特定の実装を例解することを意図される。例は、主に当業者のための本発明の例解を目的とすると理解され得る。本明細書に記載のこれらの図表またはオペレーションには、本発明の精神を離れることのない変形があり得る。例えば、ある特定の場合では、方法のステップまたはオペレーションは、順番を変えて実施または実行されてもよく、あるいは操作が追加され、除かれまたは変更されてもよい。

【０２０２】

図面に示されまたは上で記載された構成要素の異なる配列ならびに示されずまたは記載されない構成要素およびステップが可能である。同様に、いくつかの特徴およびサブコンビネーションが有用であり、他の特徴およびサブコンビネーションに関係なく採用され得る。本発明の実施形態は、限定する目的でなく、例示のために記載され、代替の実施形態も本特許を読む者には明らかとなる。したがって、本発明は、上に記載されたまたは図面に示された実施形態に限定されず、本開示の範囲を離れることなく多様な実施形態および変更がなされ得る。

【図１】

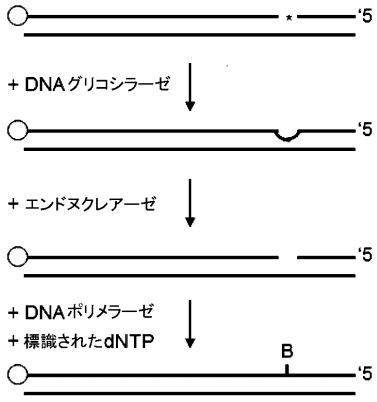
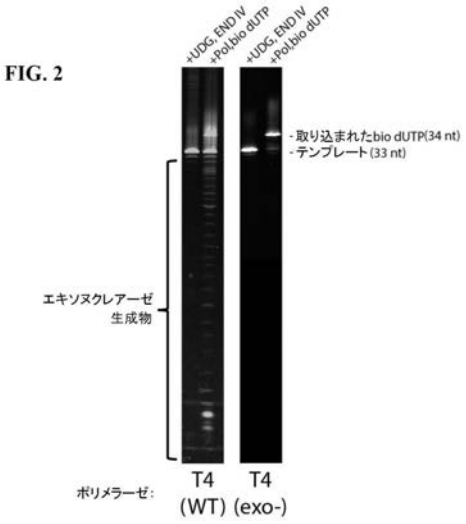
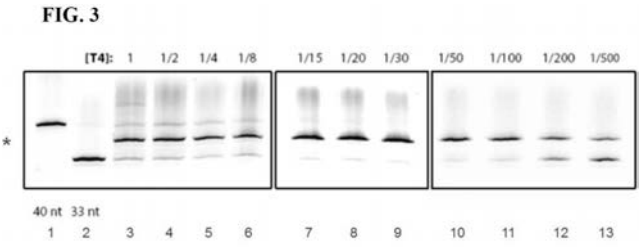


