

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017年6月22日(22.06.2017)



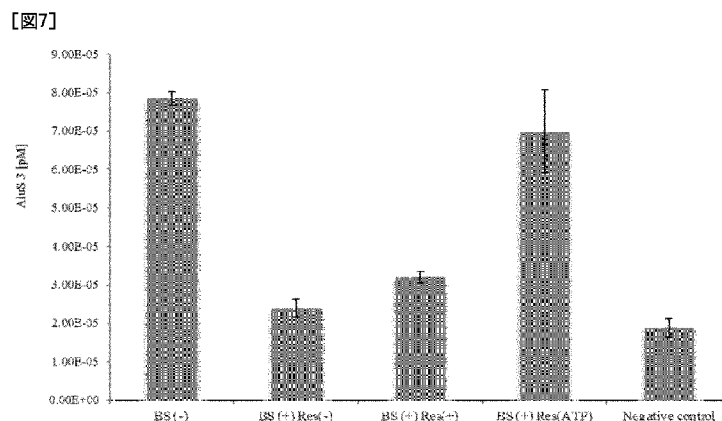
(10) 国際公開番号

WO 2017/104675 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/68 (2006.01) *C12Q 1/48* (2006.01)
C12Q 1/25 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
C12Q 1/42 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/087100
- (22) 国際出願日: 2016年12月13日(13.12.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-242932 2015年12月14日(14.12.2015) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人京都大学(KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 Kyoto (JP).
- (72) 発明者: 藤渕 航(FUJIBUCHI, Wataru); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 山根 順子(YAMANE, Junko); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 鮫島 睦, 外(SAMEJIMA, Mutsumi et al.); 〒5300017 大阪府大阪市北区角田町8番1号梅田阪急ビルオフィスタワー青山特許事務所 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: SAMPLE PREPARATION METHOD FOR DNA METHYLATION ANALYSIS

(54) 発明の名称: DNAメチル化解析のための試料調製方法



(57) Abstract: The invention provides a method for DNA methylation analysis using bisulfite treatment, wherein the method is characterized in that the yield of DNA sample that can be amplified by PCR after bisulfite treatment is increased by treating the DNA sample after bisulfite treatment with a single-stranded DNA ligase.

(57) 要約: 本発明は、バイサルファイト処理を用いるDNAメチル化解析のための方法であって、バイサルファイト処理後のDNA試料を1本鎖DNAリガーゼで処理することにより、バイサルファイト処理後のPCR増幅可能なDNA試料の収量を増加させることを特徴とする方法を提供する。

WO 2017/104675 A1

明 細 書

発明の名称：DNAメチル化解析のための試料調製方法

技術分野

[0001] 本発明は、DNAメチル化解析法の改良に関する。詳細には、本発明は、バイサルファイトを用いるDNAメチル化解析において、バイサルファイト処理後のPCR増幅可能なDNA試料の収量を増加させる方法に関する。

背景技術

[0002] DNAのメチル化は、エピジェネティック機構の1つであり、胚発生、細胞分化、表現型の差異、様々な疾病などと深く関わっている。現在、DNAのメチル化解析のための様々な方法が開発され、使用されている。最近では、目的にかなったiPS細胞の選別にもDNAのメチル化解析が利用されている。

[0003] DNAのメチル化解析方法のなかで、特定ゲノム領域のDNAのメチル化解析法としてはバイサルファイト処理を用いる方法が多用されている。バイサルファイトは、DNA中の非メチル化シトシンをウラシルに変換するが、メチル化シトシンは他の塩基に変換されない。このことを利用して、バイサルファイト処理されたDNAをPCR増幅後、シーケンス解析を行うことによって、DNAのメチル化の状態を知ることができる。

[0004] バイサルファイトを用いるDNAのメチル化解析方法の1つとして、RRBS (Reduced Representation Bisulfite Sequencing) 法がある。RRBS法は、DNAのメチル化を1塩基レベルで調べることができる方法であり、シーケンス量を減らすことができ、しかも全ゲノム解析法と同様のカバー率を得ることができる方法である。近年、RRBS法を用いてシングルセルDNAのメチル化解析を行う試みがなされている（非特許文献1、2参照）。シングルセル由来のDNAなどの微量試料のDNAメチル化解析を行う際に、バイサルファイト処理が過酷な条件で行われるためにDNA試料が断片化し、次工程であるPCR増幅のための十分な量のDNAが供給されないと

いう問題がある。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1 : H. Guo et al. Genome Research, 23, 2126–2135 (2013)

非特許文献2 : H. Guo et al. Nature Protocols, 10(5), 645–659 (2015)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明が解決すべき課題は、バイサルファイト処理後のPCR増幅可能なDNA試料の収量を増加させるための有効かつ簡単な方法を開発することであつた。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、上記課題を解決せんと鋭意研究を重ね、バイサルファイト処理後のDNA試料を1本鎖DNAリガーゼで処理する工程を含むレスキューを行うことにより、バイサルファイト処理後のPCR増幅可能なDNA試料の収量を増加させることができることを見出し、本発明を完成するに至つた。

[0008] すなわち、本発明は下記のものに関する。

(1) バィサルファイト処理を用いるDNAメチル化解析のための方法であつて、バイサルファイト処理後のDNA試料を1本鎖DNAリガーゼで処理することにより、バイサルファイト処理後のPCR増幅可能なDNA試料の収量を増加させることを特徴とする方法。

(2) バィサルファイト処理を用いるDNAメチル化解析がRRBS (Reduced Representation Bisulfite Sequencing) 法によるものである(1)記載の方法。

(3) 1本鎖DNAリガーゼでの処理の前に、バイサルファイト処理後のDNA試料を下記工程：

(a) DNA 5' - , 3' -ホスファターゼまたはDNA 3' -ホスファ

ターゼでの処理、および

(b) DNA 5' - キナーゼでの処理

に付すことを特徴とする (1) または (2) 記載の方法。

(4) バイサルファイト処理後の DNA 試料が担体に固定化されている、
(1) ~ (3) のいずれかに記載の方法。

(5) 工程 (b) が ATP の存在下において行われる、(1) ~ (4) の
いずれかに記載の方法。

(6) (1) ~ (5) のいずれかに記載の方法を実施するためのキットで
あって、1本鎖DNAリガーゼを含むキット。

(7) さらにDNA 5' -, 3' - ホスファターゼまたはDNA 3' - ホ
スファターゼおよびDNA 5' キナーゼを含む (6) 記載のキット。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、1本鎖DNAリガーゼを用いる簡単な方法により、バイサルファイト処理後のPCR増幅可能なDNA試料の収量を増加させることができ、その後のPCR工程およびシーケンス工程に十分な量のDNA試料を供給することができる。したがって、本発明を用いれば、シングルセル由来のDNAなどの微量なDNA試料のメチル化解析が可能となる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]図1は、1本鎖DNAリガーゼでの処理の効果を示すグラフである。横軸は試料名、縦軸はDNA量 (ng/μl) である。試料Iはバイサルファイト処理および1本鎖DNAリガーゼでの処理を行わなかった試料、試料IVはバイサルファイト処理を行ったが、1本鎖DNAリガーゼでの処理を行わなかった試料、試料Vはバイサルファイト処理および1本鎖DNAリガーゼでの処理を行った試料のPCR増幅産物量を示す。

[図2]図2は、図1で説明したPCR増幅産物の2.0%エーゲルを用いた電気泳動の結果を示す写真である。レーンは、左からDNAサイズマーカー、ヌクレアーゼフリーの水 (ブランク)、試料I、試料IV、試料Vである

[図3]図3は、ヒトiPS細胞株を試料とした場合のDNA収量結果を示すグ

ラフである。BS (－) はバイサルファイト処理を行わなかった場合、BS (＋) Res (－) はバイサルファイト処理のみ、BS (＋) Res (＋) はバイサルファイト処理を行った後、本発明の方法を適用した場合である。

[図4]図4は、ヒトES細胞株12シングルセルを試料とした場合のDNA収量結果を示すグラフである。BS (－) はバイサルファイト処理を行わなかった場合、BS (＋) Res (－) はバイサルファイト処理のみ、BS (＋) Res (＋) はバイサルファイト処理を行った後、本発明の方法を適用した場合である。

[図5]図5は、ヒトES細胞株から得られたDNAを次世代シーケンスで配列を取得し、解析した結果である。左図が本発明の方法を適用しなかった場合、右図が本発明の方法を適用した場合である。

[図6]図6は、ヒトES細胞株から得られたDNAを次世代シーケンスで配列を取得し、解析した結果場合のローレンツ曲線を示す。左図が本発明の方法を適用しなかった場合、右図が本発明の方法を適用した場合である。

[図7]図7は、ヒトゲノムDNAを試料とした場合の収量結果を示すグラフである。BS (－) はバイサルファイト処理を行わなかった場合、BS (＋) Res (－) はバイサルファイト処理のみ、BS (＋) Res (＋) はバイサルファイト処理を行った後、本発明の方法を適用した場合、BS (＋) Res (ATP) はキナーゼ処理時にATPを添加した場合である。

発明を実施するための形態

[0011] 本発明は、1の態様において、バイサルファイト処理を用いるDNAメチル化解析のための方法であって、バイサルファイト処理後のDNA試料を1本鎖DNAリガーゼで処理することにより、バイサルファイト処理後のPCR増幅可能なDNA試料の収量を増加させることを特徴とする方法に関する。

[0012] バイサルファイト処理を用いるDNAのメチル化解析は広く用いられている。バイサルファイトは、DNA中の非メチル化シトシンをウラシルに変換

するが、メチル化シトシンは他の塩基に変換されない。このことを利用して、バイサルファイト処理されたDNAをPCR増幅後、シーケンス解析を行うことによって、DNAのメチル化の状態を知ることができる。しかし、バイサルファイト自体反応性に富む物質であり、処理条件も高温であるために、バイサルファイト処理を行うとDNA試料が断片化し、次工程であるPCR増幅のために十分な量のDNAが供給されないという問題がある。

