

(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2006-271311

(P2006-271311A)

(43) 公開日 平成18年10月12日(2006. 10. 12)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/66 (2006.01)	C 1 2 Q 1/66	4 B O 6 3
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願2005-98398 (P2005-98398)	(71) 出願人	000005108
(22) 出願日	平成17年3月30日 (2005. 3. 30)		株式会社日立製作所
			東京都千代田区丸の内一丁目6番6号
		(74) 代理人	100091096
			弁理士 平木 祐輔
		(72) 発明者	谷口 妃代美
			埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520番地 株
			式会社日立製作所基礎研究所内
		(72) 発明者	永井 啓一
			埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520番地 株
			式会社日立製作所基礎研究所内
		(72) 発明者	松永 浩子
			埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520番地 株
			式会社日立製作所基礎研究所内
		Fターム(参考)	4B024 AA11 CA04 CA09 HA09 HA12
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸分析方法

(57) 【要約】

【課題】被検体DNA由来の標的配列中に含まれる遺伝子変異及びCpGジヌクレオチドのメチル化シトシンの有無を簡便に、かつ高精度に検出する方法を提供する。

【解決手段】二本鎖核酸試料の非相補鎖部位を一本鎖特異的エンドヌクレアーゼで切断し、得られた核酸断片を前記二本鎖核酸試料のいずれか一方の鎖と一部又は全部が同一の塩基配列を含むプローブとハイブリダイゼーションさせ、前記プローブにハイブリダイズした前記核酸断片からの伸長反応を行い、前記伸長反応で生じるピロリン酸を光学的に検出することにより、前記二本鎖核酸試料中の非相補鎖部位の有無を判定することを特徴とする核酸分析方法。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

二本鎖核酸試料中の非相補鎖部位を分析する方法であって、
前記非相補鎖部位を一本鎖特異的エンドヌクレアーゼで切断して核酸断片を得る工程と、
得られた核酸断片を、前記二本鎖核酸試料のいずれか一方の鎖と一部又は全部が同一の塩基配列を含むプローブとハイブリダイゼーションさせる工程と、
前記プローブにハイブリダイズした前記核酸断片からの伸長反応を行う工程と、
前記伸長反応で生じるピロリン酸を光学的に検出する工程とを含む、核酸分析方法。

【請求項 2】

前記二本鎖核酸試料が、標的核酸上の前記非相補鎖部位を含む配列をあらかじめ増幅して得られたものである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記増幅工程で二本鎖核酸試料の一方の鎖をビオチン標識し、その一本鎖特異的エンドヌクレアーゼによる切断によって得られるビオチン標識核酸断片を、アビジン標識担体を用いて回収する工程を含む、請求項 2 に記載の核酸分析方法。

【請求項 4】

前記プローブが固相担体に固定化されたものである、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の核酸分析方法。

【請求項 5】

前記非相補鎖部位が前記二本鎖核酸試料中に存在する変異部位である、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の核酸分析方法。

【請求項 6】

前記変異部位がメチル化シトシンである、請求項 5 に記載の核酸分析方法。

【請求項 7】

前記増幅工程前に前記二本鎖核酸試料をBisulfite処理する工程を含む、請求項 6 に記載の核酸分析方法。

【請求項 8】

前記ハイブリダイゼーション工程が 0.1℃/秒以下で温度降下させて行われるものである、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の核酸分析方法。

【請求項 9】

前記ピロリン酸の光学的な検出工程が、ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応を利用した生物学的発光反応により行われるものである、請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の核酸分析方法。

【請求項 10】

前記一本鎖特異的エンドヌクレアーゼが、CELIヌクレアーゼ、Mung Beanヌクレアーゼ、S1ヌクレアーゼ、及びP1ヌクレアーゼから選ばれるいずれかである、請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の核酸分析方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、標的核酸中のCpGジヌクレオチドのメチル化シトシンを含む、各種変異の有無を検出する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

真核細胞のDNAメチル化は、グアニンの5'側に位置するシトシン（以下「CpGジヌクレオチド」という）で生じることが多い。特に多くの遺伝子プロモーター領域には複数のCpGジヌクレオチドが見られ、CpGアイランドと呼ばれている。癌細胞中に観察されるメチル化のパターンには広範囲のメチル化の低下、部位（プロモーター領域など）特異的高メチル化がある。低メチル化が生じるとそれぞれの細胞において不必要な遺伝子の発現が抑制

10

20

30

40

50

されないので染色体の不安定化を招き遺伝子突然変異のリスクを高めると報告されている（非特許文献1）。部分的な高メチル化は、遺伝子のプロモーター領域など遺伝子の発現に関係する領域に集中的にメチル化が観察される現象であり、癌抑制遺伝子やDNA修復遺伝子の発現を妨げると報告されている（非特許文献2参照）。

【0003】

特定の癌では、p16などの突然変異又はCpGジヌクレオチドのメチル化により不活化される癌抑制遺伝子の頻度を見た場合、突然変異に比べてCpGジヌクレオチドのメチル化異常の頻度が高く認められるケースもある（非特許文献3参照）。またCpGジヌクレオチドのメチル化異常は前癌病変など、早期から認められることがあり、例えば肺発癌においてp16のCpGジヌクレオチドのメチル化の異常は、過形成（17%）、化生（24%）、そして上皮内癌（50%）のように病変の進展に伴いその頻度が増加していることも報告されている（非特許文献4参照）。 10

【0004】

メチル化されていないシトシンは、Bisulfiteで脱アミノ化することによって容易にウラシルへ変換される（非特許文献5参照）。一方、メチル化されているシトシンは、Bisulfiteで処理してもウラシルへは変換されない。したがって被検体由来のDNAをBisulfiteで処理することにより、メチル化されているDNAとメチル化されていないDNAにおいて塩基配列に差が生じる。これを利用してメチル化の有無を検出することが可能となっている。

【0005】

特定のCpGジヌクレオチドのメチル化を検出する方法として、被検体由来のDNAをBisulfiteで処理した後にメチル化特異的PCR（MSP：Methylation specific PCR）によって鋭敏に検出が可能であるが、広範囲のCpGジヌクレオチドのメチル化を調べるには数多くのプライマーが必要となる（非特許文献6参照）。 20

【0006】

CpGジヌクレオチドのメチル化シトシンを検出する方法として、Bisulfiteで処理した被検体由来のDNAを用いて制限酵素処理を施し、その断片解析の結果によってメチル化シトシンの有無を検出するCombined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA)法がある（非特許文献7参照）。

【0007】

CpGジヌクレオチドのメチル化シトシンを検出する方法として、基板上に固定化された複数のキャプチャーオリゴヌクレオチドヌクレオチドと、Bisulfiteで処理した被検体由来のDNA試料との間でハイブリダイゼーションを行い、その結果によってDNA試料中のCpGジヌクレオチドのCのメチル化の有無を判定する方法も報告されている（特許文献1参照）。 30

【0008】

遺伝子突然変異を検出する方法として、被検体由来のDNA試料及び突然変異を含まないコントロールDNA試料をそれぞれPCR増幅させた産物との間でハイブリダイゼーションを行った後、遺伝子突然変異部位由来する非相補鎖部位を一本鎖特異的ヌクレアーゼで切断し、遺伝子突然変異の有無を検出する方法が報告されている（特許文献2参照）。

【0009】

レーザー励起蛍光を用いないDNA検出方法として、相補鎖合成により伸長する塩基長分のピロリン酸が生成され、このピロリン酸をATPへ変換し、ルシフェラーゼ存在下でルシフェリンと反応させて誘起される生物発光を利用した方法がある。これを利用した検出法としては、DNA塩基配列を決定するパイロシーケンス法（非特許文献8参照）と、遺伝子変異及びSNPの判定を行うBAMPER法(Bioluminometric Assay with Modified Extension Reaction, 非特許文献9参照)が報告されている。 40

【0010】

【特許文献1】特開2001-17199号

【特許文献2】特表2000-511774号

【非特許文献1】Chen RZ. et al., Nature. 395, p89-93, (1998)

- 【非特許文献2】 Jones PA. et al., Nat. Rev. Genet. 3, p415-428, (2002)
【非特許文献3】 Esteller M. et al., Cancer Res. 61, p3225-3229, (2001)
【非特許文献4】 Belinsky SA. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95, p11891-11896 (1998)
【非特許文献5】 Shapiro R. et al., J. Am. Chem. Soc. 96, p206-212, (1974)
【非特許文献6】 Chan EC. et al., Clin. Cancer Res. 8, p3741-3746, (2002)
【非特許文献7】 Xiong Z. et al., Nucleic Acids Res. 25, p2532-2534, (1997)
【非特許文献8】 Ahmadian A. et al., Anal. Biochem. 280, p103-110, (2000)
【非特許文献9】 Zhou G. et al., Nucleic Acids Res. 29, e93, (2001)

