

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810008337.1

[43] 公开日 2008 年 9 月 3 日

[11] 公开号 CN 101255476A

[22] 申请日 2008.2.26

[21] 申请号 200810008337.1

[30] 优先权

[32] 2007. 2. 28 [33] JP [31] 2007 - 050748

[71] 申请人 希森美康株式会社

地址 日本兵库县神户市中央区脇浜海岸通 1
丁目 5 番 1 号

[72] 发明人 梶田昌裕 酒井绫子 山本宪明
石原英干

[74] 专利代理机构 北京金之桥知识产权代理有限公司

代理人 梁朝玉 刘良勇

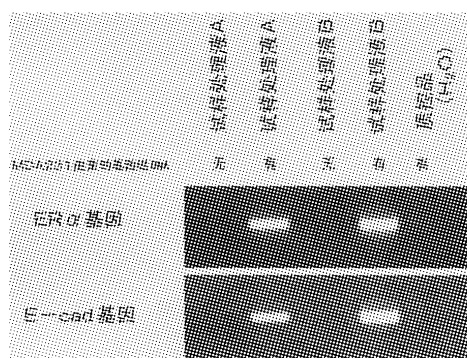
权利要求书 2 页 说明书 19 页 附图 3 页

[54] 发明名称

用于制备检测 DNA 甲基化试样的试样处理液
和试剂盒

[57] 摘要

本发明提供一种可以获得稳定的 DNA 甲基化检测结果、前处理简便易行、含有蛋白酶和水性溶剂的、用于制备 DNA 甲基化检测用试样的试样处理液和试剂盒、使用该试样处理液和该试剂盒的试样制备方法和 DNA 甲基化检测方法。



1. 一种用来制备 DNA 检测用试样的试样处理液，其特征在于：所述试样处理液含有蛋白酶和水性溶剂。

2. 如权利要求 1 所述的试样处理液，其特征在于：还含有表面活性剂和/或离液剂。

3. 如权利要求 2 所述的试样处理液，其特征在于：表面活性剂是选自十二烷基硫酸钠、十四烷基硫酸钠、十二(烷)磺酸钠、十四烷基磺酸钠、胆酸钠、脱氧胆酸钠、牛磺胆酸钠和牛磺脱氧胆酸钠中的至少一种。

4. 如权利要求 2 所述的试样处理液，其特征在于：离液剂是选自硫氰酸胍、硫氰酸钠、盐酸胍、碘化钠、碘化钾和尿素中的至少一种。

5. 如权利要求 1~4 中任一项所述的试样处理液，其特征在于：其中还含有可以切断 DNA 的切断剂。

6. 如权利要求 1~4 中任一项所述的试样处理液，其特征在于：其 pH 值为 7~10。

7. 一种制备 DNA 甲基化检测用试样的试剂盒，其包括：
由权利要求 1~4 其中任一所述的试样处理液构成的第一试剂；

含将 DNA 所含非甲基化胞核嘧啶诱变为其他碱基的诱变剂的第二试剂。

8. 如权利要求 7 所述的试剂盒，其特征在于：所述诱变剂为重亚硫酸盐。

9. 如权利要求 8 所述的试剂盒，其特征在于：所述重亚硫酸盐的浓度为 3~10M。

10. 一种 DNA 甲基化检测用试样的制备方法，包括：
混合步骤，将含有蛋白酶和水性溶剂的试样处理液和含有细胞的生物样本混合；

诱变步骤，在所得混合液中加入可使 DNA 所含非甲基化胞核嘧啶转换成其他碱基的诱变剂，将混合液中的 DNA 所含非甲基化胞核嘧啶转换成其他碱基。

11.如权利要求 10 所述的方法，其特征在于：所述生物样本为血清、血浆、生物组织或乳腺分泌液。

12.如权利要求 10 或 11 所述的方法，其特征在于：所述细胞为肿瘤细胞。

13.如权利要求 10 或 11 所述的方法，其特征在于：还包括溶解步骤，即在混合试样处理液和生物样本之前，先用含表面活性剂和/或离液剂的溶解液溶解含细胞的生物样本。

14.一种 DNA 甲基化检测方法，包括：

混合步骤，将含有蛋白酶和水性溶剂的试样处理液和含有细胞的生物样本混合；

诱变步骤，在所得混合液中加入可使 DNA 所含非甲基化胞核嘧啶诱变为其他碱基的诱变剂，将混合液中的 DNA 所含非甲基化胞核嘧啶变为其他碱基；

检测步骤，用在诱变步骤中获得的 DNA 甲基化检测试样和与诱变步骤前混合液中的 DNA 一定区域杂交的多核甙酸检测 DNA 甲基化检测试样中所含 DNA 的甲基化。

15.如权利要求 14 所述的方法，其特征在于：所述的 DNA 一定区域是含有基因 CpG 岛的区域。

16. 一种试样处理液作为制备检测 DNA 甲基化试样的应用，其特征在于：所述的试样处理液中包含有蛋白酶和水性溶剂。

用于制备检测 DNA 甲基化试样的试样处理液和试剂盒

技术领域：

本发明涉及一种用于制备检测 DNA 甲基化试样的试样处理液和试剂盒。也就是说，本发明涉及一种使用该试样处理液和试剂盒的试样制备方法和 DNA 甲基化检测方法。

背景技术：

在高等真核生物的染色体 DNA 中，有时在构成 DNA 的碱基中，C(胞核嘧啶)5'端受到甲基化修饰。高等真核生物中的 DNA 甲基化与原核生物不同，作为遗传信息的表达抑制机构发挥着功能。比如当含有大量某种基因的 CpG 区域(CpG 岛、CG 岛)甲基化时，其基因的转录受到抑制。相反，当 CpG 岛没有甲基化时，转录基因可结合到启动子区，基因处于可转录状态。如此，DNA 甲基化是基因表达的调控机构之一，对早期胚胎发育、组织变异的基因表达、哺乳动物特有现象的基因印记和 X 染色体失活、染色体稳定化、DNA 复制的时机等种种生理和病理现象起着重要作用。近年来，人们越来越明白，这种 DNA 的甲基化强烈地干预癌症和其他疾病。