[0013] 本発明は、かかるDNA試料の損失を抑制するために、バイサルファイト処理後のDNA試料を1本鎖DNAリガーゼ処理に付すことによりレスキューを行い、次工程であるPCR増幅のために十分な量のDNAを供給するものである。このようなレスキューは、従来のバイサルファイト処理を用いるDNAのメチル化解析においては行われていなかった。

[0014] 現在よく用いられているバイサルファイト処理を用いるDNAのメチル化解析法の例としては、RRBS法および全ゲノムバイサルファイトシーケンシング(WGBS)法などが挙げられる。本発明は、バイサルファイトを用いるいずれのDNAのメチル化解析法においても実施可能であるが、RRBS法において実施することが好ましい。以下において、RRBS法に関連して本発明を説明する。

[0015] 一般に、RRBS法は以下の工程を含む(H. Guo et al. Nature Protocols, 10(5), 645-659 (2015)等を参照のこと)：

- 制限酵素によるDNA試料の消化
- エンドリペアおよびdAテイリング
- アダプターライゲーション
- バイサルファイト処理
- PCR増幅
- シーケンシング

[0016] 本発明においては、バイサルファイト処理とPCR増幅との間に、1本鎖DNAリガーゼを用いて断片化したDNA試料を連結することにより、DNA試料のレスキューを行う。ここで用いられる1本鎖DNAリガーゼは、1

本鎖DNAを連結する活性を有するものであればいずれの酵素であってもよく、市販もされている。本発明に使用する1本鎖DNAリガーゼの例としてはEpicentre社のCircLigase™ssDNA Ligase、和光純薬工業株式会社のSingle Strand DNA Ligase, thermostable, recombinant, Solutionなどが挙げられるが、これらに限定されない。1本鎖DNAリガーゼの好ましい反応条件は酵素の種類により異なるが、それらは当業者に公知であるか、あるいは当業者が容易に定めうるものである。

[0017] 一般に、1本鎖DNAリガーゼは、ポリヌクレオチドの3'末端の水酸基と、5'末端のリン酸基を結合する反応を触媒する。したがって、バイサルファイト処理後の断片化したDNA試料の3'末端を水酸基とし、5'末端にリン酸基を付加することが、1本鎖DNAリガーゼによる連結反応の効率化および連結されたDNAの収量増加につながる。

[0018] そのためには、1本鎖DNAリガーゼでの連結反応の前に、DNA 5' - , 3' -ホスファターゼまたはDNA 3' -ホスファターゼでの処理、およびDNA 5' -キナーゼでの処理を行うことが好ましい。

[0019] 本発明に使用するDNA 5' - , 3' -ホスファターゼは、DNAの5'末端および3'末端のリン酸基を加水分解して水酸基を生じさせる活性を有するものであればいずれのものであってもよく、例えば、ThermoFisher Scientific社の製品番号EFO654などが挙げられるが、これらに限定されない。DNA 5' - , 3' -ホスファターゼの好ましい反応条件は酵素の種類により異なるが、それらは当業者に公知であるか、あるいは当業者が容易に定めうるものである。

[0020] 本発明に使用するDNA 3' -ホスファターゼは、DNAの3'末端のリン酸基を加水分解して水酸基を生じさせる活性を有するものであればいずれのものであってもよい。DNA 3' -ホスファターゼの好ましい反応条件は酵素の種類により異なるが、それらは当業者に公知であるか、あるいは当業者が容易に定めうるものである。また、ポリヌクレオチドキナーゼ 3' -ホスファターゼ (PNKP) を用いてもよい。PNKPは3' -ホスファターゼ

活性と5' -キナーゼ活性を有する酵素である。いくつかのP N K PがQ I A G E N社などから市販されている。

[0021] 本発明に使用する5' -キナーゼは、DNAの5' 末端にリン酸基を付加する活性を有するものであればいずれのものであってもよく、例えば、P r o m e g a社のT4ポリヌクレオチドキナーゼなどが挙げられるが、これらに限定されない。DNA 5' -キナーゼの好ましい反応条件は酵素の種類により異なるが、それらは当業者に公知であるか、あるいは当業者が容易に定めうるものである。また、ATPの存在下においてキナーゼ反応を行うことにより、DNA試料の収量をさらに増加させることができる。ATPの量は特に限定されず、当業者が適宜定めうるものである。ATPの量の例として、キナーゼ反応系中、終濃度として約1 mM～数mMとすることが挙げられるが、これに限定されない。

[0022] DNA 5' -, 3' -ホスファターゼを用いる場合には、DNA 5' -キナーゼを作用させる前に、DNA 5' -, 3' -ホスファターゼを作用させ、バイサルファイト処理により生じた断片化DNA試料の5' 末端および3' 末端の両方のリン酸基を加水分解して、各末端に水酸基を生じさせる。次いで、DNA 5' -キナーゼを作用させ、断片化DNA試料の5' 末端にリン酸基を付加する。その後、1本鎖DNAリガーゼを作用させて、断片化したDNA試料を連結してレスキューする。

[0023] DNA 5' -, 3' -ホスファターゼのかわりにDNA 3' ホスファターゼを用いる場合は、(i) DNA 3' ホスファターゼでの処理とDNA 5' -キナーゼでの処理を同時に行ってもよく、(ii) 先にDNA 5' -キナーゼで処理し、その後DNA 3' ホスファターゼで処理してもよい。例えばNEB社のT4ポリヌクレオチドキナーゼを用いて(i)の処理を行ってもよい。ただし、(i)、(ii)のような処理を行う場合は、DNA 3' -ホスファターゼは、DNAの5' 末端のリン酸基を加水分解する活性が無視できる程度であるか、あるいはそのような活性を有していないことが必要である。

[0024] 1本鎖DNAリガーゼによる連結反応を効率よく行って、レスキューされるDNA試料の収量を増加させるために、DNA試料を固定化担体に結合させることが好ましい。DNA試料を固定化した担体を集めることにより、DNA試料が濃縮、精製されてレスキュー効率が上昇し、より多くのDNA試料を回収できる。DNA試料の固定化は、バイサルファイト処理の前、後いずれに行ってもよいが、バイサルファイト処理の後で行うほうが好ましい。その理由として、バイサルファイト処理中の反応時に固定化担体が反応を妨げる可能性があること、およびバイサルファイト処理後の精製はカラムを使用するため、固定化担体がカラムを通過できないことが挙げられる。

[0025] DNA試料の固定化のために、担体との結合を可能にする物質または官能基をアダプターに結合または導入することができる。かかる物質または官能基を予め結合または導入したアダプターをDNA試料に連結してもよく、アダプターをDNA試料に連結した後かかる物質または官能基を結合または導入してもよい。バイサルファイト処理前に固定化を行う場合は、担体に固定化されたDNA試料をバイサルファイト処理する。バイサルファイト処理後に固定化を行う場合は、アダプターを付したDNA試料をバイサルファイト処理し、その後、担体に固定化する。

[0026] アダプターの設計は当業者に公知であり、PCR増幅に用いるプライマーの塩基配列やシークエンサーなどの条件に応じて行うことができる。メチル化解析用の市販キットの構成成分として含まれているアダプターを使用してもよい。

[0027] DNA試料を固定化するためにアダプターに結合させる物質、およびアダプターに導入する官能基は当業者に公知であり、それらの結合方法、導入方法、および担体への固定化方法も当業者に公知である。例えば、アダプターの末端にビオチンを付加し、担体にアビジンを結合させておいて、ビオチン-アビジン結合を利用して固定化を行うことができる。上例の場合、担体としてはアビジンを結合した磁性ビーズが適当である。担体との結合を可能にする物質や官能基、固定化担体ならびに固定化方法は上記のものに限定され

ないことはいうまでもない。

[0028] 本発明は、さらなる態様において、バイサルファイトを用いるDNAメチル化解析において、バイサルファイト処理後のPCR増幅可能なDNA試料の収量を増加させる方法であって、バイサルファイト処理後のDNA試料を1本鎖DNAリガーゼで処理することを特徴とする方法を実施するためのキットに関するものである。したがって、本発明のキットは、1本鎖DNAリガーゼを含む。

[0029] 本発明のキットは、さらにDNA 5' - , 3' -ホスファターゼまたはDNA 3' -ホスファターゼ、およびDNA 5' -キナーゼを含んでいてもよい。1本鎖DNAリガーゼ、DNA 5' - , 3' -ホスファターゼ、DNA 3' -ホスファターゼ、およびDNA 5' -キナーゼについては上で説明したとおりである。

[0030] 以下に実施例を示して本発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、実施例は本発明を限定するものと解してはならない。

実施例 1

[0031] R R B S法によりヒトゲノムDNAのメチル化を解析するにあたり、バイサルファイト処理後に本発明のレスキュー反応を行って、回収されるDNA試料の収量の増加を調べた。

[0032] 1. 実験手順

試料として、Promega 製品番号 G3041-1のヒトゲノムDNA 3 ngを用いた。実験手順は以下の7つの工程を含んでいた：1) Msp Iでの消化、2) エンドリペア／dAテイリング反応、3) アダプターライゲーション、4) バイサルファイト処理、5) レスキュー反応、6) 第1ラウンドPCRエンリッチメント、および7) 第2ラウンドPCRエンリッチメント。

[0033] 1) Msp Iでの消化

ヒトゲノムDNA 3 ngを、9ユニットのMsp I、1x Tangoバッファー (Guo H et al, Nature Protocols, vol.10 (5), 645-659参照)、ヌクレアーゼフリーの水の混合物中で37℃にて3時間反応させ、次いで、

