

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-125014

(P2007-125014A)

(43) 公開日 平成19年5月24日(2007.5.24)

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00	Z N A A	4 B O 2 4
<b>C 1 2 Q 1/68</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68	A	4 B O 6 3

審査請求 未請求 請求項の数 30 O L 外国語出願 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2006-294582 (P2006-294582)	(71) 出願人	505060347
(22) 出願日	平成18年10月30日 (2006.10.30)		ベリデックス・エルエルシー
(31) 優先権主張番号	11/262, 667		Veridex, LLC
(32) 優先日	平成17年10月31日 (2005.10.31)		アメリカ合衆国、07059 ニュージャージー州、ウォレン、テクノロジー・ドライブ 33
(33) 優先権主張国	米国 (US)		33 Technology Drive , Warren, NJ 07059, U. S. A.
		(74) 代理人	100066474
			弁理士 田澤 博昭
		(74) 代理人	100088605
			弁理士 加藤 公延
		(74) 代理人	100123434
			弁理士 田澤 英昭

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子メチル化検査法対照物

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】不死化し変形した細胞にしばしば起こる、遺伝子のメチル化現象を解明し、腫瘍抑制に有用なメチル化遺伝子の新規な検査法を提供する。

【解決手段】ヌクレオチド配列対照物（一以上の既知の場所にメチルシトシン、未修飾シトシン、ウラシルをもつ合成ヌクレオチド）の連結によりプラスミドを造り、このプラスミドを線状にしてゲノム核酸サンプルの模倣体を産生し、この模倣体をメチル化検査法に供し、メチル化検査法の有効性を評価するための方法に使用する。

【選択図】なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

ヌクレオチド配列対照物を生成する方法において、

- a) シトシンの代わりに、グアノシンまたはウラシルに隣接する 5 - メチルシトシンを含む、オリゴヌクレオチドの合成のステップと、
  - b) 前記オリゴヌクレオチドをアニールして、合成二本鎖体を形成するステップと、
  - c) 修飾核酸の検査法の反応条件下で、前記合成二本鎖体を使用するステップと、
  - d) 前記検査法の性能を評価するステップと、
- を含む、方法。

**【請求項 2】**

請求項 1 に記載の方法において、

前記オリゴヌクレオチドの合成は、制限酵素および/または連結酵素の存在下で実行され、前記対照物をプラスミドまたは他の DNA 中にクローン化するか、または連結させる、方法。

**【請求項 3】**

請求項 1 に記載の方法において、

前記オリゴヌクレオチドの合成は、自動的に行われる、方法。

**【請求項 4】**

請求項 2 に記載の方法において、

前記プラスミドは、環状または線状である、方法。

**【請求項 5】**

請求項 1 に記載の方法において、

前記ヌクレオチド配列対照物は、前記核酸の修飾が関与する検査法の品質管理テストのために使用される、方法。

**【請求項 6】**

請求項 5 に記載の方法において、

前記品質管理テストは、試薬バッチの標準化、種々異なる器具についての検査法性能の標準化、種々異なるフォーマットについての性能の標準化、種々異なるサイトの性能の標準化、および、前記検査法の種々異なる操作者についての性能の標準化を含む、方法。

**【請求項 7】**

請求項 6 に記載の方法において、

前記種々異なるフォーマットの標準化は、マイクロタイタープレート、試験管、ウェル、キャピラリー装置、管状材料、および、カラムの使用を含む、方法。

**【請求項 8】**

請求項 1 に記載の方法において、

前記合成オリゴヌクレオチドの長さは、100塩基以上である、方法。

**【請求項 9】**

請求項 1 に記載の方法において、

複数の二本鎖体を使用される、方法。

**【請求項 10】**

請求項 1 に記載の方法において、

前記合成二本鎖体は、定量的 PCR または終点 PCR で使用される、方法。

**【請求項 11】**

請求項 1 に記載の方法において、

患者のサンプルが使用される場合、または、定量化目的のための標準曲線を作成するために前記合成二本鎖体を使用される場合に、前記合成二本鎖体は、メチル化特異的 PCR のための正の対照物として使用される、方法。

**【請求項 12】**

請求項 1 に記載の方法において、

前記合成二本鎖体は、5 - メチルシトシンを含まない、方法。

10

20

30

40

50

- 【請求項 13】  
請求項 12 に記載の方法において、  
前記二本鎖体は、m s P C R 検査法の特異性を評価するために使用される、方法。
- 【請求項 14】  
請求項 1 に記載の方法において、  
5 - メチルシトシンおよびウラシルのみを有する二本鎖体の混合物が生成される、方法。
- 【請求項 15】  
請求項 14 に記載の方法において、  
D N A メチル化検査法において非メチル化 D N A のバックグラウンドを評価するために 10  
使用される、方法。
- 【請求項 16】  
請求項 1 に記載の方法において、  
二種類の相異なるタイプの二本鎖体の混合物が生成され、これら二種類の相異なるタイプ  
の二本鎖体は、亜硫酸水素塩変換の程度を推定するか、または決定するために使用され  
る、方法。
- 【請求項 17】  
組成物において、  
S e q . I D N o . 1 ~ 6 よりなる群の構成員を含む、組成物。
- 【請求項 18】 20  
キットにおいて、  
請求項 17 の組成物を含む、キット。
- 【請求項 19】  
修飾核酸の検査を実行するためのキットにおいて、  
ヌクレオチド配列対照物を含む、キット。
- 【請求項 20】  
請求項 19 に記載のキットにおいて、  
二以上のヌクレオチド対照配列を含む、キット。
- 【請求項 21】  
請求項 20 に記載のキットにおいて、 30  
二以上の遺伝子のための前記ヌクレオチド対照配列が用意されている、キット。
- 【請求項 22】  
請求項 19 に記載のキットにおいて、  
説明書を更に含む、キット。
- 【請求項 23】  
請求項 19 に記載のキットにおいて、  
メチル化遺伝子を増幅し、そのメチル化遺伝子の存在を検出するための試薬を更に含む  
、キット。
- 【請求項 24】  
請求項 19 に記載のキットにおいて、 40  
構成的に発現した遺伝子を増幅し、その遺伝子の存在を検出するための試薬を更に含む  
、キット。
- 【請求項 25】  
修飾核酸を検査するための方法において、  
a ) 修飾を有するのではないかと疑われる核酸を試薬と反応させて、生成物を形成する  
ステップと、  
b ) ステップ a ) の前記生成物を増幅するステップと、  
c ) 核酸配列対照物を増幅条件にさらすステップと、  
d ) ステップ b ) およびステップ c ) の前記生成物の存在を検出するステップと、  
を含む、方法。 50

