

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4714148号
(P4714148)

(45) 発行日 平成23年6月29日 (2011.6.29)

(24) 登録日 平成23年4月1日 (2011.4.1)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 Z N A A

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 40 (全 28 頁)

(21) 出願番号 特願2006-525009 (P2006-525009)
 (86) (22) 出願日 平成16年9月3日 (2004.9.3)
 (65) 公表番号 特表2007-503819 (P2007-503819A)
 (43) 公表日 平成19年3月1日 (2007.3.1)
 (86) 国際出願番号 PCT/AU2004/001196
 (87) 国際公開番号 W02005/024053
 (87) 国際公開日 平成17年3月17日 (2005.3.17)
 審査請求日 平成19年8月13日 (2007.8.13)
 (31) 優先権主張番号 2003904832
 (32) 優先日 平成15年9月4日 (2003.9.4)
 (33) 優先権主張国 オーストラリア (AU)

(73) 特許権者 505188906
 ヒューマン ジェネティック シグネチャ
 ーズ ビーティーワイ リミテッド
 オーストラリア国, ニュー サウス ウェ
 ールズ 2113, ノース ライド, ジュ
 リアス アベニュー 11, レベル 4,
 リバーサイド コーポレート パーク
 (74) 代理人 100079108
 弁理士 稲葉 良幸
 (74) 代理人 100093861
 弁理士 大賀 眞司
 (74) 代理人 100109346
 弁理士 大賀 敏史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸検出アッセイ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ゲノム核酸におけるメチル化候補部位のメチル化状態を判定するための方法であって、
 メチル化候補部位を含むゲノム核酸の2本の相補鎖から修飾核酸鋳型を形成する条件下で、
 シトシン塩基を修飾するが5 - メチルシトシン塩基を修飾しない作用物質でゲノム核酸
 を処理する工程と；

前記修飾核酸鋳型の第1鎖におけるメチル化候補部位の一方側に隣接する領域に相補的
 な第1捕捉配列と、前記修飾核酸鋳型の第2鎖におけるメチル化候補部位の一方側に隣接
 する領域に相補的な第2捕捉配列と、を含む第1クランプを提供する工程と；

前記修飾核酸鋳型におけるメチル化候補部位の他方側に隣接する領域に相補的な第3捕
 捉配列を含む第2クランプを提供する工程と；

前記第1クランプおよび前記第2クランプが前記修飾核酸鋳型にハイブリダイズするこ
 とを可能にする工程と；

前記ハイブリダイズした第1および第2クランプをライゲートすることで前記修飾核酸
 鋳型におけるメチル化候補部位をまたぐプローブを形成する工程と；

前記修飾核酸鋳型を消化することで前記プローブを得る工程と；

前記プローブを検出して前記修飾ゲノム核酸におけるメチル化候補部位のメチル化状態
 を判定する工程と、を含む、方法。

【請求項 2】

前記第1クランプおよび前記第2クランプは、前記クランプをライゲートすることで前

10

20

記修飾核酸鋳型におけるメチル化候補部位をまたぐプローブを形成するのに先立って、前記第 1 クランプと前記第 2 クランプの間に少なくとも 1 つの塩基が挿入されるように前記修飾核酸鋳型にハイブリダイズする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記メチル化候補部位は、3' 側にグアニン (G) が隣接したシトシン (C) である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記修飾用の作用物質は、重亜硫酸塩である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記修飾用の作用物質は、重亜硫酸ナトリウムである、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記第 1 または第 2 クランプのうちの少なくとも 1 つは、前記ライゲーション工程後に前記プローブの増幅を可能にするユニバーサルプライマーを含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記第 1 または第 2 クランプのうちの少なくとも 1 つは、前記プローブの捕捉を可能にする捕捉部位を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記第 1 または第 2 クランプのうちの少なくとも 1 つは、切断可能部位を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記切断可能部位は、ヌクレアーゼ制限部位である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記切断可能部位は、ウラシル塩基である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記第 1 または第 2 クランプの相補配列は、ライゲートされる際に前記修飾核酸鋳型上のメチル化候補部位をまたぐ、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

前記クランプは、一本鎖核酸をライゲート可能な適切な酵素を用いてライゲートされる、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

前記クランプは、前記第 1 および第 2 捕捉配列の位置またはその付近でライゲートされる、請求項 1 および 3 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

核酸ポリメラーゼによって 1 つまたは複数の塩基が前記クランプの間に挿入される、請求項 2 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

塩基挿入反応は、1 種類のヌクレオチドの存在下で実施され、特定の塩基の挿入が前記修飾核酸鋳型上の相補的塩基を同定することになるように、各種のヌクレオチドが別々に反応させられる、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記修飾核酸鋳型は、酵素によって消化される、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

前記酵素は、ウラシル N DNA グリコシラーゼである、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記第 1 クランプと第 2 クランプとの間における欠落していた塩基の組み込みを認識可能な、または前記プローブの特異的な増幅を検出可能な検出系によって、前記プローブが検出され、且つ修飾された前記ゲノム核酸における前記メチル化候補部位のメチル化状態

10

20

30

40

50

が判定される、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 19】

前記検出系は、アレイによるハイブリダイゼーションと、サザンブロット型検出と、リアルタイム PCR 定量と、蛍光ビーズと、酵素共役と、放射性ビーズと、リガーゼ連鎖反応と、鎖置換増幅もしくはローリングサークル増幅を含む等温 DNA 増幅技術とからなる群から選択される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記ゲノム核酸は、DNA である、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 21】

ゲノム核酸上のメチル化候補部位のメチル化状態を判定するための方法であって、
メチル化候補部位を含むゲノム核酸の 2 本の相補鎖から修飾核酸鋳型を形成する条件下で、シトシン塩基を修飾するが 5 - メチルシトシン塩基を修飾しない作用物質でゲノム核酸
を処理する工程と；

10

前記修飾核酸鋳型の第 1 鎖における前記メチル化候補部位の一方側に隣接する領域に相補的な第 1 捕捉配列と、前記修飾核酸鋳型の第 2 鎖における前記メチル化候補部位の一方側に隣接する領域に相補的な第 2 捕捉配列と、を含む第 1 クランプを供給する工程と；

前記修飾核酸鋳型の第 1 鎖における前記メチル化候補部位の他方側に隣接する領域に相補的な第 3 捕捉配列と、前記修飾核酸鋳型の第 2 鎖における前記メチル化候補部位の他方側に隣接する領域に相補的な第 4 捕捉配列と、を含む第 2 クランプを供給する工程と；

前記第 1 クランプおよび前記第 2 クランプが前記修飾核酸鋳型の 2 本の相補鎖にハイブリダイズすることを可能にする工程と；

20

前記ハイブリダイズされたクランプをライゲートすることで前記修飾核酸鋳型の相補鎖の前記メチル化候補部位をまたぐ環状プローブを形成する工程と；

前記修飾核酸鋳型を消化することで前記環状プローブを得る工程と；

前記環状プローブを検出して前記修飾ゲノム核酸の前記メチル化候補部位のメチル化状態を判定する工程と、を含む、方法。

【請求項 22】

前記第 1 クランプおよび前記第 2 クランプは、前記クランプをライゲートすることで前記修飾核酸鋳型の前記メチル化候補部位をまたぐプローブを形成するのに先立って、前記第 1 クランプと前記第 2 クランプの間に少なくとも 1 つの塩基が挟まれるように、前記修飾核酸鋳型の 2 本の相補鎖にハイブリダイズする、請求項 21 に記載の方法。

30

【請求項 23】

前記メチル化候補部位は、3' 側にグアニン (G) が隣接したシトシン (C) である、請求項 21 または 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記修飾用の作用物質は、重亜硫酸塩である、請求項 21 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 25】

前記修飾用の作用物質は、重亜硫酸ナトリウムである、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 26】

40

前記第 1 クランプまたは第 2 クランプのうちの少なくとも 1 つは、前記ライゲーション工程後に前記プローブの増幅を可能にするユニバーサルプライマーを含む、請求項 21 ~ 25 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 27】

前記第 1 または第 2 クランプのうちの少なくとも 1 つは、前記プローブの捕捉を可能にする捕捉部位を含む、請求項 21 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 28】

前記第 1 または第 2 クランプのうちの少なくとも 1 つは、切断可能部位を含む、請求項 21 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 29】

50

前記切断可能部位は、ヌクレアーゼ制限部位である、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記切断可能部位は、ウラシル塩基である、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 31】

前記第 1 または第 2 クランプの相補配列は、ライゲートされる際に前記修飾核酸鋳型上のメチル化候補部位をまたぐ、請求項 21 および 23 ~ 30 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 32】

前記クランプは、一本鎖核酸をライゲート可能な適切な酵素を用いてライゲートされる、請求項 21 ~ 31 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 33】

前記クランプは、第 1 および第 2 捕捉配列の位置またはその付近でライゲートされる、請求項 21 および 23 ~ 32 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 34】

DNA ポリメラーゼによって、1 つまたは複数の塩基が前記クランプ間に挿入される、請求項 22 ~ 32 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 35】

塩基挿入反応は 1 種類のヌクレオチドの存在下で実施され、特定の塩基の挿入が前記修飾核酸鋳型上の相補的塩基を同定することになるように、各種のヌクレオチドが別々に反応させられる、請求項 34 に記載の方法。

20

【請求項 36】

前記修飾核酸鋳型は、酵素によって消化される、請求項 21 ~ 35 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 37】

前記酵素がウラシル N DNA グリコシラーゼである請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

前記プローブが検出され、かつ前記修飾ゲノム核酸における前記メチル化候補部位のメチル化状態が前記第 1 クランプと、第 2 クランプとの間の欠失塩基の組込みを認識できる、または前記プローブの特異的な増幅を検出できる検出系を用いて判定される請求項 21 ~ 37 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 39】

前記検出系は、アレイによるハイブリダイゼーションと、サザンロット型検出と、リアルタイム PCR 定量と、蛍光ビーズと、酵素共役と、放射性ビーズと、リガーゼ連鎖反応と、鎖置換増幅もしくはローリングサークル増幅を含む等温 DNA 増幅技術とからなる群から選択される、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

前記ゲノム核酸は、DNA である、請求項 21 ~ 39 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

40

技術分野

本発明は、核酸検出アッセイおよび特に重亜硫酸塩 (bisulfite) クランプを用いた改善されたオリゴヌクレオチドアッセイに関する。本発明は、これらのアッセイを用いて、核酸内に 5 - メチルシトシン塩基を含む特異的な塩基配列を識別するための方法に関する。

【背景技術】

【0002】

背景技術

現在、特異的な核酸分子の検出において多数の手順を利用可能である。これらの手順は、典型的には長さが短いオリゴヌクレオチド (20 塩基以下) から数千塩基 (kb) の