【発明の開示】

10

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

遺伝子診断において要請される事項としては、高精度な判定結果が得られること、手法が簡便であること、高価な試薬及び装置を必要としないこと、複数部位を一括して調べることができることが挙げられる。本発明の目的は、標的配列内において1箇所又は複数箇所存在する遺伝子変異及びメチル化シトシンの有無を簡便かつ高精度に判定する方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0012】

上記課題を克服するため鋭意検討し、被検体DNA由来の標的配列を有する一本鎖核酸と、変異部位以外は標的配列に相補的な参照配列を有する一本鎖核酸とのハイブリダイゼーションを行った後、被検体DNAに変異部位が存在する場合にのみ形成される非相補塩基対を、一本鎖特異的エンドヌクレアーゼで切断した。そして、その際に生じた断片が、前記標的配列又は参照配列の一部又は全部に相補的な配列を有する核酸プローブを鋳型として伸長反応が進むか否かを判定することで、変異部位の有無を決定できることを確認した。

20

【0013】

すなわち、本発明は、二本鎖核酸試料中の非相補鎖部位を分析する方法であって、前記非相補鎖部位を一本鎖特異的エンドヌクレアーゼで切断して核酸断片を得る工程と、
得られた核酸断片を、前記二本鎖核酸試料のいずれか一方の鎖と一部又は全部が同一の塩基配列を含むプローブとハイブリダイゼーションさせる工程と、
前記プローブにハイブリダイズした前記核酸断片からの伸長反応を行う工程と、
前記伸長反応で生じるピロリン酸を光学的に検出する工程とを含む、核酸分析方法を提供する。

30

【0014】

前記方法において、二本鎖核酸試料は、分析対象である標的核酸（標的遺伝子）上の前記非相補鎖部位を含む配列をあらかじめ増幅して得られた核酸試料であることが好ましい。増幅すべき領域の長さは、非相補鎖部位を含む100塩基～300塩基程度の長さであることが好ましい。可能であれば、前記増幅領域は分析対象である非相補鎖部位がその5'末端から20塩基以上3'側に存在するように設定することが好ましい。この範囲に設定されれば、後の酵素切断において生じる核酸断片からの伸長反応が円滑に進むことが期待されるからである。

40

【0015】

本発明の核酸分析方法では、前記増幅工程で二本鎖核酸試料の一方の鎖を（例えば、ビオチン標識化プライマーを用いるなどして）ビオチン標識し、この標識化二本鎖核酸試料の一本鎖特異的エンドヌクレアーゼによって切断で生じるビオチン標識核酸断片を、アビジン標識担体を用いて回収してもよい。

【0016】

また、プローブは固相担体にあらかじめ固定化しておいてもよい。前記固相化担体としては、例えば金属やガラス性の基板のほか、ビーズ、セファロース等を用いることができ

50

る。

【0017】

分析対象である非相補鎖部位としては、二本鎖核酸試料中に存在するあらゆる変異部位、例えば、SNP、マイクロサテライト多型、VNTR、その他特定塩基の欠失、置換、挿入、メチル化等の修飾が存在する部位を挙げることができる。なかでも、本発明の方法はCpGジヌクレオチドに存在するメチル化シトシンの分析に好適に用いることができる。

【0018】

メチル化シトシンの分析に用いる場合、前記増幅工程前に二本鎖核酸試料をあらかじめBisulfite処理することにより非メチル化シトシンをチミンに変換しておくことが好ましい。

10

【0019】

また、核酸断片とプローブとのハイブリダイゼーション工程は、非特異的なハイブリダイゼーションを避けるために、0.1℃/秒以下の速度でゆっくりと温度降下させていくことが好ましい。

【0020】

本発明の方法において、前記ピロリン酸の光学的検出工程は、例えばルシフェリンールシフェラーゼ反応を利用した生物学的発光反応によって実施することができる。なお、この方法に限定されず、TAMRA、Texas Red等で蛍光標識されたddNTPを利用する事により、伸長反応の有無が検出できる。

【0021】

また、用いられる一本鎖特異的エンドヌクレアーゼとしては、例えばCELIヌクレアーゼ、Mung Beanヌクレアーゼ、S1ヌクレアーゼ、P1ヌクレアーゼを挙げることができる。酵素処理後の核酸断片は、用いる酵素（例えば、CELI）の特性に応じて、適宜断片末端の平滑処理を行う。

20

【発明の効果】

【0022】

1つのゲノムDNA(核酸試料)にメチル化/変異部位が複数ある場合、切断処理によって様々な長さの断片が生じる。これを従来法である電気泳動によって検出すると、各断片長が異なることから信号強度がばらつき、検出感度が落ちる。本発明によれば、各断片長の長さにかかわらず、得られる発光強度は同じになるため、検出感度が向上する。さらに標的

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0023】

本発明の遺伝子検査方法では、被検体DNA由来の標的配列を有する核酸と、遺伝子変異あるいはメチル化シトシン以外は標的配列に相補的である参照配列を有する核酸との間でハイブリダイゼーションを行った後、被検体DNAに遺伝子変異塩基あるいはメチル化シトシンが存在する場合において形成される非相補塩基対を、一本鎖特異的エンドヌクレアーゼ活性を有する酵素で切断する。その際に生じた断片が、前記標的配列あるいは参照配列の一部又は全部に相補的な配列を有する核酸を鋳型として伸長反応が進むか否かを判定し

40

【0024】

遺伝子突然変異を検出する場合には、被検体DNA由来の標的配列とハイブリダイゼーションさせる上記参照配列は、遺伝子変異塩基以外は標的配列に対して相補的な配列を用いる。

【0025】

上記メチル化シトシンを検出する場合には、被検体DNAに含まれるメチル化されていないシトシンを脱アミノ化してウラシルへ変換するBisulfite処理をあらかじめ施す。

【0026】

メチル化シトシンを検出する場合に被検体DNA由来の標的配列とハイブリダイゼーション

50

ンさせる上記参照配列は、標的配列に含まれるCpGジヌクレオチドのシトシン以外の全てのシトシンをチミンに変換した塩基配列に相補的な配列、又は標的配列に含まれる全てのシトシンをチミンに変換した塩基配列に相補的な配列を用いる。

【0027】

上記断片と上記参照配列との伸長反応で生成されるピロリン酸をATPに変え、ルシフェラーゼ存在下でルシフェリンと反応させた結果得られる発光を検出する工程により、伸長反応の有無を判定することができる。

【0028】

標的配列又は参照配列から一本鎖特異的エンドヌクレアーゼにより非相補鎖部位の3'側で切断されて生じた断片と、突然変異及びメチル化シトシンを含まない標的配列又は参照配列に相補的な配列を有する核酸を鋳型とした伸長反応は、液相中で行ってもいいし、上記標的配列に相補的塩基配列であるオリゴヌクレオチドを固定化した固相担体を用いて行ってもよい。

【0029】

図15に、複数の変異部位を分析する場合における、電気泳動法と本発明の方法を比較したもの（概念）を示す。図15からわかるように、1つのゲノムDNA(核酸試料)にメチル化又は変異部位が複数あると、切断処理によって様々な長さの断片が生じる。これを従来の電気泳動法で検出すると、各断片長が異なることから信号強度がばらつき、検出感度が落ちる。本発明によれば、断片長が異なっても、期待される発光強度は同じになるため、検出感度が高くなる。さらに調べたい場所ごとに多くのオリゴヌクレオチドを作成する必要がなく、簡便に広範囲の遺伝子突然変異又はメチル化シトシンを検出することができる。

【実施例】

【0030】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。以下の実施例は、遺伝子変異検出とメチル化検出の例を示すためのものであり、本発明を限定するものではない。実施例1で用いる癌遺伝子K-Rasは、ここで用いた癌細胞由来DNAではコドン12に遺伝子変異が存在し、非癌細胞由来のDNAでは全て遺伝子変異が存在しない状態とする。また実施例2～5で用いる癌抑制遺伝子hMLH1のプロモーター領域内に存在する3箇所のCpGジヌクレオチドシトシンは、ここで用いた癌細胞由来DNAでは全てメチル化されており、非癌細胞由来のDNAでは全て非メチル化状態であるものとする。

【0031】

〔実施例1〕

癌遺伝子K-Rasのコドン12における遺伝子変異について、遺伝子変異の有無を判定した。検体から通常の方法（Molecular Cloning Third Edition (2001) PP6.8-6.11 (Cold Spring Harbor Laboratory Press)）に従ってゲノムDNAを抽出した。抽出したゲノムDNA（20 ng/μL）、10 μMのプライマー（表1）、2.5 mMのdNTP、PCR緩衝液（QIAGEN）をそれぞれ各2 μLずつ、さらに5U / μLのTaq DNA Polymerase（QIAGEN）を0.2 μL混和して滅菌水で20 μLに調製した。

【0032】

PCR増幅は94℃ 1.5分間の熱変性の後、94℃ 30秒間、55℃ 30秒間、72℃ 1分間を35回行った後、72℃ 2分間の温度サイクルで行った。増幅されるPCR産物及びプライマーの配列を表1に示す。