## 【請求項 26】

請求項 25 に記載の方法において、  
前記修飾核酸は、メチル化されたものである、方法。

## 【請求項 27】

請求項 25 に記載の方法において、  
ステップ a) の前記試薬は、亜硫酸水素塩または結果として亜硫酸水素塩が存在することになる組成物である、方法。

## 【請求項 28】

請求項 26 に記載の方法において、  
メチル化率を確立し、前記メチル化率が、カットオフ値を上回るかどうかを決定するステップを更に含む、方法。 10

## 【請求項 29】

請求項 1 に記載の方法において、  
メチル化特異的 PCR で使用される、方法。

## 【請求項 30】

亜硫酸水素塩最終生成対照物を生成する方法であって、メチル化特異的 PCR 検査法での PCR 条件を最適化するために使用でき、亜硫酸水素塩変換ステップとは分離された、前記方法において、

a) 完全な亜硫酸水素塩変換の前記最終生成物を表す、シトシンの代わりにグアノシンまたはウラシルに隣接する 5 - メチルシトシンを含む、100 塩基オリゴヌクレオチドの自動 DNA 合成ステップと、 20

b) 合成一本鎖オリゴヌクレオチドのアニール化による合成二本鎖体の形成ステップと、

c) 前記合成二本鎖体を、PCR 熱サイクル条件、バッファ、酵素、および、リポーターシステム、好ましくはスコルピオン、と共に使用することによるメチル化特異的 PCR 検査法の最適化ステップと、  
を含む、方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【開示の内容】

## 【0001】

〔発明の背景〕

本発明は、メチル化遺伝子の検査法に関するものである。

## 【0002】

高等な真核生物では、DNA は、CpG ジヌクレオチド中のグアノシンに対し 5' に位置するシトシンでのみメチル化される。この修飾は、特に遺伝子プロモータ領域に位置する CpG に富んだ区域 (CpG 島) が関与する場合、遺伝子発現に重要な規制効果を有する。通常はメチル化されない CpG 島の異常なメチル化は、不死化し変形した細胞にしばしば起こる事象であって、ある種のヒトの癌の改善に結びつく筈のある種の腫瘍抑制遺伝子の転写の不活性化と関連付けられてきた。

## 【0003】

メチル化特異的 PCR (“MSP”) は、遺伝子のメチル化の検査のために現在知られている方法の中で最高のものの一つである。本方法の原理は、亜硫酸水素塩のシトシンと 5 - メチルシトシンに対する反応性の差に基づくものである。シトシンは亜硫酸水素塩との反応とアルカリによる脱スルホン化によってウラシルに変換するが、5 - メチルシトシンは、それよりかなりゆっくり反応する。このようにして、5 - メチルシトシンを含むゲノム DNA は、5 - メチルシトシンの向かい側に補完的なグアノシンを有するプライマーを使用する PCR のための基質として使用し得る。これに対して、シトシンを含み、これがウラシルに変換されるゲノム DNA は、(亜硫酸水素塩反応によってつくられる)ウラシルの向かい側にあるグアノシンのハイブリダイゼーションによって造られる不整合により、効率的にプライミングされることはない。このようにして、定量的 PCR 後、5 - メ 40 50

チルシトシンが存在することにより、元のゲノムDNA中にシトシンが存在する場合とは異なるCt(サイクル閾値)値を与える。

【0004】

シトシンがウラシルに変換される程度は、この分析の成功にとって重要である。理想的には、全てのシトシンがこのように変換される。この変換は、DNAが変性する程度に依存するので、変性ステップも同様に重要である。MSP反応のこれらの局面およびその他の局面の改善およびこれらに使用される試薬が提案されてきた。また、今後も開発が続けられるであろう。これらのプロセスにおけるプロトコルや処方の変化の影響を比較する手段を持つことへのニーズが存在する。同様に、品質管理等の目的のために、MSPプロセスで使用される試薬の有効性を決定することができることへのニーズがある。核酸の亜硫酸水素塩修飾が関与する用途では、このような修飾を用いる検査法の評価および処方において、亜硫酸水素塩修飾ステップを、増幅および検出方法(例えばqPCRステップ)から分離することができる試薬が必要とされる。反応条件の差異または反応に使用されるプライマーおよびプローブの差異についての影響を特異的に報告する増幅および検出のプロセス(例えばqPCRプロセス)の標準化のために使用し得る試薬も必要とされる。

【0005】

〔発明の概要〕

本発明の一態様によれば、ヌクレオチド配列対照物の連結(ligating)によりプラスミドを造り、このプラスミドを線状にしてゲノム核酸サンプルの模倣体を産生し、この模倣体をメチル化検査法に供し、この検査法の有効性を決定することが関与する、メチル化検査法の有効性の評価方法が提供される。

【0006】

本発明の他の一態様によれば、ヌクレオチド配列対照物が、一以上の既知の場所に、メチルシトシン、シトシンまたはウラシルを持つ合成オリゴヌクレオチドである。

【0007】

本発明の更に他の一態様によれば、このメチル化検査法の有効性の評価のための方法に、一以上の既知の場所に、メチルシトシン、シトシンまたはウラシルを持つヌクレオチド配列対照物の使用が含まれる。

【0008】

本発明の更に他の一態様によれば、ヌクレオチド配列対照物の作製方法に、線状プラスミドからのMSP生成物のプライミングに貢献する一以上の既知の場所における、メチルシトシン、シトシンまたはウラシルを持つオリゴヌクレオチドの合成が関与する。

【0009】

本発明の更に他の一態様によれば、ヌクレオチド対照配列が、MSP生成物のプライミングに貢献する一以上の既知の場所に、メチルシトシン、シトシンまたはウラシルを持つ合成オリゴヌクレオチドであり、線状のプラスミドから形成される。

【0010】

本発明の更に他の一態様によれば、メチル化検査法対照物に、MSP生成物のプライミングに貢献する一以上の既知の場所に、メチルシトシン、シトシンまたはウラシルを持つ合成オリゴヌクレオチドであり、線状のプラスミドから形成されるヌクレオチド対照配列が含まれる。

【0011】

本発明の更に他の一態様によれば、メチル化検査法を行うためのキットにヌクレオチド対照配列が含まれる。

【0012】

本発明の更に他の一態様によれば、メチル化検査法を行う方法に、ヌクレオチド対照配列を検査し、そのような対照配列の検査結果に基づいて、そのメチル化検査法が有効かどうかを決定することが含まれる。

【0013】

〔発明の詳細な説明〕

10

20

30

40

50

### <メチル化検査法>

ハイパーメチル化を検出するための検査法には、MSPおよび制限エンドヌクレアーゼ分析等の技術がある。

#### 【0014】

本発明の対照物が有用である例示的な検査法では、マーカーを含む標的細胞を核酸と結合するための試薬と接触させる。この文脈においてマーカーは、診断的見地から見てメチル化の状態が意味のあるヌクレオチド配列である。すなわち、そのような配列がハイパーメチル化されるかどうかを知ることにより、癌や過生成のような状態の診断または予後診断が可能になる。標的細胞成分は、DNAまたはRNA等の核酸である。これらの試薬には、標的配列を増幅し検出するように構成された、プローブおよびPCRプライマーまたはMSPプライマー等のプライマーあるいはその他の分子が含まれ得る。例えば、これらの試薬には、スコルピオン試薬 (Scorpion reagents) またはスコルピオンレポーター (Scorpion reporters) と呼ばれ、ウィトコン (Whitcombe) 等に付与された米国特許第6,326,145号および6,270,967号 (これらの文献は、参照によりその全体が本明細書に包含される) に記載されたような、それら自身のレポーターセグメントと組み合わせられまた結合したプライミング配列が含まれ得る。用語「プライマー」および「プライミング配列」は、正確には同一ではないが、本明細書において、核酸配列の増幅をプライミングする分子または分子の部分を意味するように使用し得る。