50

配列に及ぶことがある標的核酸と核酸プローブの間の配列依存性ハイブリダイゼーションに依存する。

【0003】

核酸配列の集団内から特異的な配列を増幅するために最も広く用いられている方法は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) (ディーフェンバッハ C (Dieffenbach C) およびウェクスラー G (Dveksler G) 編「PCR primer: A Laboratory Manual」Cold Spring Harbor Press、プレインビュー、ニューヨーク州、NY) の方法である。この増幅方法では、一般に増幅されるべき領域のそれぞれの末端における相補鎖上の、15~30塩基長のオリゴヌクレオチドを用いることによって、変性した一本鎖DNA上でDNA合成がブライミ

10

【0004】

PCRと同様、特異的な配列の検出および増幅についても種々の技術が開発されている。その一例はリガーゼ連鎖反応である(バラニー F (Barany F)「Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase」Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189-193頁(1991年))。

20

【0005】

直接検出において、標的核酸は、最も一般的にはゲル電気泳動によって大きさに基づいて分離され、標的配列に相補的なプローブを用いたハイブリダイゼーションに先立って、固体支持体に移される(サザンおよびノーザンブロッティング)。プローブは、天然核酸またはペプチド核酸(PNA)もしくは固定化核酸(LNA)などの類似体であってもよい。プローブは(例えば³²Pで)直接標識してもよく間接的な検出手順を用いてもよい。間接的な手順は通常、ビオチンもしくはジゴキシゲニンなどの「タグ」のプローブ中への組込みに依存し、次いで酵素基質変換もしくは化学発光などの手段を介してプローブが検出される。

30

【0006】

広く用いられている核酸の直接検出のためのもう一つの方法は「サンドイッチ」ハイブリダイゼーションである。この方法では、捕捉プローブが固体支持体とカップリングされ、溶液中で標的核酸がその固定されたプローブとハイブリダイズする。結合しない標的核酸は洗い流され、標的配列にハイブリダイズする二次プローブを用いて結合核酸が検出される。上記概説のように、検出には直接的方法または間接的方法を用いることができる。

40

「分岐DNA」シグナル検出系は、サンドイッチハイブリダイゼーションの原理を用いる一例である(ウルデア MS (Urdea MS)ら、「Branched DNA amplification multimers for the sensitive direct detection of human hepatitis viruses」Nucleic Acids Symp Ser. 1991年;(24):197-200頁)。

【0007】

核酸配列の直接検出において核酸ハイブリダイゼーションを用いる急速な成長分野は、DNAマイクロアレイの分野である(ヤング RA (Young RA)「Biomedical discovery with DNA arrays」Cell 1

50

02:9-15頁(2000年);ワトソン A(Watson A)「New tools. A new breed of high tech detectives.」Science 289:850-854頁(2000年)。この方法では、オリゴヌクレオチドからcDNAクローンなどのより長い配列へと多岐にわたる個々の核酸種が固体支持体に格子パターン状に固定される。次いで、タグ付きの核酸または標識された核酸の集団がアレイとハイブリダイズし、アレイ内の各スポットとのハイブリダイゼーションレベルが定量される。最も一般的には、放射性標識または蛍光標識された核酸(例えばcDNA)がハイブリダイゼーション用に用いられたが、他の検出系も利用された。

【0008】

ゲノムタイピング分析におけるマイクロアレイの使用に付随する1つの問題は、個々の部位を分析する前に、通常何らかの方法で予備増幅しなければならないことである。ほとんどの方法は標的配列のPCR増幅に依存する。しかしながら、反応混合物中のプライマーセットの数が n 個の標的配列に対するものである場合、プローブにおける任意の $2n^2 + n$ 通りの起こり得る対結合によって非特異的な増幅産物が生成される場合がある(ランデグレン(Landegren)およびニルソン(Nilsson)「Locked on target: strategies for future gene diagnostics.」Ann. Med. 1997年;(29):585-590頁)。この技術に対応するために、パッドロックプローブが開発されている。これらのプローブによれば、非特異的な反応によって線状分子が生成される一方で、特異的なハイブリダイゼーション事象により、エキソヌクレアーゼの使用を介して線状分子と区別できる二量体分子が生成される(ニルソン(Nilsson)ら、「Padlock Probes: circularised oligonucleotides for local DNA detection.」1994年;Science 92650;2085-2088頁)。しかしながら、ゲノム変異の特異的検出では、典型的には個々の多型部位の検出のために4本のプローブが用いられ、全ゲノム走査においては極めて多数のプローブが生成されることになる。

【0009】

もう一つの最近の技術である分子反転プローブ(MIP)は、単一チューブ内で高レベルの多重化を実現することが実証されている。1000本以上のプローブが単一チューブ内で多重化できることが報告されている(ハーデンボル(Hardenbol)ら、Nature Biotechnology、21:673-678頁)。しかしながら、パッドロックプローブとMIPの方法の両方は、ほとんどの販売業者が入手できないほど非常に長い110bpを超えるオリゴヌクレオチドの合成を必要とする。

【0010】

現在、前立腺癌におけるGSTP1遺伝子プロモーター中に認められるようなDNAにおけるメチル化変化を検出するための選択方法は、DNAの重亜硫酸塩修飾後における該配列のPCR増幅に依存する。重亜硫酸塩で処理されたDNAでは、メチル化シトシンが反応を示さずにシトシンとして残存する一方でシトシンはウラシルに変換される(それ故にPCR中にチミンとして増幅される)(フロマー M(Frommer M)、マクドナルド LE(McDonald LE)、ミラー DS(Millar DS)、コリス CM(Collis CM)、ワット F(Watt F)、グリッグ GW(Grigg GW)、モリー PL(Molloy PL)およびポール CL(Paul CL)「A genomic sequencing protocol which yields a positive display of 5-methyl cytosine residues in individual DNA strands.」PNAS 89:1827-1831頁(1992年);クラーク SJ(Clark SJ)、ハリソン J(Harrison J)、ポール CL(Paul CL)およびフロマー M(Frommer M)「High sensitivity mapping of methylated cytosines.」Nucleic Acids Res. 22:2990-2997頁(1994年)。したがっ

10

20

30

40

50

て、重亜硫酸塩処理後、5 - メチルシトシン塩基を含むDNAは、対応する非メチル化DNAとは配列において異なることになる。対象ゲノム領域を非選択的に増幅するようにプライマーを選択することによりそのメチル化状態を判定するか、またはメチル化された特定のシトシンを含む配列を選択的に増幅するようにプライマーが設計される場合がある（ハーマン JG (Herman JG)、グラフ JR (Graf J R)、ミヨハネン S (Myohanen S)、ネルキン BD (Nelkin BD) およびバイリン SB (Baylin SB) 「Methylation - specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands.」 PNAS 93: 9821 - 9826 頁 (1996 年))。

10

【0011】

シトシンメチル化を検出するための代替方法として、部位特異的なDNAメチル化により切断を遮断する制限酵素による消化や、それに続く対象領域に対するサザンブロッティングやハイブリダイゼーションプロベリングが挙げられる。このアプローチは、有意な割合（一般に > 10 %）でDNAが同部位でメチル化され、かつDNAが約 1 ~ 5 μ g で十分に存在することで検出が可能になる場合の環境に限られる。部位特異的なDNAメチル化によって切断が遮断されるという制限酵素による消化の後に、制限酵素部位に隣接するプライマーを用いてPCR増幅が行われる。この方法は、DNA量の利用を低減できるが、DNAメチル化以外の理由で完全酵素消化において何らかの不足が生じると偽陽性シグナルを招く可能性がある。

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明者らは、今回、感度のよい特異的なメチル化核酸の検出を行うためにオリゴヌクレオチドクランプを利用する方法を開発しており、当該方法は、非標的配列の非特異的増幅に関連する問題を大幅に低減し、個々の反応チューブ内で実施できる多重化レベルを上昇させるものである。これは、同技術を、メチル化パターンの全ゲノム分析にとって最適でロボット操作にも適用可能なものとする。

【課題を解決するための手段】

【0013】

30

発明の開示

第1態様では、本発明は、

(a) メチル化候補部位 (potential methylation site) を含む修飾核酸鋳型を形成する条件下で、シトシン塩基を修飾するが5 - メチルシトシン塩基を修飾しない作用物質でゲノム核酸を処理する工程と；

(b) 該修飾核酸鋳型におけるメチル化候補部位の一方側に隣接する領域に相補的な第1捕捉配列を含む第1クランプを提供する工程と；

(c) 該修飾核酸鋳型におけるメチル化候補部位の他方側に隣接する領域に相補的な第2捕捉配列を含む第2クランプを提供する工程と；

(d) 該第1クランプおよび該第2クランプが修飾核酸鋳型にハイブリダイズすることを可能にする工程と；

40

(e) 該修飾核酸鋳型におけるメチル化候補部位をまたぐプローブを形成するためにハイブリダイズした第1クランプおよび第2クランプをライゲートする工程と；

(f) 該修飾核酸鋳型を消化する工程と；

(g) 該プローブを検出し、該修飾ゲノム核酸におけるメチル化候補部位のメチル化状態を判定する工程とを含む、ゲノム核酸におけるメチル化候補部位のメチル化状態を判定するための方法を提供する。

【0014】

第2態様では、本発明は、

(a) 修飾核酸鋳型を形成する条件下でシトシン塩基を修飾するが5 - メチルシトシン塩

50

基を修飾しない作用物質でゲノム核酸を処理する工程と；

(b) 該修飾核酸鋳型におけるメチル化候補部位の一方側に隣接する領域に相補的な第1捕捉配列を含む第1クランプを提供する工程と；

(c) 該修飾核酸鋳型におけるメチル化候補部位の他方側に隣接する領域に相補的な第2捕捉配列を含む第2クランプを提供する工程と；

(d) 該メチル化候補部位に相補的塩基が全く存在しないように該第1クランプおよび該第2クランプが該修飾核酸鋳型とハイブリダイズすることを可能にする工程と；

(e) 該第1クランプと該第2クランプの間に1つもしくは複数の塩基をもたらす工程と；

(f) 該修飾核酸鋳型におけるメチル化候補部位をまたぐプローブを形成するために該ハイブリダイズされたクランプをライゲートする工程と；

(g) 該修飾核酸鋳型を消化する工程と；

(h) 該プローブを検出し、該修飾ゲノム核酸におけるメチル化候補部位のメチル化状態を判定する工程とを含む、ゲノム核酸におけるメチル化候補部位のメチル化状態を判定するための方法を提供する。

【0015】

第3態様では、本発明は

(a) メチル化候補部位を含むゲノム核酸の2本の相補鎖から修飾核酸鋳型を形成する条件下で、シトシン塩基を修飾するが5-メチルシトシン塩基を修飾しない作用物質でゲノム核酸を処理する工程と；