【0033】

【表 1】

【表 1】

(A) PCR プライマー (K-RasF の 5' 末端はビオチン標識)

プライマー	配列 (5' → 3')	長さ (bp)	T _m (°C)	PCR 産物 (bp)	配列番号
K-RasF	GACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTG	26	62.4	107	配列番号 1
K-RasR	CTATTGTTGGATCATATTCGTCC	23	63.4		配列番号 2

(B) PCR 産物の正常配列 (配列番号 3 : コドン 1 2 遺伝子変異 : GGT→TGT)

10	20	30	40	50	60	
5' GACTGAATAT	AACTTGTGG	TAGTTGGAGC	TGGTGGCGTA	GGCAAGAGTG	CCTTGACGAT	3'
3' CTGACTTATA	TTTGAACACC	ATCAACCTCG	ACCACCGCAT	CCGTTCTCAC	GGAAGTCTA	5'
70	80	90	100	107		
5' ACAGCTAATT	CAGAATCATT	TTGTGGACGA	ATATGATCCA	ACAATAG	3'	
3' TGTGATTAA	GTCTTAGTAA	AACACCTGCT	TATACTAGGT	TGTTATC	5'	

【0034】

後のハイブリダイゼーションの効率を上げるため、二本鎖PCR産物に残存するPCRプライマー及びdNTPを除去した (QIAquick PCR purificationキット : QIAGEN社)。この二本鎖PCR産物10 μLにStreptavidin Sepharose (Amersham Biosciences社) 8 μL、及びBinding Buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.01 % Tween20(w/v)) 42 μLを添加し、5分間よく混和して片方の鎖がビオチン標識された二本鎖PCR産物をStreptavidinに捕捉させた。この混和物を60 μL/wellずつMulti Screen-96 wellプレート (Millipore社) に分注して遠心 (2450 rpm、3分間、室温) した。さらに0.2 MのNaOHを50 μL/well分注して二本鎖PCR産物をアルカリ変性させた後、遠心 (2450 rpm、3分間、室温) してビオチン標識されていない一本鎖PCR産物を含む濾液を回収し、エタノール沈殿精製を施した。

【0035】

標的配列である被検体由来の一本鎖PCR産物 (核酸 50 ng) を1 μL、参照配列として、遺伝子変異塩基以外は標的配列と相補的であり、5' 末端側にビオチンが標識された一本鎖DNA (核酸 50 ng) を1 μL添加し、さらにハイブリダイゼーションバッファ (100 mM Tris-HCl, 1M NaCl, 0.5mM EDTA) を1 μL加えて、滅菌水で8 μLに調製した。

【0036】

標的配列 : (下線部は変異塩基部位)

3' -CTGACTTATATTTGAACACCATCAACCTCGAACACCGCATCCGTTCTCACGGAAGTCTATGTCGATTAAAGTCTTAGTAAACACCTGCTTATACTAGGTTGTTATC- 5' (配列番号 4)

【0037】

参照配列 : (下線部は変異塩基部位)

5' -GACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTGGACGAATATGATCCAACAATAG- 3' (配列番号 5)

【0038】

これを95°C 10分間で熱変性させ、非特異的なハイブリダイゼーションを回避するために0.1°C/秒間ずつゆっくりと温度を25°Cまで低下させる条件でハイブリダイゼーションを行った。標的配列に遺伝子変異が存在する場合、遺伝子変異塩基において非相補鎖部位が生じる。

【0039】

上記工程でハイブリダイゼーションを施した試料8 μL (核酸 100 ng) に、10×緩衝液 (100mM KCl, 100mM MgSO₄, 100mM HEPES, 0.02% TritonX100, 0.002mg/mL BSA) を1 μL

10

20

30

40

50

、エンハンサー及び一本鎖特異的ヌクレアーゼCELI (TRANSGENOMIC社)を各0.5 μ Lずつ混和して計10 μ Lの反応溶液に調製した。これを45°C 15分間インキュベートして上記非相補鎖部位を酵素消化し、500mM EDTAを1 μ L添加して一本鎖特異的ヌクレアーゼ反応を停止させる。さらに、断片末端の平滑処理を行った。

【0040】

一本鎖特異的ヌクレアーゼの消化により参照配列から生じたビオチン標識断片10 μ Lに、Streptavidin Sepharose 8 μ L、及びBinding Buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.01 % Tween20(w/v)) 42 μ Lを添加し、5分間よく混和してビオチン標識された断片をStreptavidinに捕捉させた。この混和物60 μ LをMulti Screen-96 wellプレート(Millipore社)に分注し、遠心(2450 rpm, 3分間, 室温)した。Multi Screen -96 wellプレートのメンブレン上に存在している一本鎖断片(5'末端ビオチン標識)が補足されたStreptavidin Sepharoseを、滅菌水10 μ Lで混濁させ、回収した。

【0041】

上記工程で回収した断片試料1.5 μ Lに、この配列に相補的な一本鎖DNA試料(1 μ M)を1 μ L、10 $\times$ Taq Buffer (Amersham Bioscience社)を0.3 μ L、1 mMのdNTP (pyrophosphatase処理済)を0.15 μ L、5 U/ μ LのTaq polymerase (Amersham Bioscience社)を0.03 μ L加えて混和し、滅菌水で3 μ Lに調製した。これを95°Cで2分間熱変性させた後、55°C 1分間の伸長反応を行い、反応液を室温に戻した。

【0042】

断片試料に相補的な一本鎖DNA試料：(下線部は変異対応部位)
3'-CTGACTTATATTTGAACACCATCAACCTCGACCACCGCATCCGTTCTCACGGAAGTCTATGTCGATTAAGTCTTAGTAAACACCTGCTTATACTAGGTTGTTATC-5' (配列番号6)

【0043】

伸長反応液にルシフェリン・ルシフェラーゼ発光試薬(Zhou G. et al., Nucleic Acids Res. 29, e93, (2001))を3 μ L添加し、発光検出を行った。即ち、標的配列中に遺伝子変異が存在する場合は、生じた断片によって伸長反応が進み、ピロリン酸が産出されるために発光が認められるが、標的配列中に遺伝子変異が存在しない場合は伸長反応が進まずピロリン酸が産出されないため、一連の反応による発光反応は認められない。

【0044】

〔実施例2〕

常法に従い、検体からゲノムDNAを抽出した(Molecular Cloning Third Edition (2001) PP6.8-6.11 (Cold Spring Harbor Laboratory Press))。20 ng/ μ Lの被検体由来ゲノムDNA 50 μ Lに2 MのNaOHを5.5 μ L加えて37°C、30分間インキュベートし、10 mMのヒドロキノン30 μ L及び3 MのBisulfiteを520 μ L加えて50~55°Cで一晩(16~20時間)遮光してインキュベートした。Wizard DNA Purification kit (Promega)を用いてBisulfite処理を施したDNAを精製した。本化学処理により、抽出したゲノムDNAの非メチル化シトシンはウラシルへ変換される(図1)。

【0045】

hMLH1遺伝子のプロモーター領域において、Bisulfite処理前のDNA配列、またメチル化シトシン及び非メチル化シトシン含むDNAを用いてBisulfite処理を施した後のDNA配列を下表2に示す。表2で灰色に囲まれた箇所は、CpGジヌクレオチドのシトシン塩基の存在箇所を示している。

【0046】

【表 2】

【表 2】

(A) hMLH1 遺伝子プロモーター領域のゲノム DNA 配列 (配列番号 7)

10	20	30	40	50	60
5' CAAGCGCATA	TCCTTCTAGG	TAGCGGGCAG	TAGCCGCTTC	AGGGAGGGAC	GAAGAGACCC 3'
3' GTTCGCGTAT	AGGAAGATCC	ATCGCCCGTC	ATCGGCGAAG	TCCCTCCCTG	CTTCTCTGGG 5'
70	80	90	100	110	118
5' AGCAACCCAC	AGAGTTGAGA	AATTTGACTG	GCATTCAAGC	TGTCCAATCA	ATAGCTGC 3'
3' TCGTTGGGTG	TCTCAACTCT	TTAAACTGAC	CGTAAGTTCG	ACAGGTTAGT	TATCGACG 5'

10

(B) メチル化シトシンを含む DNA の Bisulfite 処理後 DNA 配列 (配列番号 8)

10	20	30	40	50	60
5' TAAGCGTATA	TTTTTTTAGG	TAGCGGGTAG	TAGTCGTTTT	AGGGAGGGAC	GAAGAGATTT 3'
3' GTTTGCGTAT	AGGAAGATTT	ATTGCTTGTT	ATTGGCGAAG	TTTTTTTTTG	CTTTTTTGGG 5'
70	80	90	100	110	118
5' AGTAATTTAT	AGAGTTGAGA	AATTTGATTG	GTATTTAAGT	TGTTTAATTA	ATAGTTGT 3'
3' TTGTTGGGTG	TTTAAATTTT	TTAAATTGAT	TGTAAGTTTG	ATAGGTTAGT	TATTGATG 5'

(C : メチル化シトシン)