作为 DNA 甲基化的分析方法，一般都使用甲基化特异 PCR(Methylation specific Polymerase Chain Reaction、以下称“MS-PCR”)。(James G. HERMAN et al., Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.93, pp.9821-9826, September 1996)。过去使用的这种方法(以下称“标准法”)分四个步骤进行：

- 1) 从生物样本中提取基因组 DNA(约 3 小时)
- 2) 用重亚硫酸盐修饰提取的基因组 DNA(约 16 小时)

3) 纯化修饰的基因组 DNA(约 1 小时), 及

4) PCR 反应(约 2 小时)

如此, 标准法非常费时(合计约 22 小时)。问题是尤其 PCR 反应之前的生物样本的前处理(制备 DNA 甲基化检测用试样)很复杂, 仅前处理(上述 1~3)就需要约 20 小时。

为了缩短长时间的前处理时间, 有人提议用高浓度重亚硫酸盐进行上述 2)的重亚硫酸盐修饰(Masahiko SHIRAISHI and Hikoya HAYATSU, High-Speed Conversion of Cytosine to UraCil in Bisulfite Genomic Sequencing Analysis of DNA Methylation, DNA RESEARCH 11, 409-415 (2004))。用此方法(以下称“快速法”)的话, 用标准法约需 16 小时, 用重亚硫酸盐修饰只需 20 分钟即可。因此, 前处理时间从约 20 小时缩短为约 4 小时。然而, 用此快速法前处理也要约 4 小时。

日本专利公开第 2005-058217 号公报公开了一种甲基化 DNA 检测方法, 是用含有异硫氰酸胍、碘化钠、尿素和 SDS 等蛋白质变性剂的溶液溶解微量的细胞标本, 用上述标准法的重亚硫酸盐处理液处理。

发明内容:

本发明的范围只由后附权利要求书所规定, 在任何程度上都不受这一节发明内容的陈述所限。

本发明人等发现专利公开第 2005-058217 号公报上公开的方法有以下几个问题:

1) 当生物样本蛋白质含量多时, DNA 甲基化的检测结果不稳定;

2) 使用高浓度重亚硫酸盐的快速法, 因进行重亚硫酸盐处理的试样的蛋白质会发生盐析, 故检测结果也不稳定。

因此，本发明的目的是提供一种用于制备 DNA 甲基化检测用试样的试样处理液和试剂盒、使用该试样处理液和该试剂盒的试样制备方法和 DNA 甲基化检测方法，这种方法可以在 DNA 甲基化检测中得出稳定的检测结果，并且前处理简便易行。

本发明人发现，用含有蛋白酶和水性溶剂的试样处理液处理生物样本，可以获得稳定的 DNA 甲基化检测结果，从而完成了本项发明。

即，本发明提供：

一种用来制备 DNA 检测用试样的试样处理液，其特征在于：所述试样处理液含有蛋白酶和水性溶剂。

所述的试样处理液还含有表面活性剂和/或离液剂。

所述的试样处理液表面活性剂是选自十二烷基硫酸钠、十四烷基硫酸钠、十二(烷)磺酸钠、十四烷基磺酸钠、胆酸钠、脱氧胆酸钠、牛磺胆酸钠和牛磺脱氧胆酸钠中的至少一种。

所述的试样处理液的离液剂是选自硫氰酸胍、硫氰酸钠、盐酸胍、碘化钠、碘化钾和尿素中的至少一种。

所述的试样处理液中还含有可以切断 DNA 的切断剂。

所述的试样处理液，其 pH 值为 7~10。

本发明还提供一种制备 DNA 甲基化检测用试样的试剂盒，其包括：由权利要求 1~4 其中任一所述的试样处理液构成的第一试剂；含将 DNA 所含非甲基化胞核嘧啶诱变为其他碱基的诱变剂的第二试剂。

所述的试剂盒的所述诱变剂为重亚硫酸盐。所述重亚硫酸盐的浓度为 3~10M。

本发明又提供一种 DNA 甲基化检测用试样的制备方法，包括：

混合步骤，将含有蛋白酶和水性溶剂的试样处理液和含有细胞的生物样本混合；

诱变步骤，在所得混合液中加入可使 DNA 所含非甲基化胞核嘧啶转换成其他碱基的诱变剂，将混合液中的 DNA 所含非甲基化胞核嘧啶转换成其他碱基。

所述的方法中所述生物样本为血清、血浆、生物组织或乳腺分泌液。所述细胞为肿瘤细胞。

所述的方法，还包括溶解步骤，即在混合试样处理液和生物样本之前，先用含表面活性剂和/或离液剂的溶解液溶解含细胞的生物样本。

本发明另提供一种 DNA 甲基化检测方法，包括：

混合步骤，将含有蛋白酶和水性溶剂的试样处理液和含有细胞的生物样本混合；

诱变步骤，在所得混合液中加入可使 DNA 所含非甲基化胞核嘧啶诱变为其他碱基的诱变剂，将混合液中的 DNA 所含非甲基化胞核嘧啶变为其他碱基；

检测步骤，用在诱变步骤中获得的 DNA 甲基化检测试样和与诱变步骤前混合液中的 DNA 一定区域杂交的多核甙酸检测 DNA 甲基化检测试样中所含 DNA 的甲基化。

所述的 DNA 一定区域是含有基因 CpG 岛的区域。

本发明再提供一种试样处理液作为制备检测 DNA 甲基化试样的应用，其特征在于：所述的试样处理液中包含有蛋白酶和水性溶剂。

本发明能够提供一种用于制备 DNA 甲基化检测用试样的试样处理液和试剂盒、使用该试样处理液和该试剂盒的试样制备方法和 DNA 甲基化检测方法，这种方法可以在 DNA 甲基化检测中，获得稳定的检测结果，且前处理简便易行。