(b) 該修飾核酸鋳型の第1鎖におけるメチル化候補部位の一方側に隣接する領域に相補的な第1捕捉配列と、該修飾核酸鋳型の第2鎖におけるメチル化候補部位の一方側に隣接する領域に相補的な第2捕捉配列と、を含む第1クランプを提供する工程と；

(c) 該修飾核酸鋳型の第1鎖におけるメチル化候補部位の他方側に隣接する領域に相補的な第3捕捉配列を含む第2クランプを提供する工程と；

(d) 該修飾核酸鋳型の第2鎖におけるメチル化候補部位の他方側に隣接する領域に相補的な第4捕捉配列を含む第3クランプを提供する工程と；

(e) 該第1、第2および第3クランプが該修飾核酸鋳型にハイブリダイズすることを可能にする工程と；

(f) 該ハイブリダイズされたクランプをライゲートすることで該修飾核酸鋳型の2本の鎖におけるメチル化候補部位をまたぐプローブを形成する工程と；

(g) 該修飾核酸鋳型を消化する工程と；

(h) 該プローブを検出して該修飾ゲノム核酸におけるメチル化候補部位のメチル化状態を判定する工程とを含む、ゲノム核酸上のメチル化候補部位のメチル化状態を判定するための方法を提供する。

【0016】

第4態様では、本発明は、

(a) メチル化候補部位を含む2本の核酸の相補鎖を含む修飾核酸鋳型を形成する条件下で、シトシン塩基を修飾するが5-メチルシトシン塩基を修飾しない作用物質でゲノム核酸を処理する工程と；

(b) 該修飾核酸鋳型の第1鎖におけるメチル化候補部位の一方側に隣接する領域に相補的な第1捕捉配列と、該修飾核酸鋳型の第2鎖におけるメチル化候補部位の一方側に隣接する領域に相補的な第2捕捉配列と、を含む第1クランプを提供する工程と；

(c) 該修飾核酸鋳型の第1鎖におけるメチル化候補部位の他方側に隣接する領域に相補的な第3捕捉配列を含む第2クランプを提供する工程と；

(d) 該修飾核酸鋳型の第2鎖におけるメチル化候補部位の他方側に隣接する領域に相補的な第4捕捉配列を含む第3クランプを提供する工程と；

(e) 該修飾核酸鋳型の少なくとも1本の相補鎖のメチル化候補部位に相補的塩基が全く存在しないように該第1、第2および第3クランプが該修飾核酸鋳型にハイブリダイズすることを可能にする工程と；

(f) 該第 1 クランプと該第 2 クランプの間に少なくとも 1 つの塩基をもたらす工程と；
(g) 該ハイブリダイズされたクランプをライゲートすることで該修飾核酸鋳型の 2 本の鎖におけるメチル化候補部位をまたぐ線状プローブを形成する工程と；
(h) 該修飾核酸鋳型を消化する工程と；
(i) 該線状プローブを検出して該修飾ゲノム核酸におけるメチル化候補部位のメチル化状態を判定する工程とを含む、ゲノム核酸上のメチル化候補部位のメチル化状態を判定するための方法を提供する。

【0017】

第 5 態様では、本発明は、

(a) メチル化候補部位を含むゲノム核酸の 2 本の相補鎖から修飾核酸鋳型を形成する条件下で、シトシン塩基を修飾するが 5 - メチルシトシン塩基を修飾しない作用物質でゲノム核酸を処理する工程と；
(b) 該修飾核酸鋳型の第 1 鎖におけるメチル化候補部位の一方側に隣接する領域に相補的な第 1 捕捉配列と、該修飾核酸鋳型の第 2 鎖におけるメチル化候補部位の一方側に隣接する領域に相補的な第 2 捕捉配列と、を含む第 1 クランプを提供する工程と；
(c) 該修飾核酸鋳型の第 1 鎖におけるメチル化候補部位の他方側に隣接する領域に相補的な第 3 捕捉配列と、該修飾核酸鋳型の第 2 鎖におけるメチル化候補部位の他方側に隣接する領域に相補的な第 4 捕捉配列と、を含む第 2 クランプを提供する工程と；
(d) 該第 1 クランプおよび該第 2 クランプが該修飾核酸鋳型の 2 本の鎖にハイブリダイズすることを可能にする工程と；
(e) 該ハイブリダイズされたクランプをライゲートすることで該修飾核酸鋳型の 2 本の鎖におけるメチル化候補部位をまたぐ環状プローブを形成する工程と；
(f) 該修飾核酸鋳型を消化する工程と；
(g) 該環状プローブを検出して該修飾ゲノム核酸におけるメチル化候補部位のメチル化状態を判定する工程とを含む、ゲノム核酸上のメチル化候補部位のメチル化状態を判定するための方法を提供する。

【0018】

第 6 態様では、本発明は、

(a) メチル化候補部位を含むゲノム核酸の 2 本の相補鎖から修飾核酸鋳型を形成する条件下で、シトシン塩基を修飾するが 5 - メチルシトシン塩基を修飾しない作用物質でゲノム核酸を処理する工程と；
(b) 該修飾核酸鋳型の第 1 鎖におけるメチル化候補部位の一方側に隣接する領域に相補的な第 1 捕捉配列と、該修飾核酸鋳型の第 2 鎖におけるメチル化候補部位の一方側に隣接する領域に相補的な第 2 捕捉配列と、を含む第 1 クランプを提供する工程と；
(c) 該修飾核酸鋳型の第 1 鎖におけるメチル化候補部位の他方側に隣接する領域に相補的な第 3 捕捉配列と、該修飾核酸鋳型の第 2 鎖におけるメチル化候補部位の他方側に隣接する領域に相補的な第 4 捕捉配列と、を含む第 2 クランプを提供する工程と；
(d) 該修飾核酸鋳型の少なくとも 1 本の相補鎖のメチル化候補部位に相補的塩基が全く存在しないように該第 1 クランプおよび該第 2 クランプが該修飾核酸鋳型の 2 本の鎖にハイブリダイズすることを可能にする工程と；
(e) 該第 1 クランプと該第 2 クランプの間に少なくとも 1 つの塩基をもたらす工程と；
(f) 該ハイブリダイズされたクランプをライゲートすることで該修飾核酸鋳型の 2 本の鎖におけるメチル化候補部位をまたぐ環状プローブを形成する工程と；
(g) 該修飾核酸鋳型を消化する工程と；
(h) 該環状プローブを検出して該修飾ゲノム核酸におけるメチル化候補部位のメチル化状態を判定する工程とを含む、ゲノム核酸上のメチル化候補部位のメチル化状態を判定するための方法を提供する。

【0019】

ゲノム核酸は DNA または RNA でありうる。好ましくは、ゲノム核酸は DNA である。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 0 】

好ましくは、メチル化候補部位は、3'側にグアニン（G）が隣接したシトシン（C）であり、当該技術ではCpGダブルットと称される。

【 0 0 2 1 】

修飾用の作用物質は、好ましくは重亜硫酸塩、酢酸塩またはクエン酸塩から選択される。より好ましくは、同剤は重亜硫酸ナトリウム、すなわち水の存在下でシトシンをウラシルに改変する試薬である。

【 0 0 2 2 】

重亜硫酸ナトリウム（ NaHSO_3 ）は、シトシンの5, 6 - 二重結合と容易に反応することで、脱アミノ化の影響を受けやすいスルホン化されたシトシン反応中間体が形成され、また水の存在下でウラシルサルファイトが生成される。必要に応じて、サルファイト基は弱アルカリ性の条件下で除去することができ、結果としてウラシルが形成される。ゆえに、すべてのシトシンがウラシルに変換されうることになる。しかしながら、任意のメチル化シトシンは、メチル化による保護に起因して修飾用の作用物質により変換されない。

10

【 0 0 2 3 】

1つの好ましい形態では、少なくとも第1、第2または第3クランプは、ライゲーション工程後のプローブの増幅を可能にするユニバーサルプライマーを含む。

【 0 0 2 4 】

別の好ましい形態では、少なくとも第1、第2または第3クランプは、プローブの捕捉を可能にする捕捉部位を含む。

20

【 0 0 2 5 】

別の好ましい形態では、少なくとも第1、第2または第3クランプは、切断可能部位を含む。好ましくは、同切断可能部位は、ヌクレアーゼ制限部位またはウラシル塩基である。

【 0 0 2 6 】

1つの好ましい形態では、第1または第2クランプの相補配列はメチル化候補部位をまたぐ。

【 0 0 2 7 】

別の好ましい形態では、第1、第2または第3クランプの相補配列は、メチル化候補部位をまたがない。

30

【 0 0 2 8 】

クランプは、好ましくは一本鎖DNAをライゲートできる適切な酵素の利用によってライゲートされる。適切なリガーゼの例として、アンプリガーゼ（*Epicentre* 様々なcat#）、T4 DNAリガーゼ（NEB cat# M0202）、*Thermus aquaticus* DNAリガーゼ（NEB cat# M0208）、DNAリガーゼ（大腸菌（*E. coli*）、NAD）（NEB cat# M0205）などが挙げられるがこれらに限定されない。また一方で、他のリガーゼも本発明に適すると考えられることが認識されるであろう。

【 0 0 2 9 】

第5および第6態様では、クランプは、好ましくは第1および第2捕捉配列の位置またはその近隣で、かつ第3および第4捕捉配列の位置またはその近隣でライゲートされる。

40

【 0 0 3 0 】

1つもしくは複数の塩基がクランプ間に存在する場合、好ましくはDNAポリメラーゼが用いられる。適切なポリメラーゼの例として、TaqポリメラーゼのStoffel断片、Taqポリメラーゼ、AdvantageのDNAポリメラーゼ、AmpliTaq、AmpliTaq Gold、Titanium Taqポリメラーゼ、KlenTaq DNAポリメラーゼ、Platinum Taqポリメラーゼ、Accuprime Taqポリメラーゼ、DNAポリメラーゼ1、T4 DNAポリメラーゼ、T7 DNAポリメラーゼ、Klenow大断片、Klenow exo-DNAポリメラーゼ、B

50

s t B ポリメラーゼなどが挙げられるがこれらに限定されない。あるいは適切なDNAポリメラーゼであれば任意である。また一方で、他のポリメラーゼも本発明に適すると考えられることが認識されるであろう。この形態では、好ましくは1種類のヌクレオチドの存在下で塩基挿入反応が実施され、各ヌクレオチドは別々に反応する。ゆえに、特定の塩基が挿入されると修飾DNA鋳型上の相補的塩基が同定されることになる。

【0031】

好ましくは、修飾DNA鋳型は、ウラシルN DNAグリコシラーゼ(UDGまたはUNG)の使用によって消化される。処理されたDNA鋳型がウラシルを含むことから、UDGによる処理によって鋳型を除去することが可能である。しかしながら、実質的にプロ