20

(C) メチル化シトシンを含まない DNA の Bisulfite 処理後 DNA 配列 (配列番号 9)

10	20	30	40	50	60
5' TAAGTGTATA	TTTTTTTAGG	TAGTGGGTAG	TAGTTGTTTT	AGGGAGGGAT	GAAGAGATTT 3'
3' GTTTGTGTAT	AGGAAGATTT	ATTGTTTGTT	ATTGGTGAAG	TTTTTTTTTG	TTTTTTTGGG 5'
70	80	90	100	110	118
5' AGTAATTTAT	AGAGTTGAGA	AATTTGATTG	GTATTTAAGT	TGTTTAATTA	ATAGTTGT 3'
3' TTGTTGGGTG	TTTAAATTTT	TTAAATTGAT	TGTAAGTTTG	ATAGGTTAGT	TATTGATG 5'

(T : 非メチル化シトシン)

30

【0047】

精製したDNAを用いて、hMLH1遺伝子のプロモーター領域のPCR増幅を行った。Bisulfite 処理を施したDNA、10 μMの各プライマー（Forward方向、Reverse方向）、2.5 mMのdNTP、10xPCR緩衝液（QIAGEN社）を各2 μLずつ、さらに5U / μLのTaq DNA Polymerase（QIAGEN社）を0.5 μL混和して滅菌水で20 μLに調製した。PCR増幅は94℃ 1.5分間の熱変性の後、94℃ 30秒間、55℃ 30秒間、72℃ 1分間を35回行った後、72℃ 2分間の温度サイクルで行った。非メチル化シトシンはBisulfite処理によってウラシルへ置換されるため、Bisulfite処理後のDNAを鋳型にしたPCR産物は、さらにウラシルからチミンへ置き換わった配列となる（図2(B)）。一方、メチル化シトシンではBisulfite処理を施しても塩基の置換が起きないために、Bisulfite処理後のDNAを鋳型にしてPCR増幅を行っても、シトシンの状態が維持される（図2(A)）。PCRプライマーの配列を表3(A)に示す。片方のPCRプライマー（hMLH1F）は5' 末端ビオチン標識を施してあるものを用いた。またメチル化シトシン及び非メチル化シトシンを含むDNAをそれぞれ鋳型にして増幅させた場合の、PCR産物の配列を、表3(B)及び(C)に示す。

40

【0048】

【表 3】

【表 3】

(A) hMLH1 PCR プライマー

プライマー	配列 (5' → 3')	長さ (bp)	T _m (°C)	PCR 産物 (bp)	配列番号
hMLH1F	CAAACGCATATCCTTCTAAATAA	23	62.2	118	配列番号 10
hMLH1R	GTAGTTATTGATTGGATAGTTTGAAT	26	61.6		配列番号 11

10

(B) メチル化シトシンを含む DNA を鋳型にした PCR 産物 (配列番号 12)

10	20	30	40	50	60	
5' CAAACGCATA	TCCTTCTAAA	TAACGAACAA	TAACCGCTTC	AAAAAAAAC	AAAAAAACCC	3'
3' GTTTGCGTAT	AGGAAGATTT	ATTGCTTGT	ATTGCGAAG	TTTTTTTTG	CTTTTTGGG	5'
70	80	90	100	110	118	
5' AACAAACCCAC	AAAATTAATA	AATTAACTA	ACATTCAAAC	TATCCAATCA	ATAACTAC	3'
3' TTGTTGGGTG	TTTAATTTT	TTAAATTGAT	TGTAAGTTTG	ATAGGTTAGT	TATTGATG	5'

(C : メチル化シトシン)

(C) メチル化シトシンを含まない DNA を鋳型にした PCR 産物 (配列番号 13)

10	20	30	40	50	60	
5' CAAACGCATA	TCCTTCTAAA	TAACAAACAA	TAACCACTTC	AAAAAAAAC	AAAAAAACCC	3'
3' GTTTGCGTAT	AGGAAGATTT	ATTGTTTGT	ATTGTTGAAG	TTTTTTTTG	TTTTTTGGG	5'
70	80	90	100	110	118	
5' AACAAACCCAC	AAAATTAATA	AATTAACTA	ACATTCAAAC	TATCCAATCA	ATAACTAC	3'
3' TTGTTGGGTG	TTTAATTTT	TTAAATTGAT	TGTAAGTTTG	ATAGGTTAGT	TATTGATG	5'

(T : 非メチル化シトシン)

20

30

【0049】

後のハイブリダイゼーションの効率を上げるため、PCR産物に残存するプライマー及びdNTPを除去した (QIAquick PCR purificationキット: QIAGEN社)。このPCR産物10 μLにStreptavidin Sepharose (Amersham Biosciences社) 8 μL、及びBinding Buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.01 % Tween20(w/v)) 42 μLを添加し、5分間よく混和させてビオチン標識されたPCR産物をStreptavidinに捕捉させた。この混和物を60 μL/wellずつMulti Screen-96 wellプレート (Millipore社) に分注して遠心 (2450 rpm, 3分間, 室温) した。さらに0.2 MのNaOHを50 μL/well分注した後、遠心 (2450 rpm, 3分間, 室温) して一本鎖PCR産物 (ビオチン非標識) を含む濾液を回収し、エタノール沈殿精製した。

40

【0050】

標的配列である一本鎖PCR産物 (核酸50 ng) と、参照配列 (核酸50 ng) として標的配列内の全てのシトシンがチミンへ変換された配列に相補的であり、かつ5'末端にビオチン標識されているものを各々混和し、ハイブリダイゼーションバッファを1 μL (100 mM Tris-HCl, 1M NaCl, 0.5mM EDTA) 加えて8 μLに調製した。

【0051】

標的配列: (下線部はメチル化シトシン対応部位)

3' - GTTTGCGTATAGGAAGATTTATTGCTTGTATTATGGCGAAGTTTTTTTTTCTTTTTTGGGTTGTTGGGTGTTTTAATTTTTAAATTGATTGTAAGTTTGATAGGTTAGTTATTGATG-5' (配列番号14)

【0052】

50

参照配列：（下線部は非メチル化シトシン対応部位）

5'-CAAACGCATATCCTTCTAAATAACAAACAATAACCACTTCAAAAAAAAAACAAAAAACCAACAACCCACAAAATTA
AAAAATTTAACTAACATTCAAACCTATCCAATCAATAACTAC-3'（配列番号15）

【0053】

この混和試料を95℃ 10分間で熱変性させ、非特異的なハイブリダイゼーションを回避するために0.1℃/秒間ずつゆっくりと温度を25℃まで低下させる工程でハイブリダイゼーションを行った。ここで被検体由来のDNA試料にメチル化シトシンが存在する場合は、図3のように相補鎖結合できずに非相補鎖部位が生じた。

【0054】

上記工程でハイブリダイゼーションを施した試料8 μL（核酸 100 ng）に、10×緩衝液（100mM KCl, 100mM MgSO₄, 100mM HEPES, 0.02% TritonX100, 0.002mg/mL BSA）を1 μL、エンハンサー及び一本鎖特異的ヌクレアーゼCELI（TRANSGENOMIC社）を各0.5 μLずつ混和して計10 μLの反応溶液に調製した。これを45℃ 15分間インキュベートし、上記非相補鎖部位を消化し（図4）、500mM EDTAを1 μL添加して一本鎖特異的ヌクレアーゼ反応を停止させた。さらに、断片末端の平滑処理を行った。

【0055】

消化反応により参照配列から生じたビオチン標識断片10 μLに、Streptavidin Sepharose 8 μL、及びBinding Buffer（10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.01 % Tween20(w/v)）42 μLを添加し、5分間よく混和してビオチン標識された断片をStreptavidinに捕捉させる。この混和物60 μLをMulti Screen-96 wellプレート（Millipore社）に分注し、遠心（2450 rpm, 3分間, 室温）した。Multi Screen-96 wellプレートのメンブレン上に存在している一本鎖断片（5'末端ビオチン標識）が補足されたStreptavidin Sepharoseを、滅菌水10 μLで混濁させ、回収した（図5）。

【0056】

参照配列に相補的な塩基配列（配列番号16）である1 μMの一本鎖DNAを1 μL, 10×Taq Buffer（Amersham Bioscience社）を0.3 μL、さらに1 mMのdNTP（pyrophosphatase処理済）を0.15 μL, 5 U/μLのTaq polymerase（Amersham Bioscience社）を0.03 μL加えて混和し、滅菌水で3 μLに調製した。これを95℃で2分間熱変性させた後、図6のように55℃ 1分間の伸長反応を行い、反応液を室温に戻した。

【0057】

参照配列に相補的な塩基配列：

3'-GTTTGCGTATAGGAAGATTTATTGTTTGTATTGGTGAAGTTTTTTTTTGTGTTTTTGGGTTGTTGGGTGTTTTAAT
TTTTTAAATTGATTGTAAGTTTGATAGGTTAGTTATTGATG-5'（配列番号16）