80℃で20分間酵素を失活させた。

- [0034] 2) エンドリペア／dA-テイルリング 5ユニットのクレノウフラグメントexon（上記Guoらの文献参照）、1xTangoバッファー、40μM dATP、4μM dCTP、4μM dGTPを加え、37℃で40分反応させ、75℃で15分間酵素失活させた。

- [0035] 3) アダプターライゲーション

アダプターライゲーションにおいて、30 WeissユニットのT4 DNAリガーゼ（上記Guoらの文献参照）、1xTangoバッファー、1mM ATP、アダプター、ヌクレアーゼフリーの水を加え、16℃で30分反応させ、引き続き4℃で一晩反応した後に、65℃で20分間酵素失活を行った。試料の正確な量を計測し、30μLになるようヌクレアーゼフリーの水で調整後、6μL（試料I）、12μL（試料II、III）、12μL（試料IV、V）に分注し、試料Iは-80℃で保存した。

- [0036] アダプターとして、以下の配列の片側ビオチン化バーコード入りアダプターのセットを設計し、使用した。

5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGATCTTT-3'（配列番号：1）

（5'-ビオチン化、Cは5-メチル-dC）

5'-AAGATCACTCTGCGTTGATACCACTGCTT-3'（配列番号：2）

（5'-リン酸化、3'-ビオチン化、Cは5-メチル-dC）

- [0037] 4) バイサルファイト処理

12μLの試料（試料IV、V）をバイサルファイト処理に付した。試料にヌクレアーゼ不含有水を加え、25μLに調整した。CTコンバージョンバッファーを125μL加え、よく混合した。バイサルファイト処理を98℃で10分、64℃で2時間、その後4℃で行った。処理済みDNAをMethylcode bisulfite conversion kit（ThermoFisher SCIENTIFIC製品番号MECOV-50）を用い、バインディングバッファーに1μLのtRNA（10ng/μL）を加え遠心した。最後の溶出は50℃でプレヒートした25μLのエリュ

ーションバッファーを使用した。量を測り取り、2等分した（改めて試料ⅠV、Ⅴと命名）。

[0038] 5) レスキュー反応

レスキュー反応は4つの工程5-1)、5-2)、5-3)、5-4)を含んでいた。

[0039] 5-1) ビーズへの固定化

Dynabeads (登録商標) M-280 ストレプトアビジンビーズ (ThermoFisher SCIENTIFIC製品番号11205D) 10 μ LをDNA LoBindチューブ (Eppendorf製品番号0030 108.051) に入れ、ビーズを捕捉し、2 $\times$ BWTバッファー (10mM Tris-HCl (pH7.5)、1mM EDTA、2M NaCl、0.01% Tween-20) で2回洗浄後、10 μ Lの2 $\times$ BWTバッファーに懸濁した。試料V (約10 μ L) を加えて混合し、室温で15分インキュベートした。ビーズを捕捉した後、1 $\times$ BWTバッファー (5mM Tris-HCl (pH7.5)、0.5mM EDTA、1M NaCl、0.02% Tween-20) で2回洗浄後、EBTバッファー (10mM Tris-HCl (pH8.5)、0.02% Tween-20) で1回洗浄した。

[0040] 5-2) ホスファターゼ反応

1 $\times$ バッファー、ヌクレアーゼフリーの水を用いてホスファターゼミクスチャーを作成した。5-1) のビーズを捕捉し、上清を取り除いた後、ホスファターゼミクスチャーに懸濁し、PCRチューブ移した。Fast AP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (ThermoFisher SCIENTIFIC製品番号EF0654) 1 μ Lを加え、37 $^{\circ}$ Cで10分反応させ、75 $^{\circ}$ Cで5分間酵素失活させた。反応後、LoBindチューブに移し、ビーズを捕捉し、EBTバッファーで2回洗浄した。

[0041] 5-3) キナーゼ反応

1 x バッファー、ヌクレアーゼフリーの水を用いてキナーゼミクスチャーを作成した。5-2) のビーズを捕捉し、上清を取り除いた後、キナーゼミクスチャーに懸濁し、PCRチューブへ移した。T4ポリヌクレオチドキナーゼ (Takara 製品番号 2021A) 1 μ L を加え、37°C で 30 分反応させ、70°C で 5 分間酵素失活させた。反応後、LoBind チューブに移し、ビーズを捕捉し、EBT バッファーで 2 回洗浄した。

[0042] 5-4) 1 本鎖 DNA リガーゼ反応

1 x バッファー、ヌクレアーゼフリーの水を用いて 1 本鎖 DNA リガーゼミクスチャーを作成した。5-3) のビーズを捕捉し、上清を取り除いた後、1 本鎖 DNA ミクスチャーに懸濁し、PCR チューブへ移した。Circ Ligase II 1 本鎖 DNA リガーゼ (epicentre 製品番号 CL9025K) 1 μ L を加え、60°C で 2 時間反応させ、80°C で 10 分間酵素失活させた。反応後、LoBind チューブに移し、ビーズを捕捉し、EBT バッファーで 2 回洗浄した。最後は Methylcode bisulfite conversion kit のエリューションバッファー 10 μ L に懸濁した。この試料を以下の核酸増幅に付した。

[0043] 6) 第 1 ラウンド PCR エンリッチメント

レスキュー反応をしていない試料 I および IV を Dynabeads (登録商標) M-280 ストレプトアビジンビーズ 10 μ L に固定化した。試料 I は、ヌクレアーゼフリーの水で 10 μ L に調整してから混合した。

下記のように PCR ミクスチャーを作成した。1 x PCR Pfu Cx バッファー (Guo らの上記文献参照)、1 ユニットの Pfu Turbo Cx hotstart DNA ポリメラーゼ (Guo らの上記文献参照)、各 200 μ M dNTP ミクスチャー、300 nM プライマー (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3') (配列番号: 3)、ヌクレアーゼ不含の水、およびビーズ付着試料。

その後 PCR 反応を次のように行った。95°C で 2 分 → 95°C で 20 秒を 22 サイクル、60°C で 30 秒、72°C で 1 分 → 72°C で 5 分 → 4°C。PC

R反応終了後、Dynabeads（登録商標） M-280 ストレプトアビジンビーズを捕捉し、上清を回収し、1 : 1 AMPureビーズ（Guoらの上記文献参照）でPCR産物を2回精製した。

[0044] 7) 第2ラウンドPCRエンリッチメント

下記のようにPCRミクスチャーを作成した。1x Phusion HF PCR master mix with HF buffer（Guoらの上記文献参照）、500nM プライマー（上記配列）、および試料。

その後PCR反応を次のように行った。98℃で2min→98℃で10秒を22サイクル、60℃で30秒、72℃で1分→72℃で5分→4℃。PCR反応終了後、1 : 1 AMPureビーズでPCR産物を1回精製し、25μLのヌクレアーゼフリーの水で溶出し、回収した。

収率を確認するために、回収した試料1μL、Qubit（ThermoFisher SCIENTIFIC Qubit（登録商標） 2.0 Fluorometer）1μL、Nano drop（ThermoFisher SCIENTIFIC NanoDrop 2000）15μLを2.0% E-gel（ThermoFisher SCIENTIFIC 製品番号G521802）で泳動しチェックした。

[0045] 2. 実験結果

ヒトゲノムDNAを試料として用いた実験結果を以下に示す。

表1に試料とその処理の関係を示す。

[表1]

	BS	Purify1 (BS kit)	rescue	Purify2 (M280 beads)
I	(-)	(-)	(-)	(-)
IV	(+)	(+)	(-)	(-)
V	(+)	(+)	(+)	(+)

BS: バイサルファイト処理の有無（上記プロトコル4-1）

Purify 1: Bisulfite conversion kit付属のカラムを使用し精製の有無（上記プロトコル4-1）

rescue: 1本鎖DNAリガーゼを用いるレスキュー

Purify 2: M280 ストレプトアビジンビーズを使用し精製の有無（上記プロトコル5）

[0046] PCR産物測定結果（上記プロトコル7）を表2および図1に示す。2.0% E-gelでの電気泳動の結果を図2に示す（中央のレーンが試料I、右から2つめのレーンが試料IV、一番右のレーンが試料V）。

[表2]

試料I	試料IV	試料V
68.6 ng/ μ l	12.4 ng/ μ l	28.4 ng/ μ l

試料IVと試料Vの比較により、本発明のレスキュー反応によって2.3倍程度の収量増加が認められた。

[0047] メチル化解析のマルチプレックス化に対応させるため、上記プロトコル3に記載のアダプターとは異なるアダプターを設計し、同様にレスキュー反応を行ったところ、同様の収量増加が認められた。

実施例 2

[0048] 以下の実施例は、RRBS法によりヒトゲノムDNAのメチル化を解析するにあたり、バイサルファイト処理後に本発明のレスキュー反応を行って、回収されるDNA試料の収量の増加を調べた際の実験手順および結果を示す。

[0049] 1. 実験手順

試料として、ヒトiPS細胞株である201B7細胞株を用いた。201B7細胞株をフィーダー細胞上で培養後細胞を回収し、抗SSEA-4抗体（BD Pharmingen）及びPI（BD Pharmingen）で染色した細胞懸濁液をFACS AriaII（BD Biosciences）を使用しシングルセルモードで抗SSEA-4抗体陽性、PI陰性の細胞を96ウェルPCRプレートに300細胞ずつソーティングした。実験手順は以下の7つの工程を含んでいた：1）MspIでの消化、2）エンドリペア/dAテイルリング反応、3）アダプターライゲーション、4）バイ

サルファイト処理、5) レスキュー反応、6) 第1ラウンドPCRエンリッチメント、および7) 第2ラウンドPCRエンリッチメント。今回の追加データでは8) ゲル切り出し、精製後のサンプルをシーケンス及び精製後のサンプルをテンプレートとし、ヒト特異的遺伝子プライマーにより定量的PCRを行った。