10

【0032】

プローブを検出し、修飾ゲノム核酸におけるメチル化候補部位のメチル化状態を判定するための適切な方法として、第1および第2クランプの間の欠落した塩基(missing base)の組込みやプローブの特異的増幅が挙げられるがこれらに限定されない。所望の試料の後成的状態を判定するのに極めて多くの有望な検出系が存在する。検出系として以下のものが挙げられるがそれらに限定されない。

20

I. 10から60, 000種類を超える各成分を選択可能と考えられるマイクロアレイ型デバイスに対する適切に標識された増幅核酸のハイブリダイゼーション。それらアレイは、ガラス、プラスチック、マイカ、ナイロン、ビーズ、磁気ビーズ、蛍光ビーズもしくは膜などの任意の適切な固体表面上において挿入核酸(INA、国際公開第03/051901号パンフレット参照)、PNA、ヌクレオチド、修飾ヌクレオチドアレイのいずれかから構成されうる。

II. サザンロット型検出系

III. 特異的ゲノムもしくは多重ゲノムの増幅断片または分子ビーコン、スコルピオンなどの任意のバリエーションにおけるリアルタイムPCR定量

IV. 蛍光ビーズ、酵素共役、放射性ビーズなどを用いる検出系

30

V. リガーゼ連鎖反応などの任意の他の増幅系

VI. 鎖置換増幅(Strand Displacement Amplification; SDA法)、ローリングサークル増幅(Rolling Circle Amplification; RCA法)などの等温核酸増幅技術

【0033】

本発明に先立ち、重亜硫酸塩処理、2つの「隣接する」クランプにおける特異的ハイブリダイゼーション、場合によってクランプ間への塩基挿入、その2つのクランプのライゲーション、それに続く鋳型核酸の除去を用いる場合のゲノム核酸における対象部位の検出は実現されていない。処理された核酸は、第1および第2クランプを配置するための足場または鋳型として機能し、次いで除去される。それに対し、ほとんどの先行技術におけるアッセイは、捕捉および核酸鋳型の保持を必要とする。

40

【0034】

本発明の1つの利点は、用いられる方法において、ゲノム核酸の増幅が必ずしも必要とされない点である。

【0035】

本明細書全体を通して、文脈上他の意味に解すべき場合を除き、「含む(comprise)」という用語、あるいは「含む(comprises)」または「含んでいる(comprising)」などの変形は、記載される因子、整数もしくは工程、または因子群、整数群もしくは工程群を包含するが、任意の他の因子、整数もしくは工程、または因子群、整数群もしくは工程群を除外しないことを意味するように理解されるであろう。

50

【 0 0 3 6 】

本明細書に包含されている記録、作用、材料、デバイス、物品または同様のものに関するあらゆる考察は、専ら本発明に文脈を与えるためである。ありとあらゆるこれらの事柄が先行技術の基盤の一部を形成するか、または本発明の出現に先立ってオーストラリアに存在したものととして本発明に関する分野における周知の知識であったことを承認として理解されるべきではない。

【 0 0 3 7 】

本発明がより明瞭に理解されるために、好ましい形態が以下の図面や実施例に関連して記載される。

【 発明を実施するための最良の形態 】

10

【 0 0 3 8 】

本発明を実施するためのモード

材料および方法

クランプ

各クランプは、DNA、RNA、固定核酸(LNA)、ペプチド核酸(PNA)、MNA、アルトリートル核酸(ANA)、ヘキシトール核酸(HNA)、挿入核酸(INA)、シクロヘキシル核酸(CNA)、およびそれらの混合物やそれらのハイブリッドから選択されるオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド類似体、ならびにホスホロチオエート、ホスホン酸メチル、ホスホアミダイト、ホスホロジチエート、ホスホロセレノエート、ホスホトリエステル、およびボラノホスフェートなどの(それらに限定されない)それらのリン原子修飾でありうる。自然発生しないヌクレオチドとして、DNA、RNA、PNA、INA、HNA、MNA、ANA、LNA、CNA、CeNA、TNA、(2'-NH)-TNA、(3'-NH)-TNA、 α -L-リボ-LNA、 α -L-キシロ-LNA、 β -D-キシロ-LNA、 α -D-リボ-LNA、[3.2.1]-LNA、ビシクロ-DNA、6-アミノ-ビシクロ-DNA、5-エピビシクロ-DNA、 α -ビシクロ-DNA、トリシクロ-DNA、ビシクロ[4.3.0]-DNA、ビシクロ[3.2.1]-DNA、ビシクロ[4.3.0]アミド-DNA、 β -D-リボピラノシル-NA、 α -L-リキソピラノシル-NA、2'-R-RNA、 α -L-RNAまたは α -D-RNA、 β -D-RNAの範囲内に含まれるヌクレオチドが挙げられるがそれらに限定されない。さらに、メチルイミノメチル、酢酸ホルム、チオホルムアセテートおよびアミドを含む連結基など(これらに限定されない)の非リン含有化合物が、ヌクレオチドへの連結用に用いられる場合がある。特に核酸および核酸類似体は1つもしくは複数の介入物である偽ヌクレオチドを含む場合がある。

20

30

【 0 0 3 9 】

好ましくは、クランプはDNAオリゴヌクレオチドである。

【 0 0 4 0 】

ゲノム核酸

ゲノム核酸は、植物、動物、そして細菌、真菌、酵母、およびウイルスなどの微生物から得られるDNAまたはRNAでありうる。好ましくは核酸はDNAであり、より好ましくは動物もしくはヒト由来のゲノムDNA、または動物もしくはヒト細胞における感染物質の核酸である。

40

【 0 0 4 1 】

DNAの重亜硫酸塩処理

核酸の重亜硫酸塩処理のために有効で典型的なプロトコルを下記に示す。プロトコルは、結果として処理対象の実質的にすべてのDNAを保持する。この方法は、本明細書においてヒューマン・ジェネティック・シグネチャーズ(Human Genetic Signatures)(HGS)法としても言及される。試料または試薬の容量もしくは量が検証できることは認識されるであろう。

【 0 0 4 2 】

重亜硫酸塩処理における好ましい方法は、参照として本明細書に援用される米国特許出

50

願第10/428310号明細書またはPCT/AU2004/000549において認められうる。

【0043】

所望される場合、適切な制限酵素で予備消化できる2 μ gのDNAに対して2 μ l(1/10容量)の3M NaOH(水50ml中6g、作製直後)を添加して最終容量を20 μ lにした。重亜硫酸塩試薬が好ましく一本鎖分子と反応することから、この工程は二本鎖DNA分子を一本鎖形態に変性させる。この混合物を37で15分間インキュベートした。室温を超える温度でのインキュベーションを行うことで変性効率を改善できる。

【0044】

インキュベーション後、208 μ lの2Mメタ重亜硫酸ナトリウム(416mlの10N NaOHを含む水20ml中7.6g; BDH Anal a R # 10356.4D; 作製直後)および12 μ lの10mMキノール(水50ml中0.055g、BDH Anal a R # 103122E; 作製直後)を連続添加した。キノールは還元剤であり、試薬の酸化を低減するのに役立つ。例えば、ジチオトレイトール(DTT)、メルカプトエタノール、キノン(ヒドロキノン)をはじめとする適切な還元剤といった他の還元剤も使用できる。試料はミネラルオイル200 μ lと重層した。ミネラルオイルの重層は試薬の蒸発および酸化を防止するが必須ではない。次いで試料を55で一晩インキュベートした。あるいは、試料は以下のようにサーマルサイクラー内でサイクリングできる。すなわち、PCR装置内で工程1として55/2時間、工程2として95/2分でサイクリングするようにして約4時間または一晩インキュベートする。工程1は約37から約90の任意の温度で実施でき、5分から8時間で長さを変更できる。工程2は約70から約99の任意の温度で実施でき、約1秒から60分もしくは60分を超えるまで長さを変更できる。

【0045】

メタ重亜硫酸ナトリウムで処理した後、オイルを除去し、そしてDNA濃度が低い場合、tRNA(20mg/ml)1 μ lもしくはグリコーゲン2 μ lを添加した。これらの添加剤は任意であり、特にDNAが低濃度で存在する場合には標的DNAとの共沈によって得られるDNAの収率を改善するのに使用できる。一般に核酸量が<0.5 μ gの場合には、核酸のより効率的な沈殿のために担体として添加剤を使用することが望ましい。

【0046】

以下のようにイソプロパノール洗浄処理を行った。すなわち水800 μ lを試料に添加して混合し、次いでイソプロパノール1mlを添加した。水または緩衝液は、反応槽中で重亜硫酸塩の濃度を同塩が対象の標的核酸と共沈しようとしめない濃度まで低下させる。本明細書において開示されるように、同塩濃度が所望の範囲未満に希釈される限り、希釈は一般に約1/4から1/1000である。

【0047】

試料を再び混合し、最低5分にわたり4で放置した。試料をマイクロチューブ内で10~15分間回転させ、ペレットを70%EtOHで2回洗浄し、各回ごとにボルテックスした。この洗浄処理によって核酸とともに沈殿した残留塩を残らず取り出す。

【0048】

ペレットを乾燥可能にし、次いで50 μ lなどの適切な容量のT/E(10mMトリス/0.1mMEDTA)、pH7.0~12.5で再懸濁した。pH10.5の緩衝液が特に有効であることが認められている。核酸を懸濁する必要に応じて、試料を37から95で1分から96時間インキュベートした。

【0049】

ポリメラーゼおよびリガーゼの添加

ポリメラーゼは、正確な塩基すなわちG(メチル化に相補的)またはA(非メチル化に相補的)を付加することになる。

【0050】

次いで、リガーゼはGまたはAの塩基をライゲートすることで環が形成されることにな

10

20

30

40

50

る。

【 0 0 5 1 】

次いで、重亜硫酸塩で処理された DNA が同環の線状化も行うウラシル N DNA グリコシラーゼで分解される。

【 0 0 5 2 】

次いで 1 対の共通プライマーで線状 DNA を増幅する。

【 0 0 5 3 】

次いで、クランププライマー内に存在する固有の DNA 配列 (Z i p コード) を用いてマイクロアレイプラットフォーム上で DNA が検出される (N B は、 Z i p コードが重亜硫酸塩で処理された DNA の相補鎖に対するハイブリダイゼーションによってではなく、単に複合体に対してアレイ上で空間的に向かうべき場所を伝えるだけの従来の方法では検出されない) 。