【0058】

ルシフェリン・ルシフェラーゼ発光試薬を3 μL添加して、伸長反応で生じたピロリン酸を利用した発光検出を行った。標的配列中にメチル化シトシンが存在する場合は、生じた断片によって伸長反応が進み、ピロリン酸が産出されるために発光が認められたが、標的配列中にメチル化シトシンが存在しない場合伸長反応が進まず、ピロリン酸が産出されないため、一連の反応による発光反応は認められなかった（図7）。

【0059】

〔実施例3〕

実施例2において、標的配列である一本鎖PCR産物（核酸50 ng）にハイブリダイゼーションさせる参照配列を、標的配列のCpGジヌクレオチド以外の全てのシトシンがチミンへ変換されたものに相補的な配列（配列番号17）に変えると、CpGジヌクレオチドのシトシンがメチル化されていない検体のみ消化反応で断片が生じるため、その後の伸長反応及び発光反応が認められた。すなわち、CpGジヌクレオチドのシトシンが非メチル化である場合は発光が検出され、逆にメチル化されている場合は、発光反応が認められないことが確認された。

【0060】

変換された参照配列：（下線部はメチル化シトシン対応部位）

10

20

30

40

50

5'-CAAACGCATATCCTTCTAAATAACGAACAATAACCGCTTCAAAAAAAAAACGAAAAAACCCAACAACCCACAAAATTA
AAAAATTTAACTAACATTCAAACCTATCCAATCAATACTAC-3' (配列番号17)

【0061】

〔実施例4〕

常法に従い、検体及び正常細胞からゲノムDNAを抽出した (Molecular Cloning Third Edition (2001) PP6.8-6.11 (Cold Spring Harbor Laboratory Press))。20 ng/μLのゲノムDNA 50 μLに2 MのNaOHを5.5 μL加えて37°C、30分間インキュベートし、10 mMのヒドロキノン30 μL及び3 MのBisulfiteを520 μL加えて50~55°Cで一晩 (16~20時間) 遮光してインキュベートした。Wizard DNA Purification kit (Promega社)を用いてBisulfite処理を施したDNAを精製した。本化学処理により、抽出したゲノムDNAの非メチル化シトシンはウラシルへ変換される。 10

【0062】

検体及び正常細胞由来のBisulfite処理したDNAを用いて、hMLH1遺伝子のプロモーター領域のPCR増幅を行う。使用するPCRプライマー (配列番号10及び11) は、両方とも5'ビオチン修飾を施していないプライマーを用いた。Bisulfite処理を施したDNA、10 μMの各プライマー (Forward方向、Reverse方向)、2.5 mMのdNTP、10xPCR緩衝液 (QIAGEN社) を各2 μLずつ、さらに5U/μLのTaq DNA Polymerase (QIAGEN社)を0.5 μL混和して滅菌水で20 μLに調製した。PCR増幅は94°C 1.5分間の熱変性の後、94°C 30秒間、55°C 30秒間、72°C 1分間を35回行った後、72°C 2分間の温度サイクルで行った。続いてQIAquick PCR purificationキット (QIAGEN社) を使用して、PCR産物に含まれる残存プライマー及び残存dNTPを除去した。 20

【0063】

上記工程で得られた検体由来のPCR産物 (核酸50 ng) と、正常細胞由来のPCR産物 (核酸50 ng) を混和し、10 μLとし、ハイブリダイゼーションバッファを1 μL (100 mM Tris-HCl, 1M NaCl, 0.5mM EDTA) 加えて滅菌水で8 μLに調製する。2次構造を崩すために混和試料を95°C 10分間で熱変性させ、非特異的なハイブリダイゼーションを回避するために0.1°C/秒間ずつゆっくりと温度を25°Cまで低下させる条件でハイブリダイゼーションを行った。検体にメチル化シトシンが存在すれば、ハイブリダイゼーションさせた試料の一部に、非相補鎖部位を有するものが生じる (図8)。

【0064】

上記工程でハイブリダイゼーションを施した試料8 μL (核酸 100 ng) に、10×緩衝液 (100mM KCl, 100mM MgSO₄, 100mM HEPES, 0.02% TritonX100, 0.002mg/mL BSA) を1 μL、エンハンサー及び一本鎖特異的ヌクレアーゼCELI (TRANSGENOMIC社)をそれぞれ0.5 μL混和して滅菌水で10 μLに調製した。これを45°C 15分間インキュベートして、上記非相補鎖部位を消化した (図9)。ただちに500mM EDTAを1 μL添加して一本鎖特異的ヌクレアーゼ反応を停止させた。さらに、断片末端の平滑処理を行った。 30

【0065】

上記工程で非相補鎖部位を酵素消化した試料を1.5 μLと被検体を用いて増幅させたPCR産物 1μMを1 μL混和し、10×Taq Buffer (Amersham Bioscience社)を0.3 μL、1 mMのdNTPを0.15 μL、5 U/μLのTaq polymerase (Amersham Bioscience社)を0.03 μL添加して、滅菌水で3 μLに調製した。これを95°C 2分間の熱変性させた後、図10のように55°C 1分間の伸長反応を行い、反応液を室温に戻した。この際、生じた断片は精製しないために複数の断片との間でハイブリダイゼーションを生じるが、伸長反応が進む組み合わせは一部である。 40

【0066】

ルシフェリン・ルシフェラーゼ発光試薬を3 μL添加して、伸長反応で生じたピロリン酸を利用した発光検出を行った。検体にメチル化シトシンが存在する場合は、生じた断片によって伸長反応が進み、ピロリン酸が産出されるために発光が認められるが、メチル化シトシンが存在しない場合伸長反応が進まず、ピロリン酸が産出されないため、一連の反応による発光反応は認められない。 50

【0067】

〔実施例5〕

実施例2と同様の工程で被検体より抽出したゲノムをBisulfite処理し、hMLH1遺伝子のプロモーター領域をPCR増幅後、一本鎖精製及びエタノール沈殿精製を施した。PCRプライマーの配列を表3(A)に示す。片方のPCRプライマー(hMLH1F)は5'末端ビオチン標識を施してあるものを用いた。

【0068】

得られた一本鎖PCR産物を標的配列としてPerfectHyb[®] Hybridization Solution (TOYOBO社)で3 µLに調製後、95℃3分間加熱して2次構造を崩した。室温に戻した後、試料 3 µLを基板上にアプライして、あらかじめ基板に固定化されたプローブと42℃、湿度100%の条件下で1時間ハイブリダイゼーションさせた(図11)。この時のプローブは、標的配列内の全てのシトシンがチミンへ変換された配列に相補的な塩基配列である。その後、ハイブリダイゼーションしなかった残物を除去するため、基板を滅菌水で2回洗浄した。

【0069】

10×緩衝液(100mM KCl, 100mM MgSO₄, 100mM HEPES, 0.02% TritonX100, 0.002mg/mL BSA)を0.6 µL、エンハンサー及び一本鎖特異的ヌクレアーゼCELI (TRANSGENOMIC社)をそれぞれ0.05 µL混和して滅菌水で6 µLに調製した。これを上記工程でハイブリダイゼーションさせた基板上にアプライした。45℃ 15分間インキュベーションを行い、非相補鎖部位を図12のように消化させた。その後ただちに500mM EDTAを1 µL添加して一本鎖特異的ヌクレアーゼ反応を停止させた。さらに、断片末端の平滑処理を行った。

【0070】

Denature solution (0.2M NaOH)を基板に添加して、図13のように基板上に固定化されたオリゴヌクレオチドに標的配列をデハイブリダイゼーションさせ、基板を滅菌水で2回洗浄した。

【0071】

プローブに相補的な塩基配列(配列番号16)のオリゴ 5 pmolをPerfectHyb[®] Hybridization Solution (TOYOBO社) 3 µLに溶解し、95℃で3分間加熱して2次構造を完全に崩した。室温に戻した後、この3 µLを基板上にアプライして、42℃、湿度100%の条件下で基板固定化プローブと1時間ハイブリダイゼーションした。その後、ハイブリダイゼーションに寄与しなかった残存物を除去するため、基板を滅菌水で2回洗浄した。

【0072】

10×Taq Buffer (Amersham Bioscience社)を0.3 µL、1 mMのdNTPを0.15 µL、5 U/µLのTaq polymerase(Amersham Bioscience社)を0.03 µL混和して、滅菌水で3 µLに調製する。この伸長反応溶液を基板上にアプライし、55℃ 10分間の伸長反応を行った(図14)。

【0073】

この時、標的配列にメチル化シトシンがない場合は、基板固定化プローブは添加したオリゴと完全長ハイブリダイゼーションしているため伸長反応は進まない。一方、標的配列にメチル化シトシンがある場合は、非相補鎖部位で消化されて基板固定化プローブは短くなっている。そのため、基板固定化プローブとハイブリダイゼーションしなかった添加したオリゴ領域は一本鎖状態であるため、伸長反応が進む。