[0050] 1) *Msp*Iでの消化

ヒトゲノムDNA 3 ngを、9ユニットの*Msp*I、1x *Tango*バッファー (Guo H et al, Nature Protocols, vol.10 (5), 645-659参照)、ヌクレアーゼフリーの水の混合物中で37℃にて3時間反応させ、次いで、80℃で20分間酵素を失活させた。

[0051] 2) エンドリペア/dA-テイルリング

5ユニットのクレノウフラグメント *exo*⁻ (上記Guoらの文献参照)、1x *Tango*バッファー、40 μM dATP、4 μM dCTP、4 μM dGTPを加え、37℃で40分反応させ、75℃で15分間酵素失活させた。

[0052] 3) アダプターライゲーション

アダプターライゲーションにおいて、30 WeissユニットのT4 DNAリガーゼ (上記Guoらの文献参照)、1x *Tango*バッファー、1 mM ATP、アダプター、ヌクレアーゼフリーの水を加え、16℃で30分反応させ、引き続き4℃で一晩反応した後に、65℃で20分間酵素失活を行った。試料の正確な量を計測し、30 μLになるようヌクレアーゼフリーの水で調整後、10 μL (試料I (表1でcontrol、図3でBS (-) と表記))、20 μL (試料II、III) に分注し、試料Iは-80℃で保存した。

[0053] アダプターとして、以下の配列の両側ビオチン化バーコード入りY字アダプターを使用した。Y字アダプターは5'末端がビオチン化されたユニバーサルアダプターと3'末端がビオチン化されたインデックスアダプターをアニーリングさせ作成した。

ユニバーサルアダプターの配列は下記の通りである。

5' -AATGATACGGCGACCGACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-3' (配列番号：4) (5' -ビオチン化、Cは5-メチル-dC、3' 末端側CT間をホスホロチオネート化)

インデックスアダプターの配列は下記の通りである

5' -GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACATCACGATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3' (配列番号：5) (5' -リン酸化、Cは5-メチル-dC、3' -ビオチン化)

[0054] 4) バイサルファイト処理

20 μ Lの試料(試料ⅠⅠ、ⅠⅠⅠ)をバイサルファイト処理に付した。試料にヌクレアーゼ不含水を加え、25 μ Lに調整した。CTコンバージョンバッファーを125 μ L加え、よく混合した。バイサルファイト処理を98℃で10分、64℃で2時間、その後4℃で行った。処理済みDNAをMethylcode bisulfite conversion kit (ThermoFisher SCIENTIFIC製品番号MECOV-50)を用い、バインディングバッファーに1 μ LのtRNA (10 ng/ μ L)を加え遠心した。最後の溶出は50℃でプレヒートした25 μ Lのエリューションバッファーを使用した。量を測り取り、2等分した(改めて試料ⅠⅠ(表3でBS(+)/rescue(-)、図3でBS(+)/Res(-))、試料ⅠⅠⅠ(表3でBS(+)/rescue(+)、図3でBS(+)/Res(+))と命名)。

[0055] 5) レスキュー反応

レスキュー反応は4つの工程5-1)、5-2)、5-3)、5-4)を含んでいた。

[0056] 5-1) ビーズへの固定化

Dynabeads (登録商標) M-280 ストレプトアビジンビーズ(ThermoFisher SCIENTIFIC製品番号11205D)10 μ LをDNA LoBindチューブ(Eppendorf製品番

号0030 108.051)に入れ、ビーズを捕捉し、2×BWTバッファー(10mM Tris-HCl (pH7.5)、1mM EDTA、2M NaCl、0.01% Tween-20)で2回洗浄後、10μLの2×BWTバッファーに懸濁した。試料V(約10μL)を加えて混合し、室温で15分インキュベートした。ビーズを捕捉した後、1×BWTバッファー(5mM Tris-HCl (pH7.5)、0.5mM EDTA、1M NaCl、0.02% Tween-20)で2回洗浄後、EBTバッファー(10mM Tris-HCl (pH8.5)、0.02% Tween-20)で1回洗浄した。

[0057] 5-2) ホスファターゼ反応

1×バッファー、ヌクレアーゼフリーの水を用いてホスファターゼミクスチャーを作成した。5-1)のビーズを捕捉し、上清を取り除いた後、ホスファターゼミクスチャーに懸濁し、PCRチューブ移した。Fast AP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (ThermoFisher SCIENTIFIC製品番号EF0654) 1μLを加え、37℃で10分反応させ、75℃で5分間酵素失活させた。反応後、LoBindチューブに移し、ビーズを捕捉し、EBTバッファーで2回洗浄した。

[0058] 5-3) キナーゼ反応

1×バッファー、ヌクレアーゼフリーの水を用いてキナーゼミクスチャーを作成した。5-2)のビーズを捕捉し、上清を取り除いた後、キナーゼミクスチャーに懸濁し、PCRチューブへ移した。T4ポリヌクレオチドキナーゼ(TaKaRa製品番号2021A) 1μLを加え、37℃で30分反応させ、70℃で5分間酵素失活させた。反応後、LoBindチューブに移し、ビーズを捕捉し、EBTバッファーで2回洗浄した。

[0059] 5-4) 1本鎖DNAリガーゼ反応

1×バッファー、1.3nM ユニバーサルアダプター、ヌクレアーゼフリーの水を用いて1本鎖DNAリガーゼミクスチャーを作成した。5-3)

のビーズを捕捉し、上清を取り除いた後、1本鎖DNAミクスチャーに懸濁し、PCRチューブへ移した。CircLigase II 1本鎖DNAリガーゼ（epicentre製品番号CL9025K）1 μ Lを加え、60℃で2時間反応させ、80℃で10分間酵素失活させた。反応後、LoBindチューブに移し、ビーズを捕捉し、EBTバッファーで2回洗浄した。最後はMethylcode bisulfite conversion kitのエリュージョンバッファー10 μ Lに懸濁した。この試料を以下の核酸増幅に付した。

[0060] 6) 第1ラウンドPCRエンリッチメント

レスキュー反応をしていない試料IおよびIIをDynabeads（登録商標）M-280 ストレプトアビジンビーズ10 μ Lに固定化した。試料Iは、ヌクレアーゼフリーの水で10 μ Lに調整してから混合した。

下記のようにPCRミクスチャーを作成した。1x PCR Pfu Cx バッファー、1ユニットのPfu Turbo Cx hot start DNAポリメラーゼ、各200 μ M dNTPミクスチャー、300 nM プライマー（Guoらの文献参照）、ヌクレアーゼ不含の水、およびビーズ付着試料。

その後PCR反応を次のように行った。95℃で2分→95℃で20秒、60℃で30秒、72℃で1分のセットを22サイクル→72℃で5分→4℃。PCR反応終了後、Dynabeads（登録商標）M-280 ストレプトアビジンビーズを捕捉し、上清を回収し、1:1 AMPureビーズ（Guoらの上記文献参照）でPCR産物を2回精製した。

[0061] 7) 第2ラウンドPCRエンリッチメント

下記のようにPCRミクスチャーを作成した。1x Phusion HF PCR master mix with HF buffer（Guoらの文献参照）、500 nM プライマー（Guoらの文献参照）、および試料。

その後PCR反応を次のように行った。98℃で2分→98℃で10秒、

60℃で30秒、72℃で1分のセットを22サイクル→72℃で5分→4℃。PCR反応終了後、1:1 AMPureビーズでPCR産物を1回精製し、25μLのヌクレアーゼフリーの水で溶出し、回収した。

収率を確認するために、回収した試料1μL、Qubit (ThermoFisher Scientific Qubit (登録商標) 2.0 Fluorometer) 1μL、Nano drop (ThermoFisher Scientific NanoDrop 2000) 15μLを2.0% E-gel (ThermoFisher Scientific 製品番号G521802) で泳動しチェックした。

[0062] 8) ゲル切り出し (250-700bp)、精製後のサンプルをテンプレートとし、ヒト特異的遺伝子プライマーにより定量的PCRを行った。
使用したプライマー配列は下記の通りである。

5' -TAGCAATAATCCCCATCCTCCATATAT-3' (配列番号: 6)

5' -ACTTGTCCAATGATGGTAAAAGG-3' (配列番号: 7)

[0063] 2. 実験結果

1) 下記の表3、および図3はヒトiPS細胞株 (201B7株) を使用し、得られた結果である。今回はヒト配列を特異的に増幅していることを確認するためヒトミトコンドリア遺伝子プライマーを用いて確認を行った (配列番号: 3、配列番号: 4)。

[表3]

ヒトiPS細胞株100細胞での収量結果

	Yield (pM)	Rescue efficiency
control	1.26E-04	(-)
BS (+)/rescue (-)	9.12E-07	1
BS (+)/rescue (+)	3.77E-06	4.1

レスキュー有りではレスキュー無しサンプルと比較し4.1倍の収量増加が見られた。

実施例 3

[0064] 1. 実験手順

試料として、ヒトES細胞株であるWA09細胞株を用いた。WA09細胞株をフィーダー細胞上で培養後細胞を回収し、抗SSEA-4抗体（BD Pharmingen）及びPI（BD Pharmingen）で染色した細胞懸濁液をFACS AriaII（BD Biosciences）を使用しシングルセルモードで抗SSEA-4抗体陽性、PI陰性の細胞を96ウェルPCRプレートに1細胞ずつソーティングした。実験手順は以下の7つの工程を含んでいた：1）MspIでの消化、2）エンドリペア／dAテイリング反応、3）アダプターライゲーション、4）バイサルファイト処理、5）レスキュー反応、6）第1ラウンドPCRエンリッチメント、および7）第2ラウンドPCRエンリッチメント。今回の追加データでは8）ゲル切り出し、精製後のサンプルをシーケンス及び精製後のサンプルをテンプレートとし、ヒト特異的遺伝子プライマーにより定量的PCRを行った。