10

#### 【0015】

本発明のヌクレオチド配列対照物の最も好ましい使用法は、メチル化特異的PCR反応 (MSP) に関連するものである。すなわち、本対照物は、このような反応の有効性を評価し、それらの操作の正当性を立証し、それらに使用される試薬および/またはキットならびに方法についての品質管理の手段を提供するために使用される。

20

#### 【0016】

このようなMSP反応では、核酸を含む試験品を、非メチル化シトシンを修飾する作用物質と接触させる。試験品中のCpG含有核酸は、CpG-特異的オリゴヌクレオチドプライマーによって増幅され、MSP生成物が、メチル化核酸の存在の指標として検出される。非メチル化シトシンの好ましい修飾は、非メチル化シトシンとメチル化シトシンとを区別するもう一つのヌクレオチドへの変換である。好ましくは、この剤は、非メチル化シトシンを修飾してウラシルにする亜硫酸水素ナトリウムであるが、非メチル化シトシンを修飾し、メチル化シトシンは修飾しない他の剤も使用し得る。亜硫酸水素ナトリウム (NaHSO<sub>3</sub>) による修飾が最も好ましく、シトシンの5,6-二重結合と直ちに反応するが、メチル化シトシンとは反応し難いものが好ましい。シトシンは亜硫酸水素イオンと反応して、脱アミノ化し易い、スルホン化シトシン反応中間体を形成し、これにより、スルホン化ウラシルを生成する。スルホン酸基はアルカリ条件下に除去でき、その結果としてウラシルが形成される。ウラシルは、Taqポリメラーゼによってチミンとして認識されるので、PCRでは、得られた生成物には、出発鋳型中に5-メチルシトシンが存在する場所にも、シトシンが含まれることになる。同様に、スコルピオンリポーターおよびスコルピオン試薬等の検出システムは、このようにして、処理された未修飾の種から修飾された種を区別する。

30

40

#### 【0017】

試験品中のCpG含有核酸の増幅のために本発明で使用されるプライマーは、(例えば亜硫酸水素塩による)修飾後、未処理のDNAとメチル化DNAと非メチル化DNAとを特異的に区別する。MSPでは、非メチル化DNAのためのプライマーまたはプライミング配列は、3'CG対に一つのTを持ち、これにより、メチル化DNA中に保持されているCから区別されることが好ましい。その相補体はアンチセンスプライマーとして設計される。非メチル化DNAのためのMSPプライマーまたはプライミング配列中には、Cがセンスプライマー中に存在せず、アンチセンスプライマー中にはGが存在しないため、通常、CまたはGは比較的少ない (Cは、修飾されて、増幅生成物中ではT (チミジン) と

50

して増幅されるU（ウラシル）になる）。

【0018】

メチル化プロセスで有用なプライマーは、多様な遺伝子座におけるかなりな数の核酸におけるポリメリゼーションを特異的に開始するための十分な長さで適切な配列のオリゴヌクレオチドである。プローブまたはリポーターに曝露されると、プライマーによって増幅された配列から、メチル化の状態、従って診断情報、が明らかになる。

【0019】

メチル化検査法において使用されるプライマーは、多様な遺伝子座を持つ鎖に対し実質的に相補的であるプライマー伸長生成物の合成を開始する能力を有する、八つ以上のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドであることが最も好ましい。合成に資する環境条件には、ヌクレオシドトリホスフェートおよび、DNAポリメラーゼ等のポリメリゼーションのための作用物質の存在および適切な温度とpHとが含まれる。プライマーまたはプライミング配列のプライミングセグメントは、増幅において最大の効率をあげるためには一本鎖であることが好ましいが、二本鎖でもよい。二本鎖の場合、プライマーは、伸張生成物を作製するために使用される前に、まずその鎖を分割するように処理される。このプライマーは、ポリメリゼーションの誘発剤の存在下、プライミングにより伸張生成物を合成するのに十分な長さでなければならない。プライマーの正確な長さは、温度、バッファおよびヌクレオチド組成等の因子に依存する。このオリゴヌクレオチドプライマーは、約12～20のヌクレオチドを含むことが最も好ましいが、これより多いヌクレオチドやこれより少ないヌクレオチドであってもよい。周知の設計ガイドラインや規則に従うことが好ましい。

10

20

【0020】

プライマーは、増幅されるゲノム遺伝子座のそれぞれの鎖と実質的に相補的であり、上記の説明のように、適切なGまたはCヌクレオチドを含むように設計される。これは、ポリメリゼーションのための作用物質が性能を発揮することができる条件下、プライマーがそれぞれの鎖とハイブリダイズするために十分に相補的でなければならないことを意味する。すなわち、プライマーは、ハイブリダイズして、ゲノム遺伝子座の増幅を許容するために、5'と3'の側鎖配列または複数の側鎖配列と十分相補的でなければならない。

【0021】

メチル化検査法に使用されるプライマーは、関与する反応ステップ数と比較して、より多くの標的遺伝子座を生じる。標的遺伝子座数より指数的により大きいことが最も好ましい。一般的には、一つのプライマーが遺伝子座の負（-）の鎖と相補的であり、もう一つのプライマーが、正（+）の鎖と相補的である。プライマーを変性核酸ヘアニールし、その後、DNAポリメラーゼI（DNA Polymerase I）（クレノウ（Klenow））およびヌクレオチドの大きなフラグメントのような酵素による伸張により、標的遺伝子座配列を含む、新たに合成された+および-の鎖が得られる。この連鎖反応の生成物は、使用された特定のプライマーの末端に対応する末端部を持つ別個の核酸二本鎖体である。

30

【0022】

標的遺伝子座（例えばCpG）を含む特定の核酸配列を含むかまたは含む可能性があるならば、出発核酸として、純粋なまたは純粋でない形態の任意の核酸試験品を使用し得る。このように、このプロセスでは、例えばDNAまたはメッセンジャーRNA等のRNAを使用し得る。このDNAまたはRNAは、一本鎖でも二本鎖でもよい。RNAが鋳型として使用される場合には、この鋳型をDNAへ逆転写するのに最適の酵素および/または条件を利用することができる。更に、それぞれの一本鎖を含むDNA-RNAハイブリッドを使用し得る。核酸の混合物も使用し得る。または、同一または相異なるプライマーを使用して事前の増幅反応で産生された核酸を使用し得る。増幅される特定の核酸配列、すなわち、標的遺伝子座、は、より大きな分子の一部でもよく、また、最初に個別の分子として存在し、その結果、特定の配列がその核酸全体を構成するようにできる。