【0074】

伸長反応終了後、速やかに基板をマイクロアレイ検出装置にセットしてルシフェリン・ルシフェラーゼ発光試薬を3 µL加え、伸長反応で生じたピロリン酸を利用した発光検出を行った。標的配列中にメチル化シトシンが存在しない場合は伸長反応が進まず、ピロリン酸が産出されないため、一連の反応による発光反応は認められなかった。一方、標的配列中にメチル化シトシンが存在する場合は、生じた断片によって伸長反応が進み、ピロリン酸が産出されたため、発光が認められた。

【産業上の利用可能性】

【0075】

本発明は、遺伝子上に複数存在する変異、特にメチル化シトシンを、簡便かつ広範囲に検出することができる。したがって、遺伝子異常を伴う疾患等の診断に利用できる。

【図面の簡単な説明】

【0076】

【図1】図1は、ゲノムDNAのBisulfite処理工程を示す。(A) *Cで示されるメチル化シトシンは、この化学処理により塩基の変化は生じないが、他方で(B) 非メチル化シトシンはウラシルへ変換される。

【図2】図2は、メチル化DNAあるいは非メチル化DNAによるPCR増幅工程を示す。(A)：メチル化DNAを用いたPCR増幅では通常のシトシンのまま増幅される。(B)：Bisulfite処理済みの非メチル化DNAを用いたPCR増幅では、非メチル化シトシンがチミンに変換されたPCR増幅産物が生じる。 10

【図3】図3は、5'末端をビオチン標識したメチル化シトシン以外は標的配列と相補的な配列である参照配列のオリゴヌクレオチドヌクレオチド又はPCR産物とのハイブリダイゼーション工程を示す。この時、非メチル化DNAの場合は非メチル化シトシンの塩基で非相補鎖部位が生じる。

【図4】図4は、一本鎖特異的ヌクレアーゼによる、非相補鎖部位の切断工程を示す。

【図5】図5は、アビジン標識担体による、ビオチン標識された断片鎖の捕捉工程を示す。

【図6】図6は、精製された断片と、標的配列に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド又はPCR産物とのハイブリダイゼーションと、これに続く伸長反応工程を示す。 20

【図7】図7は、伸長反応溶液に発光試薬を添加し、生じる発光を検出した結果を示す。

【図8】図8は、未標識のメチル化シトシン以外は標的配列と相補的な配列である参照配列のオリゴヌクレオチド又はPCR産物とのハイブリダイゼーション工程を示す。この時、非メチル化DNAの場合は、非メチル化シトシンの塩基で非相補鎖部位が生じる。

【図9】図9は、一本鎖特異的ヌクレアーゼによる非相補鎖部位の切断工程を示す。

【図10】図10は、切断断片と標的配列に相補的なオリゴヌクレオチド又はPCR産物とのハイブリダイゼーションと、これに続く伸長反応工程を示す。ここでは、生じた断片を精製しないために複数の断片との間でハイブリダイゼーションされるが、伸長反応が進む組み合わせは一部である。

【図11】図11は、基板上に固定化された正常塩基配列のオリゴヌクレオチドヌクレオチドと一本鎖精製したPCR産物とのハイブリダイゼーション工程を示す。 30

【図12】図12は、基板上での、一本鎖特異的ヌクレアーゼによる非相補鎖部位の切断工程を示す。

【図13】図13は、デハイブリダイゼーション工程を示す。

【図14】図14は、参照配列であるオリゴヌクレオチドヌクレオチド又はPCR産物のハイブリダイゼーションと、これに続く基板上での伸長反応工程を示す。

【図15】図15は、複数の変異部位を分析する場合における、電気泳動法と本発明の方法を比較した概念図である。

【符号の説明】

【0077】

1：ゲノムDNAにおけるメチル化シトシン (*C)

2：ビオチン

3：メチル化シトシン塩基以外は標的配列と相補的な配列である参照配列

4：被検体をPCR増幅し、一本鎖精製を施した標的配列

5：非相補塩基対

6：一本鎖特異的ヌクレアーゼによる切断

7：アビジン

8：担体

9：伸長反応

10：基板上に固定化されたプローブ(5'末端側は一本鎖特異的ヌクレアーゼの作用を受 50

けないCn(カーボン)スペーサーもしくはホスホロチオエート結合オリゴヌクレオチドから成る)。

11 : 一本鎖特異的ヌクレアーゼによって切断された固定化プローブ

12 : 基板固定化プローブに相補的な配列

13 : 100 bp DNA断片

14 : 200 bp DNA断片

15 : 300 bp DNA

16 : 70 bp DNA断片

17 : 130 bp DNA断片

18 : 50 bp DNA断片

19 : 80 bp DNA断片

20 : 生物発光強度

21 : 100 bp DNA断片 (13) のForward鎖

22 : 参照配列 (300塩基:15) のReverse鎖

10

【配列表フリーテキスト】

【0078】

配列番号1－人工配列の説明：プライマー(K-RasF)

配列番号2－人工配列の説明：プライマー(K-RasR)

配列番号3－kRAS gene (断片)

配列番号4－人工配列の説明：標的配列

配列番号5－人工配列の説明：参照配列

配列番号6－人工配列の説明：断片試料に相補的な一本鎖DNA試料

配列番号7－hMLH1 gene遺伝子プロモーター領域

配列番号8－人工配列の説明：メチル化シトシンを含むhMLH1 gene遺伝子プロモーター領域のBisulfite処理で得られたDNA配列

配列番号9－人工配列の説明：メチル化シトシンを含まないhMLH1 gene遺伝子プロモーター領域のBisulfite処理で得られたDNA配列

配列番号10－人工配列の説明：プライマー(hMLH1F)

配列番号11－人工配列の説明：プライマー(hMLH1R)

配列番号12－人工配列の説明：メチル化シトシンを含む鋳型配列から得られたPCR産物
配列番号13－人工配列の説明：メチル化シトシンを含まない鋳型配列から得られたPCR産物

20

30

配列番号14－人工配列の説明：標的配列

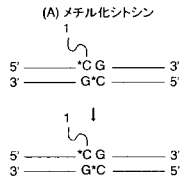
配列番号15－人工配列の説明：参照配列

配列番号16－人工配列の説明：参照配列に相補的な配列

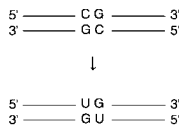
配列番号17－人工配列の説明：変換された参照配列

【図 1】

【図1】

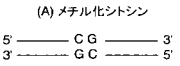


(B) 非メチル化シトシン

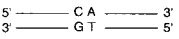


【図 2】

【図2】

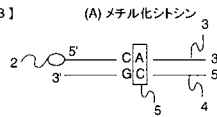


(B) 非メチル化シトシン

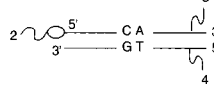


【図 3】

【図3】

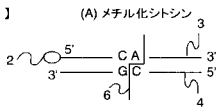


(B) 非メチル化シトシン

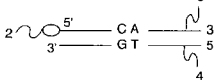


【図 4】

【図4】

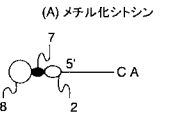


(B) 非メチル化シトシン

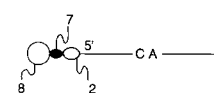


【図 5】

【図5】

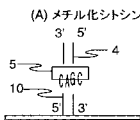


(B) 非メチル化シトシン

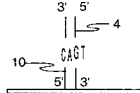


【図 11】

【図11】

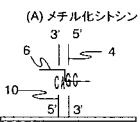


(B) 非メチル化シトシン

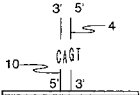


【図 12】

【図12】

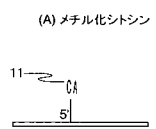


(B) 非メチル化シトシン

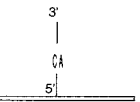


【図 13】

【図13】

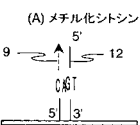


(B) 非メチル化シトシン

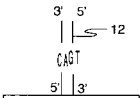


【図 14】

【図14】

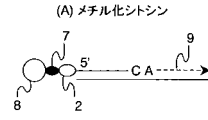


(B) 非メチル化シトシン

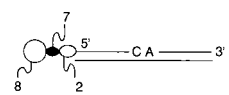


【図 6】

【図6】

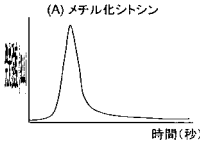


(B) 非メチル化シトシン

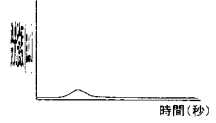


【図 7】

【図7】

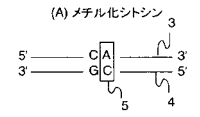


(B) 非メチル化シトシン

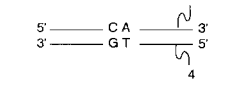


【図 8】

【図8】

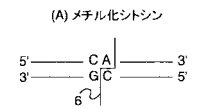


(B) 非メチル化シトシン

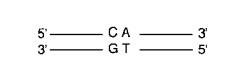


【図 9】

【図9】

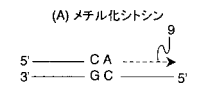


(B) 非メチル化シトシン

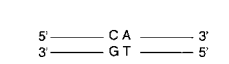


【図 10】

【図10】

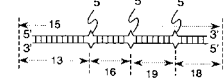
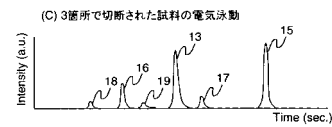
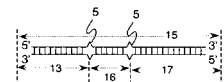
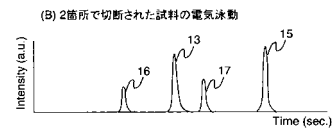
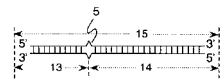
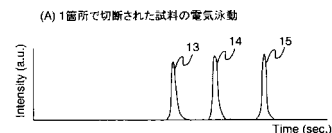