【 0 0 5 4 】

N B プライマーの 1 と 3 は配列が同一であるが、異なる Z i p コード (青および黄色の棒) や、プライマー 3 がメチル化の欠失を検出する末端塩基 A を有する一方でメチル化の存在を検出する末端塩基 G を有するプライマー 1 を含める場合を除く。これによって産物をマイクロアレイ上で間隔を置いて分離できる (図 1 5 参照) 。このことは C または T の存在が同じ反応槽内で同時に検出できることを意味する。それ故に、何千もの異なるゲノム座が 1 つの反応槽において対応でき、それら固有の Z i p コードに基づいて分離できる。

【 0 0 5 5 】

クランプは、ライゲートされて増幅されていると、次には各重亜硫酸塩クランププライマーセット内に含まれる内部 Z i p コードによって予め定められたマイクロアレイデバイス上の特異的部位に導かれる (図 1 6) 。

【 0 0 5 6 】

結果

クランプの特異性に対するエキソヌクレアーゼ I I I 濃度およびリガーゼ濃度の効果

メチル化 DNA 配列を用いて実験を行った。図 1 は、クランプ反応の性能に関するリガーゼ酵素濃度およびエキソヌクレアーゼ I I I 濃度の効果を示す。同図から明らかなように、エキソヌクレアーゼ酵素を過量に用いる場合 (1 0 ユニット) 、反応が効率的とはいえない。逆に用いる酵素が少なすぎる場合 (2 ユニット) 、これは反応の特異性を低下させ、A、T および C トラックにおける非特異的増幅の発生をもたらす (図 1 A 参照) 。 (星で示される) 一部のレーンを認める上部バンドは、環を 2 回複製するポリメラーゼの結果としての標的バンドの二量体である。

【 0 0 5 7 】

さらに反応あたり 5 U から反応あたり 1 0 U までのリガーゼ濃度の上昇によって本方法の特異性が再び低下する結果として、A、T および C トラックにおいて非特異的検出がなされた (図 1 b 参照) 。太字は最適なエキソヌクレアーゼ濃度を示す。1 ナノグラム (n g) のメチル化オリゴヌクレオチドを標的として用いた。反応において 0 . 1 ユニットの S t o f f e l DNA ポリメラーゼとともに 1 0 n g の各クランプを用いた。アンプリガーゼ酵素を 5 および 1 0 ユニットで用いた。矢印は P C R 産物の正確な大きさを示す。

【 0 0 5 8 】

詳細には、0 . 5 μ l 薄壁 P C R チューブに以下を添加した。

1 0 $\times$ アンプリガーゼ緩衝液	1 . 0 μ l
クランプ # 1 (1 0 n g / μ l)	1 . 0 μ l
クランプ # 2 (1 0 n g / μ l)	1 . 0 μ l
S t o f f e l ポリメラーゼ	0 . 1 μ l
アンプリガーゼ	1 . 0 μ l または 2 μ l
d G / d A / d T / d C (1 m M)	1 . 0 μ l (d G / d A / d T / d C を別々のチューブに添加する)

水 3.9 μ l または 2.9 μ l

【0059】

反応物を以下のようにインキュベートした：

20 4分間、95 2分間、50 15分間、55 5分間（0.05 /秒のランプ時間）、50 1分間

【0060】

【表1】

エキソヌクレアーゼ処理

	10U ExoIII/2U Exo1	5U ExoIII/2U Exo1	2U ExoIII/2U Exo1	10
ExoIII	0.05 μ l	0.025 μ l	0.01 μ l	
ExoI	0.1 μ l	0.1 μ l	0.1 μ l	
T/E	0.85	0.875	0.89	

【0061】

上記反応混合物 1 μ l を適切なチューブに添加した。次いで試料を 37 で 14分間、続いて 95 で 2分間、最後に 37 で 1分間インキュベートした。

20

【0062】

以下を添加することによってユニバーサルプライマーを用いてPCRを実施した。

10 $\times$ PCR 緩衝液 2.5 μ l (Promega)
 水 19.0 μ l
 ユニバーサル P1 1.0 μ l
 ユニバーサル P2 1.0 μ l
 dNTPs 1.2 μ l
 Taq 0.3 μ l
 95 30秒、48 45秒、72 45秒（25サイクル）

【0063】

メチル化DNA、非メチル化DNAおよび50%メチル化DNA + 50%非メチル化DNAの混合物の検出

30

図2から明らかなように、同系はメチル化配列を非メチル化配列から容易に識別でき、混合集団の存在も検出できる。

【0064】

メチル化オリゴヌクレオチド、非メチル化オリゴ、またはメチル化オリゴと非メチル化オリゴの50%/50%混合物のいずれか1ngを標的として用いた。反応において1ユニットのStoffel DNAポリメラーゼとともに各クランプを10ngずつ用いた。アンプリガーゼ酵素を5ユニットで用いた。矢印はPCR産物の正確な大きさを示す。

【0065】

詳細には、以下を0.5 μ lの薄壁PCRチューブに添加した。

10 $\times$ アンプリガーゼ緩衝液 1.0 μ l
 クランプ#1 (10ng/ μ l) 1.0 μ l
 クランプ#2 (10ng/ μ l) 1.0 μ l
 Stoffel ポリメラーゼ 0.1 μ l (1ユニット)
 アンプリガーゼ 1.0 μ l
 dG/dA/dT/dC (1mM) 1.0 μ l (dG/dA/dT/dCを別々のチューブに添加する)

40

水 3.9 μ l

【0066】

50

反応物を以下のようにインキュベートした：

20 4分間、95 2分間、50 15分間、55 5分間（0.05 /秒のランプ時間）、50 1分間

【0067】

エキソヌクレアーゼ処理：

5 U	Exo I I I I / 2 U	Exo I
Exo I I I		0.025 μ l
Exo I		0.1 μ l
T / E		0.875

【0068】

上記反応混合物 1 μ l を適切なチューブに添加した。次いで試料を 37 で 14分間、続いて 95 で 2分間、最後に 37 で 1分間インキュベートした。

【0069】

以下を添加することによってユニバーサルプライマーを用いてPCRを実施した。

10 $\times$ PCR 緩衝液	2.5 μ l (Promega)
水	19.0 μ l
ユニバーサル P 1	1.0 μ l
ユニバーサル P 2	1.0 μ l
dNTPs	1.2 μ l
Taq	0.3 μ l

95 30秒, 48 45秒, 72 45秒 (25 サイクル)

【0070】

クランプ反応に対するポリメラーゼ効果

メチル化DNA配列を用いて行われた実験。

【0071】

図3は、反応の実施に対する異なるポリメラーゼ酵素の効果を示す。標的の濃度がさらに上昇する際にすべての試験対象のポリメラーゼ酵素が陽性シグナルを発したことは注目すべきである。しかしながら、更なる最適化を伴うことなく低いDNA濃度で使用できた酵素はすべてではなかった。

【0072】

これらの結果は、最大の感度をもたらす酵素がKlenow DNAポリメラーゼおよびTaqポリメラーゼであったことを示した。更なる実験では引き続き、これら2つの酵素を使用した。

【0073】

反応において1ユニットのDNAポリメラーゼとともに各クランプを1ngずつ用いた。矢印はPCR産物の正確な大きさを示す。

【0074】

詳細には、以下を0.5 μ lの薄壁PCRチューブに添加した。

10 $\times$ アンプリガーゼ緩衝液	1.0 μ l
クランプ # 1 (1ng / μ l)	1.0 μ l
クランプ # 2 (1ng / μ l)	1.0 μ l
ポリメラーゼ	1 U
アンプリガーゼ	5 U
dG / dA / dT (1mM)	1.0 μ l (dG / dA / dTを 別々のチューブに添加する)
水	3.9 μ l

【0075】

先に示した適切な濃度で鋳型DNAを添加した。

【0076】

反応物を以下のようにインキュベートした：

10

20

30

40

50

20 4分間、95 2分間、50 15分間、55 5分間(0.05 /秒のランプ時間)、50 1分間

【0077】

エキソヌクレアーゼ処理:

	5 U	Exo I I I / 2 U	Exo I
Exo I I I		0.025 μ l	
Exo I		0.1 μ l	
T / E		0.875	

【0078】

上記反応混合物1 μ lを適切なチューブに添加した。次いで試料を37 で14分間、
続いて95 で2分間、最後に37 で1分間インキュベートした。

【0079】

ウラシルDNAグリコシラーゼ0.5 μ lを各反応チューブに添加し、そして試料を50 15分間、95 5分間、50 1分間のように入キュベートした。

【0080】

以下を添加することによってユニバーサルプライマーを用いてPCRを実施した。

10 $\times$ PCR 緩衝液	2.5 μ l (Promega)
水	19.0 μ l
ユニバーサル P 1	1.0 μ l
ユニバーサル P 2	1.0 μ l
d N T P s	1.2 μ l
Taq	0.3 μ l

95 30秒, 48 45秒, 72 45秒(25サイクル)

【0081】

ポリメラーゼ/リガーゼ濃度の効果

メチル化DNAを用いて実施された実験。

【0082】

図4は、バンドがGとTトラックの両方に存在する場合に例えば5ユニットのリガーゼとポリメラーゼの両方に伴って認められたように、高濃度の両酵素が偽陽性シグナルを生成できることを示す。それに対し、2ユニットのリガーゼおよび1ユニットのポリメラーゼを用いると、バンドは正確なGトラックにのみ存在する。したがって、酵素の組み合わせに関して注意深く滴定を行うことは、最も感度がよく特異的な酵素の組み合わせを作り出すのに不可欠である。以上のように、2 Uのリガーゼおよび1 UのKlenowにより、たとえ低いDNA濃度でも最も一貫性がある信頼性の高い増幅が得られる。

【0083】

反応において各クランプを1 ngずつ用い、アンプリガーゼおよびポリメラーゼ酵素とともに上記のように用いた。矢印はPCR産物の正確な大きさを示す。

【0084】

詳細には、以下を0.5 μ lの薄壁PCRチューブに添加した。

10 $\times$ アンプリガーゼ緩衝液	1.0 μ l
クランプ # 1 (1 ng / μ l)	1.0 μ l
クランプ # 2 (1 ng / μ l)	1.0 μ l
Klenow	上記
アンプリガーゼ	上記
d G / d T (1 mM)	1.0 μ l (d G / d Tを別々のチューブに 添加する)
水	3.9 μ l

【0085】

先に示した適切な濃度で鋳型DNAを添加した。

【0086】

反応物を以下のようにインキュベートした：

20 4分間、95 2分間、50 15分間、55 5分間（0.05 /秒のランプ時間）、50 1分間

【0087】

エキソヌクレアーゼ処理：

5 U	Exo III / 2 U	Exo I
Exo III		0.025 μ l
Exo I		0.1 μ l
T / E		0.875

【0088】

上記反応混合物 1 μ l を適切なチューブに添加した。次いで試料を 37 で 14 分間、続いて 95 で 2 分間、最後に 37 で 1 分間インキュベートした。

