



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02805507.1

[45] 授权公告日 2007 年 11 月 7 日

[11] 授权公告号 CN 100347314C

[22] 申请日 2002.3.8 [21] 申请号 02805507.1  
 [30] 优先权  
     [32] 2001. 3. 9 [33] DE [31] 10112515.1  
     [32] 2001.11.19 [33] DE [31] 10158283.8  
 [86] 国际申请 PCT/EP2002/002572 2002. 3. 8  
 [87] 国际公布 WO2002/072880 德 2002. 9. 19  
 [85] 进入国家阶段日期 2003. 8. 25  
 [73] 专利权人 EPI 基因组股份公司  
     地址 德国柏林  
 [72] 发明人 A·奥莱克 K·伯林  
 [56] 参考文献  
     WO9955905A1 1999.11.4  
     CLAMPING. ORUM H PCR. CURRISSUES  
     MOL BIOL, Vol. 2 No. 1. 2000

SPECIFIC INHIBITION OF PCR BY NON EX-  
 TENDABLE OLIGONUCLEOTIDS USING A  
 . . . . . YU ET AL. BIOTECHNOLOGICAL, Vol.  
 23 No. 4. 1997  
 审查员 孙俊荣  
 [74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利  
     商标事务所  
     代理人 吴亦华

权利要求书 5 页 说明书 40 页 附图 15 页

## [54] 发明名称

探测胞嘧啶甲基化模式的高灵敏度方法

## [57] 摘要

本发明涉及一种在 DNA 样品中探测胞嘧啶甲基化的方法，其中进行了下面的步骤：将包含所研究的 DNA 和背景 DNA 的基因组 DNA 样品以这样一种方式进行化学处理，从而使得所有非甲基化的胞嘧啶碱基都转变为尿嘧啶，而 5 - 甲基胞嘧啶碱基保持不变；用至少 2 个引物寡核苷酸和一个聚合酶对经化学处理的 DNA 样品进行扩增，其中所研究的 DNA 相对于背景 DNA 是优选被作为模板的；并且分析扩增产物，并从扩增产物的存在性和/或从对它的位置的分析中推断所研究的 DNA 中的甲基化状态。

1. 一种在 DNA 样品中探测胞嘧啶甲基化的方法，其特征在于，进行了下面的步骤：

a) 将包含所研究的 DNA 和背景 DNA 的基因组 DNA 样品以这样一种方式进行化学处理，从而使得所有非甲基化的胞嘧啶碱基都转变为尿嘧啶，而 5-甲基胞嘧啶碱基保持不变；

b) 用至少 2 个引物寡核苷酸、一个聚合酶和至少一种额外的寡核苷酸或 PNA 寡聚体对经化学处理的 DNA 样品进行扩增，其中该寡核苷酸或 PNA 寡聚体结合 5'-CG-3' 二核苷酸或 5'-TG-3' 二核苷酸或 5'-CA-3' 二核苷酸，其中该额外的寡核苷酸或 PNA 寡聚体优先地结合背景 DNA 并对其扩增产生不利影响，在扩增中所研究的 DNA 相对于背景 DNA 是优先被作为模板的，并且

c) 分析扩增产物，并从扩增产物的存在性和/或从对其它位置的分析中推断所研究的 DNA 中的甲基化状态。

2. 根据权利要求 1 的方法，其特征在于，样品 DNA 是从个体的血清或其它体液中获得的。

3. 根据权利要求 1 的方法，其特征在于，样品 DNA 是从细胞系、血液、痰、粪便、尿、血清、脑脊液、包埋于石蜡中的组织如来自眼、肠、肾、脑、心、前列腺、肺、乳房或肝的组织、组织载玻片和其所有可能的组合中获得的。

4. 根据前面权利要求中之一的方法，其特征在于，化学处理是用亚硫酸氢盐进行的。

5. 根据权利要求 4 的方法，其特征在于，化学处理是在将 DNA 包埋于琼脂糖中之后进行的。

6. 根据权利要求 4 的方法，其特征在于，使 DNA 双链体变性的试剂和/或自由基阱存在于化学处理中。

7. 根据权利要求 1 的方法，其特征在于，该额外的寡核苷酸或 PNA 寡聚体的结合位点与引物在背景 DNA 上的结合位点重叠，且该额

外的寡核苷酸阻碍了至少一种引物寡核苷酸与背景 DNA 的结合。

8. 根据权利要求 1 的方法, 其特征在于, 使用至少两个额外的寡核苷酸或 PNA 寡聚体, 其中它们的结合位点再次分别与引物在背景 DNA 上的结合位点重叠, 且所述额外的寡核苷酸和/或 PNA 寡聚体都阻碍了这两个引物寡核苷酸与背景 DNA 的结合。

9. 根据权利要求 8 的方法, 其特征在于, 额外的寡核苷酸和/或 PNA 寡聚体之一阻碍了正向引物的结合, 而另一个阻碍了反向引物的结合。

10. 根据权利要求 6~9 中之一的方法, 其特征在于, 所述额外的寡核苷酸和/或 PNA 寡聚体至少以相对于引物寡核苷酸 5 倍的浓度存在。

11. 根据权利要求 6 的方法, 其特征在于, 额外的寡核苷酸和/或 PNA 寡聚体结合背景 DNA 并因而阻碍了引物寡核苷酸在聚合酶反应中的完全延伸。

12. 根据权利要求 11 的方法, 其特征在于, 所用的聚合酶不具有 5'-3'外切核酸酶活性。

13. 根据权利要求 11 的方法, 其特征在于, 额外的寡核苷酸存在 5'末端的修饰, 并因而不能被具有 5'-3'外切核酸酶活性的聚合酶显著地破坏。

14. 根据权利要求 6~13 中之一的方法, 其特征在于, 除引物之外使用的寡核苷酸不具备 3'-OH 功能。

15. 根据权利要求 1~14 中之一的方法, 其特征在于, 在第二步骤中, 经化学处理的 DNA 样品使用至少 2 个引物寡核苷酸和一个额外的与 5'-CG-3'二核苷酸或 5'-TG-3'二核苷酸或 5'-CA-3'二核苷酸杂交的寡核苷酸或 PNA 寡聚体, 和至少一个与 5'-CG-3'二核苷酸或 5'-TG-3'二核苷酸或 5'-CA-3'二核苷酸杂交的报道寡核苷酸以及聚合酶进行扩增; 其中该额外的寡核苷酸或 PNA 寡聚体优先结合背景 DNA 并对其扩增产生不利影响, 且其中该报道寡核苷酸优先结合所研究的 DNA 并指示其扩增。

16. 根据权利要求 15 的方法，其特征在于，是相对于报道寡核苷酸附加地使用另一个用荧光染料进行标记的寡聚体，该寡聚体直接在邻近报道寡核苷酸处进行杂交，且该杂交借助荧光共振能量转移进行检测。

17. 根据权利要求 15 或 16 中之一的方法，其特征在于，进行 TaqMan 测定。

18. 根据权利要求 15 或 16 中之一的方法，其特征在于，进行 LightCycler 测定。

19. 根据权利要求 15~18 中之一的方法，其特征在于，报道寡核苷酸带有至少一个荧光标记。

20. 根据权利要求 15~19 中之一的方法，其特征在于，报道分子通过荧光的增加或减少以显示扩增。

21. 根据权利要求 20 的方法，其特征在于，荧光的增加和减少也直接用于分析，且所研究的 DNA 的甲基化状态从荧光信号来推断。

22. 根据权利要求 1~21 中之一的方法，其特征在于，背景 DNA 以所研究的 DNA 浓度的 100 倍存在。

23. 根据权利要求 1~21 中之一的方法，其特征在于，背景 DNA 以所研究的 DNA 浓度的 1000 倍存在。

24. 根据权利要求 1~23 中之一的方法，其特征在于，该分析或者在根据权利要求 5~10 的方法情况下，进一步的分析是借助与寡聚体阵列的杂交来进行的，其中寡聚体可以是核酸或与其杂交性质上相似的分子。

25. 根据权利要求 24 的方法，所述寡聚体是 PNA。

26. 根据权利要求 24 的方法，其特征在于，该寡聚体通过 12-22 个碱基长的区段与所研究的 DNA 杂交且它们包括 CG、TG 或 CA 二核苷酸。

27. 根据权利要求 24 的方法，其特征在于，所研究的 DNA 中多于 20 个甲基化位置的甲基化状态是在一个实验中探测的。

28. 根据权利要求 24 的方法，其特征在于，所研究的 DNA 中多于

60个甲基化位置的甲基化状态是在一个实验中探测的。

29. 根据权利要求 1~24 中之一的方法，其特征在于，所述分析是通过对扩增的所研究的 DNA 的长度测量来进行的，其中长度测量的方法包括凝胶电泳、毛细管凝胶电泳、层析、质谱分析和其它适宜的方法。

30. 根据权利要求 29 的方法，所述层析是 HPLC。

31. 根据权利要求 1~24 中之一的方法，其特征在于，所述分析是通过测序进行的，其中测序方法包括桑格方法、马吉测序法和通过杂交的测序（SBH）。

32. 根据权利要求 31 的方法，其特征在于，对每一个或一小组 CpG 位置的测序分别用一个单独的引物寡核苷酸进行，且引物延伸仅构成了一个或几个碱基段，且从引物延伸类型推断所研究的 DNA 中相关位置的甲基化状态。

33. 根据权利要求 1~32 中之一的方法，其特征在于，从不同的经研究的 CpG 位置的甲基化程度能够推断病人的疾病或另一种医学状况的存在。

34. 根据权利要求 1~33 之一的方法，其特征在于，扩增产物本身带有可探测的标记用于对其进行探测。

35. 根据权利要求 34 的方法，其特征在于，该标记为荧光标记。

36. 根据权利要求 34 的方法，其特征在于，该标记为放射性核素。

37. 根据权利要求 34 的方法，其特征在于，该标记为在质谱仪中探测的可除去的质量标记。

38. 根据权利要求 1~37 之一的方法，其特征在于，在扩增反应中引物之一是结合在固相上的。

39. 根据权利要求 1~34 中之一的方法，其特征在于，扩增产物是全部在质谱仪上探测并由此通过其质量明确地进行特征记录。

40. 根据权利要求 1~39 之一的方法的用途，用于区别细胞类型或组织或者用于研究细胞分化。

---

41. 一种试剂盒，该试剂盒包括含有亚硫酸氢盐的试剂、引物和其它用于产生扩增产物的无 3'-OH 功能的寡核苷酸，以及可选择的实施根据权利要求 1~39 中之一的测定的说明书。

## 探测胞嘧啶甲基化模式的高灵敏度方法

本发明涉及在 DNA 样品中探测胞嘧啶甲基化的方法。

近几年中在分子生物学中由于方法的发展而充分研究的观察水平是基因本身，即这些基因至 RNA 的翻译和由此产生的蛋白质。在个体发育过程中，哪些基因何时开启及某些细胞和组织中某些基因激活和抑制如何得到控制，与基因或基因组甲基化的程度和特性相关。致病的状态也是以单个基因或基因组的改变了的甲基化模式表达的。

5-甲基胞嘧啶是真核细胞 DNA 中最经常进行共价修饰的碱基。例如，它在转录调节中、在遗传印记中和在肿瘤发生中起作用。5-甲基胞嘧啶作为遗传信息成分的鉴定因而具有相当的重要性。然而 5-甲基胞嘧啶位置不能通过测序来鉴定，这是因为 5-甲基胞嘧啶与胞嘧啶具有相同的碱基配对性质。此外，在 PCR 扩增的情况下，由 5-甲基胞嘧啶携带的外遗传信息完全丧失了。

其后研究 DNA 的 5-甲基胞嘧啶最经常应用的相对新的方法是基于亚硫酸氢盐与胞嘧啶的特定反应的，胞嘧啶在随后的碱水解之后转变为尿嘧啶，尿嘧啶在碱基配对性质上相应于胸腺嘧啶。相反地，5-甲基胞嘧啶在这些条件下不被改变。因而使最初的 DNA 进行了如此转变，使最初不能依靠其杂交性质与胞嘧啶区分的甲基胞嘧啶现在可以作为单独剩余的胞嘧啶而通过“标准的”分子生物学技术进行探测，例如通过扩增和杂交或测序。所有这些技术都基于碱基配对，就此碱基配对得到充分利用。涉及灵敏度的现有技术是通过一种方法定义的，该方法将所研究的 DNA 结合到琼脂糖基质上，借此防止了 DNA 的扩散和复性（亚硫酸氢盐只能在单链 DNA 上反应），且所有的沉淀和纯化步骤都被快速的透析取代了（Olek A., Oswald J., Walter J., 一种改良和提高了的基于硫酸氢盐的胞嘧啶甲基化分析方法（A modified and improved method for bisulphate based cytosine

methylation analysis), *Nucleic Acids Res.* 1996 年 12 月 15 日; 24 (24): 5064-6)。用该方法可研究单独的细胞, 这说明了该方法的潜力。然而至今仅研究了长度为约 3000 个碱基对的单独区域, 对细胞进行完全研究以进行数千的可能的甲基化分析是不可能的。然而该方法也不能可靠地分析来自微量样品的非常小的片段, 其尽管基质的扩散保护, 但还是损失了。

对探测 5-甲基胞嘧啶的其它已知可能性的综述可源自下面的综述文章: Rein T, DePamphilis ML, Zorbas H, 鉴定 DNA 基因组中的 5-甲基胞嘧啶和相关的修饰 (Identifying 5-methylcytosine and related modifications in DNA genomes), *Nucleic Acids Res.* 1998 年 5 月 15 日; 26 (10): 2255-64。

至今亚硫酸氢盐技术仅应用于研究中, 仅有少数例外 (例如, Zeschnigk M, Lich C, Buiting K, Dörfler W, Horsthemke B, 用于基于 SNRPN 座位的等位甲基化差异对 Angelman 和 Prader-Willi 综合症进行诊断的单管 PCR 检验 (A single-tube PCR test for the diagnosis of Angelman and Prader-Willi syndrome based on allelic methylation differences at the SNRPN locus), *Eur J Hum Genet.* 1997 年 3 月-4 月; 5 (2): 94-8)。然而, 在亚硫酸氢盐处理之后已知基因的短的特定片段总是得到扩增, 并且由“引物延伸反应”探测了或者经完全测序的 (Olek A, Walter J, H19 甲基化印记的植入前个体发生 (The preimplantation ontogeny of the H19 methylation imprint), *Nat. Genet.* 1997 年 11 月; 17 (3): 275-6) 或者单独的胞嘧啶位置 (Gonzalzo ML, Jones PA, 用甲基化敏感性单一核苷酸引物延伸 (Ms-SNuPE) 对特定位点上甲基化差异的快速定量 (Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE)), *Nucleic Acids Res.* 1997 年 6 月 15 日; 25 (12): 2529-31, WO 专利 95 00669) 或者酶的切割 (Xiong Z, Laird PW, COBRA: 一种灵敏的定

量 DNA 甲基化测定 ( a sensitive and quantitative DNA methylation assay ), *Nucleic Acids Res.* 1997 年 6 月 15 日; 25 ( 12 ): 2532-4)。此外还描述有依靠杂交进行的探测 ( Olek 等人, WO 99/28498 )。

基因组 DNA 中的 5-甲基胞嘧啶测序之前, 尿素改进了亚硫酸氢盐处理的效率 ( Paulin R, Grigg GW, Davey MW, Piper AA, 尿素改进了硫酸氢盐介导的对基因组 DNA 中 5-甲基胞嘧啶测序的效率 ( Urea improves efficiency of bisulphate-mediated sequencing of 5'-methylcytosine in genomic DNA ), *Nucleic Acids Res.* 1998 年 11 月 1 日; 26 ( 21 ): 5009-10)。

其它有关用于在单个基因中探测甲基化的亚硫酸氢盐技术的应用的出版物为: Grigg G, Clark S, 基因组 DNA 中 5-甲基胞嘧啶残基的测序 ( Sequencing 5-methylcytosine residues in genomic DNA ), *Bioassays.* 1994 年 6 月; 16 ( 6 ): 431-6, 431; Zeschnigk M, Schmitz B, Dittrich B, Buiting K, Horsthemke B, Dörfler W, 人类基因组中印记的区段: 由基因组测序方法确定的 Prader-Willi/Angelman 综合症区域中的不同的 DNA 甲基化模式 ( Imprinted segments in the human genome: different DNA methylation patterns in the Prader-Willi/Angelman syndrome region as determined by the genomic sequencing method ), *Hum Mol Genet.* 1997 年 3 月; 6 ( 3 ): 387-95; Feil R, Charlton J, Bird AP, Walter J, Reik W, 单独染色体的甲基化分析: 硫酸氢盐基因组测序改进的规程 ( Methylation analysis on individual chromosomes: improved protocol for bisulphate genomic sequencing ), *Nucleic Acids Res.* 1994 年 2 月 25 日; 22 ( 4 ): 695-6; Martin V, Ribieras S, Song-Wang X, Rio MC, Dante R, 基因组测序显示 pS2 基因的 5' 区域中的和其在人乳腺癌细胞系中表达中的 DNA 甲基化不足之间相关 ( Genomic sequencing indicates a correlation between DNA hypomethylation in the

5' region of the pS2 gene and in its expression in human breast cancer cell lines), Gene. 1995年5月19日; 157(1-2): 261-4; WO 97/46705, WO 95/15373 和 WO 45560.