(B) 非メチル化シトシン

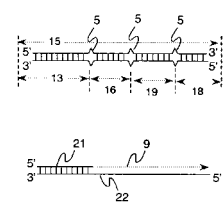
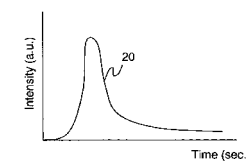


【図 15】

【図15】



(D) 本法による発光測定結果は上記(A)(B)(C)のいずれにおいても同じ結果が得られる



【配列表】

2006271311000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成18年2月2日(2006.2.2)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0007

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0007】

CpGジヌクレオチドのメチル化シトシンを検出する方法として、基板上に固定化された複数のキャプチャーオリゴヌクレオチドと、Bisulfiteで処理した被検体由来のDNA試料との間でハイブリダイゼーションを行い、その結果によってDNA試料中のCpGジヌクレオチドのCのメチル化の有無を判定する方法も報告されている（特許文献1参照）。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0010

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0010】

【特許文献1】特開2001-17199号

【特許文献2】特表2000-511774号

【非特許文献1】Chen RZ. et al., Nature. 395, p89-93, (1998)

【非特許文献2】Jones PA. et al., Nat. Rev. Genet. 3, p415-428, (2002)

【非特許文献3】Esteller M. et al., Cancer Res. 61, p3225-3229, (2001)

【非特許文献4】Belinsky SA. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95, p11891-11896 (1998)

【非特許文献5】Shapiro R. et al., J. Am. Chem. Soc. 96, p906-912, (1974)

【非特許文献6】Chan EC. et al., Clin. Cancer Res. 8, p3741-3746, (2002)

【非特許文献7】Xiong Z. et al., Nucleic Acids Res. 25, p2532-2534, (1997)

【非特許文献8】Ahmadian A. et al., Anal. Biochem. 280, p103-110, (2000)

【非特許文献9】Zhou G. et al., Nucleic Acids Res. 29, e93, (2001)

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0036

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0036】

標的配列：（下線部は変異塩基部位）

3' -CTGACTTATATTTGAACACCATCAACCTCGAACACCGCATCCGTTCTCACGGAAGTCTATGTCGATTAAGTCTTAGTAAACACCTGCTTATACTAGGTTGTTATC- 5'（配列番号4）

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0037

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0037】

参照配列：（下線部は変異塩基部位）

5' -GACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTGGACGAATATGATCCAACAATAG- 3'（配列番号5）

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0042

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0042】

断片試料に相補的な一本鎖DNA試料：（下線部は変異対応部位）

3' -CTGACTTATATTTGAACACCATCAACCTCGACACCGCATCCGTTCTCACGGAAGTCTATGTCGATTAAGTCTTA
 GTAAAACACCTGCTTATACTAGGTTGTTATC-5'（配列番号6）

【手続補正 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0046

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0046】

【表 2】

【表 2】

(A) hMLH1 遺伝子プロモーター領域のゲノム DNA 配列（配列番号 7）

	10	20	30	40	50	60
5'	CAAGCGCATA	TCCTTCTAGG	TAGCGGGCAG	TAGCCGCTTC	AGGGAGGGAC	GAAGAGACCC 3'
3'	GTTCGCGTAT	AGGAAGATCC	ATCGCCCGTC	ATCGGCGAAG	TCCCTCCCTG	<u>C</u> TTCTCTGGG 5'
	70	80	90	100	110	118
5'	AGCAACCCAC	AGAGTTGAGA	AATTTGACTG	GCATTCAAGC	TGTCCAATCA	ATAGCTGC 3'
3'	TCGTTGGGTG	TCTCAACTCT	TTAAACTGAC	CGTAAGTTCG	ACAGGTTAGT	TATCGACG 5'

(B) メチル化シトシンを含む DNA の Bisulfite 処理後 DNA 配列（配列番号 8）

	10	20	30	40	50	60
5'	UAAG <u>C</u> GUATA	TUUTTUTAGG	TAGCGGGUAG	TAGU <u>C</u> GUTTU	AGGGAGGGAC	GAAGAGAUUU 3'
3'	GTTUG <u>C</u> GTAT	AGGAAGATUU	ATUG <u>C</u> UUGTU	ATUGG <u>C</u> GAAG	TUUUTUUUTG	<u>C</u> TTUTUTGGG 5'
	70	80	90	100	110	118
5'	AGUAAUUUUAU	AGAGTTGAGA	AATTTGAUTG	GUATTUAAGU	TGTUUAATUA	ATAGUTGU 3'
3'	TUGTTGGGTG	TUTUAAUTUT	TTAAAUTGAU	UGTAAGTTUG	AUAGGTTAGT	TATUGAUG 5'

(C: メチル化シトシン)

(C) メチル化シトシンを含まない DNA の Bisulfite 処理後 DNA 配列（配列番号 9）

	10	20	30	40	50	60
5'	UAAGU <u>G</u> UATA	TUUTTUTAGG	TAGU <u>G</u> GGUAG	TAGUU <u>G</u> UTTU	AGGGAGGGAU	GAAGAGAUUU 3'
3'	GTTUG <u>G</u> GTAT	AGGAAGATUU	ATUGU <u>G</u> UUGTU	ATUGG <u>G</u> GAAG	TUUUTUUUTG	<u>G</u> TTUTUTGGG 5'
	70	80	90	100	110	118
5'	AGUAAUUUUAU	AGAGTTGAGA	AATTTGAUTG	GUATTUAAGU	TGTUUAATUA	ATAGUTGU 3'
3'	TUGTTGGGTG	TUTUAAUTUT	TTAAAUTGAU	UGTAAGTTUG	AUAGGTTAGT	TATUGAUG 5'

(U: 非メチル化シトシン)

【手続補正 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0048

【補正方法】変更

【補正の内容】

【 0 0 4 8 】

【 表 3 】

【表 3】

(A) hMLH1 PCR プライマー

プライマー	配列 (5' → 3')	長さ (bp)	T _m (°C)	PCR 産物 (bp)	配列番号
hMLH1F	CAAACGCATATCCTTCTAAATAA	23	62.2	118	配列番号 10
hMLH1R	GTAGTTATTGATTGGATAGTTTGAAT	26	61.6		配列番号 11

(B) メチル化シトシンを含む DNA を鋳型にした PCR 産物 (配列番号 12)

	10	20	30	40	50	60	
5'	CAAACGCATA	TCCTTCTAAA	TAACGAACAA	TAACCGCTTC	AAAAAAAAC	GAAAAAAGCC	3'
3'	GTTTGCGTAT	AGGAAGATTT	ATTG <u>C</u> TTGTT	ATTGG <u>C</u> GAAG	TTTTTTTTTG	<u>C</u> TTTTTTGGG	5'
	70	80	90	100	110	118	
5'	AACAACCCAC	AAAATTAATA	AATTTAACTA	ACATTCAAAC	TATCCAATCA	ATAACTAC	3'
3'	TTGTTGGGTG	TTTAAATTTT	TTAAATTGAT	TGTAAGTTTG	ATAGGTTAGT	TATTGATG	5'

(C : メチル化シトシン)

(C) メチル化シトシンを含まない DNA を鋳型にした PCR 産物 (配列番号 13)

	10	20	30	40	50	60	
5'	CAAACGCATA	TCCTTCTAAA	TAACAAACAA	TAACCACTTC	AAAAAAAAC	AAAAAAAGCC	3'
3'	GTTTGCGTAT	AGGAAGATTT	ATTG <u>I</u> TTGTT	ATTGG <u>I</u> GAAG	TTTTTTTTTG	<u>I</u> TTTTTTGGG	5'
	70	80	90	100	110	118	
5'	AACAACCCAC	AAAATTAATA	AATTTAACTA	ACATTCAAAC	TATCCAATCA	ATAACTAC	3'
3'	TTGTTGGGTG	TTTAAATTTT	TTAAATTGAT	TGTAAGTTTG	ATAGGTTAGT	TATTGATG	5'

(I : 非メチル化シトシン)

【 手続補正 8 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 0 5 1

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0 0 5 1 】

標的配列 : (下線部はメチル化シトシン対応部位)