【0089】

ウラシル DNA グリコシラーゼ 0.5 μ l を各反応チューブに添加し、そして試料を 50 15分間、95 5分間、50 1分間のようインキュベートした。

【0090】

以下を添加することによってユニバーサルプライマーを用いて PCR を実施した。

10 $\times$ PCR 緩衝液	2.5 μ l (Promega)
水	19.0 μ l
ユニバーサル P1	1.0 μ l
ユニバーサル P2	1.0 μ l
dNTPs	1.2 μ l
Taq	0.3 μ l

95 30秒、48 45秒、72 45秒（25 サイクル）

【0091】

メチル化 DNA 配列に対して向けられたクランププライマーの使用におけるクランプ反応の感度

図 5 から明らかなように、アッセイは試験されたすべての DNA 濃度において極めて高い特異性および感度を有した。

【0092】

反応において各クランプを 1 ng ずつ用い、アンプリガーゼ酵素とともに 2.5 および 1 ユニットで用いた。矢印は PCR 産物の正確な大きさを示す。

【0093】

詳細には、以下を 0.5 μ l 薄壁 PCR チューブに添加した。

10 $\times$ アンプリガーゼ緩衝液	1.0 μ l
クランプ # 1 (1 ng / μ l)	1.0 μ l
クランプ # 2 (1 ng / μ l)	1.0 μ l
クランプ # 3 (1 ng / μ l)	1.0 μ l
アンプリガーゼ	0.5 または 0.2 μ l
水	4.5 または 4.8 μ l

【0094】

鋳型 DNA 1 μ l を上記の適切な濃度で添加した。

【0095】

反応物を以下のようにインキュベートした：

20 4分間、95 2分間、50 15分間、55 5分間（0.05 /秒のランプ時間）、50 1分間

【0096】

エキソヌクレアーゼ処理：

5 U	Exo III / 2 U	Exo I
Exo III		0.025 μ l

10

20

30

40

50

E x o I 0 . 1 μ l
T / E 0 . 8 7 5

【 0 0 9 7 】

上記反応混合物 1 μ l を適切なチューブに添加した。次いで試料を 37 で 14 分間、続いて 95 で 2 分間、最後に 37 で 1 分間インキュベートした。

【 0 0 9 8 】

ウラシル DNA グリコシラーゼ 0 . 5 μ l を各反応チューブに添加し、そして試料を 50 15 分間、95 5 分間、50 1 分間のようにインキュベートした。

【 0 0 9 9 】

以下を添加することによってユニバーサルプライマーを用いて PCR を実施した。

10

10 $\times$ PCR 緩衝液 2 . 5 μ l (P r o m e g a)

水 19 . 0 μ l

ユニバーサル P 1 1 . 0 μ l

ユニバーサル P 2 1 . 0 μ l

d N T P s 1 . 2 μ l

T a q 0 . 3 μ l

95 30 秒、48 45 秒、72 45 秒 (25 サイクル)

【 0 1 0 0 】

(対応部位での非メチル化で既知の) ゲノム DNA 上のクランプ

反応において 2 . 5 および 1 ユニットのアンプリガーゼ酵素とともに 10 p g または 1 p g の各クランプを用いた。矢印は PCR 産物の正確な大きさを示す (図 6) 。

20

【 0 1 0 1 】

詳細には、以下を 0 . 5 μ l 薄壁 PCR チューブに添加した。

10 $\times$ アンプリガーゼ緩衝液 1 . 0 μ l

クランプ # 1 1 . 0 μ l

クランプ # 2 1 . 0 μ l

アンプリガーゼ 0 . 5 μ l

ポリメラーゼ 0 . 1 μ l

d G / d A / d T / d C (1 m M) 1 . 0 μ l (d G / d A / d T / d C を
別々のチューブに添加する)

30

水 4 . 4 μ l

【 0 1 0 2 】

重亜硫酸塩誘型 DNA 1 μ l を添加した。

【 0 1 0 3 】

反応物を以下のようにインキュベートした :

20 4 分間、95 2 分間、50 15 分間、55 5 分間 (0 . 05 / 秒のランプ時間)、50 1 分間

【 0 1 0 4 】

エキソヌクレアーゼ処理 :

5 U E x o I I I / 2 U E x o 1

40

E x o I I I 0 . 025 μ l

E x o I 0 . 1 μ l

T / E 0 . 8 7 5

【 0 1 0 5 】

上記反応混合物 1 μ l を適切なチューブに添加した。次いで試料を 37 で 14 分間、続いて 95 で 2 分間、最後に 37 で 1 分間インキュベートした。

【 0 1 0 6 】

ウラシル DNA グリコシラーゼ 0 . 5 μ l を各反応チューブに添加し、そして試料を 50 15 分間、95 5 分間、50 1 分間のようにインキュベートした。

【 0 1 0 7 】

50

以下を添加することによってユニバーサルプライマーを用いてPCRを実施した。

10 × PCR 緩衝液	2.5 μl (Promega)
水	19.0 μl
ユニバーサル P 1	1.0 μl
ユニバーサル P 2	1.0 μl
d N T P s	1.2 μl
Taq	0.3 μl
95 30 秒、48 45 秒、72 45 秒 (40 サイクル)	
【0108】	

クランプ反応 - 非環状

10

図7は2つのクランプの2つの単一アームを用いたリガーゼ充填反応の結果を示す。

【0109】

オリゴヌクレオチド (非メチル化) を含むウラシル 5 pg を標的として用いた。反応において 0.05 ユニットの Taq ポリメラーゼとともに各オリゴ「アーム」1 f モルを用いた。1 ユニットから 0.03 ユニットのアンプリガーゼ酵素を希釈した。矢印は PCR 産物の正確な大きさを示す。

【0110】

詳細には、以下を 0.5 μl 薄壁 PCR チューブに添加した。

10 × アンプリガーゼ緩衝液	0.9 μl
オリゴ標的 (5 pg / μl)	1.0 μl
クランプ 1 (1 f モル / μl)	1.0 μl
クランプ 2 (1 f モル / μl)	1.0 μl
Taq ポリメラーゼ	0.1 μl (アンプリガーゼ緩衝液中で 希釈された 0.5 U / μl ストックにおける)
d A / d C / d G (1 mM)	1.0 μl (d A / d C / d G を別々の チューブに添加する)
水	4.0 μl

20

【0111】

反応物を以下のようにインキュベートした：

20 4 分間、95 5 分間、60 25 分間、65 5 分間 (0.05 / 秒のランプ 30 時間)、50 1 分間。

【0112】

UDG 1 μl を添加して鋳型を分解した。

【0113】

50 15 分間、95 5 分間、50 1 分間。

【0114】

以下を添加することによってユニバーサルプライマーを用いてPCRを実施した。

10 × PCR 緩衝液	2.5 μl (Promega)
水	19.0 μl
ユニバーサル P 1	1.0 μl
ユニバーサル P 2	1.0 μl
d N T P s	1.2 μl
Taq	0.3 μl
95 30 秒、48 45 秒、72 45 秒 (28 サイクル)	
【0115】	

第1態様例

40

図8は本発明の第1態様に従う方法を示す。次いで例 # 1 および # 2 では、DNA リガーゼを用いて2つの隣接するクランプ配列を共にライゲートした。

【0116】

第2態様例

50

図 9 は、本発明の第 2 態様に従う方法を示す。例 # 3 では、ポリメラーゼ酵素は正確な塩基 (G) をその部位にもたらし、次いでリガーゼ酵素は同塩基を DNA 配列内にライゲーションして線状プローブを形成することになる。例 # 4 では、ポリメラーゼ酵素は正確な塩基 (A) をその部位にもたらし、次いでリガーゼ酵素は同塩基を DNA 配列内にライゲーションすることで線状プローブを形成することになる。

【 0 1 1 7 】

第 3 態様例

例 # 5 では、重亜硫酸塩で処理されたゲノム DNA 上に正確に位置する 3 つのクランプ配列をもたらし、4 つの独立したハイブリダイゼーション事象の発生が要求される (図 1 0)。ここでクランプの 1 つのアームが半環状プローブを形成する一方、他の 2 つのクランプは、半環状プローブに隣接する DNA のトップ鎖およびボトム鎖にハイブリダイズする。リガーゼ酵素は、塩基を DNA 配列内にライゲーションすることで完全に線状化されたプローブを形成することになる。

10

【 0 1 1 8 】

例 # 6 では、重亜硫酸塩で処理されたゲノム DNA 上に正確に位置する 3 つのクランプ配列をもたらし、4 つの独立したハイブリダイゼーション事象の発生が要求される (図 1 0)。ここでクランプの 1 つのアームが半環状プローブを形成する一方、他の 2 つのクランプは、半環状プローブに隣接する DNA のトップ鎖およびボトム鎖にハイブリダイズする。リガーゼ酵素は、塩基を DNA 配列内にライゲーションすることで完全に線状化されたプローブを形成することになる。

20

【 0 1 1 9 】

第 4 態様例

例 # 7 では、重亜硫酸塩で処理されたゲノム DNA 上に正確に位置する 3 つのクランプ配列をもたらし、4 つの独立したハイブリダイゼーション事象の発生が要求される (図 1 1)。ここでクランプの 1 つのアームが半環状プローブを形成する一方、他の 2 つのクランプは、半環状プローブに隣接する DNA のトップ鎖およびボトム鎖にハイブリダイズする。ポリメラーゼ酵素は正確な塩基 (G) をその部位にもたらし、次いでリガーゼ酵素は、塩基を DNA 配列内にライゲーションすることで完全に線状化されたプローブを形成することになる。

【 0 1 2 0 】

30

例 # 8 では、重亜硫酸塩で処理されたゲノム DNA 上に正確に位置する 3 つのクランプ配列をもたらし、4 つの独立したハイブリダイゼーション事象の発生が要求される (図 1 1)。ここでクランプの 1 つのアームが半環状プローブを形成する一方、他の 2 つのクランプは、半環状プローブに隣接する DNA のトップ鎖およびボトム鎖にハイブリダイズする。ポリメラーゼ酵素は正確な塩基 (A) をその部位にもたらし、次いでリガーゼ酵素は、塩基を DNA 配列内にライゲーションすることで完全に線状化されたプローブを形成することになる。

【 0 1 2 1 】

第 5 態様例

例 # 9 では、重亜硫酸塩で処理されたゲノム DNA 上に正確に位置する 2 つのクランプ配列をもたらし、4 つの独立したハイブリダイゼーション事象の発生が要求される。ここでクランプの各アームは、半環状プローブを形成する (図 1 2)。リガーゼ酵素は、塩基を DNA 配列内にライゲーションすることで完全に環状化されたプローブを形成することになる。