[0065] 1）MspIでの消化

ヒトゲノムDNA 3 ngを、9ユニットのMspI、1 x Tangoバッファー（Guo H et al, Nature Protocols, vol.10 (5), 645-659参照）、ヌクレアーゼフリーの水の混合物中で37℃にて3時間反応させ、次いで、80℃で20分間酵素を失活させた。

[0066] 2）エンドリペア／dA-テイリング

5ユニットのクレノウフラグメントexon（上記Guoらの文献参照）、1 x Tangoバッファー、40 μM dATP、4 μM dCTP、4 μM dGTPを加え、37℃で40分反応させ、75℃で15分間酵素失活させた。

[0067] 3）アダプターライゲーション

各ウェルに12種類の片側ビオチン化バーコード入りアダプターをそれぞれ付加した。アダプターライゲーションにおいて、30 WeissユニットのT4 DNAリガーゼ、1 x Tangoバッファー、1 mM ATP、12種類のアダプター、ヌクレアーゼフリーの水を加え、16℃で30分反応

させ、引き続き 4℃で一晩反応した後に、65℃で20分間酵素失活を行った。試料の正確な量を計測し、25μLになるようヌクレアーゼフリーの水で調整した。

[0068] アダプターとして、以下の配列の両側ビオチン化バーコード入りY字アダプターを使用した。Y字アダプターは5'末端がビオチン化されたユニバーサルアダプターと3'末端がビオチン化されたインデックスアダプターをアニーリングさせ作成した。

ユニバーサルアダプターの配列は下記の通りである。

5' -AATGATACGGCGACCAACGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-3'

(配列番号：4) (5'-ビオチン化、Cは5-メチル-dC、3'末端側CT間をホスホロチオネート化)

インデックスアダプターの配列は下記の12通りである(5'-リン酸化、Cは5-メチル-dC、3'-ビオチン化)

5' -GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACATCACGATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'
(配列番号：8)

5' -GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACCGATGTATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'
(配列番号：9)

5' -GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACTTAGGCATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'
(配列番号：10)

5' -GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACTGACCAATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'
(配列番号：11)

5' -GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACACAGTGATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'
(配列番号：12)

5' -GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACGCCAATATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'
(配列番号：13)

5' -GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACCAGATCATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'
(配列番号：14)

5' -GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACACTTGAATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'

' (配列番号：15)

5' -GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACGATCAGATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3

' (配列番号：16)

5' -GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACTAGCTTATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3

' (配列番号：17)

5' -GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACGGCTACATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3

' (配列番号：18)

5' -GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACCTTGAATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3

' (配列番号：19)

[0069] 4) バイサルファイト処理

1 ウェルあたり 25 μ L の試料をバイサルファイト処理に付した。CTコンバージョンバッファーを 125 μ L 加え、よく混合した。バイサルファイト処理を 98℃で 10 分、64℃で 2 時間、その後 4℃で行った。処理済み DNA を Methylcode bisulfite conversion kit (ThermoFisher SCIENTIFIC 製品番号 MECOV-50) を用い、バインディングバッファーに 1 μ L の tRNA (10 ng/ μ L) を加え遠心した。最後の溶出は 50℃でプレヒートした 25 μ L のエリューションバッファーを使用した。12 ウェル分を 1 本のチューブにまとめ量を測り取り、300 μ L に TE Buffer で量を合わせたのちに 2 等分した (改めて試料 I (表 4 で BS (+) / rescue (-)、図 4 で BS (+) Res (-))、試料 II (表 4 で BS (+) / rescue (+)、図 4 で BS (+) Res (+)) と命名)。

[0070] 5) レスキュー反応

レスキュー反応は 4 つの工程 5-1)、5-2)、5-3)、5-4) を含んでいた。

[0071] 5-1) ビーズへの固定化

Dynabeads (登録商標) M-280 ストレプトアビジンビーズ (ThermoFisher SCIENTIFIC 製品番号 11205

D) 10 μ LをDNA LoBindチューブ (Eppendorf 製品番号0030 108.051) に入れ、ビーズを捕捉し、2 x BWTバッファ (10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1 mM EDTA、2 M NaCl、0.01% Tween-20) で2回洗浄後、10 μ Lの2 x BWTバッファに懸濁した。試料V (約10 μ L) を加えて混合し、室温で15分インキュベートした。ビーズを捕捉した後、1 x BWTバッファ (5 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.5 mM EDTA、1 M NaCl、0.02% Tween-20) で2回洗浄後、EBTバッファ (10 mM Tris-HCl (pH 8.5)、0.02% Tween-20) で1回洗浄した。

[0072] 5-2) ホスファターゼ反応

1 x バッファ、ヌクレアーゼフリーの水を用いてホスファターゼミクスチャーを作成した。5-1) のビーズを捕捉し、上清を取り除いた後、ホスファターゼミクスチャーに懸濁し、PCRチューブ移した。Fast AP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (ThermoFisher SCIENTIFIC 製品番号EF0654) 1 μ Lを加え、37°Cで10分反応させ、75°Cで5分間酵素失活させた。反応後、LoBindチューブに移し、ビーズを捕捉し、EBTバッファで2回洗浄した。

[0073] 5-3) キナーゼ反応

1 x バッファ、ヌクレアーゼフリーの水を用いてキナーゼミクスチャーを作成した。5-2) のビーズを捕捉し、上清を取り除いた後、キナーゼミクスチャーに懸濁し、PCRチューブへ移した。T4ポリヌクレオチドキナーゼ (Takara 製品番号2021A) 1 μ Lを加え、37°Cで30分反応させ、70°Cで5分間酵素失活させた。反応後、LoBindチューブに移し、ビーズを捕捉し、EBTバッファで2回洗浄した。

[0074] 5-4) 1本鎖DNAリガーゼ反応

1 x バッファ、1.3 nM ユニバーサルアダプター、ヌクレアーゼフリ

ーの水を用いて1本鎖DNAリガーゼミクスチャーを作成した。5-3)のビーズを捕捉し、上清を取り除いた後、1本鎖DNAミクスチャーに懸濁し、PCRチューブへ移した。CircLigase II 1本鎖DNAリガーゼ (epicentre製品番号CL9025K) 1 μ Lを加え、60℃で2時間反応させ、80℃で10分間酵素失活させた。反応後、LoBindチューブに移し、ビーズを捕捉し、EBTバッファーで2回洗浄した。最後はMethylcode bisulfite conversion kitのエリュージョンバッファー10 μ Lに懸濁した。この試料を以下の核酸増幅に付した。

[0075] 6) 第1ラウンドPCRエンリッチメント

レスキュー反応をしていない試料IをDynabeads (登録商標) M-280 ストレプトアビジンビーズ10 μ Lに固定化した。試料Iは、ヌクレアーゼフリーの水で10 μ Lに調整してから混合した。

下記のようにPCRミクスチャーを作成した。1x PCR Pfu Cx バッファー、1ユニットのPfu Turbo Cx hotstart DNAポリメラーゼ、各200 μ M dNTPミクスチャー、300 nM プライマー (Guoらの文献参照)、ヌクレアーゼ不含の水、およびビーズ付着試料。

その後PCR反応を次のように行った。95℃で2分→95℃で20秒、60℃で30秒、72℃で1分のセットを22サイクル→72℃で5分→4℃。PCR反応終了後、Dynabeads (登録商標) M-280 ストレプトアビジンビーズを捕捉し、上清を回収し、1:1 AMPureビーズ (Guoらの上記文献参照) でPCR産物を2回精製した。

[0076] 7) 第2ラウンドPCRエンリッチメント

下記のようにPCRミクスチャーを作成した。1x Phusion HF PCR master mix with HF buffer (Guoらの文献参照)、500 nM プライマー (Guoらの文献参照)、および試料。

その後PCR反応を次のように行った。98℃で2分→98℃で10秒、60℃で30秒、72℃で1分のセットを26サイクル→72℃で5分→4℃。PCR反応終了後、1:1 AMPureビーズでPCR産物を1回精製し、25 µLのヌクレアーゼフリーの水で溶出し、回収した。

収率を確認するために、回収した試料1 µL、Qubit (ThermoFisher Scientific Qubit (登録商標) 2.0 Fluorometer) 1 µL、Nano drop (ThermoFisher Scientific NanoDrop 2000) 15 µLを2.0% E-gel (ThermoFisher Scientific 製品番号G521802) で泳動しチェックした。

[0077] 8) ゲル切り出し(250-700 bp)、精製後のサンプルをテンプレートとし、ヒト特異的遺伝子プライマーにより定量的PCRを行った。

使用したプライマー配列は下記の通りである。

5' -TAGCAATAATCCCCATCCTCCATATAT-3' (配列番号: 6)

5' -ACTTGTCCAATGATGGTAAAAGG-3' (配列番号: 7)

[0078] 2. 実験結果

ヒトES細胞株12シングルセルでの収量結果を図4および表4に示す。

[表4]

	Yield (pM)	Rescue efficiency
BS (+)/rescue (-)	6.4E-07	1
BS (+)/rescue (+)	3.1E-06	4.8

レスキュー有りではレスキュー無しサンプルと比較し4.8倍の収量増加が見られた。

実施例 4

[0079] 上記のごとく、にヒトES細胞株(WA09株)12シングルセルを使用し得られたサンプルについて、次世代シーケンサー(イルミナ社HiSeq 2500)を使用し、取得した遺伝子配列を解析した。