本发明提供的试样处理液和试剂盒以及试样制备方法和 DNA 甲基化检测方法有益于使用蛋白质含量多的生物样本的 DNA 甲基化检测。

特别是，本发明提供的试样处理液和试剂盒以及试样制备方法和 DNA 甲基化检测方法对用快速法进行 DNA 甲基化检测时有用。

本发明提供的用于 DNA 甲基化检测的试样制备方法可以简化基因组 DNA 的提取处理，从而可以在短时间内制备出 DNA 甲基化检测用试样。

本实施方式的试样制备方法前处理可以在一个容器中进行，因此不必在前处理中进行分装，从而得以减少分装时产生的试样浪费。结果是能够提高检测敏感度。

本发明提供的用于 DNA 甲基化检测的试样制备方法还步骤少，简便易行，因此，此方法适于仪器的自动化。

附图说明：

图 1 为用于制备 DNA 甲基化检测试样的试剂盒的示意图。

图 2 为用试样处理液 A、试样处理液 B 和质控品检测 ER α 基因和 E-Cad 基因的 CpG 岛甲基化的结果的显示图。

图 3 为用试样处理液 A~F 和质控品检测 ER α 基因和 E-Cad 基因的 CpG 岛甲基化的结果的显示图。

具体实施方式：

本实施方式的用于检测 DNA 甲基化的试样(以下有时称“DNA 甲基化检测用试样”)制备方法包括：混合含蛋白酶和水性溶剂的试样处理液与含细胞的生物样本的步骤(混合步骤)和在所得混合液中添加诱变剂、使混合液中 DNA 所含非甲基化胞核嘧啶转换成其他碱基的步骤(诱变步骤)。

在本实施方式中，所谓水性溶剂指一般的水，如蒸馏水、离子交换水和纯水等。水性溶剂只要不对蛋白酶的酶反应产生负作用，也可含有有机溶液。

本实施方式中的蛋白酶只要是分解蛋白质的酶即可，无特别限制。比如可以是嗜热菌蛋白酶、高温蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、链霉蛋白酶、 α -胰凝乳蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、胃蛋白酶、纤溶酶和蛋白酶 K 等，最好是蛋白酶 K。

试样处理液中的蛋白酶浓度只要在混合步骤可以在不给诱变步骤造成不良影响的程度内分解生物样本中的蛋白质即可，无特别限定。其浓度可以因所用蛋白酶而适当选择。比如使用蛋白酶 K 时，在试样处理液中的浓度以 0.5~40mg / ml 为宜。以此浓度，在混合步骤中，生物样本中所含的蛋白质可以充分分解。因此，完全可以在诱变步骤中通过诱变剂使非甲基化的胞嘧啶转换成其他碱基。

在本实施方式中，对生物样本无特别限定，只要是采自生物、含有细胞的样品即可。比如可以是采自人等动物的淋巴结等生物组织、血液、血浆、血清、尿液、唾液、体液、乳腺分泌物、培养组织以及培养细胞等。尤以血浆、血清、生物组织和乳腺分泌物为佳。

本实施方式中的试样处理液用于从含细胞的生物样本中制备 DNA 甲基化检测用试样。试样处理液含有蛋白酶和水性溶剂。尤以含表面活性剂和/或离液剂的试样处理液为宜。

表面活性剂并无特别限定，只要可溶解细胞即可。细胞中的 DNA 由于细胞的溶化，从细胞中游离出来。这样可以更有效地在诱变步骤中将该 DNA 的非甲基化胞嘧啶转换成其他碱基。作为表面活性剂可用阴离子型表面活性剂、阳离子型表面活性剂、两性型表面活性剂和非离子型表面活性剂。特别是以阴离子型表面活性剂为宜。

作为阴离子型表面活性剂可举例如下：十二烷基硫酸钠(SDS)、十四烷基硫酸钠、十二(烷)磺酸钠、十四烷基磺酸钠、胆酸钠(CHO)、脱氧胆酸钠(DOC)、牛磺胆酸钠和牛磺脱氧胆酸钠等。特

别以十二烷基硫酸钠(SDS)为佳。因为 SDS 对蛋白质具有很高的亲和性，易于溶解细胞。

试样处理液中所含表面活性剂的浓度可根据所用表面活性剂种类适当选择，比如，试样处理液中所含阴离子型表面活性剂的浓度以 0.1~10 体积%为宜，最好为 0.5~5 体积%。这样可以充分溶解细胞。

离液剂具有破坏水分子结构稳定性的特点，作用于疏水性分子的疏水结合力很弱，凡是能够增加水溶性的东西都可，无特别限定。与表面活性剂同样，离液剂可溶解细胞。有如硫氰酸胍、硫氰酸盐、盐酸胍、碘化钠、碘化钾和尿素等。尤以盐酸胍和尿素为宜。

试样处理液中的离液剂浓度可根据所用离液剂适当选择，无特别限定。比如，使用盐酸胍作离液剂时，其在试样处理液中的浓度以 0.5~8M 为宜，1~6M 更好。当使用尿素作离液剂时，其在试样处理液中的浓度以 1~24M 为宜。以此浓度即可溶解生物样本中的细胞，使诱变步骤中的非甲基化胞核嘧啶向其他碱基的转换更有效进行。

试样处理液的 pH 值以能够促进蛋白酶的酶反应即可，并无特别限定。特别是以当与生物样本混合时能够促进细胞中所含 RNA 分解的中性到弱碱性为好。更具体地说就是以 pH7~10 为宜。试样处理液为了使上述 pH 值保持一定，还可含有众所周知的缓冲剂。

本实施方式中的混合步骤无特别限制，只要能够充分混匀生物样本和试样处理液，生物样本的蛋白质能与试样处理液中的蛋白酶反应即可。比如，混合步骤可以在 25~70℃下搅拌生物样本和试样处理液 5~120 分钟。