另一个已知的方法是所谓的甲基化灵敏性 PCR (Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB, (1996), 甲基化特异性 PCR: CpG 岛甲基化状况的新 PCR 测定 (Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands), Proc Natl Acad Sci USA. 9月3日; 93(18): 9821-6)。该方法使用了引物, 该引物或者仅与序列杂交, 所述序列是由于对相关位置上未甲基化的 DNA 进行亚硫酸氢盐处理而形成的, 或者相反的引物, 该引物仅与核酸结合, 所述核酸通过亚硫酸氢盐处理在相关位置上未甲基化的 DNA 而形成。利用这些引物, 就可以产生扩增产物, 其探测反过来提供了引物所结合的样品中甲基化或非甲基化位置存在的线索。

一种更新近的方法也是依靠 TaqMan PCR 对胞嘧啶甲基化进行探测, 该方法以甲基灯 (methyl-light) 闻名 (WO 00/70090)。该方法可以直接在 PCR 过程中探测单独的位置或数个位置的甲基化状态, 从而省去了随后对产物的分析。

对寡聚体阵列产品的现有技术综述可获取自发表于 1999 年 1 月的自然基因学 (Nature Genetics) 上的特刊 (Nature Genetics 增刊 (Supplement), 21 卷, 1999 年 1 月)、在此处引用的文献及美国专利 5,994,065 中的生产在减低的非特异性背景信号下用于目标分子如寡核苷酸的固体载体的方法。

多重荧光标记的探针被用于对固定的 DNA 阵列的扫描。特别适合于进行荧光标记的是在各个探针的 5'-OH 简单地引入 Cy3 和 Cy5 染料。杂交的探针的荧光是依靠如聚焦显微镜进行探测的。除许多其它的之外, 染料 Cy3 和 Cy5 是商业可购得的。

基质辅助的激光解吸/电离质谱分析 (MALDI-TOF) 是生物分子分析的非常有效力的发展 (Karas M, Hillenkamp F, 分子量超过

10,000 道尔顿的蛋白质的激光解吸电离 ( Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons ), Anal Chem. 1988 年 10 月 15 日; 60 (20): 2299-301 )。将一种分析物包埋入光吸收性基质中。依靠短的激光脉冲使该基质蒸发, 且促使该分析物分子未片段化地迁移到气相中。分析物的电离是通过与基质分子的碰撞而实现的。施加的电压将离子加速进入一个无场的飞行管。离子基于其不同的质量而被加速到不同的程度。较小的离子比较大的离子更快地到达探测器。

MALDI-TOF 光谱极其适合于对肽和蛋白质的分析。对核酸的分析则有些困难 (Gut, I. G. 和 Beck, S. (1995), DNA 和基质辅助的激光解吸 / 电离质谱分析 ( DNA and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry ) , Molecular Biology: Current Innovations and Future Trends 1: 147-157)。对于核酸, 灵敏度比肽大约低 100 倍, 且随着增大的片段而以过大的比例降低。对于具有多负电荷主链的核酸, 通过基质的电离过程基本是低效的。在 MALDI-TOF 光谱中, 对基质的选择起非常重要的作用。对于肽的解吸, 已发现了几个非常有效力的基质, 所述基质产生非常精细的结晶。同时虽然也发现了用于 DNA 的一些符合要求的基质, 却借此未能减少灵敏度的差异。灵敏度的差异的减少可通过对 DNA 进行修饰而使之类似于肽的方法。硫代磷酸核酸可通过简单的烷基化化学而转变为电荷中性的 DNA, 所述核酸主链中通常的磷酸被硫代磷酸替代 (Gut, I. G. 和 Beck, S. (1995), 选择性 DNA 烷基化和由质谱探测的程序 ( A procedure for selective DNA alkylation and detection by mass spectrometry ) , Nucleic Acids Res. 23: 1367-1373)。“电荷标记”与该经修饰的 DNA 的偶联导致灵敏度的增加, 增加量与其对肽的效用一样。“电荷标记”的另一个优点是相对于杂质分析稳定性的增加, 杂质严重妨碍了对未修饰的底物的探测。

基因组 DNA 是通过标准方法从细胞、组织或其它检验样品的 DNA

中获得的。

所述标准的方法学可发现于参考文献中，如 Fritsch 和 Maniatis，分子克隆：实验室手册（Molecular Cloning: A Laboratory Manual），1989。

因此，在现有技术中迄今已有许多甲基化分析的方法。然而，本发明将解决现有方法不能解决的问题，即，当其它不同来源的序列同源 DNA 片段也存在时以定向的方式扩增所研究的在体液或血清中的 DNA。

所研究的 DNA 及在下面命名为背景 DNA 的其它存在的核酸通常是同样扩增的，这是因为所用的引物不能区别所研究的 DNA 与背景 DNA。然而，区别这些 DNA 的一种可能性是通过不同的甲基化模式。一种现有的方法是甲基化灵敏性 PCR，简称 MSP (Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB, (1996) 甲基化特异性 PCR: CpG 岛甲基化状况的新 PCR 测定 (Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands), Proc Natl Acad Sci USA. 9 月 3 日; 93 (18): 9821-6)。该方法包含多个步骤。首先，进行了根据现有技术的亚硫酸氢盐处理，再次导致所有胞嘧啶转变为尿嘧啶而甲基化的胞嘧啶碱基（5-甲基胞嘧啶）保持不变的情况。在下一个步骤中，人们开始使用引物，该引物与用亚硫酸氢盐转变的甲基化 DNA 完全互补，但不与最初以非甲基化状态存在的相应 DNA 互补。当用这种引物进行 PCR 时，这导致最初甲基化的 DNA 专一地扩增的事实。同样可能的是使用相反只扩增非甲基化 DNA 的引物。这样，如果要分析的 DNA 及背景 DNA 存在时，所研究的 DNA 片段将选择性地和专一地产生，只要它们与背景 DNA 鉴于 CpG 位置中的甲基化状态有区别。目前现有技术从这样一种所研究的 DNA 分子中反向推断所研究的 DNA 的甲基化状态或其是否存在，其再次原则上允许如对病人肿瘤病症的诊断，因为已知的是，如肿瘤病人的血清 DNA 浓度部分地大幅度增加了。只有源自肿瘤的 DNA 除背景 DNA 之外应被检测到。原则上，在其它体液中的 DNA 分析是类似的。

然而，此处描述的且认为是最近的现有技术的方法具有一些缺点。例如，它不可能从所研究的 DNA 的扩增片段的可探测性中推断血清中存在的量。虽然最微量的这种 DNA 都可成功地获得阳性结果，这在一方面是优点，但如果人们希望判断如肿瘤切除对血清 DNA 的影响时，它也可以以非常不适宜的方式起作用。然而，最大的缺点是有许多甲基化位置存在，其对于所研究的 DNA 和背景 DNA 仅在程度上有差别。明显的是如果人们不希望冒着得到假阳性结果的风险，那么现有的 MSP 方法只能在如果人们知道背景 DNA 与所研究的 DNA 在目标 CpG 位置有明确的或达到 100% 的差别时才可实施。相反地，在肿瘤组织中典型地例如 95% 的肿瘤细胞中在特定位置上呈现甲基化状态，而其中另外存在的背景 DNA 却最多只有 5% 的甲基化状态，这却不可能用 MSP 方法得到能提供信息的结果，这是因为依靠 PCR 对模板 DNA 的量化原则上是不可能的或只能靠增加花费来实现。此外该发明是基于这样的知识，即其经常是 DNA 片段中的甲基化模式，这对于特定的细胞类型如肿瘤细胞是典型的。

同样，现有技术包括由 Epigenomics 发展的方法，该方法在亚硫酸氢盐处理后同样地扩增所研究的 DNA 和背景 DNA，然后通过杂交技术和可选择地依靠小测序 (mini-sequencing) 或其它现有方法来鉴定包含于片段中先前 CpG 的位置。这具有获得相对于所研究的甲基化位置的定量模式的优点，即，成功地获得了对多个位置的甲基化程度的确定，这例如使得能够在实体瘤的情况下非常精确的分类。然而，该方法的缺点是它在背景 DNA 非常占优势的情况下不能提供精确的信息，这是因为该信息是完全如同所研究的 DNA 一样扩增的，且两者均在混合物中进行分析。对实体瘤的分析中不存在该问题，其中所研究的材料可以定向选择，但是却造成如对血清 DNA 的分析的困难。

本发明的目的目前是克服现有技术的缺点并将用于对体液和血清探测的两种方法的优点组合。

该目的是通过创造用于探测 DNA 样品中胞嘧啶甲基化的方法而解决的，在该方法中进行了下面的步骤：

将包含所研究的 DNA 和背景 DNA 的基因组 DNA 样品以进行化学处理，从而使得所有非甲基化的胞嘧啶碱基都转变为尿嘧啶，而 5-甲基胞嘧啶碱基保持不变；

用至少 2 个引物寡核苷酸和一个聚合酶对经化学处理的 DNA 样品进行扩增，其中所研究的 DNA 相对于背景 DNA 是优选被作为模板的，分析扩增产物，并从扩增产物的存在性和/或从对其它位置的分析中得出所研究的 DNA 中甲基化状态的结论。

根据本发明优选的是样品从个体的血清或其它体液中获得。

根据本发明进一步优选的是样品从细胞系、血液、痰、粪便、尿、血清、脑脊液、包埋于石蜡中的组织如来自眼、肠、肾、脑、心、前列腺、肺、乳房和肝的组织、组织载玻片和其所有可能的组合中获得。

根据本发明尤其特别优选的是化学处理是用亚硫酸氢盐 (=Disulfit, Hydrogensulfit) 进行的。还优选的是在将 DNA 包埋于琼脂糖中之后进行的化学处理。同样且进一步优选的是使 DNA 双链体变性的试剂和/或自由基阱存在于化学处理中。

优选扩增是在第二个步骤中至少一种额外的寡核苷酸存在下进行的，该寡核苷酸结合 5'-CG-3'二核苷酸或 5'-TG-3'二核苷酸或 5'-CA-3'二核苷酸，其中该额外的寡核苷酸优选地结合背景 DNA 并对其扩增产生不利影响。

特别优选的是额外的寡核苷酸或 PNA 寡聚体在背景 DNA 上的结合位点与引物的结合位点重叠，且额外的寡核苷酸阻碍了至少一种引物寡核苷酸与背景 DNA 的结合。

再度特别优选的是利用了至少两个额外的寡核苷酸或 PNA 寡聚体，其中它们的结合位点再次分别与引物在背景 DNA 上的结合位点重叠，且额外的寡核苷酸和/或 PNA 寡聚体阻碍了这两个引物寡核苷酸与背景 DNA 的结合。

此外特别言优选的是额外的寡核苷酸和/或 PNA 寡聚体之一阻碍了正向引物的结合，而另一个阻碍了反向引物的结合。

特别优选的是额外的寡核苷酸和/或 PNA 寡聚体至少以引物寡核苷酸浓度的 5 倍存在。

在本发明的另一个特别优选的变体中，额外的寡核苷酸和/或 PNA 寡聚体结合背景 DNA 并因而阻碍了引物寡核苷酸在聚合酶反应中的完全延伸。其中再度特别优选的是所用的聚合酶不具有 5'-3' 外切核酸酶活性。另一个优选的变体是额外的寡核苷酸存在 5' 末端的修饰，并因而不能被具有 5'-3' 外切核酸酶活性的聚合酶显著地破坏。

此外，根据本发明优选的是经化学处理的 DNA 样品在第二步骤中使用至少 2 个引物寡核苷酸和另一个与 5'-CG-3' 二核苷酸或 5'-TG-3' 二核苷酸或 5'-CA-3' 二核苷酸杂交的寡核苷酸，和至少一个与 5'-CG-3' 二核苷酸或 5'-TG-3' 二核苷酸或 5'-CA-3' 二核苷酸杂交的报道寡核苷酸以及一个聚合酶进行扩增；其中该额外的寡核苷酸优选结合背景 DNA 并对其扩增产生不利影响，且其中该报道寡核苷酸优选地结合所研究的 DNA 并指示其扩增。因而有利的是对于报道寡核苷酸附加地使用另一个用荧光染料进行标记的寡聚体，其直接在邻近报道寡核苷酸处进行杂交，且该杂交借助荧光共振能量转移进行探测。进一步有利的是进行 TaqMan 测定。同样优选的是进行 LightCycler 测定。

根据本发明进一步优选的是除引物外所使用的寡核苷酸不能具备 3'-OH 功能。此外，优选的是报道寡核苷酸带有至少一个荧光标记。同样优选的是报道分子通过荧光的增加或减少显示扩增。在此特别有利的是该荧光的增加和减少也直接用于分析，且所研究的 DNA 的甲基化状态可从荧光信号来推断。