40

【0023】

50

メチル化 CpG の検出のために使用される、核酸を含む試験品は、組織（特に、前立腺組織およびリンパ組織）、血液、リンパ、尿および精液等の任意のソースからのものであり得、マニアティス (Maniatis) 等 (分子クローニング (Molecular Cloning) : ラボラトリー・マニュアル (A Laboratory Manual), コールド・スプリング・ハーバー (Cold Spring Harbor), ニューヨーク州, p. 280, 281, 1982年) に記載されたような種々の技術によって抽出することができる。

**【0024】**

抽出されたサンプルが不純な場合には、増幅前に、サンプルの細胞、液体、組織または動物細胞膜を開放して、核酸または複数の核酸の鎖または複数の鎖を露出させおよび/または分割するのに有効な試薬で処理することができる。鎖の露出と分割のためのこの溶解と核酸変性ステップにより、増幅がより容易に起こるようになる。

10

**【0025】**

サンプルの標的核酸配列が二本鎖を含む場合、鋳型として使用できるようになる前に、核酸の鎖を分割することが必要である。鎖の分割は、別個のステップとしてでも、プライマー伸長生成物の合成と同時にでも行い得る。この鎖分割は、物理的、化学的あるいは酵素的手段を含む種々の適切な変性条件を用いて行い得る。核酸鎖分割の物理的方法の一つに、核酸を変性するまで加熱することが関与するものがある。典型的な加熱変性には、10分までの間で約80~105の範囲の温度が採用され得る。鎖分割は、ヘリカーゼとして知られる酵素群に属する酵素または、ヘリカーゼ活性を有し、リボATPの存在下にDNAを変性することが知られている、酵素RecAによっても誘発し得る。ヘリカーゼを使用する核酸の鎖分割に適した反応条件は、クーン・ホフマン・バーリン (Kuhn Hoffmann - Berlin) (シー・エス・エイチ定量的生物学 (C S H - Quantitative Biology), 43:63, 1978年) に記載されている。RecAを使用するための技術は、シー・ラディング (C. Radding) (アニュアル・レビュー・オブ・ジェネティクス (Ann. Rev. Genetics), 16:405-437, 1982年) に総説されている。これらの技術の改良も現在周知である。

20

**【0026】**

核酸の相補鎖が分割されると、その核酸が当初二本鎖であったか一本鎖であったかに拘わらず、分割された鎖は、さらなる核酸鎖の合成の鋳型として直ぐに使用できる状態になる。この合成は、鋳型に対するプライマーのハイブリダイゼーションが起こり得る条件下に実行される。一般的に、合成は、緩衝水溶液中で、好ましくは7~9のpHで、最も好ましくは約8のpHで、起こる。モル的に過剰な量の二つのオリゴヌクレオチドプライマーが、分割された鋳型鎖を含むバッファに対し加えられることが好ましい (ゲノム核酸については、通常、プライマー:鋳型が約 $10^8$ :1)。本発明のプロセスが診断用途に使用される場合、相補鎖の量は不明であり得る。それ故、プライマー量対相補鎖の量は、確実に決定されとは限らない。しかしながら、実際上は、増幅される配列が複雑な長い核酸鎖の混合物中に含まれる場合、加えられるプライマーの量は、一般的に、相補鎖 (鋳型) の量に対しモル的に過剰になる。このプロセスの効率を向上させるにはモル的に大過剰であることが好ましい。

30

40

**【0027】**

デオキシリボヌクレオシド三リン酸である、dATP、dCTP、dGTPおよびdTTPは、適切な量だけ、プライマーとは別にまたはプライマーと共に、合成混合物中に加えられ、得られた溶液は、約90~100まで加熱される。加熱時間は10分までであり、好ましくは1~4分間である。この加熱期間の後、溶液は、プライマーハイブリダイゼーションのために好ましい室温まで冷却される。冷却された混合物に対し、プライマー伸長反応を行うための適切な作用物質 (「ポリメリゼーションのための作用物質」) が加えられ、公知の条件下、反応が起こる。ポリメリゼーションのための作用物質は、熱に対し安定ならば、他の試薬と共に加えてもよい。この合成 (または増幅) 反応は、室温から

50

、ポリメリゼーションのための作用物質がもはや機能しない温度までの範囲で起こり得る。

【0028】

ポリメリゼーションのための作用物質は、プライマー伸長生成物の合成を達成するように機能する任意の化合物または系であり得るが、好ましくは酵素である。この目的に適した酵素には、例えば、大腸菌DNAポリメラーゼ1、大腸菌DNAポリメラーゼIのクレノウフラグメント、T4 DNAポリメラーゼ、他の利用できるDNAポリメラーゼ、ポリメラーゼ突然変異タンパク質 (polymerase mutants)、逆転写酵素、および、耐熱性酵素 (例えば、変性を起こすために十分高くした温度に供した後にプライマー伸長を行う酵素) 等の他の酵素が含まれる。好ましい作用物質はTaqポリメラーゼである。適切な酵素は、適当なやり方でヌクレオチドの結合を促進して、それぞれの遺伝子座の核酸鎖に対し相補的なプライマー伸長生成物を形成する。一般的に、この合成は、それぞれのプライマーの3'末端で開始され、鋳型鎖に沿って5'方向に、合成が終わり、種々異なる長さの分子が作製されるまで進行する。しかしながら、上記と同じプロセスを用いて、5'末端で合成が開始され、3'方向に進むポリメリゼーションのための作用物質もあり得る。

10

【0029】

代替の増幅方法も、メチル化遺伝子座と非メチル化遺伝子座とが、代替手段で検出されるに十分な程増幅される限り採用し得る。制限エンドヌクレアーゼ活性に基づく検査法も、メチル化パターンを検出する鋭敏な方法である。これらには、メチル化に鋭敏な酵素の使用とポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) との組み合わせが関与する。酵素によるDNAの消化の後、PCRは、DNA開裂がメチル化によって防止される場合にのみ、制限サイトの側面にあるプライマーから増幅する。

20

【0030】

増幅した生成物は、マリス (Mullis) 等に付与された米国特許第4,683,195号 (本文献は、参照によりその全体が本明細書に包含される) に記述されているように、生成物に特異的なプローブまたはリポーターで、メチル化されたものまたは非メチル化されたものとして特定されることが好ましい。ポリヌクレオチドを検出するためのプローブとリポーターとの分野における進歩は、当業者に周知である。オプションで、制限酵素消化およびサザンプロット分析等の他の技術により核酸のメチル化パターンを確認することができる。5' CpGメチル化の検出に使用できるメチル化に対し鋭敏な制限エンドヌクレアーゼの例には、SmaI、SacII、EagI、MspI、HpaII、BstUIおよびBssHIIが含まれる。