试样处理液的添加量可视生物样本数量和试样处理液中的蛋白酶浓度等适当调节，无特别限定。比如从以后诱变步骤中的操作性观点来看以 100~1000 μ l 为宜，200~600 μ l 更好。

在混合步骤前，也可进行溶解步骤，用含表面活性剂和/或离液剂的溶剂溶解含细胞的生物样本。这样，预先将生物样本中所含细胞溶解后再进行混合步骤，可以更好地使蛋白酶分解蛋白质。

溶解步骤无特别限定条件，只要用表面活性剂和/或离液剂能够溶解细胞即可。比如可在 25~70℃下搅拌生物样本和试样处理液 5~120 分钟。

溶剂的添加量可根据生物样本的数量和溶解液中的表面活性剂和/或离液剂浓度等适当调节，无特别限定。比如从以后诱变步骤中的操作性观点来看以 100~1000 μ l 为宜，200~600 μ l 更好。

进行诱变步骤前，也可进行物理破碎生物样本中所含细胞的破碎步骤。比如当使用切除组织等的细胞块作为生物样本时，细胞块与试样处理液或溶剂混合后，可对细胞块进行匀质化处理等。

本实施方式中的诱变步骤无特别限定，只要能在上述混合步骤中获得的混合液中添加诱变剂，将 DNA 中所含非甲基化胞核嘧啶变为其他碱基即可。从缩短反应时间的观点出发，特别推荐上述快速法。

在此所谓诱变剂可将 DNA 中所含非甲基化胞核嘧啶转换成其他碱基。即，诱变剂是将非甲基化胞核嘧啶变为胞核嘧啶以外的碱基(尿嘧啶、胸腺嘧啶、腺嘌呤或鸟嘌呤)的试剂。作为这种诱变剂最好使用重亚硫酸盐。作为重亚硫酸盐可以使用亚硫酸氢的钠盐、钾盐、钙盐、镁盐等。用其中之一以上处理 DNA，则 DNA 中的非甲基化胞嘧啶脱氨基变为尿嘧啶。另一方面，诱变剂对 DNA 中的甲基化胞嘧啶不起作用，甲基化胞嘧啶不会因诱变

剂而转变为其他碱基。此诱变剂最好溶解于溶解液中作为溶液使用。

当使用重亚硫酸盐作诱变剂时，对其添加量没有特别限定，只要能充分诱变生物样本中的 DNA 的非甲基化胞嘧啶即可。比如，1M 以上，1~15M 更好，最好是 3~10M。如在生物样本中添加 4M 重亚硫酸盐时，在 50~80℃培养 10~90 分钟非甲基化胞嘧啶即可变为尿嘧啶。如果低浓度使用重亚硫酸盐，则可以在足以使非甲基化胞嘧啶突变的时间和温度下进行诱变即可。诱变剂不限于重亚硫酸盐，只要是能够不使甲基化胞嘧啶转换而仅有选择地将非甲基化胞嘧啶变为其他碱基的物质都可。

在本实施方式中，进行诱变步骤前，还可以包含 DNA 的切断步骤。通过将生物样本中的 DNA 预先切成适当长度，将其加工成片段，可更有效地在诱变步骤对非甲基化胞嘧啶进行诱变处理。

切断 DNA 可通过超声波处理(超声波破碎)等物理处理、碱处理等化学处理、使用限制酶等的酶处理进行。特别推荐使用氢氧化钠和限制酶等可切断 DNA 的物质(以下有时称切断剂)。比如，如果使用氢氧化钠作为切断剂，则可以在混合步骤获得的混合液中添加 5~15N 的氢氧化钠溶液 5~30 μ l，在 10~40℃培养 5~15 分钟，切断 DNA。

当用化学处理法或酶处理法切断 DNA 时，也可以将碱处理所使用的物质(如氢氧化钠)或酶(如限制性内切核酸酶)作为切断剂加入试样处理液。此时，仅混合生物样本和试样处理液即可一次操作完成试样的溶解和切断步骤。因此，可以进一步缩短 DNA 甲基化检测试样的制备时间(前处理时间)。当使用氢氧化钠时，试样处理液中的氢氧化钠浓度以 0.1~1N 为宜，最好是 0.2~0.5N。切断 DNA 可以在诱变剂添加前的任何时间。

在本实施方式中，诱变步骤前还可以包括将试样中的双链 DNA 变成单链 DNA 的步骤。将双链 DNA 变成单链 DNA 可以使诱变步骤中非甲基化胞核嘧啶的转变更有效率，也可在进行后述甲基化特异 PCR 等反应时，使 DNA 聚合酶更易与 DNA 结合。从而使 DNA 甲基化检测得以更顺利地进行。

使 DNA 由双链变成单链的方法有比如使用 DNA 螺旋酶等酶的方法、提高含 DNA 溶液的温度等物理方法以及用氢氧化钠对 DNA 进行碱处理等化学方法。特别是用氢氧化钠对 DNA 进行碱处理等化学方法也可与 DNA 切断步骤同时进行，因此比较理想。

本实施方式中用于制备 DNA 甲基化检测用试样的试剂盒包括由上述试样处理液构成的第一试剂和含诱变剂的第二试剂。

本实施方式的试剂盒还可以含有上述溶解液和切断剂。此时，试样处理液、诱变剂、溶解液和切断剂可以分别盛放在不同的容器中。而且除诱变剂外，也可以放在同一容器中。比如，也可试样处理液和切断剂放在同一容器中，溶解液和诱变剂分别盛放于不同容器。

图 1 所示为试剂盒一例。图 1 所示试剂盒有第一试剂和第二试剂。由试样处理液 1 构成的第一试剂盛放在试剂容器 2 中。由诱变剂 3 构成的第二试剂盛放在试剂容器 4 中。如上所述，还可准备盛放溶解液和切断剂的试剂容器。