40

【 0 1 2 2 】

例 # 1 0 では、重亜硫酸塩で処理されたゲノム DNA 上に正確に位置する 2 つのクランプ配列をもたらし、4 つの独立したハイブリダイゼーション事象の発生が要求される。ここでクランププローブの各アームは、半環状プローブを形成する (図 1 2)。リガーゼ酵素は、塩基を DNA 配列内にライゲーションすることで完全に環状化されたプローブを形成することになる。

50

【 0 1 2 3 】

第 6 態様例

例 # 1 1 では、重亜硫酸塩で処理されたゲノム DNA 上に正確に位置する 2 つのクランプ配列をもたらすのに 4 つの独立したハイブリダイゼーション事象の発生が要求される。ここでクランプの各アームは、半環状プローブを形成する (図 1 3)。ポリメラーゼ酵素は正確な塩基 (G) をその部位にもたらし、次いでリガーゼ酵素は、2 つの半環状プローブをライゲーションすることで完全に環状化されたプローブを形成することになる。

【 0 1 2 4 】

例 # 1 2 では、重亜硫酸塩で処理されたゲノム DNA 上に正確に位置する 2 つのクランプ配列をもたらすのに 4 つの独立したハイブリダイゼーション事象の発生が要求される (図 1 3)。ここでクランプの各アームは、半環状プローブを形成する。ポリメラーゼ酵素は正確な塩基 (A) をその部位にもたらし、次いでリガーゼ酵素は、2 つの半環状プローブをライゲーションすることで完全に環状化されたプローブを形成することになる。

【 0 1 2 5 】

図 1 4 は、ウラシル切断部位を有する環状プローブを形成するクランプ反応の略図を示す。

【 0 1 2 6 】

アレイタグ検出系

重亜硫酸塩クランプは、メチル化シトシン塩基のゲノムワイド検出用の新しい方法である。メチル化シトシンの検出に対するすべての従来方法と異なり、クランプ法は重亜硫酸塩で処理された核酸の増幅に依存しない。同方法はライゲーション反応を用いることで C p G ダブルレット内のメチル化シトシンの有無を判定できるという点で独特である (図 1 5 および図 1 6 を参照)。このことは各 C p G 部位がゲノム全体を通して解析できることを意味する。

【 0 1 2 7 】

クランプは、ライゲートされて増幅されていると、次には各重亜硫酸塩クランププライマーセット内に含まれる内部 Z i p コードによって予め定められたマイクロアレイデバイス上の特異的な部位に方向づけできる。図 1 6 は上記検出系の例を示す。

【 0 1 2 8 】

従来のマイクロアレイ解析に比べてこのアプローチが有する主な利点の 1 つは、ハイブリダイゼーション条件が精密に制御できる点である。Z i p コードプライマーは、すべてが同一の融解温度を共有し、類似した配列内容を有するようにテーラーメイド可能である。このことは、ハイブリダイゼーション挙動が各プローブにおいて極めて類似することを意味する一方で、従来のマイクロアレイではハイブリダイゼーションがゲノム核酸の DNA 配列に依存し同様には制御できない。

【 0 1 2 9 】

要約

既存技術と比較し、メチル化状態のゲノムワイド検出を目的とした本発明に従う重亜硫酸塩クランプ法には多数の固有の利点がある。1 つの主な利点は、反応中にもたらされる精巧な特異性である。従来の重亜硫酸塩分析 (クラーク (C l a r k) ら、1994 年) は、重亜硫酸塩で変換されたゲノムにおいて要求される特異性をもたらすのに 2 回の入れ子 P C R に依存する。これは重亜硫酸塩処理後にすべての非メチル化シトシンが U に変換されて以降、ゲノムが本質的に 3 つの塩基すなわち A G および T のみから構成されるという事実に起因する。次いで、4 つの入れ子プライマーが重亜硫酸塩で処理された DNA 鎖の 1 本に対して設計された上で 2 回の P C R を実施することで、要求される特異性や感度をもたらされる。重亜硫酸塩処理後、DNA の二本鎖はもはや相補的ではない。これまで変換後の両鎖の標的化は利用されていない。本発明に従う重亜硫酸塩クランプ法は、修飾または変換された DNA の両鎖を標的とすることができることから (図 1 0 から図 1 4 を参照)、反応が進行する以前に 4 つの独立したハイブリダイゼーション反応の発生が要求される。このことは事実上、1 回で P C R 汚染の可能性を低減しかつ著しく手順を簡素化

10

20

30

40

50

する入れ子PCRの特異性を提供する。さらに先行技術における非特異的増幅は、特に標的DNA量が少ない場合に頻繁に起こる。このことはPCR増幅反応の性質に起因する。しかしながら、好ましい重亜硫酸塩クランプ法では、二重の特異性を有する系を用いることによってこれを克服する。特異性の第1層は、修飾核酸鋳型におけるメチル化候補部位をまたぐ2つのクランプ配列の間に相補的塩基が全くない場合に、ポリメラーゼが正確な塩基を充填することによってもたらされる。たとえポリメラーゼが誤りを起こしても、リガーゼ酵素の使用によって2回目で忠実性が得られる。これは任意の誤りのある塩基が正確にライゲートされないと反応が停止することになることを意味する。

【0130】

該修飾核酸鋳型の第1鎖および第2鎖におけるメチル化候補部位の領域に相補的な捕捉配列を有するクランプを用いて正確なハイブリダイゼーション構成が生じる場合、環状DNA構造が形成される。ある場合にはこの環を線状に変換することは利点があり、1つもしくは複数のウラシルまたは代わりに制限部位を1つのプライマーの1つのアーム内に組み込むことによってこれが実施できる（ウラシルが付加される部位はウラシル部位と称される；図14）。重亜硫酸塩クランプ法のもう一つの特徴は、1つのプライマーまたはクランプへの1つのアームへのウラシル部位の組み込みでありうる。したがって、正確なハイブリダイゼーションやライゲーションが生じる際に環が形成される。次いで反応混合物は、ウラシルNグリコシラーゼ（UNG）で処理可能である。次いでこの酵素は、すべてのウラシルを含む重亜硫酸塩で処理されたDNAを分解すると同時に環を線状化することになる。ゆえに、非標的ゲノムDNAの海の中で起こる従来のPCRと異なり、この段階で反応効率を大幅に上昇させる純粋な標的分子集団において引き続き増幅が起こる。あるいは、クランププライマーの1つに固有の制限部位が付加できることで、UNG消化後、環は未消化のままであるが重亜硫酸塩で処理されたゲノムDNAは分解されている。次いで環状DNAは、等温におけるローリングサークル増幅（RCA）を介して複製できる（リザーディ（Lizardi）ら、「Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification.」1998年 Nat. Genetics（19）；225-232頁）。

【0131】

さらに、重亜硫酸塩クランプ法は、同一反応チューブ内での多数のプロープの多重化を可能にする。したがって、1つの反応チューブ内で同時に多数のゲノム領域が対応できる。これは、クランプが共通のPCRプライマー部位を含みうることから、個々のプライマーセットが対象の各遺伝子座に対して設計される必要がある場合の多重PCRと異なり、標的環状分子を増幅するのに必要なのは2つのプライマーにすぎないという事実に起因する。

【0132】

さらに、本方法は、重亜硫酸塩反応において頻発しうるPCRバイアスの問題も除去する。これは重亜硫酸塩クランプが2つのプライマー部位をまたぐゲノム領域の増幅に左右されないという事実の結果である。重亜硫酸塩で処理されたDNAの特定配列の増幅によって真のメチル化状態が過小評価される可能性があることが判明している（ウォーニキー（Warneke）ら）。この現象は、メチル化DNA鎖の非メチル化鎖との比較において異なる配列内容の結果であり、メチル化鎖よりも非メチル化鎖の優先的な複製をもたらす。クランプがハイブリダイゼーション反応にのみ依存することから、PCRバイアスは発生しないであろう。

【0133】

その上、マイクロアレイによる重亜硫酸塩で処理されたDNA内のメチル化変化の検出は、2つの固有のプライマー部位間に含まれる増幅DNA領域における配列に特異的なハイブリダイゼーションに依存している。先に述べたように、メチル化DNA配列の配列内容は非メチル化配列の場合とは極めて異なる。これは非メチル化配列のハイブリダイゼーション挙動がメチル化配列のそれと極めて異なるようになるという効果を発揮する。した

がって、実際面では非メチル化配列およびメチル化配列の両方が同一アレイに対して同時になるようにアレイに対して結合する場合に好適となるハイブリダイゼーション条件を決定することは極めて困難である。重亜硫酸塩クランプ手順は、場合によってZ i pコード配列を後にアレイ上の規定の場所に同配列を導くプライマーに組込むことによってこの問題を克服できる。Z i pコード配列は、重亜硫酸塩で処理された1片のDNAに対応するように設計されるのではなく、ヒトゲノム内に存在しない無作為に規定されたDNA配列である。このZ i pコード配列は、各Z i pコードが同一の融解温度や配列組成物を有するように「シャッフル」できる。それ故に、重亜硫酸塩クランプにおけるハイブリダイゼーション条件は、各プローブのハイブリダイゼーション挙動が同一になるようにテラメイド可能である。したがって、最終の読み出しが試料のメチル化状態を真に反映したものであろう。

10

【0134】

極めて多くのバリエーションおよび/または修飾は、幅広く記載された本発明の技術思想または範囲から逸脱することなく、特定の実施形態において示される本発明に対して施される場合があることが当業者によって認識されるであろう。したがって、本実施形態は、すべての態様において図示されるものや制限されないものとして考慮されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【0135】