30

【0031】

多くのメチル化検査法において、メチル化率を測定することが好ましい。これは、得られたマーカの増幅されたメチル化種の量と増幅された参照マーカまたは増幅された非メチル化マーカ領域の量との比率を定めることによって行うことができる。これは、定量的リアルタイムPCRを使用して行うことが最もよい。決められたあるいは所定のカットオフまたは閾値を超える比率は、ハイパーメチル化され、癌 (GSTP1の場合には前立腺癌) 等の増殖性障害があることを示すものと考えられる。カットオフは公知の方法によって決められ、その場合に、公知の病態のものと公知の正常な容態のものとの少なくとも二セットのサンプルについて、このような方法が使用される。本発明の参照マーカは、内部標準としても使用し得る。参照マーカは、-アクチンのようなサンプルの細胞中に構成的に発現する遺伝子であることが好ましい。

40

【0032】

本発明の方法およびキットには、多重化のためのステップおよび試薬を含めることができる。すなわち、一度に二以上のマーカを分析することができる。

【0033】

<ヌクレオチド配列対照物>

本発明のヌクレオチド配列対照物は、メチル化検査法のアンプリコン、標的またはマー

50

カーに相当するオリゴヌクレオチドである。これらの対応の程度は、部分的に、その使用目的に依存する。対照物が品質管理目的のために使用される場合には、この対応は非常に近接している。このような用途では、対照物が標的またはアンプリコンとほとんど同一であることが最も好ましい。対照物が検査法キットのための内部標準として使用される場合には、対象物の少なくとも一部が、検査法の実際のマーカー、標的またはアンプリコンと重複する。このような検査法では、別々の容器で対照物を使用することが好ましい。

**【0034】**

検査プロトコルへの提案された修飾の評価等の用途では、対照配列は、標的またはアンプリコンの近くにある配列と類似するが、同様なやり方で評価される反応に参加できることだけが必要である。対照物が標的またはアンプリコンとほとんど同一であることが最も好ましい。

10

**【0035】**

対照物は、メチル化検査法スキームに対して有意な場所に、5 - メチルシトシン、未修飾シトシンまたはウラシルの塩基を持つ。それぞれの対照物が、このような三つの塩基を持つことが好ましい。これらは、標識化されておらず、それ故、qPCR中で標的として使用し得ることが好ましい。メチル化検査法スキームに対し有意な場所にそれらが配置されていることは、それらの場所におけるそれらの存在または不在により、反応経路の検討が可能になることを意味する。検査法の条件またはプロトコルを評価しまたは策定するために対照物を使用する場合、全部で三つのタイプの対照物（すなわち、有意な場所に5 - メチル基を持つものが少なくとも一つ、有意な場所に未修飾シトシンを持つものが少なくとも一つおよび、有意な場所にウラシルを持つものが少なくとも一つ）を使用することが好ましい。

20

**【0036】**

本発明の一態様では、本発明のヌクレオチド配列対照物が、分子生物学に一般的な方法により線状化されたプラスミド配列から構築されることが好ましい。

**【0037】**

本ヌクレオチド配列対照物を構築するために使用されるプラスミドには、分子生物学の分野で使用される任意の細菌プラスミドで見出される必要構成成分の全てを含むことができ、有利である。例えば、宿主細菌中で複製することができるであろう複製起点を含め得る。更に、適切なプラスミドには、ヌクレオチド配列対照物において使用される標的配列のクローニングを促進するための多重クローン化サイトを含めることができる。ヌクレオチド配列対照物を構築するために使用するプラスミドには、その他の必要なまたは有用なプラスミド成分も含めることができる。

30

**【0038】**

細菌中で複製可能であり、分子生物学的操作に適した任意のプラスミドを使用し得る。対照プラスミドの多重クローン化領域は、対照物として働くように構築されたフラグメント上のサイトに対応する制限エンドヌクレアーゼで切断することができる。制限酵素による消化により、対照配列である外因性の核酸サンプルを受け入れる線状プラスミドが作製される。次いで、消化された対照プラスミドは標準技術を用いて消化反応から単離される。これらの技術には、ガラスビーズの使用、種々のカラムマトリックス、ジェル分離等が含まれるが、これらに限られるわけではない。

40

**【0039】**

開裂したプラスミドの精製品は、次いで、精製したフラグメントと混合し、本技術分野で公知の標準的な技術を使用して、DNA分子と一緒に連結 ( l i g a t e ) される。新しく形成された内部対照プラスミドのリン酸塩バックボーンを閉じるためにDNAリガーゼが使用される。

**【0040】**

オリゴヌクレオチドは、一般的に、ホスホルアミダイト法 ( 米国特許第 4 , 4 1 5 , 7 3 2 号 ; 第 4 , 9 7 3 , 6 7 9 号 ; 第 4 , 4 5 8 , 0 6 6 号 ; ビューページ , S ( B e a u c a g e , S . ) およびアイヤー , R ( I y e r , R . ) ( 1 9 9 2 年 ) , テトラヘド

50

ロン (Tetrahedron), 48:2223-2311) により、市販のホスホル  
 アミダイトヌクレオシド、シリカ、コントロールされた多孔ガラス等の担体 (米国特許第  
 4,458,066号) およびポリスチレン (米国特許第5,047,524号および第  
 5,262,530号) および自動合成装置 (モデル392,394,3948 DNA /  
 RNA 合成装置 (Models 392,394,3948 DNA / RNA Synthesizers),  
 アプライド・バイオシステム社 (Applied Biosystems)) を使用して、固体担体の上で合成される。

#### 【0041】

<メチル化検査法におけるヌクレオチド配列対照物の使用方法>

増幅分析法では、検査法の試薬の機能性を保証するためのチェックのために、一般的に  
 10 正の対照物サンプルが使用される。実験ウェルに信号がなく、対照物ウェルに信号がある  
 場合、この検査法の試薬が機能していることをこの対照物ウェルからの結果が示している  
 ので、通常、実験ウェルには標的配列がないと結論される。負の対照物サンプルは、バック  
 グラウンド信号を決定する手段を提供する。

#### 【0042】

本発明のメチル化分析法では、PCR反応は、通常、サンプルを例えば亜硫酸水素塩で  
 修飾した後実行される。メチル化された種と非メチル化種の増幅は、平行して実行される  
 ことが好ましい。このようにして、対照物戦略としては、修飾種と非修飾種の増幅をテスト  
 し、更に、好ましくはすでに修飾されているべきではあるが実際にはされていない種の  
 20 増幅をテストすることがよい戦略である。