1. 実験手順

H i S e q 2 5 0 0 には 6 p M のインストール濃度でランを行った。

配列を取得後、下記の流れでデータ処理を行い、図示を行った（図 5）。

B i s m a r k ソフトウェアの b i s m a r k コマンドを用いてシーケンズデータを E n s e m b l データベースからダウンロードしたヒトの参照ゲノム配列（G R C h 3 8 r e l e a s e 8 5, N によるマスク済み）にマッピングした後（G u o らの方法参照）、さらに b i s m a r k _ m e t h y l a t i o n _ e x t r a c t o r コマンドを用いて参照ゲノム配列上における C p G サイトの位置情報を取得し、図示を行った。b i s m a r k と b i s m a r k _ m e t h y l a t i o n _ e x t r a c t o r の実行時のコマンドとオプションは下記の通りである。B i s m a r k ソフトウェアの実行には B o w t i e 2 ソフトウェアと S A M t o o l s ソフトウェアがインストールされている必要がある。

[0080] \$ bismark --path_to_bowtie <Bowtie2へのパス> --samtools_path <SAMtoolsへのパス> --quiet --non_directional -o <出力ディレクトリ> --temp_dir <一時出力ディレクトリ> <参照ゲノム配列のインデックス> <入力FASTQファイル>

\$ bismark_methylation_extractor -s --bedGraph --counts --buffer_size 10G --samtools_path <SAMtoolsへのパス> -o <出力ディレクトリ> <入力BAMファイル>

[0081] ローレンツ曲線の描画とジニ係数計算のためのプログラムは R 言語を用いて実装した（図 6）。

[0082] 2. 実験結果

図 5 において、色の濃い部分（原図では赤色）は各染色体において取得できた C p G サイトの部位を示している。

レスキューを行うことにより、取得できる C p G サイトの数が約 1.6 倍に増加した（レスキュー無：15,181 C p G s、レスキュー有：24,413 C p G s）。また、レスキュー有のサンプルでは各染色体間でより偏りなく情報が得られることが確認された。ジニ係数が小さい値ほどデー

タの偏りが無いことを示す（レスキュー無：0.22、レスキュー有：0.16）。

実施例 5

[0083] 1. 実験手順

試料として、Promega製品番号 G3041-1のヒトゲノムDNA 600 pgを用いた。実験手順は以下の7つの工程を含んでいた：1) MspIでの消化、2) エンドリペア／dAテイリング反応、3) アダプターライゲーション、4) バイサルファイト処理、5) レスキュー反応、6) 第1ラウンドPCRエンリッチメント、および7) 第2ラウンドPCRエンリッチメント。8) ゲル切り出し、精製後のサンプルをシーケンス及び精製後のサンプルをテンプレートとし、ヒト特異的遺伝子プライマーにより定量的PCRを行った。

[0084] 1) MspIでの消化

ヒトゲノムDNA 3 ngを、9ユニットのMspI、1xTangoバッファー（Guo H et al, Nature Protocols, vol.10 (5), 645-659参照）、ヌクレアーゼフリーの水の混合物中で37℃にて3時間反応させ、次いで、80℃で20分間酵素を失活させた。

[0085] 2) エンドリペア／dA-テイリング

5ユニットのクレノウフラグメントexo-（上記Guoらの文献参照）、1xTangoバッファー、40 μM dATP、4 μM dCTP、4 μM dGTPを加え、37℃で40分反応させ、75℃で15分間酵素失活させた。

[0086] 3) アダプターライゲーション

アダプターライゲーションにおいて、30 WeissユニットのT4 DNAリガーゼ（上記Guoらの文献参照）、1xTangoバッファー、1 mM ATP、アダプター、ヌクレアーゼフリーの水を加え、16℃で30分反応させ、引き続き4℃で一晩反応した後に、65℃で20分間酵素失活を行った。試料の正確な量を計測し、24 μLになるようヌクレアーゼフリーの水

で調整後、6 μ L (試料 I (図 7 で B S (−) と表記))、18 μ L (試料 I I (図 7 で B S (+) R e s (−) と表記)、試料 I I I (図 7 で B S (+) R e s (+) と表記)、試料 I V (図 7 で B S (+) R e s (A T P) と表記)) に分注し、試料 I は −80 °C で保存した。

[0087] アダプターとして、以下の配列の両側ビオチン化バーコード入り Y 字アダプターを使用した。Y 字アダプターは 5' 末端がビオチン化されたユニバーサルアダプターと 3' 末端がビオチン化されたインデックスアダプターをアニーリングさせ作成した。

ユニバーサルアダプターの配列は下記の通りである。

5' -AATGATACGGCGACCGACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-3'

(配列番号：4) (5' ービオチン化、C は 5-メチルー d C、3' 末端側 C T 間をホスホロチオエート化)

インデックスアダプターの配列は下記の通りである (5' ーリン酸化、C は 5-メチルー d C、3' ービオチン化)

5' -GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACATCACGATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'
(配列番号：5)

[0088] 18 μ L の試料 (試料 I I、I I I、I V) をバイサルファイト処理に付した。試料にヌクレアーゼ不含水を加え、25 μ L に調整した。C T コンバージョンバッファーを 125 μ L 加え、よく混合した。バイサルファイト処理を 98 °C で 10 分、64 °C で 2 時間、その後 4 °C で行った。処理済み D N A を M e t h y l c o d e b i s u l f i t e c o n v e r s i o n k i t (T h e r m o F i s h e r S C I E N T I F I C 製品番号 M E C O V - 5 0) を用い、バインディングバッファーに 1 μ L の t R N A (10 n g / μ L) を加え遠心した。最後の溶出は 50 °C でプレヒートした 25 μ L のエリ्यूションバッファーを使用した。量を測り取り、3 等分した (改めて試料 I I (図 7 で B S (+) R e s (−))、試料 I I I (図 7 で B S (+) R e s (+))、試料 I V (図 7 で B S (+) R e s (A T P) と命名)。

[0089] 5) レスキュー反応

レスキュー反応は4つの工程5-1)、5-2)、5-3)、5-4)を含んでいた。

[0090] 5-1) ビーズへの固定化

Dynabeads (登録商標) M-280 ストレプトアビジンビーズ (ThermoFisher SCIENTIFIC製品番号11205D) 10 μ LをDNA LoBindチューブ (Eppendorf製品番号0030 108.051) に入れ、ビーズを捕捉し、2 $\times$ BWTバッファー (10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1 mM EDTA、2 M NaCl、0.01% Tween-20) で2回洗浄後、10 μ Lの2 $\times$ BWTバッファーに懸濁した。試料V (約10 μ L) を加えて混合し、室温で15分インキュベートした。ビーズを捕捉した後、1 $\times$ BWTバッファー (5 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.5 mM EDTA、1 M NaCl、0.02% Tween-20) で2回洗浄後、EBTバッファー (10 mM Tris-HCl (pH 8.5)、0.02% Tween-20) で1回洗浄した。

[0091] 5-2) ホスファターゼ反応

1 $\times$ バッファー、ヌクレアーゼフリーの水を用いてホスファターゼミクスチャーを作成した。5-1) のビーズを捕捉し、上清を取り除いた後、ホスファターゼミクスチャーに懸濁し、PCRチューブ移した。Fast AP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (ThermoFisher SCIENTIFIC製品番号EF0654) 1 μ Lを加え、37℃で10分反応させ、75℃で5分間酵素失活させた。反応後、LoBindチューブに移し、ビーズを捕捉し、EBTバッファーで2回洗浄した。

[0092] 5-3) キナーゼ反応

1 $\times$ バッファー、ヌクレアーゼフリーの水を用いてキナーゼミクスチャーを作成した。キナーゼミクスチャーには終濃度1 mMのATPを添加した。

5-2) のビーズを捕捉し、上清を取り除いた後、キナーゼミクスチャーに懸濁し、PCRチューブへ移した。T4ポリヌクレオチドキナーゼ (Takara製品番号2021A) 1 μ Lを加え、37°Cで30分反応させ、70°Cで5分間酵素失活させた。反応後、LoBindチューブに移し、ビーズを捕捉し、EBTバッファーで2回洗浄した。

[0093] 5-4) 1本鎖DNAリガーゼ反応

1xバッファー、1.3 nM ユニバーサルアダプター、ヌクレアーゼフリーの水を用いて1本鎖DNAリガーゼミクスチャーを作成した。5-3) のビーズを捕捉し、上清を取り除いた後、1本鎖DNAミクスチャーに懸濁し、PCRチューブへ移した。CircLigase II 1本鎖DNAリガーゼ (epicentre製品番号CL9025K) 1 μ Lを加え、60°Cで2時間反応させ、80°Cで10分間酵素失活させた。反応後、LoBindチューブに移し、ビーズを捕捉し、EBTバッファーで2回洗浄した。最後はMethylcode bisulfite conversion kitのエリュージョンバッファー10 μ Lに懸濁した。この試料を以下の核酸増幅に付した。

[0094] 6) 第1ラウンドPCRエンリッチメント

レスキュー反応をしていない試料IおよびIIをDynabeads (登録商標) M-280 ストレプトアビジンビーズ10 μ Lに固定化した。試料Iは、ヌクレアーゼフリーの水で10 μ Lに調整してから混合した。

下記のようにPCRミクスチャーを作成した。1xPCR Pfu Cx バッファー、1ユニットのPfu Turbo Cx hotstart DNAポリメラーゼ、各200 μ M dNTPミクスチャー、300 nM プライマー (Guoらの文献参照)、ヌクレアーゼ不含の水、およびビーズ付着試料。

その後PCR反応を次のように行った。95°Cで2分→95°Cで20秒、60°Cで30秒、72°Cで1分のセットを22サイクル→72°Cで5分→4°C。PCR反応終了後、Dynabeads (登録商標) M-280 ス

トレプトアビジンビーズを捕捉し、上清を回収し、1 : 1 AMPureビーズ（Guoらの上記文献参照）でPCR産物を2回精製した。

[0095] 7) 第2ラウンドPCRエンリッチメント

下記のようにPCRミクスチャーを作成した。1x Phusion HF PCR master mix with HF buffer（Guoらの文献参照）、500nM プライマー（Guoらの文献参照）、および試料。