FIG. 1

【図２】



【図３】



【図４Ａ】

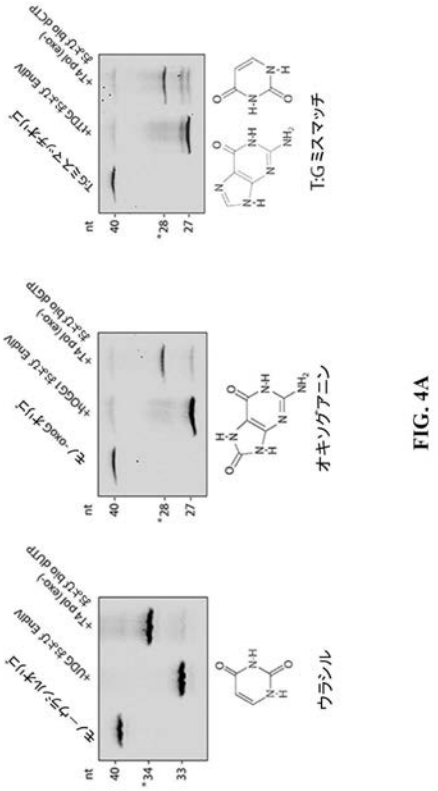


FIG. 4A

【図４Ｂ】

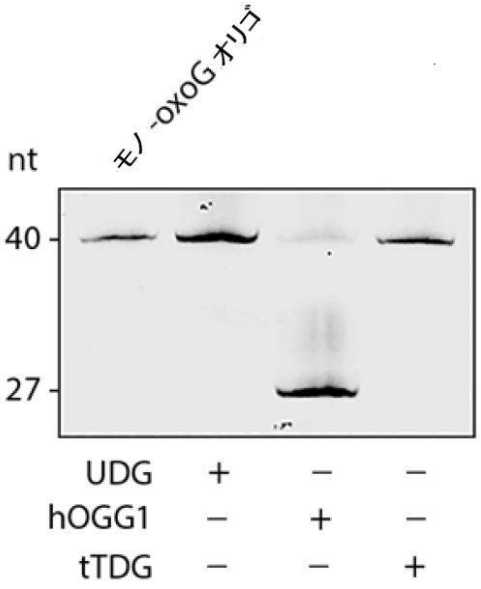


FIG. 4B

【図４Ｃ】

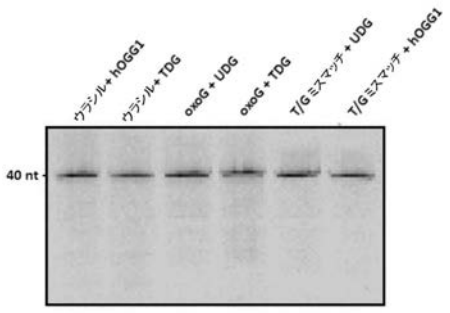


FIG. 4C

【図５】

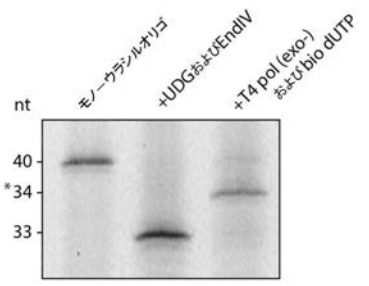


FIG. 5

【図６Ａ】

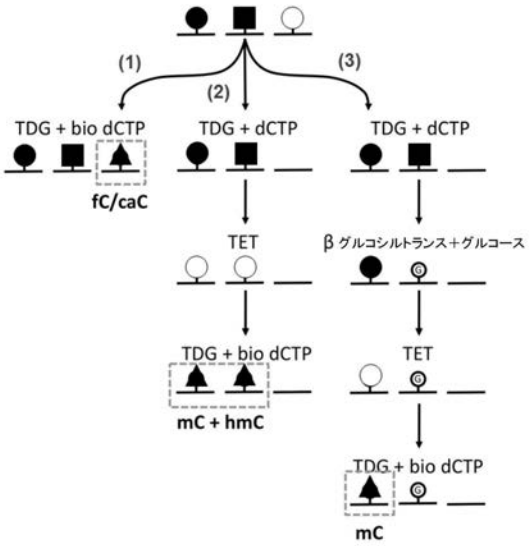


FIG. 6A

【図６Ｂ】

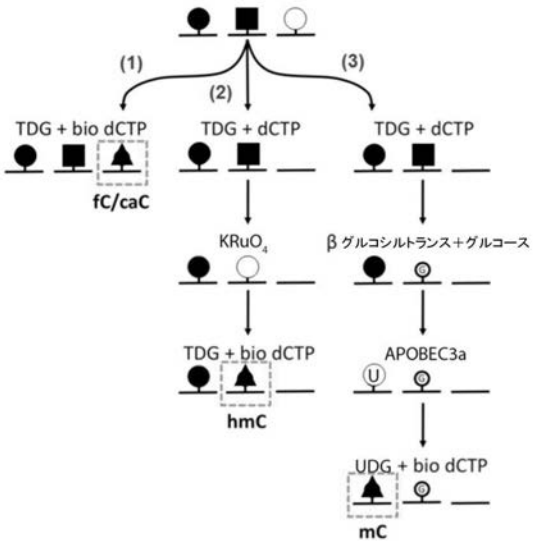


FIG. 6B

【図７】

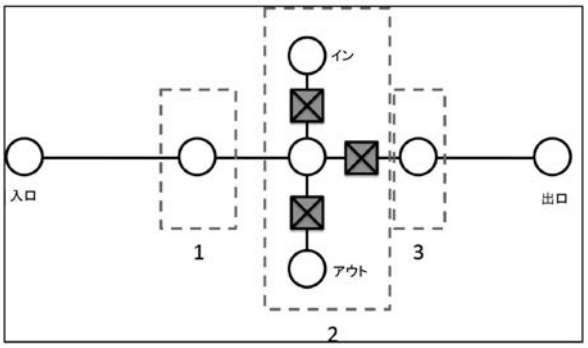


FIG. 7

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2016/032029

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - C07H 21/04; C12M 1/00; C12P 19/34; C12Q 1/68 (2016.01)
CPC - B01L 3/5027; B01L 2300/0861; C12Q 1/68 (2016.05)
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)
IPC - C07H 21/04; C12M 1/00; C12P 19/34; C12Q 1/68
CPC - B01L 3/5027; B01L 2300/0861; C12Q 1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC - 435/6; 435/91.1; 435/287.2 (keyword delimited)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PatBase, Google Patents, Google Scholar, Google

Search terms used: modified base abasic apurinic apyrimidinic DNA glycosylase DNA polymerase

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X – Y	WO 2015/015175 A1 (ATLAS GENETICS LIMITED) 05 February 2015 (05.02.2015) entire document	44 --- 45
X	US 2006/0068415 A1 (JONES et al) 30 March 2006 (30.03.2006) entire document	39, 40
X	CARLSEN et al. "Selective detection and quantification of modified DNA with solid-state nanopores," Nano Lett. 29 May 2014 (29.05.2014), Vol. 14, Pgs. 5488-92. entire document	41, 43
Y	US 2014/0361995 A1 (HEWLETT-PACKARD DEVELOPMENT COMPANY, PC) 11 December 2014 (11.12.2014) entire document	45
Y	US 2013/0004956 A1 (LANDERS et al) 03 January 2013 (03.01.2013) entire document	45