#### 【0043】

これは、遺伝子配列であってそのハイパーメチル化が診断的意味または予後診断的意味  
 を持つ遺伝子配列の増幅に対して有意な場所に特定の塩基を持つ、三つの相異なる対照物  
 のセットを作成することによって達成される。このような対照物は三つの5-メチルシト  
 シン (第二のオリゴヌクレオチドは、三つのシトシンを持ち; 第三のオリゴヌクレオチド  
 は三つのウラシルヌクレオチドを持つ) を用いて作製することが好ましい。次いで、サン  
 プルアリクォットおよびこれら三つの対照配列のそれぞれについて、亜硫酸水素塩による  
 処理が行われる (または、対照物としては行われない)。次いで、例えば、未修飾のシト  
 シンにハイブリダイズするように設計されたプライマーを使用して、定量的PCRを行い  
 、PCRの特徴が比較される。この検査法が適切に機能すれば、5-メチルシトシンを持  
 30 つ対照物が最も低いCt (サイクル閾) 値を示す一方、ウラシルを含む対照物は、最も高  
 いCt値を示す。更に、シトシンを含むプラスミドは、(最初の三つの) どのシトシンへ  
 の照会にどのプライマーが使用されるかおよび、亜硫酸水素塩反応で何%の転化率が得ら  
 れるかに依存して、これらの二つの両極端に等しいかそれらの中間のCt値を示す。

#### 【0044】

<メチル化検査法の評価方法>

本発明の好ましい典型的な一形態では、GSTP1 (SEQ ID No. 7) のハイ  
 パーメチル化に基づくメチル化検査法を評価するために、四つの100-塩基オリゴヌク  
 レオチド (SEQ ID 1, SEQ ID 2, SEQ ID 3, SEQ ID 4)  
 40 が使用される。ここで、SEQ ID 1とSEQ ID 3とが互いにハイブリダイズ  
 し、SEQ ID 2とSEQ ID 4とが互いにハイブリダイズし、二つの別々の二  
 本鎖体が形成される。SEQ ID 1は、(グアノシンの前にあるシトシンの全てがメ  
 チル化された場合の)、亜硫酸水素塩修飾後のGSTP1遺伝子の一番上の鎖の100の  
 塩基を表す。残りのシトシンは全てウラシルに置換され、(シトシンの100%がウラシ  
 ルに変換すると) 亜硫酸水素塩反応の最終生成物を生成した。SEQ ID 2は、(グア  
 ノシンの前にあるシトシンのどれもメチル化されなかった場合の)、亜硫酸水素塩修飾後  
 のGSTP1遺伝子の一番上の鎖の100の塩基を表す。このようにして、このオリゴヌ  
 クレオチドでは、シトシンの全てがウラシルに置換された。SEQ ID 3は、(グアノ  
 シンの前にあるシトシンの全てがメチル化された場合の)、亜硫酸水素塩修飾後のGST  
 P1遺伝子の一番下の鎖の100の塩基を表す。残りのシトシンは全てウラシルに置換さ  
 50

れ、(シトシンの100%がウラシルに変換すると)亜硫酸水素塩反応の最終生成物を生成した。SEQ ID 4は、(グアノシンの前にあるシトシンのどれもメチル化されなかった場合の)、亜硫酸水素塩修飾後のGSTP1遺伝子の一番下の鎖の100の塩基を表す。このようにして、このオリゴヌクレオチドでは、シトシンの全てがウラシルに置換された。同様に、SEQ ID 5とSEQ ID 6とは互いにハイブリダイズすることができる。SEQ ID 5は、(シトシンのどれもメチル化されなかった場合の)、亜硫酸水素塩修飾後の - アクチン遺伝子の一番上の鎖の100の塩基を表す。シトシンは全てウラシルに置換され、(シトシンの100%がウラシルに変換すると)亜硫酸水素塩反応の最終生成物を生成した。SEQ ID 6は、(シトシンのどれもメチル化されなかった場合の)、亜硫酸水素塩修飾後の - アクチン遺伝子の一番下の鎖の100の塩基を表す。このようにして、このオリゴヌクレオチドでは、シトシンの全てがウラシルに置換された。

10

#### 【0045】

これらの生成物は亜硫酸水素塩変換の最終生成物であるので、これらの二本鎖体のそれぞれの使用により、qPCRの効果のみを測定するようになる。このようにして、二本鎖体は、次のものに有用である。

- 1) 非メチル化配列ではなく、メチル化配列の検出に対して最適の性能(例えば感度)を示す条件の決定。
- 2) 多重試薬ロット(酵素混合物、プローブ合成またはプライマー合成、等)の再現性の決定。
- 3) PCR反応の標準化または定量化。
- 4) PCRのための正と負の対照物としての役割。

20

#### 【0046】

上述のアプローチでは、亜硫酸水素塩反応の下流における試薬およびプロセスの影響のみが測定される点に留意する必要がある。このようなやり方により、不完全なあるいは一貫性のない(あるシトシンでは完全であるが、他のシトシンでは部分的である)亜硫酸水素塩変換からの交絡効果を分離することができる。この同じアプローチは、他のメチル化検査法のための対照物で取ることができる。このアプローチは、標的を、その増幅および/または検出とは別のステップで修飾する他の検査法で実際に使用し得る。

#### 【0047】

<キット>

本発明のキットは、全てが本発明に係るヌクレオチド配列対照物を少なくとも一つ含んでいれば、種々の成分を用いて構成し得る。一形態では、このキットに、ハイパーメチル化マーカーセグメントの増幅および検出のための試薬が含まれる。オプションでは、このキットに、サンプルから核酸を抽出するためのサンプル作製試薬および/または物品(例えば試験管)が含まれる。

30

#### 【0048】

好ましいキットでは、対応するPCRプライマーセット、耐熱性DNAポリメラーゼ(例えばTaqポリメラーゼ)および適切な検出試薬または複数の検出試薬(例えば加水分解プローブまたは分子ビーコン)等の1-チューブMSPに必要な試薬が含まれる。オプションの好ましいキットでは、スコルピオンレポーターまたはスコルピオン試薬が検出試薬である。エチジウムブロマイド等の二本鎖DNAに特異的な単一染料プライマーまたは蛍光染料も使用し得る。プライマーは、高濃度を与える量であることが好ましい。このキットの追加的材料としては、MSP反応で使用し得る、適切な反応試験管または反応バイアル、バリア組成物(典型的にはワックスビーズ、オプションでマグネシウムを含む); 必要なバッファおよび試薬(例えばdNTPs); 対照核酸および/または任意の追加的バッファ、化合物、共因子、イオン性構成成分、タンパク質および酵素、ポリマー等を含め得る。オプションで、キットに、核酸抽出試薬および材料が含まれる。

40

#### 【0049】

<例>

50

## 例 1 :ヌクレオチド配列対照物の作製

100塩基の合成オリゴヌクレオチドを、TriLink Biotechnologies (サンディエゴ、カリフォルニア州)による標準的ホスホルアミダイト化学を使用して合成した。好ましい場所に5-メチルシチジンおよびウリジンホスホルアミダイトを合成した。ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を使用してオリゴヌクレオチドを精製した。オリゴヌクレオチド濃度は、260nm波長の分光光度的測定法によって測定した。SEQ ID 1およびSEQ ID 3は、互いにハイブリダイズして、qPCR検査法での使用のために逐次希釈した。SEQ ID 2およびSEQ ID 4は、互いにハイブリダイズして、qPCR検査法での使用のために逐次希釈した。