本实施方式的检测生物样本中的 DNA 甲基化的方法除上述 DNA 甲基化检测用试样的制备方法外，还包括用杂交于诱变步骤前的 DNA 一定区域的多核甙酸检测 DNA 甲基化检测用试样中的 DNA 甲基化步骤(检测步骤)。

检测步骤最好还用杂交于一定区域的 DNA 内的非甲基化胞核嘧啶诱变为其他碱基后的一定区域的多核甙酸检测 DNA 的甲基化。以此可以提高检测结果的可靠性。

用上述试样制备方法制备的试样中所含的 DNA 中含有由诱变剂从非甲基化胞嘧啶诱变出的其他碱基和 5-甲基化胞核嘧啶。为了区分这些诱变产生的其他碱基和 5-甲基化胞核嘧啶，可以对该试样进行 DNA 扩增、检测或二者都用，确定 DNA 一定区域的甲基化状态。

DNA 甲基化的检测是用特异性杂交于非甲基化胞核嘧啶诱变为其他碱基之前的 DNA 序列(以下称未诱变序列)的多核甬酸和特异性杂交于根据需要进行诱变后的 DNA 序列(以下称诱变序列)的多核甬酸进行的。以该多核甬酸为引物进行 PCR 和 LAMP 等核酸扩增，即可检测甲基化。也可以用将该多核甬酸固定于基板形成的 DNA 芯片检测甲基化。

如：用与转变为甲基化或非甲基化其中之一的 DNA 特异性杂交的 PCR 引物进行甲基化特异性的 PCR(MS-PCR)、重亚硫酸盐基因组测序、结合重亚硫酸盐的限制性内切酶法(COBRA, Combined Bisulfite Restriction Analysis)、甲基化敏感性单核苷酸引物延伸(Ms-SnuPE, Methylation-sensitive Single-Nucleotide Primer Extension)等。也可以用上述多核甬酸通过 LAMP 法(参照 USP6410278 号)检测甲基化。

使用 MS-PCR 法时，具体来说可如下检测甲基化。

1)将从生物样本制备的 DNA 甲基化检测用试样分装入二个试管(设其为 DNA 甲基化检测用试样 1 和 DNA 甲基化检测用试样 2)。

2)在 DNA 甲基化检测用试样 1 中加入与诱变序列特异性杂交的多核甬酸、DNA 聚合酶和 dNTPs(dATP、dGTP、dTTP 及 dCTP)，配制 PCR 反应液 1。

3)在 DNA 甲基化检测用试样 2 中添加与非诱变序列特异性杂交的多核甬酸、DNA 聚合酶和 dNTPs(dATP、dGTP、dTTP 及 dCTP)，配制 PCR 反应液 2。

4)用 PCR 反应液 1 和 2 进行 PCR。

5)通过琼脂糖凝胶电泳等后续检测方法确认目标序列是否扩增。

当 5)的结果是在 PCR 反应液 1 中确认 DNA 扩增，而在 PCR 反应液 2 中未确认 DNA 扩增时，说明多核甙酸杂交的区域未甲基化。相反，当在 PCR 反应液 1 中未确认 DNA 扩增，而在 PCR 反应液 2 中确认 DNA 扩增时，则说明多核甙酸杂交的区域已甲基化。

检测扩增后的 DNA 的方法无特别限定，可以用众所周知的方法检测。比如可以用：琼脂糖凝胶电泳法、使用荧光标记的探针进行检测的实时检测法(在此情况下，上述 4)和 5)可同时进行)、测定 DNA 合成时的副产品(焦磷酸镁)的混浊度(浊度)的浊度测定法、根据需要确认酶切类型或直接测序来确定碱基序列的方法等。当非特异性扩增条带过多，特异条带难以识别时，可以通过使用目标扩增区域内的探针的核酸杂交技术等确认特异带。

在此，上述多核甙酸可以作为引物发挥作用，是可与修饰型或非修饰型 DNA 的互补链进行序列特异性杂交(退火)的、直线形单链的低聚物 DNA 或 RNA，具有适当序列和充分长度以供在扩增过程中引起特异性且高效的重合反应(引物延伸)。引物长度无特别限定，当用于 PCR 时，以 5~50mer 为宜，10~30mer 更好。引物最好是单链结构，但如果链一开始就分离的话，也可以使用双链结构。引物可用任意适当方法、如常用的磷酸三酯法和磷酸二酯法或业界公认的自动化方法配制。

所用引物最好设计得与上述 DNA 的一定区域实际上互补，且含有适量 GC。即，上述多核甙酸在上述诱变步骤后特别识别未处理或未修饰 DNA、甲基化 DNA 和非甲基化 DNA。正向引物中没有 C，反向引物中没有 G，所以通常本发明方法中使用的低聚甙酸引物其序列中含有较少量的 C 或 G。

在此，就诱变步骤中使用重亚硫酸盐作为诱变剂的情况作一说明。在第二步骤中，非甲基化胞嘧啶会因重亚硫酸盐而转变为尿嘧啶，但 5-甲基化胞嘧啶不转变，原样保留。因此，以含有转变的尿嘧啶(非甲基化)的基因组 DNA 为模具，用杂交于有尿嘧啶的位点的多核甙酸进行核酸扩增，生成扩增产物，而杂交于含有 5-甲基化胞嘧啶的位点的多核甙酸则不扩增，不能生成产物。另一方面，有 5-甲基化胞嘧啶(甲基化)的基因组 DNA 用杂交于有尿嘧啶的位点的多核甙酸不扩增，也没有生成物，但用杂交于含有 5-甲基化胞嘧啶的位点的多核甙酸则扩增并有生成物。用琼脂糖凝胶电泳法检测此生成物，即可分析 DNA 的一定区域是否甲基化。

在本实施方式中，作为 DNA 的一定区域可以是生物样本中所含 DNA 的所希望的任何区域，并无特别限定，但以基因的 CpG 岛为宜。CpG 岛是与基因转录相关的 DNA 序列，主要在基因外显子的上游区域(启动子区)，有时也存在于内含子和外显子。当 CpG 岛甲基化时，表示基因的转录得到抑制，当未甲基化时，转录因子可结合到启动子区，故表示该基因已转录或可转录。