3' -GTTTGCGTATAGGAAGATTTATTGCTTGTTATTGGCGAAGTTTTTTTTTGCTTTTTTTGGGTTGTTGGGTGTTTTAAT
 TTTTAAATTGATTGTAAGTTTGATAGGTTAGTTATTGATG-5' (配列番号 14)

【 手続補正 9 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 0 5 2

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0 0 5 2 】

参照配列 : (下線部は非メチル化シトシン対応部位)

5' -CAAACGCATATCCTTCTAAATAACAAACAATAACCACTTCAAAAAAAAAACAAAAAAACCCAACAACCCACAAAATTA
 AAAAATTTAACTAACATTCAAACCTATCCAATCAATAACTAC-3' (配列番号 15)

【 手続補正 10 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【補正対象項目名】 0 0 5 7

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0 0 5 7】

参照配列に相補的な塩基配列：（下線部は参照配列中の非メチル化シトシン対応部位）

3'-GTTTGCGTATAGGAAGATTTATTGTTTGGTGAAGTTTTTTTTTTGTTTTTTGGGTTGTTGGGTGTTTTAAT
TTTTTAAATTGATTGTAAGTTTGATAGGTTAGTTATTGATG-5'（配列番号16）

【手続補正 1 1】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 0 6 0

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0 0 6 0】

変換された参照配列：（下線部はメチル化シトシン対応部位）

5'-CAAACGCATATCCTTCTAAATAACGAACAATAACCGCTTCAAAAAAAAAACGAAAAAACCCAACAACCCACAAAATTA
AAAAATTAACTAACATTCAAACCTATCCAATCAATAACTAC-3'（配列番号17）

【手続補正 1 2】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 0 6 3

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0 0 6 3】

上記工程で得られた検体由来のPCR産物（核酸50 ng）と、正常細胞由来のPCR産物（核酸50 ng）を混和し、ハイブリダイゼーションバッファを1μL（100 mM Tris-HCl, 1M NaCl, 0.5mM EDTA）加えて滅菌水で8 μLに調製する。2次構造を崩すために混和試料を95℃10分間で熱変性させ、非特異的なハイブリダイゼーションを回避するために0.1℃/秒間ずつゆっくりと温度を25℃まで低下させる条件でハイブリダイゼーションを行った。検体にメチル化シトシンが存在すれば、ハイブリダイゼーションさせた試料の一部に、非相補鎖部位を有するものが生じる（図8）。

【手続補正 1 3】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 0 7 6

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0 0 7 6】

【図1】図1は、ゲノムDNAのBisulfite処理工程を示す。（A）*Cで示されるメチル化シトシンは、この化学処理により塩基の変化は生じないが、他方で（B）非メチル化シトシンはウラシルへ変換される。

【図2】図2は、メチル化DNAあるいは非メチル化DNAによるPCR増幅工程を示す。（A）：メチル化DNAを用いたPCR増幅では通常のシトシンのまま増幅される。（B）：Bisulfite処理済みの非メチル化DNAを用いたPCR増幅では、非メチル化シトシンがチミンに変換されたPCR増幅産物が生じる。

【図3】図3は、5'末端をビオチン標識したメチル化シトシン以外は標的配列と相補的な配列である参照配列のオリゴヌクレオチド又はPCR産物とのハイブリダイゼーション工程を示す。この時、メチル化DNAの場合はメチル化シトシンの塩基で非相補鎖部位が生じる。

【図4】図4は、一本鎖特異的ヌクレアーゼによる、非相補鎖部位の切断工程を示す。

【図5】図5は、アビジン標識担体による、ビオチン標識された断片鎖の捕捉工程を示す。

【図6】図6は、精製された断片と、これに相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド又は

PCR産物とのハイブリダイゼーションと、これに続く伸長反応工程を示す。

【図 7】図 7 は、伸長反応溶液に発光試薬を添加し、生じる発光を検出した結果を示す。

【図 8】図 8 は、未標識のメチル化シトシン以外は標的配列と相補的な配列である参照配列のオリゴヌクレオチド又はPCR産物とのハイブリダイゼーション工程を示す。この時、メチル化DNAの場合は、メチル化シトシンの塩基で非相補鎖部位が生じる。

【図 9】図 9 は、一本鎖特異的ヌクレアーゼによる非相補鎖部位の切断工程を示す。

【図 10】図 10 は、切断断片と標的配列に相補的なオリゴヌクレオチド又はPCR産物とのハイブリダイゼーションと、これに続く伸長反応工程を示す。ここでは、生じた断片を精製しないために複数の断片との間でハイブリダイゼーションされるが、伸長反応が進む組み合わせは一部である。

【図 11】図 11 は、基板上に固定化された正常塩基配列のオリゴヌクレオチドと一本鎖精製したPCR産物とのハイブリダイゼーション工程を示す。

【図 12】図 12 は、基板上での、一本鎖特異的ヌクレアーゼによる非相補鎖部位の切断工程を示す。

【図 13】図 13 は、デハイブリダイゼーション工程を示す。

【図 14】図 14 は、参照配列であるオリゴヌクレオチド又はPCR産物のハイブリダイゼーションと、これに続く基板上での伸長反応工程を示す。

【図 15】図 15 は、複数の変異部位を分析する場合における、電気泳動法と本発明の方法を比較した概念図である。

【手続補正 14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

[2006271311000001.app](#)

【手続補正 15】

【補正対象書類名】図面

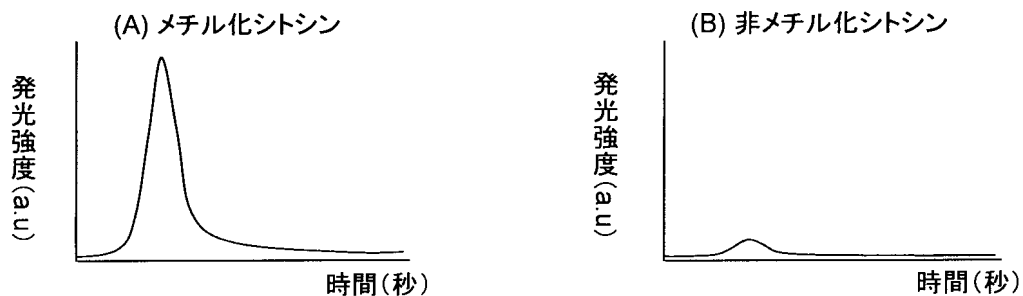
【補正対象項目名】図 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 7】

【図7】



【手続補正 16】

【補正対象書類名】図面

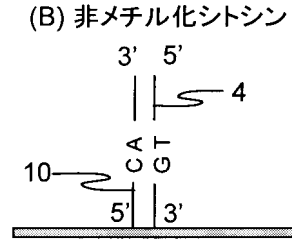
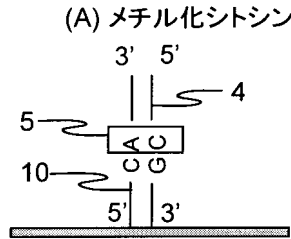
【補正対象項目名】図 11

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 1 1】

【図11】



【手続補正 1 7】

【補正対象書類名】図面

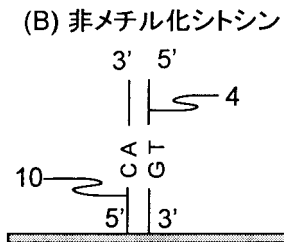
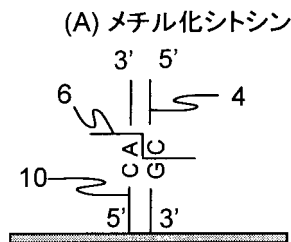
【補正対象項目名】図 1 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 1 2】

【図12】



【手続補正 1 8】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 1 3

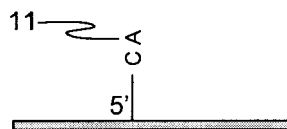
【補正方法】変更

【補正の内容】

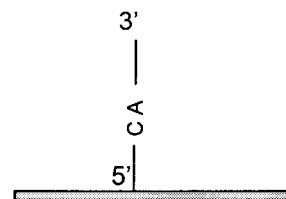
【図 1 3】

【図13】

(A) メチル化シトシン



(B) 非メチル化シトシン



【手続補正 1 9】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 1 4

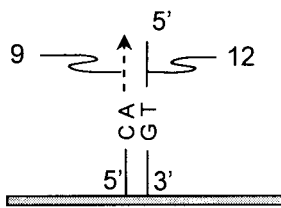
【補正方法】変更

【補正の内容】

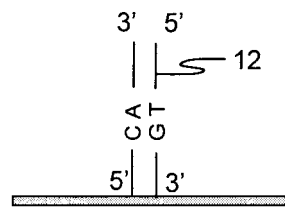
【図 14】

【図14】

(A) メチル化シトシン



(B) 非メチル化シトシン



フロントページの続き

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA19 QQ43 QR08 QR14 QR42 QR56 QS05 QS25 QS34
QX02