根据本发明进一步优选的是背景 DNA 以所研究的 DNA 浓度的 100 倍存在。进一步优选的是背景 DNA 以所研究的 DNA 浓度的 1000 倍存在。

此外优选的是该分析或者视情况进一步的分析可依靠与寡聚体阵列的杂交来进行，其中寡聚体可以是核酸或其杂交性质上相似的分子如 PNA。

根据本发明同样有利的是寡聚体通过 12-22 个碱基长的区段与所

研究的 DNA 杂交且它们包括 CG、TG 或 CA 二核苷酸。

优选的是所研究的 DNA 中多于 20 个甲基化位置的甲基化状态是在一个实验中探测的。

进一步优选的是所研究的 DNA 中多于 60 个甲基化位置的甲基化状态是在一个实验中探测的。

根据本发明同样优选的是该分析或者视情况的进一步分析是通过扩增的所研究的 DNA 的长度测量来进行的，其中该长度测量的方法包含凝胶电泳、毛细管凝胶电泳、层析（如 HPLC）、质谱分析和其它适宜的方法。在此同样有利的测序方法包括桑格方法、马吉测序法和其它方法，如通过杂交的测序（SBH）。

一种根据本发明的方法同样是优选的，其中对每一个或一小组 CpG 位置的测序分别用一个单独的引物寡核苷酸进行，且引物延伸仅构成了一个或几个碱基段，且从引物延伸的类型中推断出所研究的 DNA 中相关位置的甲基化状态。

进一步优选的是从不同的经研究的 CpG 位置的甲基化程度推断病人的病症或另一种医学状况的存在。

有利的是扩增产物本身是带有可探测的标记的。进一步有利的是该标记为荧光标记或/和该标记为放射性核素或/和该标记为在质谱仪中探测的可除去的质量标记。

此外优选的是在扩增中，引物之一是结合在固相上的。

根据本发明，扩增产物是全部在质谱仪上探测的且由此通过其质量明确地进行特征记录。

本发明的另一个目的还有使用根据本发明的方法对病人或个体进行不利情形的诊断和/或预诊，其中这些不利情形属于至少一种下面的种类：非期望的药物作用；癌病症；CNS 功能失常、损伤或疾病；攻击或行为障碍症状；脑损伤的临床、心理学和社会结果；精神病障碍和个性病症；痴呆和/或有关的症状；心血管疾病、功能失常和损伤；胃肠道的功能失常、损伤或疾病；呼吸系统的功能失常、损伤或疾病；受伤、炎症、感染、免疫和/或康复；作为发育过程中畸形的

身体功能失常、损伤或疾病；皮肤、肌肉、结缔组织或骨骼的功能失常、损伤或疾病；内分泌和代谢功能失常、损伤或疾病；头痛或性功能失常。

在此根据本发明的方法用于区别细胞类型或组织或者用于研究细胞分化是有利的。

本发明的目的还有一种试剂盒，该试剂盒包括含有亚硫酸氢盐的试剂、引物和其它用于产生扩增产物的无 3'-OH 功能的寡核苷酸，以及可选择的实施根据本发明测定的说明书。

因而本发明描述了探测基因组 DNA 样品的甲基化状态的方法。与以前已知的方法相反，一组 CpG 位置的甲基化程度是在选择的 DNA 片段亚组中确定的，如在血清中，从而在过量的与诊断不相关的背景 DNA 存在下该分析也是可能的。

在此优选的方法包含几个步骤，概述如下：

首先，从病人获取血清和/或其它的体液，并且如果需要分离在其中存在的 DNA。随后，在第二个步骤中，进行化学处理，优选的是用亚硫酸氢盐 (=Hydrogensulfit, Disulfit) 的，其中如所有非甲基化的胞嘧啶碱基转变为尿嘧啶，但甲基化的胞嘧啶碱基 (5-甲基胞嘧啶) 则保持不变。在方法的第三个步骤中，开始进行扩增，其中优选地扩增所研究的 DNA 而不是或者仅扩增较少量的背景 DNA。在随后的第四个步骤中，对扩增片段的甲基化特征进行分析，且多个先前的 CpG 位置的甲基化程度是在扩增产物中确定的。在该方法的第五个步骤中，病人的病症或另一种医学状况的存在性是从研究的不同 CpG 位置的甲基化程度推断的。

本发明的要素是两类 CpG 位置对分析都起作用且具有相同的贡献，这将在下面命名为“限定器 (Qualifier)”位置和“分类器 (Classifier)”位置。限定器位置在扩增中用作将所研究的 DNA 与背景 DNA 区分开来。这可在技术上在不同的途径中进行，如在下面详细给出的。然而，这些位置的性质是在所研究的 DNA 中的甲基化程度与来自背景 DNA 的尽可能的不同，且这导致在扩增中对所研究的 DNA

的优选。相反地，分类器位置用作从所研究的 DNA 产生的扩增产物中通过各自的甲基化程度提取对于诊断很重要的信息。如果进行例如寡聚体阵列上的分析，多达几百个这样的分类器位置可用于一个分析中，尽管这经常不是必需的。然而，在这种情况下，不是特定扩增产物的形成而是在相同产物中 CpG 位置的分析对于研究结果是重要的。然而，在一些情况下，将从扩增产物的形成推导出的信息用于分析中却是可能和有意义的；在这种情况下，几个位置则同时是分类器和限定器。

该方法的第一步，即获得样品是优选地通过获得体液如痰或血清而进行的，但明显的是该方法可用来自不同来源的许多类型的样品来进行，此处列出这些样品，但并不认为是其全部。

优选地，本方法中所用的基因组 DNA 从 DNA 样品中获得，其中 DNA 的来源包括如细胞系、血液、痰、粪便、尿、血清、脑脊液、包埋于石蜡中的组织如来自眼、肠、肾、脑、心、前列腺、肺、乳房和肝的组织、组织载玻片和其所有可能的组合。

在一些情况下，为了避免由于过高的不纯程度而导致的对亚硫酸氢盐反应和/或随后的 PCR 的破坏，在亚硫酸氢盐处理之前进行了 DNA 的纯化和浓缩。然而，已知的是如源自组织的 PCR 可以在如蛋白酶 K 处理各无需进一步纯化而进行，且按其意义也适用于亚硫酸氢盐处理和随后的 PCR。

化学处理优选通过用亚硫酸氢盐的处理进行，再次优选的是亚硫酸氢钠（亚硫酸氢铵的适合程度次之）。该反应或者是根据发表的变体方案进行的，在此 DNA 优选地包埋在琼脂糖中以使在处理中 DNA 保持单链状态，然而或者根据一种新的变体方案，通过在自由基阱和变性剂存在下进行处理，优选地为乙二醇二烷基醚或如二噁烷。在 PCR 反应之前，在琼脂糖的情况下通过洗涤除去试剂或者通过 DNA 纯化方法除去（现有技术，沉淀或结合到固相、膜上），或者简单地通过在浓度区进行稀释，该方法不会显著影响 PCR。

对于第三个步骤，现在基本的是选择限定器位置和适当的方法，

以允许所研究的 DNA 选择性地扩增。位置的选择是根据下面的前提进行的, 即这些位置应尽可能地鉴于其甲基化相互区别背景 DNA 和所研究的 DNA。为此, 分别确定所研究的肿瘤以及来自健康个体的背景 DNA 的相关基因区段的甲基化特点。这些在肿瘤 DNA 和背景 DNA (如在血清中) 具有最大差异的位置是作为限定器位置选择的。这种位置对于大量基因是已知的, 如对于 GSTpi、对于 HIC-1 和 MGMT (von Wronski MA, Harris LC, Tano K, Mitra S, Bigner DD, Brent TP, (1992) 人横纹肌肉瘤细胞系和异种移植中的胞嘧啶甲基化和 O6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶表达的抑制 (Cytosine methylation and suppression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase expression in human rhabdomyosarcoma cell lines and xenografts), *Oncol Res.*; 4 (4-5): 167-74; Esteller M, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, Capella G, Peinado MA, Watkins DN, Issa JP, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG, (2000), 通过启动子超甲基化的 DNA 修复基因 O6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶的失活与结肠肿瘤发生中 K-ras 中 G 到 A 的突变有关 (Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis), *Cancer Res.* 5 月 1 日; 60 (9): 2368-71)。现在有多种完全优选的方法, 依靠这些方法所研究的 DNA 可优选地利用这些限定器位置进行扩增。

首先, 可能的是用引物进行相应于 MSP 的反应, 该引物完全与亚硫酸氢盐处理后相应于所研究的 DNA 的序列进行杂交, 但不与进行类似处理的背景 DNA 进行杂交。换句话说, 引物与在其中具有一个或多个限定器位置的 DNA 区段进行杂交, 且只有当最初的 DNA 中的甲基化状态相应于对所研究的 DNA 进行特征记述的时, 才可能发生显著程度的扩增。这原则上是一个简单的变体方案, 但它具有限定器位置必须分别位于 DNA 片段的一端或两端的缺点, 即, 分类器位置必须位于限

定器位置之间（然而或者在只有一个限定器位置的情况下，限定器位置不应该位于分类器位置的中间）。尽管根据本发明优选的是进行这样的 MSP 变体方案，但事实上它由此仅能用于比较少数的情况中，这是因为限定器和分类器位置的分布仅在少数情况下是如此理想的。然而，由于原则上它是易于进行的，所以尽管如此将其列在此处作为优选。

然而特别优选的是一个变体方案，其中引物不与限定器位置重叠或与其杂交，而是 PCR 扩增由至少一种其它的寡核苷酸影响的，该寡核苷酸不发挥引物的功能，但在限定器位置结合。

这意味着原则上化学处理的 DNA 如在现有技术中是借助两个引物扩增。在由两个引物局限的 DNA 区段中具有一个或多个限定器位置。现在与标准的 PCR 相反地，加入了额外的寡核苷酸，该寡核苷酸与在亚硫酸氢盐处理之前或呈现甲基化或非甲基化的这些限定器位置选择性地结合。如果所加入的寡核苷酸与限定器位置的结合比与背景 DNA 的结合较弱，那么所研究的 DNA 从而优选地得到扩增。换句话说，加入的寡核苷酸选择性地阻断了背景 DNA 的扩增。

优选这些加入的寡核苷酸含有至少一个 CG、一个 TG 或者一个 CA 二核苷酸。它们必须额外具有不能被在 PCR 反应中所用的聚合酶延伸的性质。这优选地是通过利用 3'-脱氧寡核苷酸或然而利用在 3'位置具有其它功能的寡核苷酸如 3'-O-乙酰基寡核苷酸来进行的。此外，必须防止这些寡核苷酸被聚合酶的分解。这优选地用无核酸酶活性的聚合酶进行，或者优选地用经修饰的寡核苷酸进行，该寡核苷酸如在 5'末端具有硫酯键（Thioatbrücken）并因而对分解有抗性。

另一个特别优选的变体方案是 PNA（肽核酸）寡聚体的使用，按其意义该 PNA 作为寡核苷酸在实验中使用。PNA 寡聚体即不能被聚合酶分解也不能被聚合酶延伸，从而理想地适合于此方法的变体方案。设计和合成 PNA 寡聚体的方法是现有技术。

如上所述，在这种方法中可以使用多个限定器位置和同样多个分别对于在背景 DNA 中存在的甲基化状态特定的寡核苷酸。

在所研究的 DNA 的选择性扩增后，开始优选的是根据本身已知的方法确定多个限定器位置的甲基化状态。

然而明显的是即使在这种情况下，PCR 片段的形成即使在个别的情况下可具有足够的信息值，同样在 MSP 的情况下，只要限定器位置例如在背景 DNA 中实际上呈现达 100% 的非甲基化，而在所研究的 DNA 中呈现甲基化形式。如果人们开始在 PCR 中使用寡核苷酸，该寡核苷酸优选经亚硫酸氢盐处理由非甲基化的背景 DNA 形成的序列结合。只要根本上存在至少微量的所研究的 DNA，那么在 PCR 中只有一种产物形成。这在个别的情况中对于诊断已经可以是足够的了，且在此它涉及具有如 MSP 的相似性质的方法。尽管这样一种方法不是直接优选的，但这样一种方法迄今是未知的，并因此也被认为是本发明的一个主题。

优选的是在 PCR 反应中同时产生多个片段，即进行多重 PCR。在其设计中必须注意不仅引物而且其它所用的寡核苷酸都必须不能相互互补，否则高度的多重性将在这种情况下比通常的情况更加困难。然而，经亚硫酸氢盐处理的 DNA 具有优点，基于两个 DNA 链的不同 G 和 C 含量，正向引物从不能同样发挥反向引物功能，这反过来促进了多重性并基本弥补了所述缺点。

在最简单的情况下，再次开始探测形成的片段。对此考虑所有可能已知的分子生物学方法，如凝胶电泳、测序、液相层析或杂交，该探测在此不分析分类器寡核苷酸。这也可考虑用作对前序方法的质量控制。如上所述，随后对分类器位置的甲基化程度的分析却是特别优选的。

优选扩增所研究的 DNA 的上述方法有利地与探测分类器寡核苷酸的技术的组合具有大量的可能性。

特别适合的探测技术是与寡聚体阵列的杂交，如引物延伸（小测序）反应。与寡聚体阵列的杂交可不必进一步修改方案地使用最近的现有技术（Olek A, Olek S, Walter J; WO 专利 99 28498）。然而优选的是使扩增产物与寡聚体阵列杂交，该寡聚体阵列包含一对

固定于固相上的寡核苷酸，分别在亚硫酸氢盐处理和扩增之前，其中之一每次最优选地与含有最初非甲基化的 CpG（分类器位置）的 DNA 区段进行杂交，而其中的另一个同样最优选地与最初含有甲基化 CpG 的相应区段进行杂交。特别优选的情况是将扩增产物进行荧光或放射性标记，或者用可除去的质量标记进行标记，从而在杂交之后，结合到成对的两个寡核苷酸上的片段可基于这些标记进行探测和定量。获得的是强度比例，从该比例可例如在对用完全甲基化和非甲基化的 DNA 的实验进行校正后，确定各个分类器位置的甲基化程度。大量的片段和分类器位置可同时在这种寡聚体阵列上进行探测（图 1）。有意义的且优选的是该阵列也含有探测限定器位置的寡聚体用于监控实验，这是因为可确定进入分析的所研究的 DNA 与背景 DNA 的比例。

引物延伸反应也可在固定于固相上的寡核苷酸上进行。尽管不是完全必需的，这些引物的固定是优选的，这是因为通常应该研究多个扩增产物中许多的分类器位置，且该研究可以以显著更简单的方式在一个实验中在固相并从而在寡聚体阵列上进行。特别优选的是引物直接位于一个分类器位置旁，则该延伸只有一个核苷酸。特别优选的是只将双脱氧胸苷和双脱氧胞苷作为核苷酸加入，且它们分别用一种不同的荧光染料进行标记，当然，其中也可考虑甚至优选其它不同的标记，如质量标记。在亚硫酸氢盐处理和扩增之后，先前甲基化的 CG 呈现为 CG，而以前非甲基化的 CG 现在呈现为 TG。因而引物延伸反应导致双脱氧胞苷或者导致双脱氧胸苷的插入。各个位置甲基化的程度可分别从对这两个终止子探测的荧光标记的比例来推断。如果不加入鸟嘌呤衍生物且由此在 TG 或 CG 序列的一个碱基向引物延伸就已经终止，那么在这种情况下同样可能和优选的是用双脱氧胞苷和双脱氧胸苷进行引物延伸。此外同样优选的是类似地通过用双脱氧-ATP 和双脱氧-GTP 或其衍生物适当地区别 CA 和 CG 而对相反链进行分析。