その後PCR反応を次のように行った。98℃で2分→98℃で10秒、60℃で30秒、72℃で1分のセットを22サイクル→72℃で5分→4℃。PCR反応終了後、1 : 1 AMPureビーズでPCR産物を1回精製し、25uLのヌクレアーゼフリーの水で溶出し、回収した。

収率を確認するために、回収した試料1μL、Qubit（ThermoFisher SCIENTIFIC Qubit（登録商標）2.0 Fluorometer）1μL、Nano drop（ThermoFisher SCIENTIFIC NanoDrop 2000）15μLを2.0% E-gel（ThermoFisher SCIENTIFIC製品番号G521802）で泳動しチェックした。

[0096] 8) ゲル切り出し（250ー700bp）、精製後のサンプルをテンプレートとし、ヒト特異的遺伝子プライマー（Alu3プライマー配列）により定量的PCRを行った。

使用したプライマー配列は下記の通りである。

5' -TGGAAGACCAGTAGGATGATTG-3' （配列番号：20）

5' -GTCTTACCATGTATCTCTGTGC-3' （配列番号：21）

[0097] 2. 実験結果

図7からわかるように、ATP存在下でキナーゼ反応を行うことにより、DNA収量がさらに約2.5倍に増加した。

[0098] 本発明のレスキュー方法を用いることにより、バイサルファイト処理後のPCR増幅可能なDNA試料の収量を増加させることができる。したがって

、シングルセル由来の試料など微量試料のDNAメチル化解析が確実かつ容易となる。

産業上の利用可能性

[0099] 本発明によれば、シングルセル由来のDNAなどの微量なDNA試料のメチル化解析が可能となる。したがって、本発明は医学、薬学、生物学、遺伝学、農学等の分野において利用価値が高い。

配列表フリーテキスト

[0100] 配列番号：1は、実施例で用いたアダプターの塩基配列である。5'末端はビオチン化され、シトシンは5-メチル-dCである。

配列番号：2は、実施例で用いたアダプターの塩基配列である。3'末端はビオチン化され、シトシンは5-メチル-dCである。

配列番号：3は、実施例で用いたPCR増幅用プライマーの塩基配列である。

配列番号：4は、実施例で用いたユニバーサルアダプターの塩基配列である。5'末端はビオチン化され、シトシンは5-メチル-dCであり、3'末端側CT間はホスホロチオエート化されている。

配列番号：5は、実施例で用いたインデックスアダプターの塩基配列である。5'末端はリン酸化され、シトシンは5-メチル-dCであり、3'末端はビオチン化されている。

配列番号：6は、実施例で用いた定量的PCR用プライマーの塩基配列である。

配列番号：7は、実施例で用いた定量的PCR用プライマーの塩基配列である。

配列番号：8は、実施例で用いたインデックスアダプターの塩基配列である。5'末端はリン酸化され、シトシンは5-メチル-dCであり、3'末端はビオチン化されている。

配列番号：9は、実施例で用いたインデックスアダプターの塩基配列である。5'末端はリン酸化され、シトシンは5-メチル-dCであり、3'末

端はビオチン化されている。

配列番号：10は、実施例で用いたインデックスアダプターの塩基配列である。5'末端はリン酸化され、シトシンは5-メチルー d Cであり、3'末端はビオチン化されている。

配列番号：11は、実施例で用いたインデックスアダプターの塩基配列である。5'末端はリン酸化され、シトシンは5-メチルー d Cであり、3'末端はビオチン化されている。

配列番号：12は、実施例で用いたインデックスアダプターの塩基配列である。5'末端はリン酸化され、シトシンは5-メチルー d Cであり、3'末端はビオチン化されている。

配列番号：13は、実施例で用いたインデックスアダプターの塩基配列である。5'末端はリン酸化され、シトシンは5-メチルー d Cであり、3'末端はビオチン化されている。

配列番号：14は、実施例で用いたインデックスアダプターの塩基配列である。5'末端はリン酸化され、シトシンは5-メチルー d Cであり、3'末端はビオチン化されている。

配列番号：15は、実施例で用いたインデックスアダプターの塩基配列である。5'末端はリン酸化され、シトシンは5-メチルー d Cであり、3'末端はビオチン化されている。

配列番号：16は、実施例で用いたインデックスアダプターの塩基配列である。5'末端はリン酸化され、シトシンは5-メチルー d Cであり、3'末端はビオチン化されている。

配列番号：17は、実施例で用いたインデックスアダプターの塩基配列である。5'末端はリン酸化され、シトシンは5-メチルー d Cであり、3'末端はビオチン化されている。

配列番号：18は、実施例で用いたインデックスアダプターの塩基配列である。5'末端はリン酸化され、シトシンは5-メチルー d Cであり、3'末端はビオチン化されている。

配列番号：１９は、実施例で用いたインデックスアダプターの塩基配列である。５'末端はリン酸化され、シトシンは５-メチルーｄＣであり、３'末端はビオチン化されている。

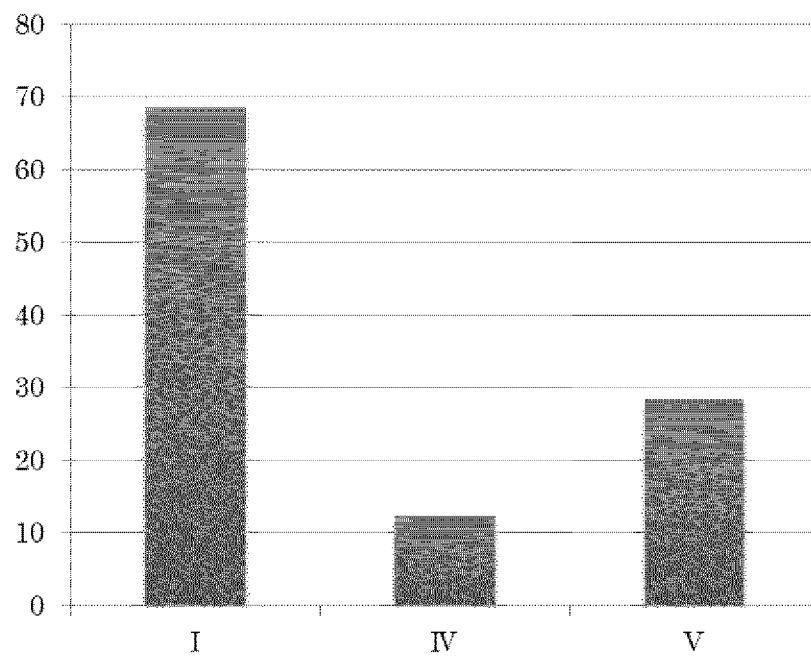
配列番号：２０は、実施例で用いた定量的ＰＣＲ用プライマーの塩基配列である。

配列番号：２１は、実施例で用いた定量的ＰＣＲ用プライマーの塩基配列である。

請求の範囲

- [請求項1] バイサルファイト処理を用いるDNAメチル化解析のための方法であって、バイサルファイト処理後のDNA試料を1本鎖DNAリガーゼで処理することにより、バイサルファイト処理後のPCR増幅可能なDNA試料の収量を増加させることを特徴とする方法。
- [請求項2] バイサルファイト処理を用いるDNAメチル化解析がRRBS (Reduced Representation Bisulfite Sequencing) 法によるものである請求項1記載の方法。
- [請求項3] 1本鎖DNAリガーゼでの処理の前に、バイサルファイト処理後のDNA試料を下記工程：
(a) DNA 5' - , 3' -ホスファターゼまたはDNA 3' -ホスファターゼでの処理、および
(b) DNA 5' -キナーゼでの処理
に付すことを特徴とする請求項1または2記載の方法。
- [請求項4] バイサルファイト処理後のDNA試料が担体に固定化されている、請求項1～3のいずれか1項記載の方法。
- [請求項5] 工程(b)がATPの存在下において行われる、請求項1～4のいずれか1項記載の方法。
- [請求項6] 請求項1～5のいずれか1項記載の方法を実施するためのキットであって、1本鎖DNAリガーゼを含むキット。
- [請求項7] さらにDNA 5' - , 3' -ホスファターゼまたはDNA 3' -ホスファターゼ、およびDNA 5' -キナーゼを含む請求項6記載のキット。

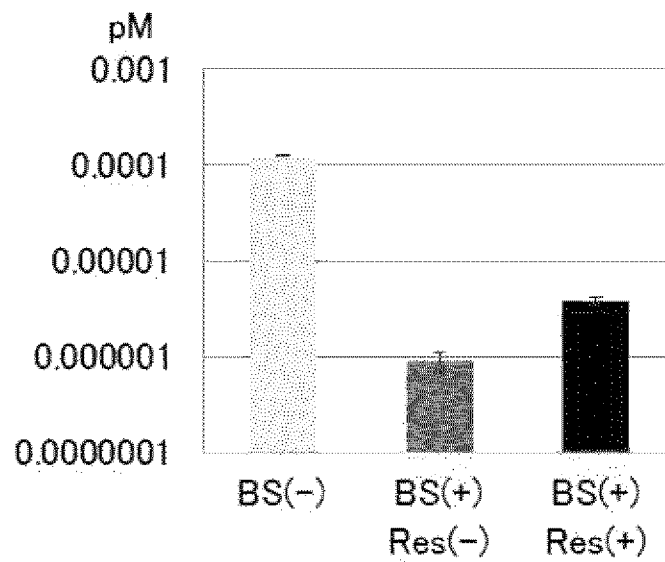
[図1]