【図1】クランプの特異性に対するエキソヌクレアーゼI I I濃度およびリガーゼ濃度の効果を示す(第6態様)。

20

【図2】(第6態様に従う)メチル化、非メチル化および50%メチル化DNA+50%非メチル化DNAの混合物の検出を示す。

【図3】(第6態様に従う)クランプ反応に対するポリメラーゼの効果を示す。

【図4】(第6態様に従う)ポリメラーゼ/リガーゼ濃度の効果を示す。

【図5】メチル化DNA配列に対して向けられたクランププライマーを用いる(第3態様に従う)クランプ反応の感度を示す。

【図6】(第6態様に従う)(対応部位でメチル化されないことで知られる)ゲノムDNAに対するクランプ反応を示す。

【図7】(第2態様に従う)クランプ反応の結果を示す。

30

【図8】クランプのハイブリダイゼーションのターゲティングの例を示す。

【図9】クランプおよび塩基挿入のハイブリダイゼーションのターゲティングの例を示す。

【図10】本発明の第3態様の例を示す。

【図11】本発明の第4態様の例を示す。

【図12】本発明の第5態様の例を示す。

【図13】本発明の第6の態様の例を示す。

【図14】本発明に従う重亜硫酸塩クランプ法の略図である。

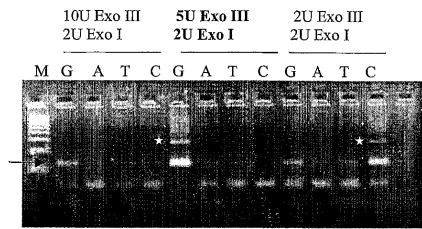
【図15】ライゲーションに依存する反応を示す。

【図16】アレイタグ検出系を示す。

40

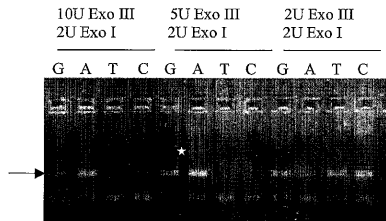
【図 1 A】

5ユニットのリガーゼ酵素



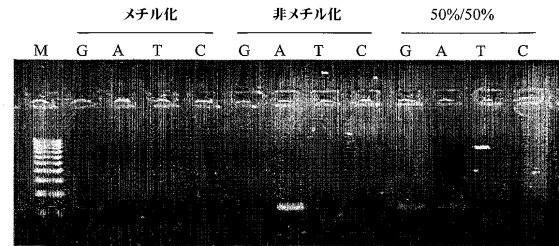
【図 1 B】

10ユニットのリガーゼ酵素



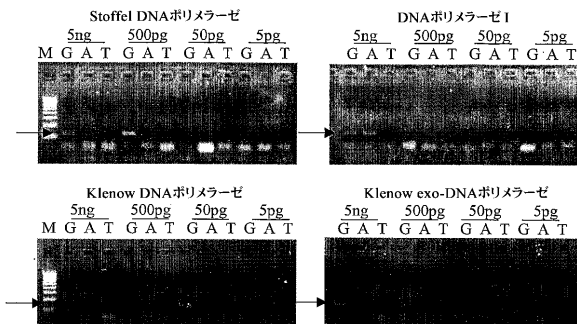
【図 2】

図2

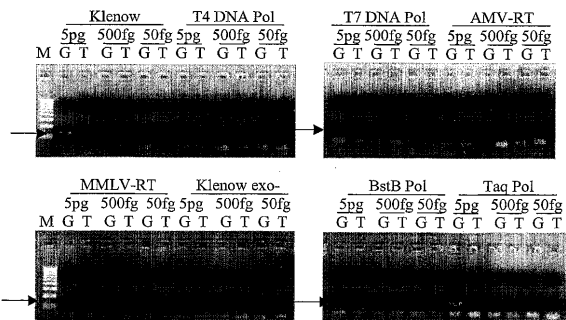


【図 3】

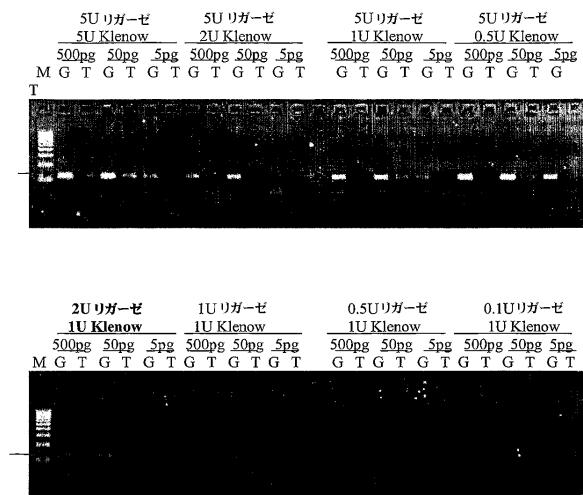
パネルA 高濃度DNA



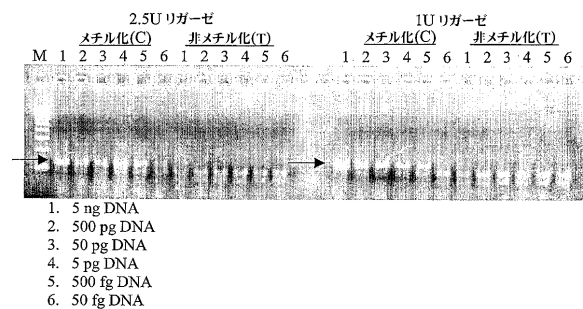
パネルB 低濃度DNA



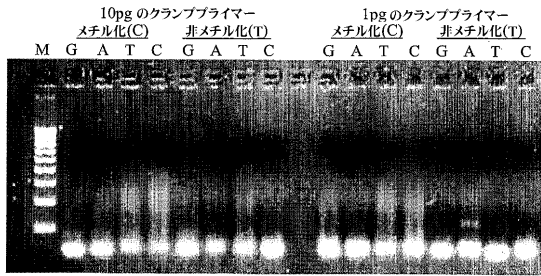
【図 4】



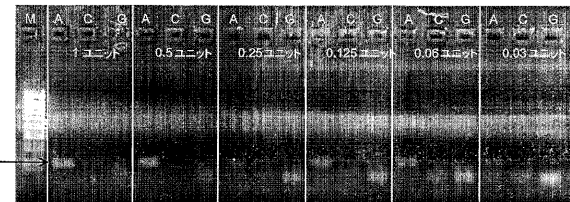
【図 5】



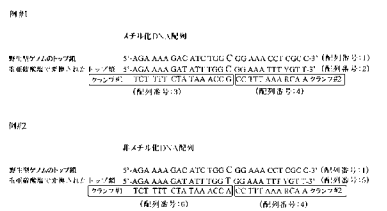
【 図 6 】



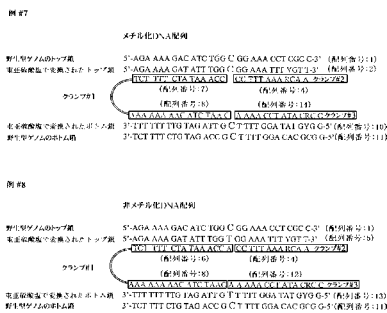
【圖 7】



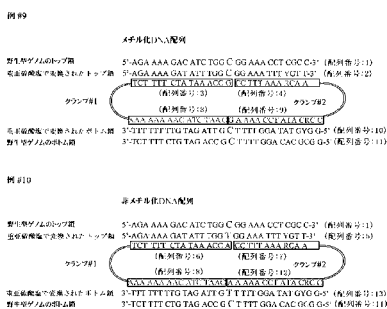
【圖 8】



【 図 1 1 】

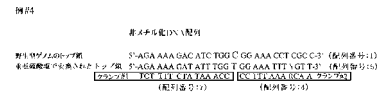
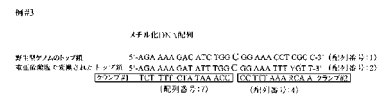


【 図 1 2 】

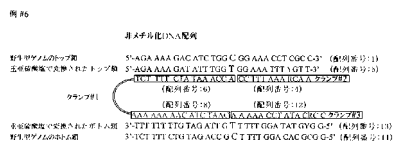
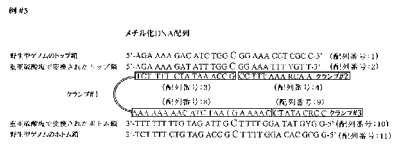


2つのタングステン錯体が重硫酸酸塩化されたグノノDNA上に正確に配置されるためには、4つの独立したハイブリダイゼーションが起る必要がある。タングステン錯体の各一本は、生膜を形成する。DNA配列内に塩基ランゲーションすることで完全に固定されたプローブが形成される。

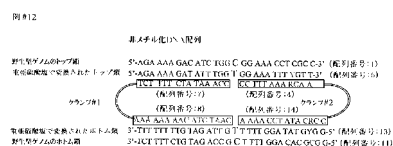
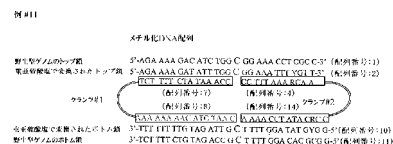
【 図 9 】



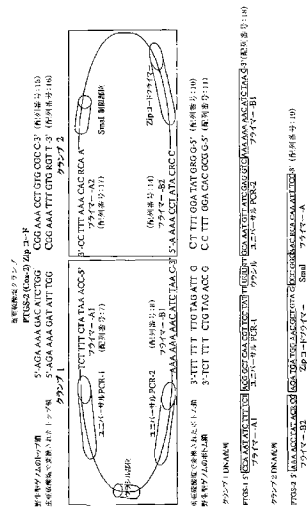
【 図 1 0 】



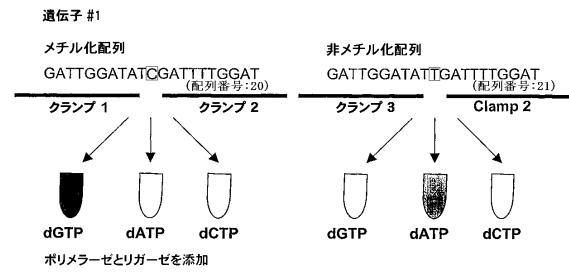
【 図 1 3 】



【 図 1 4 】

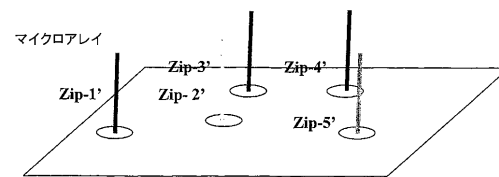


【 図 1 5 】



【 図 1 6 】

Zip-1	クランプ A
Zip-2	クランプ B
Zip-3	クランプ C
Zip-4	クランプ D
Zip-5	クランプ E



【配列表】

0004714148000001 . app

フロントページの続き

- (72)発明者 ミラー, ダグラス, スペンサー
オーストラリア連邦, ニューサウスウェールズ州 2 2 1 2 , レブズビー, ローランド アベニュー 8
- (72)発明者 メルキ, ジョン, ロバート
オーストラリア連邦, ニューサウスウェールズ州 2 2 1 9 , ドールズ ポイント, ラッセル アベニュー 7 / 1 7 0
- (72)発明者 ミクロス, ジョージ, エル. ガボール
オーストラリア連邦, ニューサウスウェールズ州 2 1 0 8 , パーム ビーチ, ビンヤ ロード 8 1

審査官 池上 文緒

- (56)参考文献 特表2 0 0 3 - 5 2 1 2 5 2 (J P , A)
国際公開第2 0 0 3 / 0 5 2 1 4 2 (W O , A 1)
国際公開第9 5 / 0 0 1 4 5 6 (W O , A 1)
Nucleic Acids Res. (2000) vol.28, no.8, p.E32

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
C12N 15/00-15/90
C12Q 1/68
PubMed
BIOSIS/WPI (DIALOG)