然而本方法的一个特别优选的变体方案是在一个实验中同时探测限定器位置和分类器位置，这将通过使用 TaqMan 或 LightCycler 技术变体方案来实现。在此相对于用于优选扩增所研究的 DNA 的寡核苷

酸，额外加入其它经荧光标记的寡核苷酸，且荧光变化的测量是在 PCR 反应过程中进行的。由于其主要用于扩增所研究的 DNA，对不同分类器 CpG 位置的甲基化状态的信息也主要是直接从该荧光变化中获得的。由于不同的寡核苷酸各自优选地使用不同的荧光染料，所以在 PCR 过程中分别区分不同位置的荧光变化也是可能的。

该依赖于甲基化状态的荧光变化可通过许多方法实现，此处将它们中的两个以例子的方式进行描述。

首先，可以使用寡核苷酸探针，该探针或者特异性地与通过化学处理从非甲基化的 DNA 的相应位置产生的序列结合，或者相应地与通过化学处理从甲基化的 DNA 的相应位置产生的序列结合。这些探针特别优选带有两种荧光染料，即一种猝灭染料和一种荧光染料。两者都是与相同的寡核苷酸探针连接的。现在，如果 PCR 反应以所研究的 DNA 作为模板来进行，那么这次 PCR 反应将被荧光标记的寡聚体探针阻断。然而，由于后者对聚合酶的核酸酶活性没有抗性，所以在 PCR 反应过程中，结合到模板 DNA 上的探针发生了分解，分解与探针和模板的结合效率相关，这是因为未结合的探针不被聚合酶分解。由于作为标记的猝灭染料和荧光染料各自分离的事实，通过标记染料的荧光增加，探针的分解是直接可见的。原则上，在此涉及所谓的 TaqMan 测定的变体方案。

依此所测量的是由所研究的 DNA 的 PCR 产物形成的，但仅仅当研究的分类器位置也呈现甲基化状态的情况下，可以通过探针在经化学处理的 DNA 上的杂交探测探针。因而含有探针的对照样品是适当且优选的，其中探针对应地结合其它甲基化状态中的分类器位置。

为了达到区别探针的能力并由此实现多重反应，优选具有不同发射波长的不同荧光染料与一个猝灭剂一起用于多个探针上。

即使在这样一种测定的情况下，也使用了与限定器位置结合的寡核苷酸，其防止了背景 DNA 的显著扩增。所研究的 DNA 的扩增也可以以这样一种途径进行分析，即相同的位置也是用上述的探针进行研究的，且从而扩增是用结合于限定器位置的探针进行探测的。在这种情

况下，特别优选的是不能被分解的寡核苷酸选择性地结合到背景 DNA 上，而荧光标记的探针结合到所研究的 DNA 上。在本方法一个特别优选的变体方案中，探针和不分解型的寡核苷酸除了优选为一个核碱基（Nukleobasen）之外具有相同的序列，但在任何情况下都不超过两个核碱基。

特别优选的还有一个变体方案，其中将多个可甲基化的位置定义为限定器位置，且分别将至少一个优选结合背景 DNA 的寡核苷酸及一个探针用于这些位置。由于在这种情况下背景 DNA 的扩增将被多个寡核苷酸抑制，所以该方法特别适用于当背景 DNA 相对于所研究的 DNA 过剩程度特别高的情况下。在许多情况下，在这些变体方案和对于多个限定器位置存在于一个片段中的情况下，对限定器位置的进一步的研究将成为多余的，这是因为用现有的设备不能同时探测任意多的不同染料（多数情况下为 4-5 种）。因而对于额外的分类器位置的研究优选地用上述的其它探测技术的一种进行。

同样优选的是多个位置的甲基化程度可同时用一个探针进行研究。

如果需要对分类器甲基化程度进行更精确的定量，那么可优选地使用两个相互竞争的具有不同染料的探针，其中之一再次在所研究的 DNA 中非甲基化的位置的情况下结合，而另一个优选地相反在甲基化位置的情况下结合。所研究的位置的甲基化程度可从两种染料增加的荧光比例来推断。

一个基本上不同的方法最近认为是 LightCycler™ 技术，然而其中在 PCR 过程中也发生了荧光变化。利用了以下事实，即只有当两个染料直接相互邻近，即只间距 1-5 个核苷酸，荧光共振能量转移（FRET）才能发生于两个染料之间。只有在那时第二个染料才可被第一个染料的发射所激发且因而反过来发射另一个波长的可被探测到的光。

在上述甲基化分析的情况下，荧光标记的探针在相关的经化学处理的 DNA 的一个分类器位置上杂交，且该探针的结合再次依赖于所研

究的 DNA 是否在该位置上呈现甲基化或非甲基化的形式。具有另一种荧光染料的另一种探针直接在邻近该探针处结合。如果另一个可甲基化的位置存在于各个序列区段，那么后一种结合再次依赖于甲基化而发生。在扩增过程中，DNA 得到了扩增，只要具有对此所要的甲基化状态，更多的荧光标记的探针就会在邻近各个位置处结合，并且因而测量到增加的 FRET。

在此方法中也同样优选使用多个不同荧光标记探针的多重反应。

此处同样可能和优选对限定器位置进行测量。假定背景 DNA 在相关位置呈现非甲基化形式，且在化学处理和扩增之后在这些位置上产生了 TG 二核苷酸，同时相反地，甲基化的所研究的 DNA 产生了 CG 二核苷酸，荧光标记的探针将结合含有 CG 的序列，而未标记的竞争性寡聚体结合背景 DNA 相应的 TG 序列。

在此重要的是非甲基化的寡核苷酸由于其与较短的探针寡核苷酸相比明显较高的熔点而阻碍了扩增。在这点上，探针与化学处理的背景 DNA 结合的寡聚体在这种情况下不是只有少数几个相同的碱基，它们基本是较长的（5-15 个碱基）。同样的，再次可能且优选的是使用修饰的寡核苷酸和/或 PNA。同样在这种情况下，为了避免在 PCR 中的延伸，除位于其 3'端的引物之外，所有探针和寡核苷酸都是被阻断的。这可用如磷酸基团来进行。

这两种方法在结果上的主要区别在于，在一种情况下测量了荧光的降低，而在另一种情况下测量了荧光的增加。在这两种情况下，即可对限定器位置也可对分类器位置进行测量。

总之，一种探测 DNA 样品中胞嘧啶甲基化的方法是特别优选的，在其中进行了下面的步骤：首先对含有所研究的 DNA 以及背景 DNA 的基因组 DNA 样品以这样一种途径进行了化学处理，使得所有非甲基化的胞嘧啶碱基都转变为尿嘧啶，而 5-甲基胞嘧啶碱基保持不变；然后将经化学处理的 DNA 样品用至少两个引物寡核苷酸及一种聚合酶进行扩增，其中所研究的 DNA 作为模板比背景 DNA 更优选，且在下一个步骤中，对扩增产物进行分析，且从扩增产物的存在性和/或从其它

位置的分析中推断所研究的 DNA 中的甲基化状态。

在本方法特别优选的变体方案中，样品 DNA 是从个体的血清或其它体液中获得的。同样优选的样品是从细胞系、血液、痰、粪便、尿、血清、脑脊液、包埋于石蜡中的组织如来自眼、肠、肾、脑、心、前列腺、肺、乳房和肝的组织、组织载玻片和其所有可能的组合中获得。

在本方法特别优选的变体中，该化学处理是用亚硫酸氢盐 (=Disulfit, Hydrogensulfit)。优选的是在将 DNA 包埋于琼脂糖中之后进行化学处理。同样优选的是在化学处理的情况中存在 DNA 双链体变性的试剂和/或自由基阱。

在本方法特别优选的变体中，扩增是在至少一种额外的寡核苷酸存在下的第二个步骤中进行的，该寡核苷酸结合 5'-CG-3'二核苷酸或 5'-TG-3'二核苷酸或 5'-CA-3'二核苷酸，其中该额外的寡核苷酸优选地结合背景 DNA 并对其扩增产生不利影响。

同样特别优选的是在第二步骤中经化学处理的 DNA 样品使用至少 2 个引物寡核苷酸和另一个与 5'-CG-3'二核苷酸或 5'-TG-3'二核苷酸或 5'-CA-3'二核苷酸杂交的寡核苷酸，和至少一个与 5'-CG-3'二核苷酸或 5'-TG-3'二核苷酸或 5'-CA-3'二核苷酸杂交的报道寡核苷酸连同 一个聚合酶一起进行扩增的；其中该额外的寡核苷酸优选结合背景 DNA 并对其扩增产生不利影响，且其中该报道寡核苷酸优选地结合所研究的 DNA 并指示其扩增。

同样优选的是除报道寡核苷酸之外，使用了另一个用荧光染料进行标记的寡聚体，该寡聚体直接在邻近报道寡核苷酸处进行杂交且该杂交可依靠荧光共振能量转移 (FRET) 进行探测。

对该分析优选进行 TaqMan 测定。同样优选的是进行 LightCycler 测定 (如上所述)。

除引物之外所用的寡核苷酸特别优选不具备 3'-OH 功能可用。此外报道寡核苷酸特别优选地带有一个荧光标记。

同样特别优选的是报道分子通过荧光的增加和减少显示扩增，且

该荧光的增加和减少也直接用于分析，且所研究的 DNA 的甲基化状态可从荧光信号来推断。

在本方法特别优选的变体方案中，该分析或进一步的分析是依靠与寡聚体阵列的杂交来进行的，其中寡聚体可为核酸或在其杂交性质上相似的分子，如 PNA。优选地，该寡聚体经 12-22 个碱基长的区段与所研究的 DNA 进行杂交并包含 CG、TG 或 CA 二核苷酸。优选该方法在一个实验中探测所研究的 DNA 中超过 20 个甲基化位置的甲基化状态，更优选的是超过 60 个的甲基化位置。

还有一种方法同样是特别优选的，其中进一步的分析是通过对经扩增的所研究的 DNA 的长度测量来进行的，其中该长度测量的方法包括凝胶电泳、毛细管凝胶电泳、层析（如 HPLC）、质谱分析和其它适当的方法。

还有一种方法同样是特别优选的，其中进一步的分析是通过测序进行的，其中用于测序的方法包括桑格方法、马吉测序法和其它方法如通过杂交的测序（SBH）。再次优选的是一种方法，其中对每一个或一小组 CpG 位置的测序（根据桑格）分别用一个单独的引物寡核苷酸来进行的，且引物延伸仅构成了一个或少数的碱基，且所研究的 DNA 中相关位置的甲基化状态是从引物延伸的类型中推断的。

在本方法特别优选的变体方案中，病人疾病或其它医学状况的存在可从经研究的不同 CpG 位置的甲基化程度来推断。

特别优选的是扩增产物本身带有可探测的标记用于对其进行探测。这些标记优选涉及荧光标记，放射性核素或在质谱仪中探测的可除去的质量标记。

此外，一种方法是优选的，其中在扩增中引物之一是结合在固相上的。

该方法的一个变体方案同样是优选的，其中扩增产物是全部在质谱仪上探测的且因而通过其质量明确地进行特征记录。

本发明的另一个目的是使用所描述的方法之一对病人或个体进行不利情形的诊断和/或预诊，其中这些不利情形属于至少一种下面的

种类：非期望的药物相互作用；癌疾病；CNS 功能失常、损伤或疾病；攻击或行为障碍症状；脑损伤的临床、心理学和社会结果；精神病障碍和个性病症；痴呆和/或有关的症状；心血管疾病、功能失常和损伤；胃肠道的功能失常、损伤或疾病；呼吸系统的功能失常、损伤或疾病；受伤、炎症、感染、免疫和/或康复；作为发育过程中畸形的身体功能失常、损伤或疾病；皮肤、肌肉、结缔组织或骨骼的功能失常、损伤或疾病；内分泌和代谢功能失常、损伤或疾病；头痛或性功能失常。

此外，所描述的方法之一用于区别细胞类型或组织或者用于研究细胞分化是有利的。

本发明的目的还有一种试剂盒，该试剂盒包括含有亚硫酸氢盐的试剂、引物和其它用于产生扩增产物的无 3'-OH 功能的寡核苷酸，以及可选择的实施至少一种所描述的变体方案的说明书。

下面的实施例解释了本发明：

实施例 1：在 MDR-1 基因中使用 PNA 阻断探针（PCR 箝位（clamping））的 MDR1 基因的甲基化灵敏性扩增。

a) 利用 PNA 探针（PNA 阻断探针）的甲基化特异性 PCR，该探针的结合位点不与引物的相重叠。

首先，PCR 条件是对经亚硫酸氢盐处理的 DNA 限定的，其中可识别 PNA 阻断探针对 PCR 的等位基因特异性影响。在该第一个实验中，PNA 和引物间的结合位点不重叠。

首先，用引物 TAAGTATGTTGAAGAAAGATTATTGTAG 和 TAAAACTATCCCATAATAACTCCCAAC 测试序列为 AAAATGTGTT 的 11 聚体 PNA 在 PCR 中的影响。PNA 对 PCR 反应的影响不能在具有 55℃ 退火温度的标准 PCR 条件下进行测量。用于 MDR1-片段扩增的标准循环程序使用下面的程序步骤：

步骤 1: T=96℃	20 分钟
步骤 2: T=96℃	30 秒钟
步骤 3: T=56℃	1.15 分钟
步骤 4: T=72℃	2.00 分钟
步骤 2~4 进行 40 个循环。	
步骤 5: T=72℃	15 分钟
步骤 6: 冷却至 4℃ 并维持该温度。	

由此，为了获得对扩增的等位基因特异性抑制，必须使引物长度、退火温度和 PNA 样品长度最优化。

为了使最适的引物和 PNA 退火成为可能，用较长的 13 聚体 PNA AAAGACGTGTTAT 测试较短的 21 聚体引物 TAAGTATGTTGAAGAAAGATT 和 AATCCCCATAAACTTACCAAAA。进一步的实验是用 18、19 和 20 聚体引物进行的，这些引物与上述序列仅区别在 3' 端的碱基被省略的事实。21 聚体引物是用退火温度的梯度进行检验的。在一个平行的批次中，将 13 聚体的 PNA AAAGACGTGTTAT 或者适合于从非甲基化等位基因生产的序列的 PNA AAAGATGTGTTAT 以 20-100 pmol/ $\mu$ l 的不同浓度加入。

在以 70 和 100 pmol/ $\mu$ l 的浓度加入 PNA 时且在退火温度 49.4℃ 和 46.7℃ 下观察到了对 PCR 的明显影响。该影响在用 18 聚体引物时最明显。

至此开始研究的是较低的延伸温度 54℃ 在多大程度上影响了 PNA 的抑制影响。

为此目的分别将上述的 13 聚体 PNA 或两个 13 聚体 PNA 一起以 50 和 70 pmol/ $\mu$ l 的浓度加入到 PCR 批次中。与无 PNA 的正对照相比观察到对 PCR 的明显抑制（图 2，琼脂糖凝胶电泳，所用的 13 聚体 PNA 探针的 PNA 浓度；注释：MDR 1-5 FM: 13 聚体 PNA AAAGACGTGTTAT; MDR 1-5 FU: 13 聚体 PNA AAAGATGTGTTAT）。该实验使得检验中所用的 DNA 在相关位置上主要呈现非甲基化成为显而易见的，这可通过亚硫酸氢盐测序来证实。因此，在该实验中可显示 PNA 阻断探针明显的等位基因特异性，该特异性导致非甲基化片段优