## 【0050】

## 例 2 : MSP 反応における対照物の使用

合成対照物を、次の成分を含む25μL反応物中で増幅した。67mMのトリス pH 8.8、16.6mMの(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、6.7mMのMgCl<sub>2</sub>、10mMのβ-メルカプトエタノール；それぞれ1.25mMのdATP、dCTP、dGTP、dTTP、1UのHot start Taq DNAポリメラーゼ、250nMのスコルピオンプローブおよび、250nMの(スコルピオン設計に依存して)リバースプライマーまたはフォワードプライマー。ついで、サンプルは、Cepheid SmartCycler (登録商標)PCR機器上、定量的リアルタイムPCR検査法でテストされた。使用したPCR条件は次の通りである：95℃で60秒間；次いで95℃で30秒の条件で40サイクル、59℃で30秒間および、72℃で5分間の最終延長期間。サイクル毎に59℃で光学的データを集めた。下記に示す結果から、このスコルピオン検査法がメチル化GSTP1を検出でき、非メチル化β-アクチンを測定するように設計されたβ-アクチン検査法でも同様であることが証明される。これらの結果は、これらの検査法の再現性も証明している。

## 【表 1】

遺伝子	Ct値	SD	終点の蛍光	SD
GSTP1	27.1	0.2	548	28
β-アクチン	28.5	0.2	218	14

## 【0051】

## 例 3 : 検査プロトコルの正当性を証明するための対照物の使用

1) GSTP1スコルピオン検査法が、亜硫酸水素塩処理後にメチル化DNAのみを検出し、非メチル化DNAを検出しないであろうこと、2) GSTP1スコルピオン検査法が、高度に鋭敏な検査法であること(すなわち、極めて少ないコピー数で検出し得ること)、および、3) 本検査法が非常に線形であること、を立証するために、オリゴヌクレオチド二本鎖体のそれぞれの逐次希釈物を使用して標準曲線が作成された。結果を、表2および表3に示す。

## 【表 2】

一本鎖GSTP1合成メチル化対照物													
検出体	タスク	量	Log Copies	Ct1	Ct2	Ct3	Ct4	平均 Ct	ΔCt	E.F1	E.F2	E.F3	E.F4
Gst-PiM	標準	2E+06	6.30	22.20	22.30	22.20	22.30	22.25	0.10	558	567	519	556
Gst-PiM	標準	2E+05	5.30	26.50	25.90	26.10	26.00	26.13	0.50	439	452	545	532
Gst-PiM	標準	20000	4.30	30.20	29.80	29.50	29.60	29.78	0.60	412	468	526	409
Gst-PiM	標準	2000	3.30	34.10	33.20	33.50	33.10	33.27	0.10	165	282	336	356
Gst-PiM	標準	200	2.30	38.90	39.00	36.70	37.20	37.95	1.70	52	49	150	118
Gst-PiM	標準	20	1.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-4	17	-15	-27
Gst-PiM	NTC			0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0	0	-27	8

10

20

30

40

50

【表 3】

一本鎖 GSTP1 合成非メチル化対照物													
検出体	タスク	量	Log Copies	Ct1	Ct2	Ct3	Ct4	平均 Ct	ΔCt	E.F1	E.F2	E.F3	E.F4
Gst-PiU	標準	2E+06	6.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-36	-15	-19	13
Gst-PiU	標準	2E+05	5.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-36	-27	-13	3
Gst-PiU	標準	20000	4.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-23	-36	-37	-47
Gst-PiU	標準	2000	3.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-51	-24	1	-25
Gst-PiU	標準	200	2.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-33	-9	-24	-10
Gst-PiU	標準	20	1.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-71	-56	-38	-25
Gst-PiU	NTC			0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0	0	-58	-34

10

## 【0052】

例 4：比較例および予想例

メチル化特異的 PCR におけるレポーターの性能を決定するための最良の従来技術を用いる場合、研究者は、レポーターのみに起因する性能的問題と、レポーターおよび/または亜硫酸水素塩反応における不完全もしくは部分的な変換に起因する性能とを区別しなければならない。通常、いくつかの PCR パラメータ（例えばバッファ条件、酵素濃度、プライマー濃度およびプローブ濃度）を検討するために、実験計画法（DOE）タイプの研究が構築されよう。しかしながら、これらの実験の成功は、事前の亜硫酸水素塩変換が成功していたという仮定に依存している。

20

## 【0053】

本発明では、亜硫酸水素塩変換の最終生成物を模倣する合成標的が DOE で使用され、それ故、その後の PCR 条件に起因する影響だけが報告されることになる。

## 【0054】

〔実施の態様〕

本発明の好ましい実施態様は以下の通りである。

(1) ヌクレオチド配列対照物を生成する方法において、

a) シトシンの代わりに、グアノシンまたはウラシルに隣接する 5 - メチルシトシンを含む、オリゴヌクレオチドの合成のステップと、

30

b) 前記オリゴヌクレオチドをアニールして、合成二本鎖体 (synthetic duplex) を形成するステップと、

c) 修飾核酸 (modified nucleic acid) の検査法 (assay) の反応条件下で、前記合成二本鎖体を使用するステップと、

d) 前記検査法の性能を評価するステップと、

を含む、方法。

(2) 実施態様 (1) に記載の方法において、

前記オリゴヌクレオチドの合成は、制限酵素および/または連結酵素 (ligation enzyme) の存在下で実行され、前記対照物をプラスミドまたは他の DNA 中にクローン化するか、または連結 (ligate) させる、方法。

40

(3) 実施態様 (1) に記載の方法において、

前記オリゴヌクレオチドの合成は、自動的に行われる、方法。

(4) 実施態様 (2) に記載の方法において、

前記プラスミドは、環状または線状である、方法。

(5) 実施態様 (1) に記載の方法において、

前記ヌクレオチド配列対照物は、前記核酸の修飾が関与する検査法の品質管理テストのために使用される、方法。

(6) 実施態様 (5) に記載の方法において、

前記品質管理テストには、試薬バッチの標準化、種々異なる器具についての検査法性能の標準化、種々異なるフォーマットについての性能の標準化、種々異なるサイトの性能の

50

標準化、および、前記検査法の種々異なる操作者についての性能の標準化を含む、方法。

(7) 実施態様(6)に記載の方法において、

前記種々異なるフォーマットの標準化は、マイクロタイタープレート、試験管(tubes)、ウェル(wells)、キャピラリー装置、管状材料(tubing)、および、カラムの使用を含む、方法。

(8) 実施態様(1)に記載の方法において、

前記合成オリゴヌクレオチドの長さは、100塩基以上である、方法。

(9) 実施態様(1)に記載の方法において、

複数の二本鎖体を使用される、方法。

(10) 実施態様(1)に記載の方法において、

前記合成二本鎖体は、定量的PCR(quantitative PCR)または終点PCR(endpoint PCR)で使用される、方法。

10

(11) 実施態様(1)に記載の方法において、

患者のサンプルが使用される場合、または、定量化目的のための標準曲線を作成するために前記合成二本鎖体を使用される場合に、前記合成二本鎖体は、メチル化特異的PCR(methylation specific PCR)のための正の対照物(positive controls)として使用される、方法。