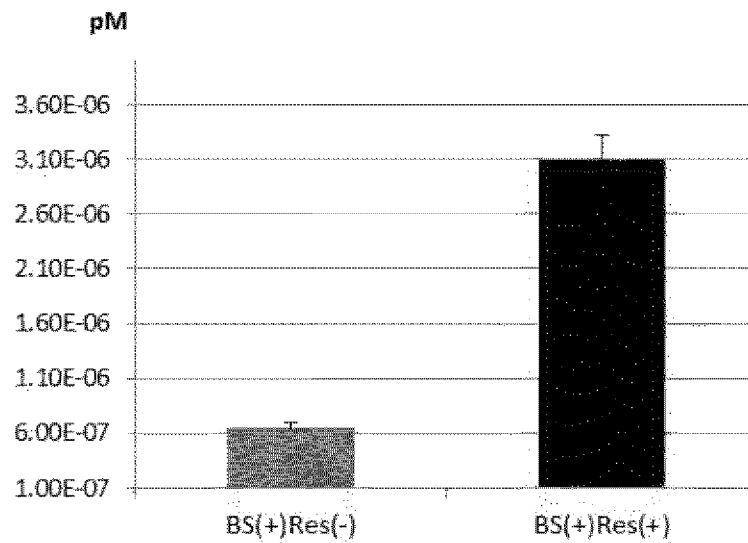
[図2]



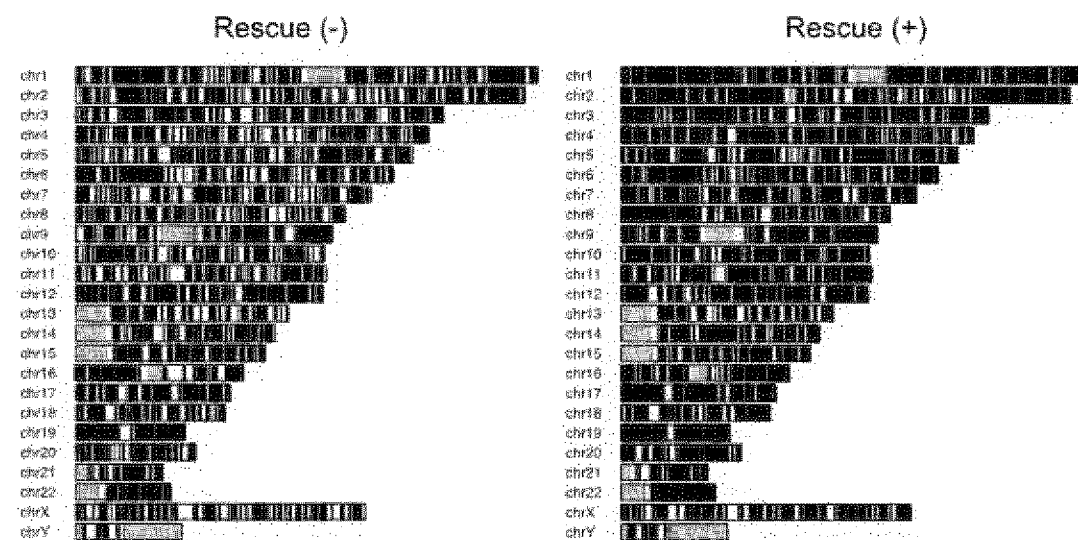
[図3]



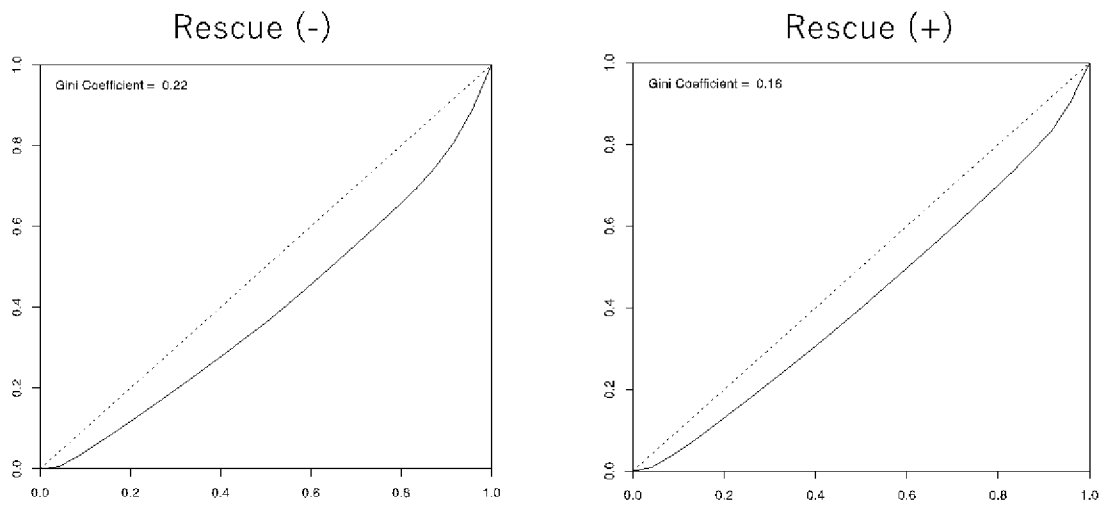
[図4]



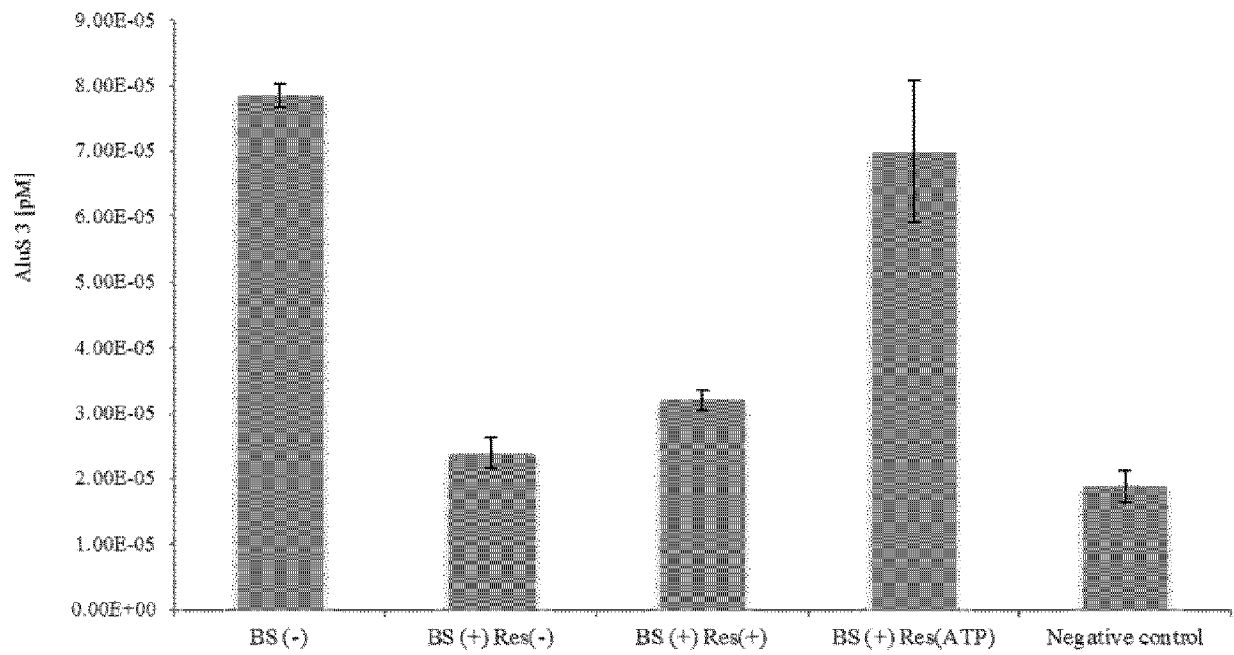
[図5]



[図6]



[図7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/087100

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/68(2006.01)i, C12Q1/25(2006.01)i, C12Q1/42(2006.01)i, C12Q1/48(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q1/68, C12Q1/25, C12Q1/42, C12Q1/48, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 2007-525963 A (Illumina, Inc.), 13 September 2007 (13.09.2007), example X; paragraphs [0354] to [0357]; fig. 21 & WO 2005/003304 A2 example X; page 128, 4th paragraph to page 129, 2nd paragraph; fig. 21 & US 2005/0037393 A1 & EP 2264188 A1	1, 3-7/2-7
Y	GUO H., ET AL, Single-cell methylome landscapes of mouse embryonic stem cells and early embryos analyzed using reduced representation bisulfite sequencing., Genome Res., 2013, Vol.23, No.12, p.2126-2135, page 2132, right column, 2nd paragraph, Figure 1	2-7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
20 February 2017 (20.02.17)

Date of mailing of the international search report
28 February 2017 (28.02.17)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12Q1/68(2006.01)i, C12Q1/25(2006.01)i, C12Q1/42(2006.01)i, C12Q1/48(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12Q1/68, C12Q1/25, C12Q1/42, C12Q1/48, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 7 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 7 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 7 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/Y	JP 2007-525963 A (イルミナ インコーポレイテッド) 2007.09.13, 実施例 X、【0354】 - 【0357】 段落、図 21 & WO 2005/003304 A2, 実施例 X、第 128 頁第 4 段落-第 129 頁第 2 段落、図 21 & US 2005/0037393 A1 & EP 2264188 A1	1, 3-7/2-7
Y	GUO H., ET AL, Single-cell methylome landscapes of mouse embryonic stem cells and early embryos analyzed using reduced	2-7

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 0 . 0 2 . 2 0 1 7

国際調査報告の発送日

2 8 . 0 2 . 2 0 1 7

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

柴原 直司

4 N

3 5 3 4

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
	representation bisulfite sequencing., Genome Res., 2013, Vol.23, No.12, p.2126-2135, 第2132頁右欄第2段落、Figure 1	