选的扩增。

b) 利用 PNA 探针 (PNA 阻断探针) 的甲基化特异性 PCR, 其结合位点与引物的相重叠 (“引物排斥”)。

在上述实验中, 引物是如此选择的, 从而使 PNA 目标序列大约位于要扩增的区域的中心。如果引物和 PNA 序列相互邻接或重叠, 那么该排列则描述为更灵敏的。在 PNA 序列特异性结合的情况下, 在这种排列下, 即使微量的 PNA 浓度是也可观察到 PNA 的作用。

在该实验中选择具有序列 TTATGTGAATTTTGAAAG 的引物, 从而使得它与 PNA 序列重叠 (引物排斥)。将 13 聚体 PNA AAAGACGTGTTAT 和 PNA AAAGATGTGTTAT 两者以 3 种不同的浓度加入到反应批次中。

在浓度为 25 pmol/ $\mu$ l 时就观察到了对 PCR 反应的完全抑制。在前述的实验中, 对 PCR 的完全抑制只有在两种 PNA 的加入下当浓度达到 70 pmol/ $\mu$ l 时才能观察到。

c) 非甲基化 DNA 的相应片断的引物排斥

为了探测序列特异性结合, 在进一步的实验中研究了 PNA 对鉴于甲基化状态有明显特征的模板的作用。用于本实验的模板 DNA 相应于经亚硫酸氢盐处理的完全非甲基化的 DNA。

这将用作 PCR 中的模板。为此使用了下面的程序步骤:

- |                                  |          |
|----------------------------------|----------|
| 步骤 1: T=96 $^{\circ}$ C          | 20 分钟    |
| 步骤 2: T=96 $^{\circ}$ C          | 30 秒钟    |
| 步骤 3: T=49 $^{\circ}$ C          | 1. 15 分钟 |
| 步骤 4: T=54 $^{\circ}$ C          | 2. 00 分钟 |
| 步骤 2~4 进行 36 个循环。                |          |
| 步骤 5: T=72 $^{\circ}$ C          | 15 分钟    |
| 步骤 6: 冷却至 4 $^{\circ}$ C 并维持该温度。 |          |

将如上所述的 13 聚体 [PNA] 以 3 个不同的浓度加入到反应批次中。在这种非甲基化模板的情况下, 人们将预期适合于该模板的 PNA MDR1-5-FU (3) 将比 MDR1-5-FM (3) 具有明显更强的影响。图 3 (注释参见图 2) 显示即使对于相当低的 PNA 浓度事实上也是这样的情

况。

这些结果显示通过特异性结合的 PNA 的甲基化特异性扩增使得对 PCR 反应的抑制成为可能。在具有不与 MDR-1 互补的 PNA 的对照实验中，可显示这在正被讨论的浓度下没有对 PCR 形成显著的影响。

#### 实施例 2: GSTpi 基因片段的甲基化灵敏性扩增。

GSTPi 基因的特定 CpG 位置被鉴定为前列腺癌的肿瘤标记。经选择用于实验的引物对 GGAAAGAGGGAAAGGTTTT 和 TACTAAAACTCTAAACCCCAT 中的一个引物是这样定位的，以使其精确地与 PNA 序列 CCCCGAAAACGCG (或 CCCTGAAAATGTG) 邻接。该 PNA 序列含有 3 个相关的 CpG 位置，其与那些用于 MDR1 片段的 PNA 有区别。GSTPi 片段的所研究及相关 CpG 呈现“正常的”非甲基化的 DNA，即不是源自肿瘤病人的 DNA。对于反应批次给出的具有序列 CCCTGAAAATGTG PNA“GSTP-down”因而应该对 PCR 反应具有可识别的影响，而不是相应的 PNA“GSTP-up” CCCCGAAAACGCG。

将 PNA“GSTP-down”以 3 个不同的浓度加入到实验批次中。在退火温度的梯度下进行了检验。

该实验的结果在图 4 中显示。对 PCR 的最强的抑制可通过在退火温度为 55℃ 时 PNA (GSTP-down) 的加入来确定。与正对照 (无 PNA 的加入) 相比，可认识到 PCR 反应将通过 PNA 以 20 [p]mol/μl 的浓度加入而显著地被抑制。

随后，将 PNA“GSTP-up”和“GSTP-down”对以最初样品中非甲基化 DNA 和源自前列腺肿瘤组织的甲基化 DNA 作为模板的扩增的影响进行比较，以探测序列特异性 (和因而最终的甲基化灵敏性) 结合。

将非甲基化的 DNA 和前列腺 DNA 作为模板用于 PCR 中。将 PNA“GSTP-up”或“GSTP-down”以 3 个不同的浓度加入到反应批次中。

“GSTP-down”PNA 的加入对下游甲基化的模板具有可见的影响：当 PNA 以 70 pmol/μl 的浓度加入时该 PCR 则被完全抑制。另一方

面，在加入 PNA“GSTP-up”的情况下，相反仅可发现 PNA 对 PCR 的弱的抑制影响。

在前列腺组织的检验 DNA 中加入“GSTP-up” PNA 对 PCR 具有相当大的抑制影响（图 5）。PNA 以 20 pmol/ $\mu$ l 的浓度的加入就已经明显地抑制了 PCR。在 PNA 以 50 pmol/ $\mu$ l 的浓度加入时可确定对 PCR 的完全抑制。与此相反，在前列腺 DNA 中加入“GSTP-down”PNA 具有明显微小的影响。即使 PNA 以 70 pmol/ $\mu$ l 的浓度加入也不能完全抑制 PCR。

该实验显示，借助阻断性寡聚体探针来选择性地抑制经限定位置的甲基化或非甲基化等位基因的扩增是可能的。在本发明的意义上，相关位置可充当限定器位置，即，将选择性地抑制背景 DNA 的不想要的甲基化模板的扩增。

实施例 3：以 GSTPi 基因为例使用甲基化特异性抑制 PCR 的探针的不同可能性。

图 6 显示对于给定的模板序列在甲基化灵敏性扩增的意义上如何排列引物的几种可能性。为了解释，图 6a 显示在经亚硫酸氢盐处理之后的模板：DNA1 相应于最初甲基化的样品，且 DNA2 相应于最初非甲基化的样品。

图 6b 显示在等位基因特异性 PCR 或甲基化特异性 PCR (MSP) 的意义上引物之一的排列。在这种情况下，利用在所显示的引物的使用下只有甲基化的 DNA1 的扩增可以发生。

图 6c 和 6d 通过使用简并位置（6c）或者图 6d 中的通用碱基（此处为肌昔）显示如何可以相应地使用非甲基化特异性的引物。

图 7 显示对于给定的模板序列在甲基化灵敏性扩增的意义上如何排列引物和探针（“封阻剂”）的几种可能性。在这些实施例中，所用的引物本身不是甲基化特异性的，而该甲基化特异性是单独通过探针（“封阻剂”）来实现的。分别对 DNA1 和 DNA2 使用了特异性探针作为

封阻剂。

在图 7a 中引物和探针不重叠，但探针直接连接到引物的 3'端了。所示的探针是在 3'端进行了修饰的寡核苷酸，其在扩增中自身不能被延伸。类似地，也可使用 PNA，但相应于其熔解温度，在本实施例中该 PNA 必须较短。在图 7b 中使用了相同的引物，但此处的 DNA 探针与引物重叠（引物排斥）。

在图 7c 和 7d 中，用于简并位置的引物与甲基化特异性探针重叠。通用的碱基也可类似地用于引物中。

在图 8 中类似地显示了具有正向和反向引物的实施例，其中使用了探针，该探针不与任何一个引物重叠。

这些实施例阐明寡聚体探针如何可以用于甲基化特异性扩增的多种可能性，以抑制背景 DNA 相对于所分析的 DNA 的扩增。然而，本发明的范围将不局限于作为实施例在此处所描述的实施方案。

#### 实施例 4：非甲基化和甲基化 DNA 的制备和亚硫酸氢盐处理

用于甲基化 DNA 的制备，将人基因组 DNA 根据生产商的说明书用 S-腺苷甲硫氨酸和 CpG 甲基化酶（SssI, New England Biolabs）进行处理。用于非甲基化 DNA 的制备，将基因片段 ELK-1 用来自人基因组 DNA 的引物 GCTCTATGGTCTTGTCTAACCGTA（SEQ-ID: 1）和 AGGTGCTGGTGGCGGTGG（SEQ-ID: 2）借助 PCR 进行扩增。将这样制备的非甲基化和甲基化 DNA 以及人基因组 DNA 以这样一种途径用亚硫酸氢盐（Bisulphit, Hydrogensulfit, Disulfit）进行处理，从而所有在碱基的 5'位置未甲基化的胞嘧啶都被修饰从而产生了在碱基配对性质上有差异的碱基，然而在 5'位置甲基化的胞嘧啶则保持不变。如果将亚硫酸氢盐在 0.1 摩尔~6 摩尔的浓度范围内用于反应中，则在非甲基化胞嘧啶碱基中发生加成。此外必须存在变性剂或溶剂及自由基阱。随后的碱性水解导致非甲基化的胞嘧啶核碱基转变为尿嘧啶。该转变的 DNA 用作验证甲基化胞嘧啶。

### 实施例 5: Cy5-标记的基因探针的制备

由经亚硫酸氢盐处理的 DNA 样品开始, 将来自 ELK-1 基因的启动子区的长度为 595 bp 的限定片段进行扩增。该扩增是用引物寡核苷酸 ATGGTTTTGTTTAATYGTAGAGTTGTTT ( SEQ- ID : 3 ) 和 TAAACCCRAAAAAAAAAAACCCAATAT ( SEQ- ID: 4 ) 进行的。通过使用以荧光染料 Cy5 标记的引物寡核苷酸, 该片段直接在 PCR 过程中进行标记。将经亚硫酸氢盐处理的 (1) 非甲基化 DNA、(2) 甲基化 DNA 或 (3) 人基因组 DNA 用作基质 DNA。然后在分开的杂交中研究这 3 种不同的 DNA 片段在特定 CpG 位置上的甲基化程度。

### 实施例 6: 进行杂交并评估经杂交的 DNA“芯片”

在实施例 5 中制备的基因探针在 DNA 芯片上进行杂交。已预先将寡核苷酸固定于芯片上。该寡核苷酸序列是源自在实施例 2 中所述的基因 ELK-1 的扩增片段, 且具有 CG 二核苷酸包含与其直接邻近的部分。寡核苷酸的长度总计 14-22 个核苷酸, 且寡核苷酸中 CG 二核苷酸的位置是可变的。杂交之后, 对 DNA 芯片进行扫描 (参见图 1), 并用数字对杂交信号进行了评估 (数据未显示)。对寡核苷酸 CTACTCAACGAAAACAAA ( SEQ- ID: 5 ) 和 CTACTCAACAAAAACAAA ( SEQ- ID: 6 ) 的杂交结果在图 1 中显示。此处如果位于扩增产物的位置 103 的 ELK-1 片段的胞嘧啶是甲基化的, 则 CTACTCAACGAAAACAAA ( SEQ-ID: 5 ) 优选地进行杂交, 而如果该胞嘧啶是非甲基化的, 则 CTACTCAACAAAAACAAA ( SEQ-ID: 6 ) 优选进行杂交。

图 1 中显示与启动子片段杂交之后的 DNA 芯片。伪彩色图像是如扫描后制作的那样显示的。相对与此处显示的黑白图相反, 彩色图像是用扫描仪制得的。不同颜色的强度代表杂交的程度, 其中杂交的程度从红色 (这可在图 1 中识别为浅色的点) 减低到蓝色 (这可在图 1

中识别为深色的点)。

### 实施例 7: 模板 DNA 的制备和确立 GSTp1 PCR

将来自外周血的人 DNA (Promega, Madison USA) 作为模板 DNA, 该 DNA 是未处理的, 用酶在体外进行甲基化, 并进行了亚硫酸氢盐处理。用于所有 CG 二核苷酸的甲基化, 根据生产商的说明书, 将 150  $\mu$ l 反应体积中的 6  $\mu$ g DNA 与 SssI (New England Biolabs, Frankfurt/Main) 进行反应。亚硫酸氢盐处理是根据已公开的方法进行的 (Olek A, Oswald J, Walter J, 一种改良提高的基于硫酸氢盐的胞嘧啶甲基化分析的方法 (A modified and improved method for bisulphate based cytosine methylation analysis), Nucleic Acids Res. 1996 年 12 月 15 日; 24 (24): 5064-6)。

将 153-bp 长的 GSTp1 片段 (序列 Acc. Nr M24485.1 中的位置 1242-1393) 用亚硫酸氢盐-DNA 特异性引物 2cf GTTTT (CT) GTTATTAGTGAGT 和 2cr TCCTAAATCCCCTAAACC 在 25  $\mu$ l 反应体积中 (1x 反应缓冲液, Qiagen; 1 U HotstarTaq, Qiagen 每种 dNTP; 200  $\mu$ M, 每一种引物 500 nM, 0.05-10 ng 经亚硫酸氢盐处理的模板 DNA) 进行扩增, 其 PCR 条件如下 (95 $^{\circ}$ C-15 分钟; 46 个循环: 96 $^{\circ}$ C-0: 45 分钟, 52 $^{\circ}$ C-0: 45 分钟, 72 $^{\circ}$ C-0: 20 分钟; 72 $^{\circ}$ C-10 分钟) (参见图 9 和 10)。通过对 GSTp1 片段的测序可显示来自外周血的人 DNA 对于这些片段没有甲基化的 CG 二核苷酸, 而在另一方面, 经 SssI 处理的 DNA 中, 所有 CG 二核苷酸都呈现甲基化的形式 (参见图 9)。对 GSTp1 片段的测序证实了其它的结果 (参见如 WO 9955905), 即在 GSTp1 基因中, 与经发表的序列 (Genbank Acc No. M24485.1) 相比, 存在额外的 G 核苷酸 (在 Genbank Acc No. M24485.1 的位置 1273 和 1274 间; GSTp1 PCR 片段的位置 33, 参见图 9)。至于 PCR 的效率, 在 CpG-甲基化和 CpG-非甲基化的模板 DNA 之间无差异 (参见图 10)。