A	SCHERMERHORN et al. "A chemical and kinetic perspective on base excision repair of DNA," Acc Chem Res, 19 March 2014 (19.03.2014), Vol. 47, Pgs. 1238-46. entire document	1-3, 15-24, 26-45
A	NIKIFOROV et al. "Fluorogenic DNA ligase and base excision repair enzyme assays using substrates labeled with single fluorophores," Anal Biochem, 28 February 2015 (28.02.2015), Vol. 477, Pgs. 69-77. entire document	1-3, 15-24, 26-45

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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 application or patent 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
19 July 2016	18 AUG 2016
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2016/032029

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

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

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

3. ☒ Claims Nos.: 4-14, 25
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

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

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	***9/24***	***(2006.01)***	Ｇ０１Ｎ	33/50	Ｐ	
Ｃ１２Ｎ	***1/00***	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｎ	9/24		
			Ｃ１２Ｎ	1/00	Ａ	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,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,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,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,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74)代理人 100181641
弁理士 石川 大輔
(74)代理人 230113332
弁護士 山本 健策
(72)発明者 ハル, アダム アール.
アメリカ合衆国 ノースカロライナ ２７１０１, ウィンストン－セイレム, ノース パターソン アベニュー ５７５, スイート １２０

Ｆターム(参考) 2G045 AA25 DA13
4B050 CC07 LL03
4B063 QA18 QA19 QQ42 QQ52 QQ58 QR08 QR32 QR35 QS34 QX02
4B065 AA90X BB40 BC50 BD50 CA46
4C084 AA11 AA17 NA05 ZB261 ZB262