(12) 実施態様(1)に記載の方法において、

前記合成二本鎖体は、5-メチルシトシンを含まない、方法。

(13) 実施態様(12)に記載の方法において、

前記二本鎖体は、msPCR検査法の特異性を評価するために使用される、方法。

20

(14) 実施態様(1)に記載の方法において、

5-メチルシトシンおよびウラシルのみを有する二本鎖体の混合物が生成される、方法。

(15) 実施態様(14)に記載の方法において、

DNAメチル化検査法において非メチル化DNAのバックグラウンドを評価するために使用される、方法。

(16) 実施態様(1)に記載の方法において、

二種類の相異なるタイプの二本鎖体の混合物が生成され、これら二種類の相異なるタイプの二本鎖体は、亜硫酸水素塩変換の程度を推定するか、または決定するために使用される、方法。

30

(17) 組成物において、

Seq. ID No. 1~6よりなる群の構成員を含む、組成物。

(18) キットにおいて、

実施態様(17)の組成物を含む、キット。

(19) 修飾核酸の検査を実行するためのキットにおいて、

ヌクレオチド配列対照物を含む、キット。

(20) 実施態様(19)に記載のキットにおいて、

二以上のヌクレオチド対照配列を含む、キット。

(21) 実施態様(20)に記載のキットにおいて、

二以上の遺伝子のための前記ヌクレオチド対照配列が用意されている、キット。

40

(22) 実施態様(19)に記載のキットにおいて、

説明書を更に含む、キット。

(23) 実施態様(19)に記載のキットにおいて、

メチル化遺伝子を増幅し、そのメチル化遺伝子の存在を検出するための試薬を更に含む、キット。

(24) 実施態様(19)に記載のキットにおいて、

構成的に発現した遺伝子を増幅し、その遺伝子の存在を検出するための試薬を更に含む、キット。

(25) 修飾核酸を検査するための方法において、

50

a) 修飾を有するのではないかと疑われる核酸を試薬と反応させて、生成物を形成するステップと、

b) ステップ a) の前記生成物を増幅するステップと、

c) 核酸配列対照物を増幅条件にさらすステップと、

d) ステップ b) およびステップ c) の前記生成物の存在を検出するステップと、を含む、方法。

(26) 実施態様(25)に記載の方法において、前記修飾核酸は、メチル化されたものである、方法。

(27) 実施態様(25)に記載の方法において、ステップ a) の前記試薬は、亜硫酸水素塩または結果として亜硫酸水素塩が存在することになる組成物である、方法。 10

(28) 実施態様(26)に記載の方法において、メチル化率を確立し、前記メチル化率が、カットオフ値を上回るかどうかを決定するステップを更に含む、方法。

(29) 実施態様(1)に記載の方法において、メチル化特異的 PCR で使用される、方法。

(30) 亜硫酸水素塩最終生成対照物を生成する方法であって、メチル化特異的 PCR 検査法での PCR 条件を最適化するために使用でき、亜硫酸水素塩変換ステップとは分離された、前記方法において、

a) 完全な亜硫酸水素塩変換の前記最終生成物を表す、シトシンの代わりにグアノシンまたはウラシルに隣接する 5 - メチルシトシンを含む、100塩基オリゴヌクレオチドの自動 DNA 合成ステップと、 20

b) 合成一本鎖オリゴヌクレオチドのアニール化による合成二本鎖体の形成ステップと、  
c) 前記合成二本鎖体を、PCR 熱サイクル条件 (PCR thermocycling condition)、バッファ、酵素、および、リポーターシステム、好ましくはスコルピオン、と共に使用することによるメチル化特異的 PCR 検査法の最適化ステップと、を含む、方法。

【図面の簡単な説明】

【0055】

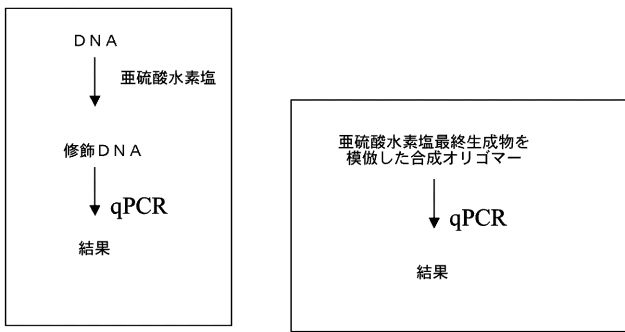
【図1】図1(a)が先行技術に係る対照物の使用を示す模式図であり、図1(b)が本発明の方法に係るヌクレオチド配列対照物の使用を示す模式図である。

【図2】例3の結果のグラフ図である。

【図3】例3の結果のグラフ図である。

【 図 1 】

qPCRからの亜硫酸水素塩変換ステップの分離



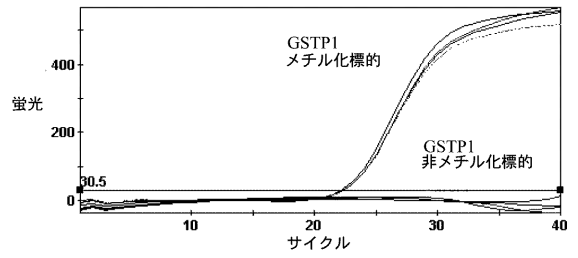
従来技術

(a)

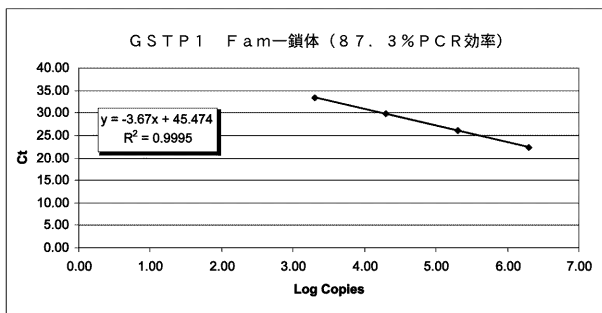
新プロセス

(b)

【 図 3 】



【 図 2 】



【 配列表 】

2007125014000001.app

---

フロントページの続き

(74)代理人 100101133

弁理士 濱田 初音

(72)発明者 オブジット・マズムダー

アメリカ合衆国、07920 ニュージャージー州、バスキング・リッジ、カーライル・ロード  
35

(72)発明者 ショバ・バルデ

アメリカ合衆国、08844 ニュージャージー州、ヒルズバーロウ、プライル・ロード 21

(72)発明者 トーマス・ブリッグス

アメリカ合衆国、18017 ペンシルベニア州、フリーマンブルグ、ノース・オーク・ストリー  
ト 221

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA20 CA01 CA05 CA09 HA14

4B063 QA01 QA13 QQ42 QR32 QR55 QR62 QS25 QS34

【外国語明細書】

2007125014000001.pdf