### 实施例 8: 甲基化 GSTp1 片段的选择性扩增。

甲基化 GSTp1 片段选择性扩增的实验设计示意性地在图 11 中显示。GSTp1 片段利用引物 2cf GTTTT (CT) GTTATTAGTGAGT 和 2cr TCCTAAATCCCCTAAACC 在非甲基化模板 DNA 上的扩增是通过 2 个封阻剂寡核苷酸 (B5+9FT6, GTGAGTATGTGTGGTTTGTGT-P; B15+17RT11, TAAACCCCATCCCAAATCTCA-P, 参见图 11) 阻止的, 所述封阻剂寡核苷酸序列相应于非甲基化的经亚硫酸氢盐处理的 DNA。这些寡核苷酸在 3'端用磷酸基团是经修饰的以防止其在 PCR 过程中的延伸。该 PCR 是在 25  $\mu$ l 反应体积中用如下循环程序 (95 $^{\circ}$ C-15 分钟; 46 个循环: 96 $^{\circ}$ C-0: 45 分钟, 52 $^{\circ}$ C-0: 45 分钟, 72 $^{\circ}$ C-0: 20 分钟; 72 $^{\circ}$ C-10 分钟) 进行的。该 PCR 批次由如下组成: 1x 反应缓冲液 (Qiagen, Hilden); 2 U HotstarTaq (Qiagen, Hilden); 每种 dNTP200  $\mu$ M, 每种引物 500 nM, 每种封阻剂 10  $\mu$ M (B5+9FT6, GTGAGTATGTGTGGTTTGTGT-P 和 B15+17RT11, TAAACCCCATCCCAAATCTCA-P), 20 ng-20 pg 经亚硫酸氢盐处理的模板 DNA。在这种 PCR 条件下, 使可能完全抑制在 25  $\mu$ g 非甲基化模板 DNA 上 GSTp1 片段的扩增 (参见图 12A, 泳道 8)。如果 PCR 是在无封阻剂寡核苷酸时进行的, 那么 GSTp1 片段即得到了扩增 (参见图 12, D 泳道 8)。相反地, GSTp1-PCR-产物可在具有或不具有封阻剂寡核苷酸的情形下在 100 pg 甲基化模板 DNA 上以相同的 PCR 条件被检测到 (参见图 12, C 泳道 7; F 泳道 7)。因而 PCR 的绝对灵敏度至少为 100 pg 甲基化模板 DNA。

为了研究 PCR 的相对灵敏度, 制备了非甲基化和甲基化模板 DNA 的混合物, 其中非甲基化的与甲基化的 DNA 的比例为 1:1 至 1:1000。用于这种 DNA 混合物的制备, 将来自外周血的人 DNA (Promega, Madison; USA) 与经 SssI-处理的 DNA 相应于要获得的比例进行混合 (参见实施例 7), 并然后进行亚硫酸氢盐处理。在这

些模板 DNA 混合物上 (25  $\mu\text{g}$  总 DNA) 具有或不具有封阻剂寡核苷酸进行的 PCR 的结果显示于图 12A、B 或图 12D、E 中。它们显示甲基化 GSTp1 基因的拷贝可在 200 个拷贝的非甲基化 GSTp1 基因的背景上重复探测 (参见图 12, A 泳道 6; B 泳道 6)。1:1000 的相对灵敏度通过进一步使 PCR 条件最优化是可以达到的 (参见图 12B, 泳道 7)。

对具有封阻剂 (参见图 12, A 泳道 6) 或不具有 B 封阻剂 (参见图 12, D 泳道 6) 的情形下, 从 DNA 混合物中 (非甲基化与甲基化 DNA 的比例为 1:200) 扩增的 PCR 产物的序列分析显示了预期的结果。在不具有封阻剂的 PCR 中产生的 PCR 产物相应于非甲基化的 GSTp1 基因, 而相反地, 在具有封阻剂寡核苷酸的 PCR 中产生的 GSTp1 基因片段具有甲基化的外遗传状态。

也成功地检验了不相应于相应的 GSTp1 核苷酸序列的其它 3' 修饰, 如 ddNTP 或额外的核苷酸。

实施例 9: 甲基化的 GSTp1 片段在 LightCycler 上的选择性扩增。

LightCycler (Roche) 是进行 PCR 并同时探测和分析 PCR 产物的仪器。该仪器是根据生产商的说明书进行操作的。对 PCR 的定量和定性分析是用 LightCycler 软件 3.5 版进行的。

甲基化 GSTp1 基因片段的选择性扩增是在 10  $\mu\text{l}$  反应体积中 (1x 反应缓冲液 (Qiagen, Hilden); 5 U HotstarTaq (Qiagen, Hilden); 每种 dNTP 250  $\mu\text{M}$ , 每种引物 625 nM (2cf GTTTT (CT) GTTATTAGTGAGT; 2cr TCCTAAATCCCCTAAACC), 4  $\mu\text{M}$  的封阻剂 (B5+9FT16, GTGAGTATGTGTGGTTTGTGTT-P), 0.25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  BSA (Sigma, Munich), 250 nM 锚定寡核苷酸 (GSTp1-Fluo, TTTAGAGTTTTTAGTATGGGGTTAATT-Fluorescein; TibMolBiol, Berlin), 250 nM 杂交探针 (GSTp1-Red 705, Red705-GTATTAGGTTTGGGTTTTTGGT-P; TibMolBiol, Berlin) 和/或 GSTp1-

Red 650, Red650-TAGTATTAGGTTTCGGTTTTTCGG-P, TibMolBiol, Berlin), 20 ng-200 pg 模板 DNA) 进行的, 使用如下循环程序: 95°C-15 分钟; 46 个循环: 变性 96°C-4 秒钟, 退火 52°C-30 秒钟, 延伸 72°C-20 秒钟。探测是在每一个循环中通过基因特异性和甲基化特异性 LightCycler 探测探针在退火步骤中 10 秒钟之后进行的。当甲基化特异性锚定探针 GSTp1-Fluo 及甲基化特异性探针 GSTp1-Red 705 或 GSTp1-Red 650 之一两者与 PCR 片段进行杂交时, 对 GSTp1-PCR 片段进行探测。

为了检查探测探针的甲基化特异性, 将各 15 ng 的经亚硫酸氢盐处理的甲基化和非甲基化模板 DNA 在 LightCycler 中进行了扩增。为了进行探测, 该 PCR 含有锚定探针 GSTp1-Fluo 和杂交探针 GSTp1-Red 705 和 GSTp1-Red 650 的等摩尔混合物。对于经甲基化的 GSTp1 基因的探针 GSTp1-Red650 的荧光是在 LightCycler 的 F2/F1 探测通道中测量的, 而相反地, 对于非甲基化的 GSTp1 基因的探针 GSTp1-Red 705 是在 F3/F1 通道中探测的 (参见图 13)。该实验显示 GSTp1-Red 650 特异性地探测甲基化的 GSTp1 基因, 而非甲基化的版本不产生荧光信号 (参见图 13A)。相反地, 探针 GSTp1-Red 705 探测非甲基化和甲基化的 GSTp1 基因, 但对后者以显著减少的效率进行探测 (参见图 13B)。

甲基化 GSTp1 片段扩增的绝对和相对灵敏度是与实施例 8 类似地进行研究的。为了确定绝对灵敏度, 在具有或不具有封阻剂寡核苷酸的情形下, 在 LightCycler 中于不同甲基化量的经亚硫酸氢盐处理的模板 DNA 上进行了 GSTp1-PCR。除“锚定”探针之外, 将杂交探针 GSTp1-Red 650 用于探测。结果总结于图 14 中。对“杂交点 (crossing points)”的计算是用 LightCycler 软件 3.5 版进行的, 并显示了 PCR 循环的数目, 其中 GSTp1 PCR 产物可第一次以比负对照高的信号探测到。这意味着“杂交点”的值越低, GSTp1 片段的扩增越有效。如果未显示“杂交点”, 则意味着不可探测到 PCR 产物。在所示的实验中, 即使在封阻剂存在时, GSTp1 也可用 75 pg 甲基化的

亚硫酸氢盐处理的模板 DNA 进行扩增（参见图 14）。

为了确定相对灵敏度，GSTp1 的 PCR 是用具有或不具有封阻剂寡核苷酸的 20 ng 模板 DNA 混合物进行的（参见实施例 8）（图 15）。为了进行探测，该 PCR 含有“锚定”探针 GSTp1-Fluo 和杂交探针 GSTp1-Red 705 和 GSTp1-Red 650 的等摩尔混合物。对于甲基化的 GSTp1 基因的探针 GSTp1-Red 650 的荧光是在 LightCycler 的 F2/F1 探测通道中测量的，而相反地，对于非甲基化的 GSTp1 基因的探针 GSTp1-Red 705 是在 F3/F1 通道中探测的。

确定的“杂交点”显示在具有封阻剂的寡核苷酸的 PCR 中，一拷贝的甲基化 GSTp1 基因可在 500 个拷贝的非甲基化 GSTP1 基因的背景中重复进行探测（参见图 15，“旋转位置（rotor position）”17，F2/F1 列）。这相应于 40 pg 甲基化模板 DNA 的绝对灵敏度。在无封阻剂寡核苷酸时，只可获得 1:10 的相对灵敏度（参见图 15，“旋转位置（rotor position）”3，F2/F1 列）。在相同的条件下，具有 15 ng 非甲基化的经亚硫酸氢盐处理的模板 DNA 的 GSTp1 基因的扩增是完全被抑制的（参见图 15，“旋转位置（rotor position）”19 和 9，F3/F1 列）。

#### 实施例 10: 甲基化 GSTp1 片段在 TaqMan 上的选择性扩增

TaqMan (Applied Biosystems, Weiterstadt) 是进行 PCR 并同时探测和分析 PCR 产物的另一种仪器。该仪器是根据生产商的说明书进行操作的。对 PCR 的定量和定性分析是用 TaqMan 软件进行的。

甲基化 GSTp1 基因片段的选择性扩增是在 20  $\mu$ l 反应体积中 (1x 反应缓冲液 (Applied Biosystems) ; 2 U Amplitaq Gold (Applied Biosystems) ; 3.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 每种 dNTP 400  $\mu$ M, 每种引物 500 nM ( 2cft, GTTTT ( CT ) GTTATTAGTGAGTA ; 2cr TCCTAAATCCCCTAAACC ) , 7.5  $\mu$ M 封阻剂 1 ( B5+9FT16 , GTGAGTATGTGTGGTTTGTGT-P ) , 7.5  $\mu$ M 封阻剂 2 ( B15+17RT19,

TAAACCCCATCCCAAATCTC-P), 450 nM TaqMan 探针 (Taq1, Black hole-TAATTCGTAGTATTAGGTTTCGGTTTTTCGGTAGGG-FAM ; Biosearch Technologies), 10 ng 模板 DNA) 进行的, 使用如下循环程序:

(95°C-10 分钟; 3 个循环: 变性 96°C-15 秒钟, 退火 60°C-60 秒钟; 3 个循环: 变性 96°C-15 秒钟, 退火 58°C-30 秒钟, 延伸 60°C-30 秒钟; 3 个循环: 变性 96°C-15 秒钟, 退火 55°C-30 秒钟, 延伸 60°C-30 秒钟; 40 个循环: 变性 96°C - 15s, 退火 52°C - 30s, 延伸 60°C - 40s)。探测是在每一个扩增循环中通过基因特异性 TaqMan 探针在延伸步骤之后进行的。

为了确定相对灵敏度, GSTp1 的 PCR 是用具有或不具有封阻剂寡核苷酸的 10 ng 模板 DNA 混合物进行的 (参见实施例 8) (图 16)。对“阈值循环”的计算是用 TaqMan 软件进行的并给出了与 LightCycler 的“杂交点”的值可比较的 PCR 循环的数目, 在该数目上 GSTP1 PCR 产物可第一次以比负对照高的信号探测到。这意味着“阈值循环”的值越低, GSTp1 片段的扩增越有效。

确定的“阈值循环”的值显示在具有封阻剂的寡核苷酸的 PCR 中, 一拷贝的甲基化 GSTp1 基因可在 200 个拷贝的非甲基化 GSTP1 基因的背景中进行探测 (参见图 16)。这相应于 50 pg 甲基化模板 DNA 的绝对灵敏度。在相同的条件下, 具有 10 ng 非甲基化的经亚硫酸氢盐处理的模板 DNA 的 GSTp1 基因的扩增是完全被抑制的 (参见图 16)。

#### 附图描述:

图 10: GSTp1 PCR 片段的琼脂糖凝胶。PCR 是用 10 ng、5 ng、1 ng、0.5 ng 和 0.1 ng 的甲基化 (A) 和非甲基化 (B) 的经亚硫酸氢盐处理的模板 DNA 进行的。

图 11: 具有引物和封阻剂寡核苷酸位置的 GSTp1 片段的序列。

图 12: GSTp1 PCR 片段的琼脂糖凝胶。对甲基化 GSTp1 基因

(A、B、D、E) 扩增的相对灵敏度和甲基化 GSTp1 基因扩增的绝对灵敏度 (C、F) 进行了分析。GSTp1 PCR 是在具有封阻剂寡核苷酸 (A、B、C) 和不具有封阻剂寡核苷酸 (D、E、F) 的情形下进行的。下面是用作模板 DNA 的: 20 ng 甲基化的经亚硫酸氢盐处理的 DNA (A1、B1、D1、E1、C1、F1、C2、F2) 和 20 ng 非甲基化的经亚硫酸氢盐处理的 DNA (A8、B8、D8、E8); 混合比例为 1:2 (A2、B2、D2、E2)、1:10 (A3、B3、D3、E3)、1:20 (A4、B4、D4、E4)、1:100 (A5、B5、D5、E5)、1:200 (A6、B6、D6、E6)、1:1000 (A7、B7、D7、E7) 的甲基化和非甲基化的经亚硫酸氢盐处理的 DNA; 10 ng (C3、F3)、2 ng (C4、F4)、1 ng (C5、F5)、0.2 ng (C6、F6)、0.1 ng (C7、F7)、0.02 ng (C8、F8) 甲基化的经亚硫酸氢盐处理的 DNA 和无 DNA (A9、D9)。

图 13: 探测探针的甲基化特异性的分析。该图显示在甲基化的经亚硫酸氢盐处理的 DNA (实线) 和非甲基化的经亚硫酸氢盐处理的 DNA (虚线) 的 GSTp1 PCR 中的荧光进程, 该进程是用杂交探针 GSTp1-Red 650 (A) 或 GSTp1-Red 705 (B) 探测的。

图 14: LightCycler 上 GSTp1 PCR 的绝对灵敏度的确定。该 GSTp1 PCR 是在具有封阻剂核苷酸 (“旋转位置”9、10、11、12、13、14、15、16、18) 和不具有封阻剂寡核苷酸 (“旋转位置”1、2、3、4、5、6、7、8、17) 的情形下进行的。下面是用作模板 DNA 的: 甲基化的经亚硫酸氢盐处理的 DNA: 7.5 ng (“旋转位置”1、9)、3.7 ng (“旋转位置”2、10)、0.75 ng (“旋转位置”3、11)、0.37 ng (“旋转位置”4、12)、0.075 ng (“旋转位置”5、13)、0.037ng (“旋转位置”6、14)、0.015 ng (“旋转位置”7、15)、0.0075 ng (“旋转位置”8、16) 和无 DNA (“旋转位置”17、18)。

图 15: 甲基化 GSTp1 基因扩增的相对灵敏度的确定。该甲基化 GSTp1 基因的扩增是用 LightCycler 进行的。该探测是用杂交探针 GSTp1-Red 650 (F2/F1, 杂交点) 和 GSTp1-Red 705 (F3/F1, 杂交点) 进行的。该 GSTp1 PCR 是在具有封阻剂寡核苷酸 (“旋转位置”