在此，作为基因最好是选自由抑癌基因、癌基因和编码肿瘤标记的基因(以下称肿瘤标记基因)构成的族群中的至少一个。抑癌基因有：RB1(视网膜母细胞瘤蛋白质：Retinoblastoma 1 protein)基因、RRCA1 基因、APC(结肠腺瘤性息肉病：Adenomatous polyosis of the Colon)基因、p53 基因、p16 基因、p15 基因、ER α (雌激素受体 1：Estrogen ReCeptor 1)基因、E-Cad(E-钙粘蛋白)基因、VHL(von Hippel-Lindau 病)基因、RASSF1A(RASassoCiation domain family protein)基因等。作为癌基因有：RAS 基因、RAF 基因、MYC 基因等。作为肿瘤标记基因有：CEA(癌胚抗原：CarCinoembryoniC antigen-related Cell adhesion moleCule 5)基因、PSA(前列腺特异抗原：Prostate

speCifiC antigen)基因、CA15-3 基因、EpCAM(Epithelial Cellular adhesion moleCule)基因等。

用本实施方式的 DNA 甲基化检测方法检测这些基因的 CpG 岛甲基化可以应用于预测患病危险和药物敏感性等的基因检查。

比如,当一定肿瘤细胞的抑癌基因的 CpG 岛甲基化时及/或癌基因的 CpG 岛未甲基化时,可以判断该肿瘤细胞为恶性。

当将抗癌药等药物排出细胞外的基因和分解药物的基因的 CpG 岛甲基化时,可以判断此细胞耐药性低,即对此药物敏感。

检测一定肿瘤细胞的肿瘤标记基因的 CpG 岛甲基化还可确认肿瘤的种类(确认原发灶)。

用不明是否存在癌细胞的生物样本检测上述基因的 CpG 岛甲基化,可以判断该生物样本中是否含有肿瘤细胞,可以进行肿瘤的早期发现和患肿瘤的风险诊断等。

当如此应用于患病风险和药物敏感性的预测等基因检查时,多使用从患者采集的血清和组织等蛋白质含量高的生物样本。因此,用过去那种仅用蛋白质变性剂制备的检测用试样进行 DNA 甲基化检测,很可能无法获得充分的检测结果。要迅速检查基因而使用快速法更难充分取得检查结果。因此,运用 DNA 甲基化检测的基因检查很难应用于临床。

本实施方式的 DNA 甲基化检测方法可以通过快速简便的操作取得稳定的检测结果。因此,很适于应用于上述那种基因检查等临床检查。用快速简便的本发明方法可以加快有关 DNA 甲基化的研究速度。

实例

〈生物样本的制备〉

在 1ng 的来源于人乳癌由来的培养细胞 MDA231 的基因组 DNA 中添加 300 μ l 人血清,作为生物样本。质控品使用不含来源于 MDA231 的基因组 DNA、只含 300 μ l 人血清的生物样本。

〈试样处理液的制备〉

如下所示，制备试样处理液 A~F。质控品使用 320 μ l 蒸馏水。

试样处理液 A：

将最终浓度 4M 的尿素水溶液 300 μ l 与 20mg/ml 蛋白酶 K 水溶液 20 μ l 混匀，得 320 μ l 试样处理液 A。

试样处理液 B：

将最终浓度 4M 的盐酸胍水溶液 300 μ l 与 20mg/ml 蛋白酶 K 水溶液 20 μ l 混匀，得 320 μ l 试样处理液 B。

试样处理液 C：

将最终浓度 1%的 SDS 水溶液 300 μ l 与 20mg/ml 蛋白酶 K 水溶液 20 μ l 混匀，得 320 μ l 试样处理液 C。

试样处理液 D：

将最终浓度 1%的 SDS 水溶液 300 μ l 与蒸馏水 20 μ l 混匀，得 320 μ l 试样处理液 D。

试样处理液 E：

将最终浓度 4M 的尿素水溶液 300 μ l 与蒸馏水 20 μ l 混匀，得 320 μ l 试样处理液 E。

试样处理液 F：

将最终浓度 4M 的盐酸胍水溶液 300 μ l 与蒸馏水 20 μ l 混匀，得 320 μ l 试样处理液 F。

〈DNA 甲基化检测的操作顺序〉

用制备的试样处理液 A~F 按以下操作顺序进行人乳癌由来的培养细胞 MDA231 的 ER α 基因和 E-Cad 基因的 CpG 岛甲基化检测。

1)混匀生物样本和试样处理液 A~F 中的某一个，50℃搅拌 1 小时。

2)添加 10N NaOH 水溶液 20 μ l，37℃培养 10 分钟。

3)添加 10M 亚硫酸氢钠水溶液 600 μ l, 80℃培养 40 分钟。

4)用 DNA 纯化试剂盒(QIAGEN 公司制 QIAquick(商品名))回收经重亚硫酸盐处理过的基因组溶液(DNA 甲基化检测用试样)。

5)用回收的 DNA 甲基化检测用试样 2.0 μ l 进行 PCR 反应。反应后的反应液在 4℃下保存。

6)将 PCR 反应后的反应液放入 2%琼脂糖凝胶的池中, 进行电泳反应。

7)用溴化乙锭对电泳后的琼脂糖凝胶进行染色, 分别确认 ER α 基因和 E-Cad 基因带。

〈PCR 反应液的制备〉

混合上述操作步骤 4)回收的 DNA 甲基化检测用试样 2.0 μ l 和以下物质, 制备上述操作步骤 5)PCR 反应所用的 PCR 反应液 25 μ l。

10 $\times$ PCR 缓冲液(2.5 μ l)

2.5mM dNTP(2 μ l)

10 μ M 正向引物(1.0 μ l)

10 μ M 反向引物(1.0 μ l)