11、12、13、14、15、17、18、19、20) 和不具有封阻剂寡核苷酸 (“旋转位置”1、2、3、4、5、7、8、9、10) 的情形下进行的。下面是用作模板 DNA 的: 15 ng 甲基化的经亚硫酸氢盐处理的 DNA (“旋转位置”1、11) 和 15 ng 非甲基化的经亚硫酸氢盐处理的 DNA (“旋转位置”10、20), 混合比例为 1: 2 (“旋转位置”2、12)、1: 10 (“旋转位置”3、13)、1: 20 (“旋转位置”4、14)、1: 100 (“旋转位置”5、15)、1: 500 (“旋转位置”7、17)、1: 1000 (“旋转位置”8、18) 的甲基化和非甲基化的亚硫酸氢盐处理的 DNA, 和无 DNA (“旋转位置”10、20)。

图 16: 甲基化 GSTp1 基因扩增的相对灵敏度的确定。该甲基化 GSTp1 基因的扩增是用 TaqMan 进行的。

## 序列表

<110> Epigenomics AG

<120> 探测胞嘧啶甲基化模式的高灵敏度方法

<130> E01/1289/W0

<160> 17

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工

<400> 1

gctctatggt cttgtctaac cgta

24

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工

<400> 2

aggtggtggt ggcggtgg

18

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工

<400> 3

atggttttgt ttaatygtag agttgttt

28

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工

<400> 4

taaaccrraa aaaaaaaaaac ccaatat 27

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工

<400> 5

ctactcaacg aaaacaaa 18

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工

<400> 6

ctactcaaca aaaacaaa 18

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工

<400> 7

gttttctggtt attagtgagt a 21

<210> 8

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工

<400> 8

taattcgtag tattaggttc gggttttcgg taggg 35

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工

<400> 9

gttttctggtt attagtgagt	20
<210> 10	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 10	
tcctaaatcc cctaaacc	18
<210> 11	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 11	
gtgagtatgt gtggtttgtg t	21
<210> 12	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 12	
taaaccceca tcccaaatct ca	22
<210> 13	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 13	
taaaccceca tcccaaatct c	21
<210> 14	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 14	

---

gtgagtaatgt gtggtttgtg tt 22

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工

<400> 15

gtattaggtt tgggttttig gt 22

<210> 16

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工

<400> 16

tagtattagg ttcgggtttt cgg 23

<210> 17

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工

<400> 17

tttagagttt ttagtatggg gttaatt 27

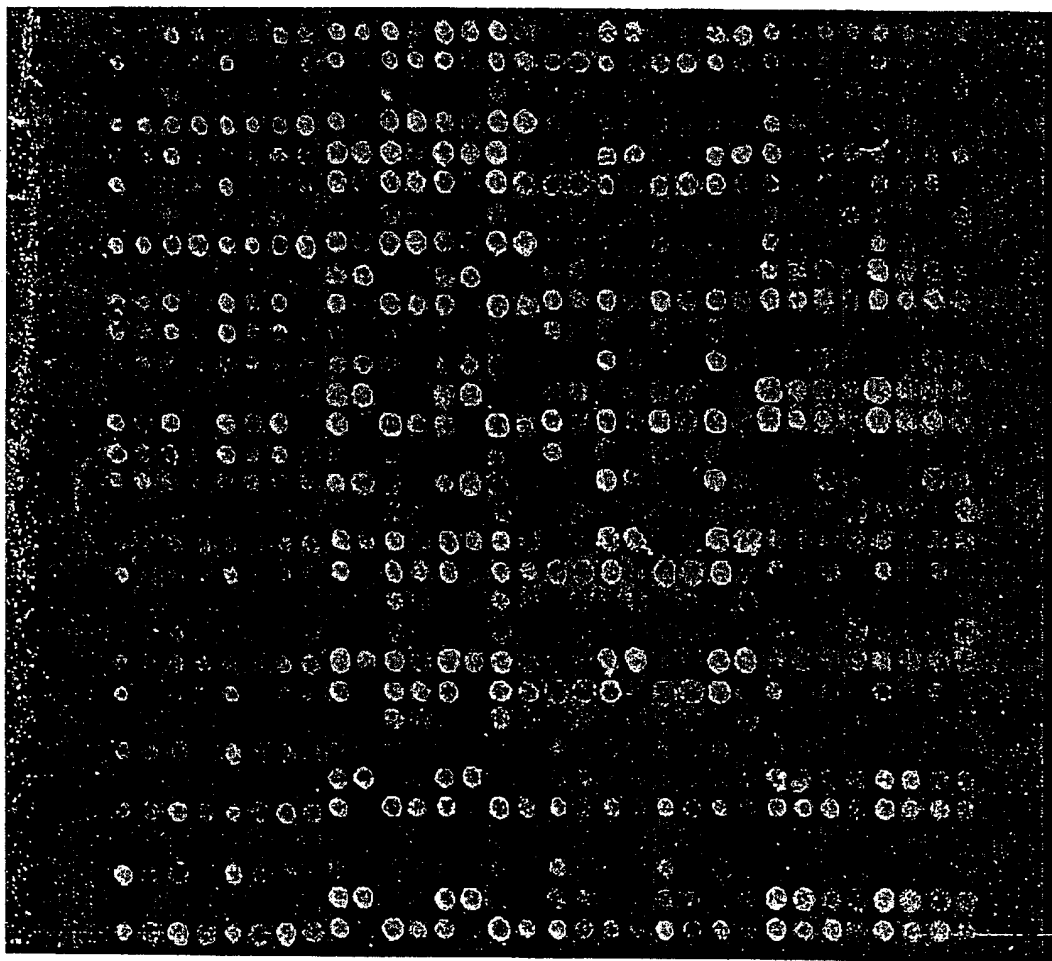


图1

图2

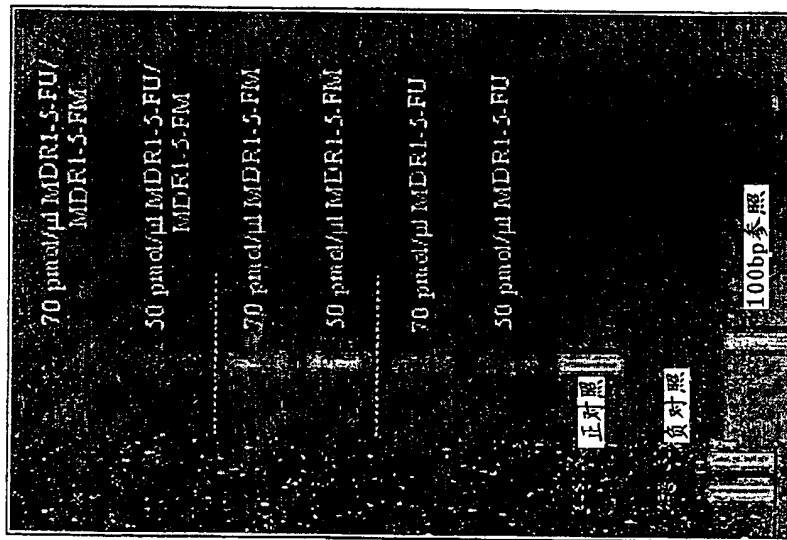


图3

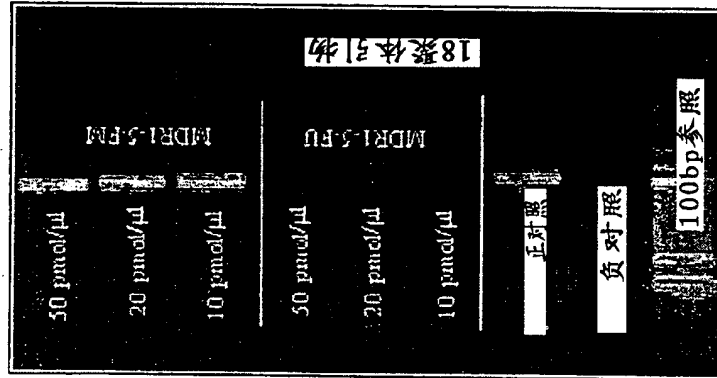


图4

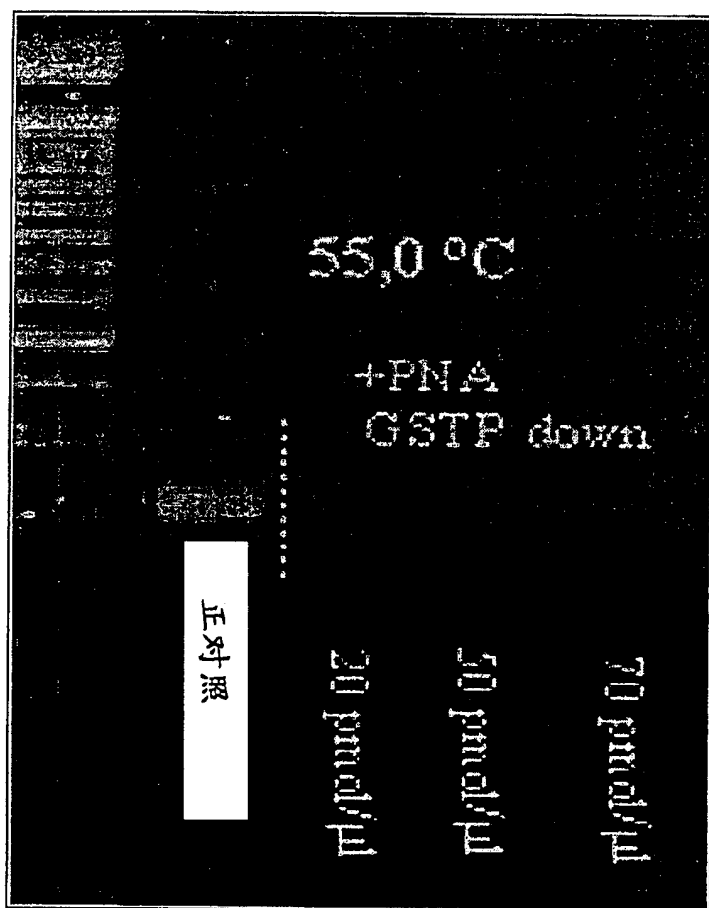
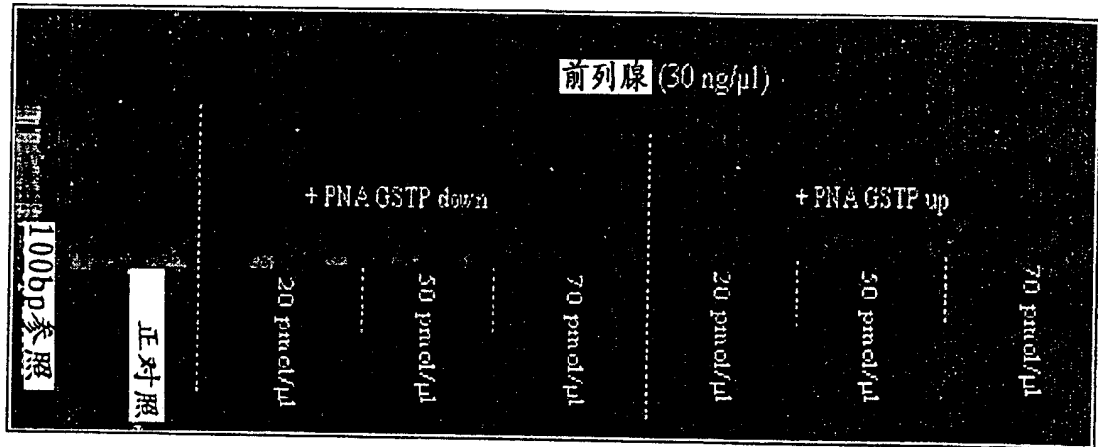
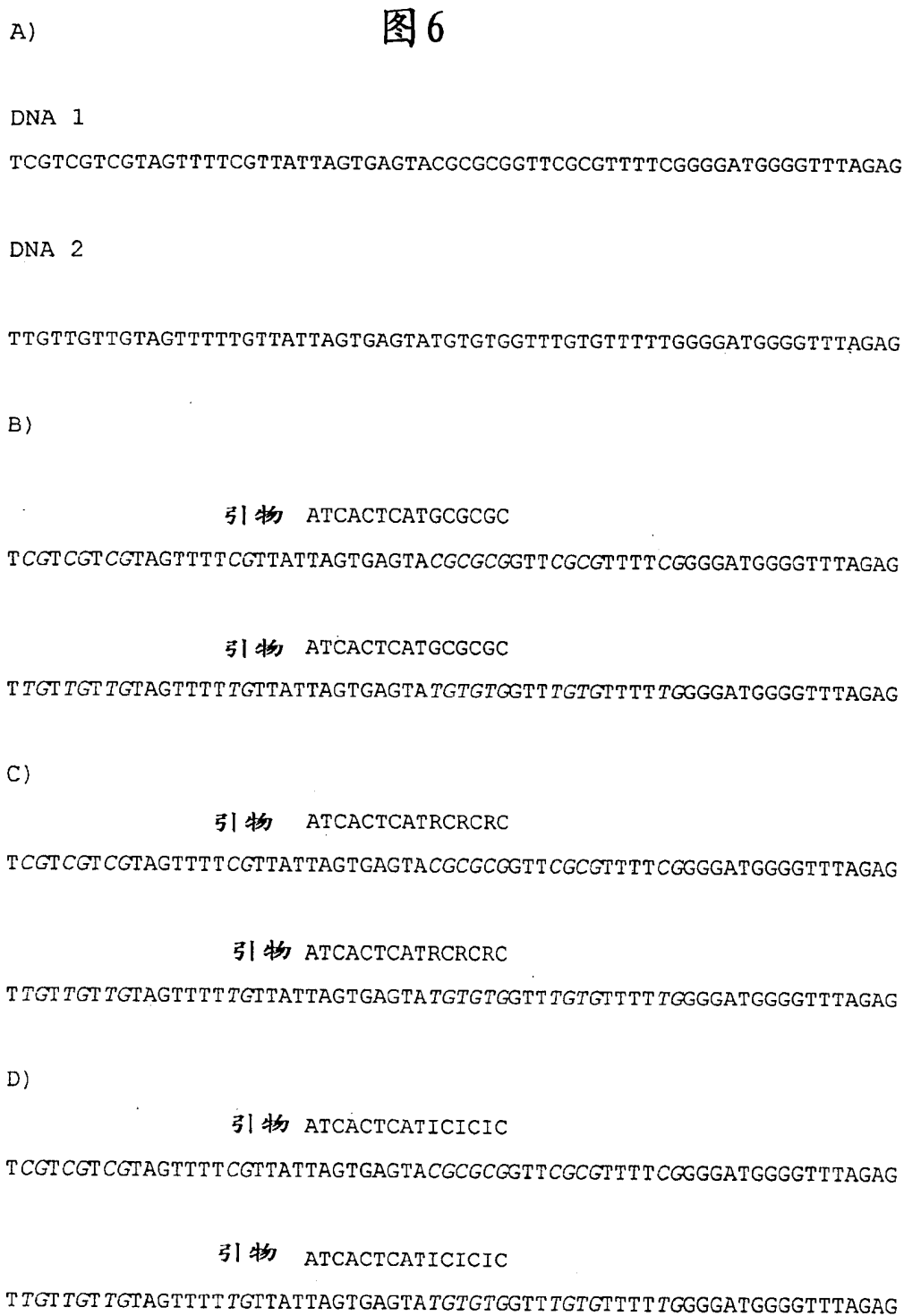


图 5





## 图7

- A)
- 引物 AATAATCACTCAT  
ACACACCAAACACAAA 封阻剂  
TCGTCGTCGTAGTTTTCGTTATTAGTGAGTACGCGCGGTTTCGCGTTTTTCGGGGATGGGGTTTAGAG
- 引物 AATAATCACTCAT  
ACACACCAAACACAAA 封阻剂  
TTGTTGTTGTAGTTTTTGTATTAGTGAGTATGTGTGGTTTGTGTTTTTGGGGATGGGGTTTAGAG
- B)
- 引物 AATAATCACTCAT  
AGTGAGTAACACACCAA 封阻剂  
TCGTCGTCGTAGTTTTCGTTATTAGTGAGTACGCGCGGTTTCGCGTTTTTCGGGGATGGGGTTTAGAG
- 引物 AATAATCACTCAT  
AGTGAGTAACACACCAA 封阻剂  
TTGTTGTTGTAGTTTTTGTATTAGTGAGTATGTGTGGTTTGTGTTTTTGGGGATGGGGTTTAGAG
- C)
- 引物 ATCACTCATRCRCRC  
ATCACTCATAGAGAGCAA 封阻剂  
TCGTCGTCGTAGTTTTCGTTATTAGTGAGTACGCGCGGTTTCGCGTTTTTCGGGGATGGGGTTTAGAG
- 引物 ATCACTCATRCRCRC  
ATCACTCATAGAGAGCAA 封阻剂  
TTGTTGTTGTAGTTTTTGTATTAGTGAGTATGTGTGGTTTGTGTTTTTGGGGATGGGGTTTAGAG
- D)
- 引物 ATCACTCATRCRCRCAA  
ACACACCAAACACAAAAA 封阻剂  
TCGTCGTCGTAGTTTTCGTTATTAGTGAGTACGCGCGGTTTCGCGTTTTTCGGGGATGGGGTTTAGAG
- 引物 ATCACTCATRCRCRCAA  
ACACACCAAACACAAAAAC 封阻剂  
TTGTTGTTGTAGTTTTTGTATTAGTGAGTATGTGTGGTTTGTGTTTTTGGGGATGGGGTTTAGAG

## 图8

引物1 AATAATCACTCAT

ACACCAAACACAAA 封阻剂

TCGTCGTCGTAGTTTTCGTTATTAGTGAGTACGCGGGTTCGCGTTTTCGGGGATGGGGTTTAGAG

引物2 CCCCTACCCCAAA

引物1 AATAATCACTCAT

ACACCAAACACAAA 封阻剂

TTGTTGTTGTAGTTTTTGTATTAGTGAGTATGTGTGGTTTGTGTTTTTGGGGATGGGGTTTAGAG

引物2 CCCCTACCCCAAA

图9

A

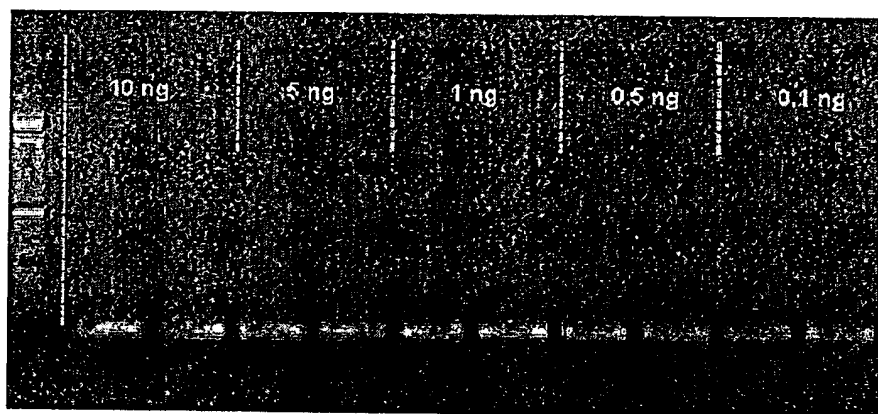
GTTTTGTTATTAGTGAGTATGTGTGGTTTGTGTTTTGGGGATGGGGTTTAGAGT  
TTTTAGTATGGGGTTAATTTGTAGTATTAGGTTTGGGTTTTGGTAGGGTTTTTG  
TTATTTTGAGATTTGGGATGGGGTTTAGGGATTAGGA

B

GTTTTCGTTATTAGTGAGTACGCGCGGTTTCGCGTTTTCGGGATGGGGTTTAGAGT  
TTTTAGTATGGGGTTAATTCGTAGTATTAGGTTTCGGGTTTCGGTAGGGTTTTCG  
TTATTTTCGAGATTCGGGACGGGGTTTAGGGATTAGGA

图10

A



B

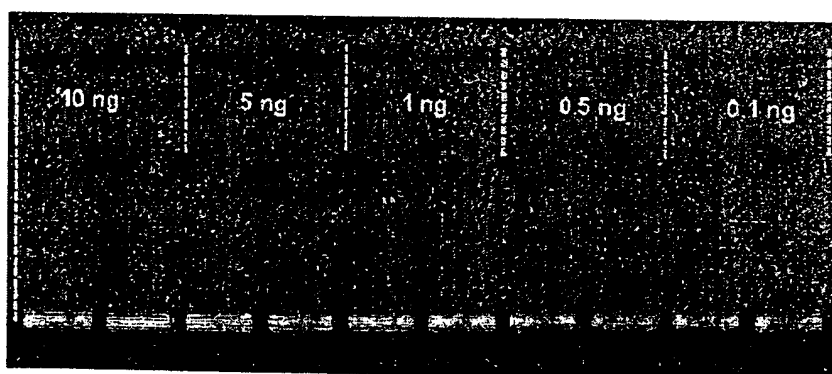




图12

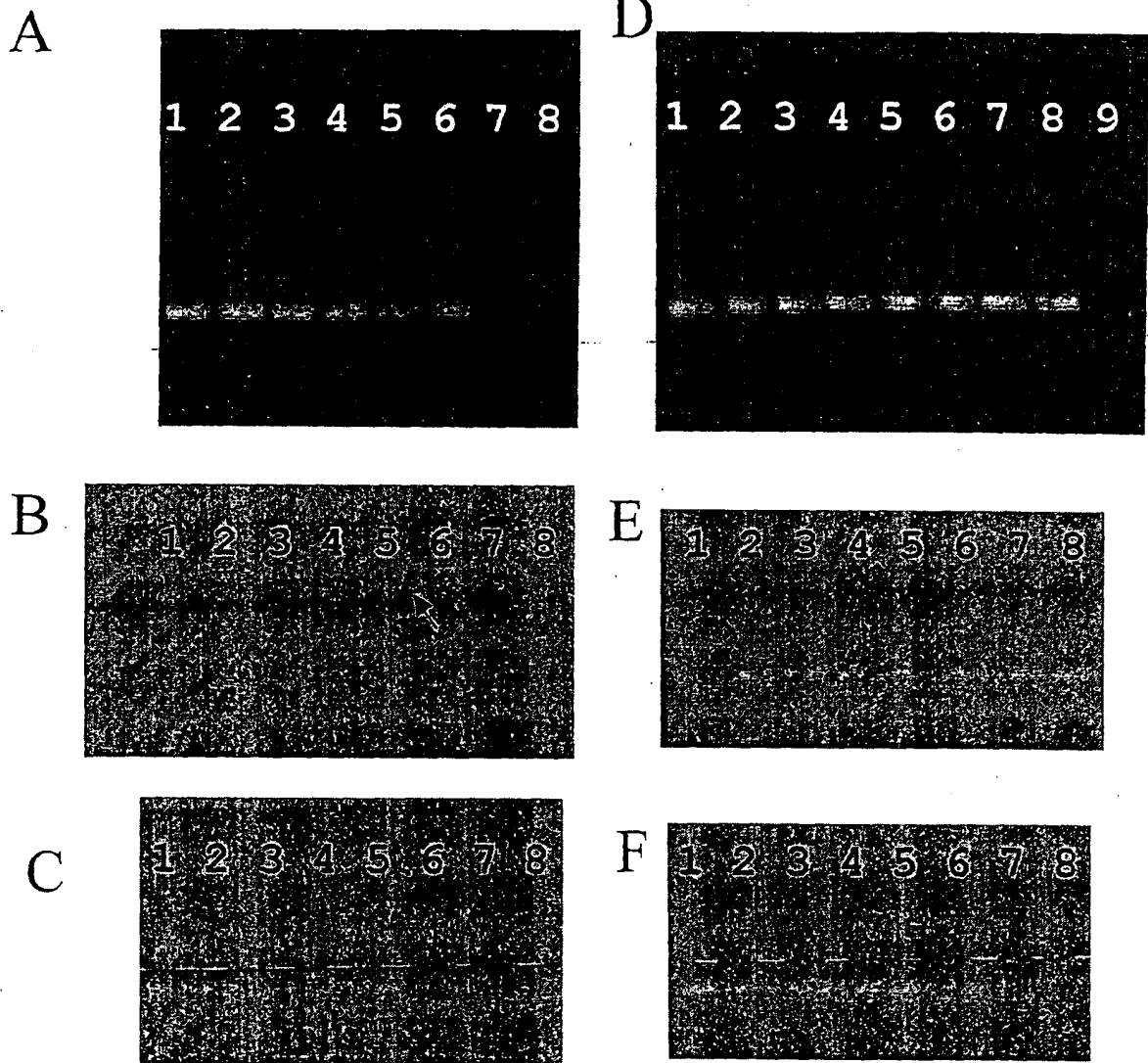


图13

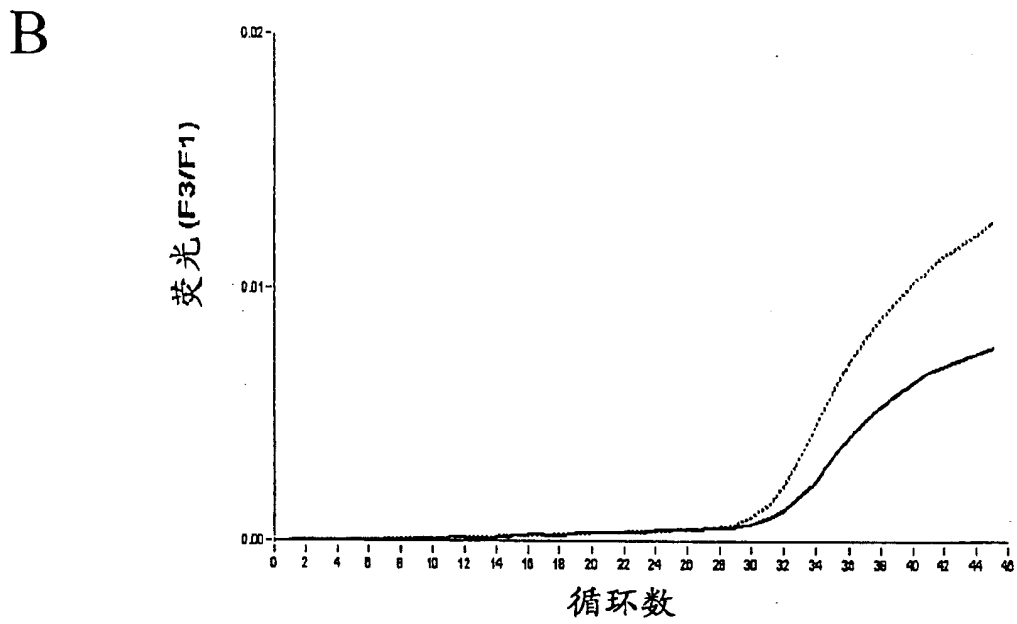
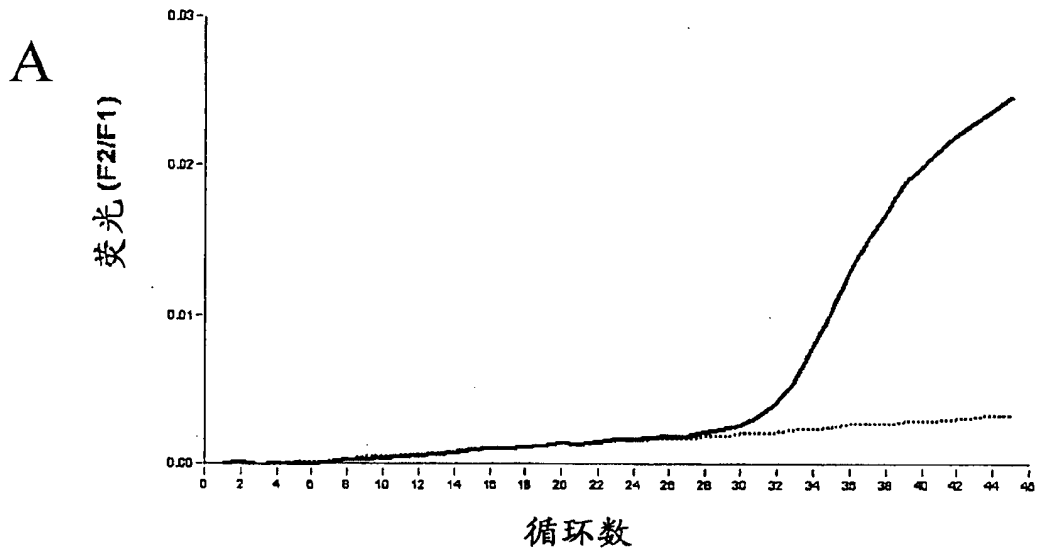


图14

旋转位置	样品名称	F2/F1 杂交点
1	up 100%, 5 ul, F1F2	28.95
2	up 1:1, 5 ul, F1F2	34.80
3	up 1:10, 5 ul, F1F2	37.46
4	up 1:20, 5 ul, F1F2	39.39
5	up 1:100, 5 ul, F1F2	41.32
6	up 1:200, 5 ul, F1F2	
7	up 1:500, 5 ul, F1F2	
8	up 1:1000, 5 ul, F1F2	
9	up 100%, 5 ul, F1F2B	33.38
10	up 1:1, 5 ul, F1F2B	34.41
11	up 1:10, 5 ul, F1F2B	36.84
12	up 1:20, 5 ul, F1F2B	37.67
13	up 1:100, 5 ul, F1F2B	40.81
14	up 1:200, 5 ul, F1F2B	
15	up 1:500, 5 ul, F1F2B	
16	up 1:1000, 5 ul, F1F2B	
17	ng F1F2	
18	ng F1F1B	

图 15

旋转位置	样品名称	F2/F1 杂交点	F3/F1 杂交点
1	up 100% -B	30.48	31.32
2	up 1:2 -B	31.46	30.18
3	up 1:10 -B	39.26	31.24
4	up 1:20 -B		30.47
5	up 1:100 -B		31.60
7	up 1:500 -B		31.38
8	up 1:1000 -B		30.68
9	down 100% -B		31.33
10	negativ-B		
11	up 100% +B	31.56	31.26
12	up 1:2 +B	32.59	31.51
13	up 1:10 +B	35.80	34.28
14	up 1:20 +B	37.33	36.47
15	up 1:100 +B	42.03	42.39
17	up 1:500 +B	42.89	
18	up 1:1000 +B		
19	down 100% +B		
20	negativ+B		

图16