FastStart Taq DNA 聚合酶 (0.2 μ l RoChe 12032902001)

水(16.3 μ l)

作为 ER α 基因 CpG 岛的甲基化检测用引物使用的是以下序列 1 和 2 所示对非诱变序列有特异性的引物对(以下称甲基化引物对)。

〈甲基化引物对〉

正向引物: TTTTGGGATTGTATTTGTTTTTCGTC(序列号 1)

反向引物: AACAAAATACAAACCGTATCCCCG(序列号 2)

用为上述 ER α 基因 CpG 岛的甲基化检测而制备的 PCR 反应液在以下条件进行 PCR 反应。

95℃ 9.5 分

以下操作反复 45 遍

- i) 95℃、30 秒
- ii) 60℃、15 秒
- iii) 72℃、30 秒

作为 E-Cad 基因 CpG 岛的甲基化检测用引物，使用了以下甲基化引物对。

〈甲基化引物对〉

正向引物：5'-TTAGGTTAGAGGGTTATCGCGT-3'(序列号 3)

反向引物：5'-TAACTAAAAATTACCTACCGAC-3'(序列号

4)

用为上述 E-Cad 基因 CpG 岛的甲基化检测而制备的 PCR 反应液在以下条件进行 PCR 反应。

95℃ 9.5 分

以下操作反复 45 遍

- i) 95℃、30 秒
- ii) 60℃、15 秒
- iii) 72℃、30 秒

(实例 1)

图 2 所示为使用试样处理液 A、试样处理液 B 和质控品时的甲基化 DNA 的检测结果。如图 2 所示，用含有作为蛋白酶的蛋白酶 K 和作为离液离子的尿素或盐酸胍的试样处理液 A 和试样处理液 B，ER α 基因和 E-Cad 基因都能够检测出甲基化 DNA，但用作为质控品的蒸馏水却不能检测出甲基化 DNA。关于不含来源于 DMA231 的基因组 DNA 的生物样本，试样处理液 A 和试样处理液 B 都未检测出甲基化 DNA。

(实例 2)

图 3 所示为使用试样处理液 A~F 和质控品对含有来源于 DMA231 的基因组 DNA 的生物样本进行甲基化 DNA 检测的结

果。如图 3 所示，用含有作为蛋白酶的蛋白酶 K 的试样处理液 A~C，ER α 基因和 E-Cad 基因都能够检测出甲基化 DNA，但使用不含蛋白酶 K 的试样处理液 D~F 却和质控品一样，检测不出甲基化 DNA。

从以上结果可以看出，当使用含有高浓度蛋白质的血清的生物样本时，用仅含表面活性剂和离液剂(SDS、尿素和盐酸胍)的试样处理液不能充分得到 DNA 甲基化的检测结果。而且还可以看出，试样处理液含有蛋白酶可以获得稳定的 DNA 甲基化检测结果。

前述的详细说明及附图是通过文字解释和图示来进行的，其目的不在于限定权利要求的保护范围。本说明书中的具体实施方式的各个变种对于普通技术人员来说显而易见，并处于权利要求及其等同技术的保护范围内。

序列表

<110>	希森美康	
<120>	用于制备检测DNA甲基化试样的试样处理液和试剂盒	
<160>	4	
<170>	PatentIn, version 3.1	
<210>	1	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物序列	
<400>	1	
	ttttgggatt gtatttgttt tcgtc	25
<210>	2	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物序列	
<400>	2	
	aacaaaatac aaaccgtatc cccg	24
<210>	3	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物序列	
<400>	3	
	ttaggttaga gggttatcgc gt	22
<210>	4	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物序列	
<400>	4	
	taactaaaaa ttcacctacc gac	23

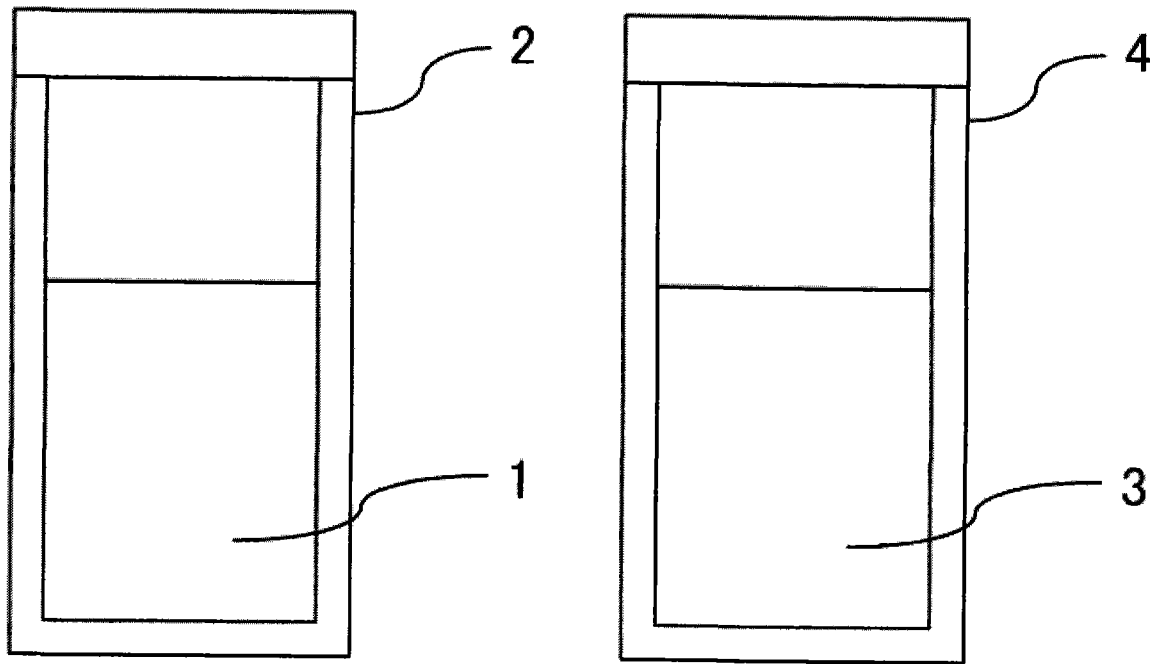


图. 1

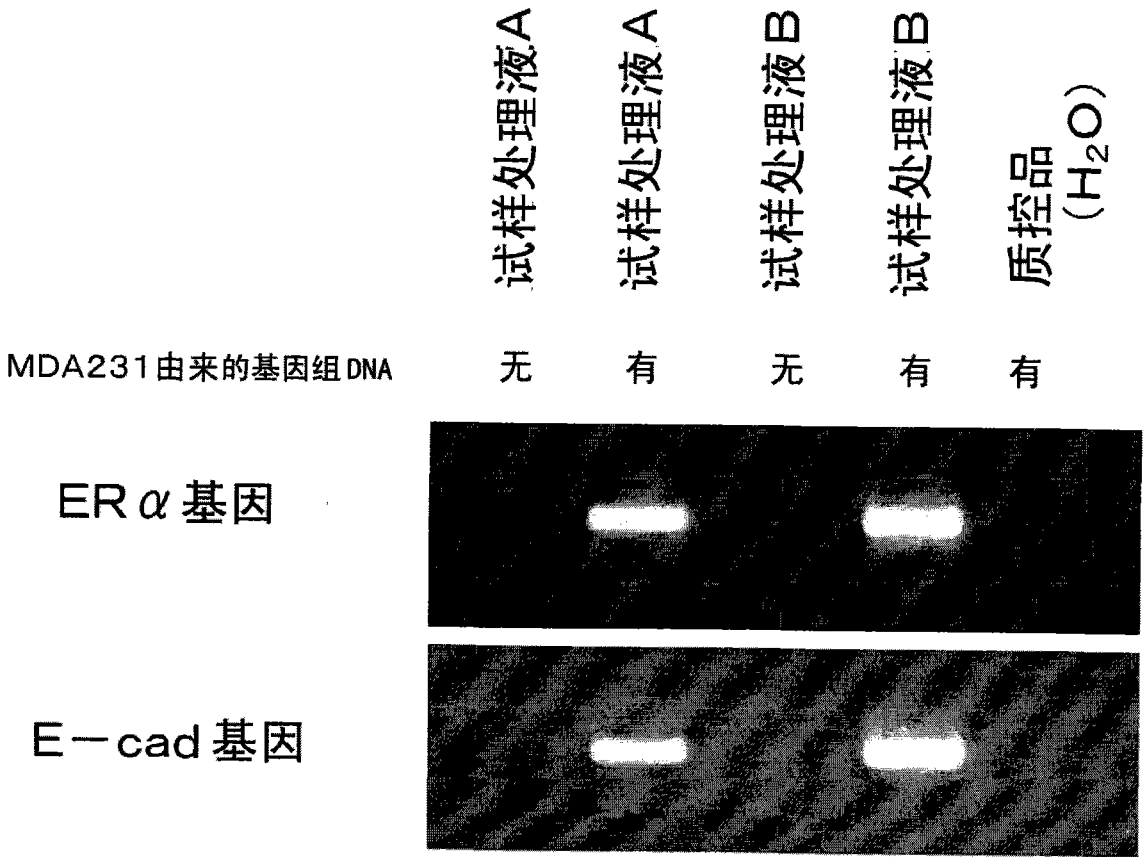


图. 2

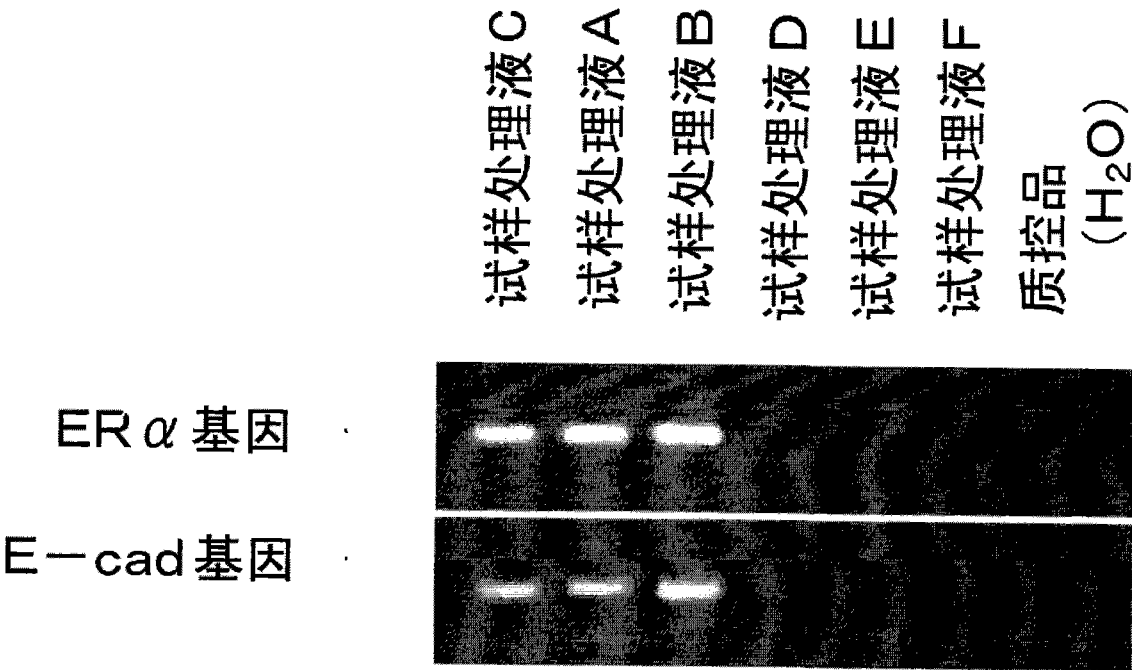


图. 3