(19)日本国特許庁（ＪＰ）　(12) 公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号

特表2003－523752
(P2003－523752A)

(43)公表日 平成15年8月12日(2003.8.12)

(51)Int.Cl^{7}	識別記号	FI		テーマコード（参考）
C 1 2 N 15/09	ZNA	C 1 2 Q 1/68	A	4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 27/62	V	4 B 0 6 3
G 0 1 N 27/62		33/53	M	
33/53		37/00 102		
37/00	102	C 1 2 N 15/00	ZNA A	

審査請求　未請求　予備審査請求（全 36数）

(21)出願番号　特願2001－561769(P2001－561769)
(86)(22)出願日　平成13年2月23日(2001.2.23)
(85)翻訳文提出日　平成14年8月26日(2002.8.26)
(86)国際出願番号　PCT/DE01/00749
(87)国際公開番号　WO01/062961
(87)国際公開日　平成13年8月30日(2001.8.30)
(31)優先権主張番号　100 10 281.6
(32)優先日　平成12年2月25日(2000.2.25)
(33)優先権主張国　ドイツ(DE)

(71)出願人　エピゲノミクス　アーゲー
ドイツ国、デー－10435　ベルリン、カスタニーンアレー　24
(72)発明者　オレク，アレクサンダ
ドイツ国、デー－10115　ベルリン、シュローデルシュトラーセ
(72)発明者　ベルリン，クルト
ドイツ国、デー－14532　スターンスドルフ、マリーンケーフェルヴェーク　4
(74)代理人　弁理士　荒井　鐘司　（外２名）

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＤＮＡプローブにおいてシトシンのメチル化を検出するリガーゼ／ポリメラーゼ法

(57)【要約】
本発明は、ゲノムＤＮＡプローブの中のシトシンのメチル化とＳＮＰｓを同時に検出するのに特に適した方法を提供する。
【解決手段】　ゲノムＤＮＡプローブの中の５－メチルシトシンの検出方法であって、下記ステップ、（ａ）ＤＮＡプローブからのゲノムＤＮＡを化学試薬と反応させ、ここで５－メチルシトシンとシトシンを異なる形で反応させ、そのためにこれらが反応後ＤＮＡ二重らせんにおいて異なる塩基対挙動を示し；（ｂ）プライマーとして少なくとも一つのオリゴヌクレオチド（タイプＡ）およびポリメラーゼを用いて予備処理したＤＮＡを増幅し；（ｃ）一組のオリゴヌクレオチドを増幅した前記ゲノムＤＮＡとハイブリッド化して二重らせんを形成し、ここでこの組のオリゴヌクレオチドはタイプＢとタイプＣのいろいろな種から構成され、そしてタイプＢの前述のハイブリッド化されたオリゴヌクレオチドはその３’－末端基と直接または塩基１０個までの間隔を置いてその位置に隣接し、その位置はゲノムＤＮＡプローブにおけるそのメチル化に関して調べる必要があり、ここで標的分子の第２の領域において第２のオリゴヌクレオチド（タイプＣ）はハイブリッド化されるので、第２のオリゴヌクレオチド（タイプＣ）は個々のヌクレオチドまたは

【特許請求の範囲】

【請求項１】　ゲノムＤＮＡプローブにおいて５－メチルシトシンを検出する方法であって、下記ステップ、

（ａ）ＤＮＡプローブからのゲノムＤＮＡを化学試薬と反応させ、ここで５－メチルシトシンとシトシンを異なる形で反応させ、そのためにこれらが反応後ＤＮＡ二重らせんにおいて異なる塩基対挙動を示し；

（ｂ）プライマーとして少なくとも一つのオリゴヌクレオチド（タイプＡ）およびポリメラーゼを用いて予備処理したＤＮＡを増幅し；

（ｃ）一組のオリゴヌクレオチドを増幅した前記ゲノムＤＮＡとハイブリッド化して二重らせんを形成し、ここでこの組のオリゴヌクレオチドはタイプＢとタイプＣのいろいろな種から構成され、そしてタイプＢの前述のハイブリッド化されたオリゴヌクレオチドはその３’－末端基と直接または塩基１０個までの間隔を置いてその位置に隣接し、その位置はゲノムＤＮＡプローブにおけるそのメチル化に関して調べる必要があり、ここで標的分子の第２の領域において第２のオリゴヌクレオチド（タイプＣ）はハイブリッド化されるので、第２のオリゴヌクレオチド（タイプＣ）は個々のヌクレオチドまたは１０個までのヌクレオチドに存在するある大きさの単位の空所を介して第１のハイブリッド化されたオリゴヌクレオチド（タイプＢ）の３’－末端基により前述の選択された位置の部位において分離され；

（ｄ）ｎ個のヌクレオチドの周知の配列を用いて、せいぜいヌクレオチドの数のポリメラーゼを介してオリゴヌクレオチド（タイプＢ）の長さを拡大し、ポリメラーゼはタイプＢのオリゴヌクレオチドの３’－末端基とタイプＣのオリゴヌクレオチドの５’－末端基の間にあり、ここで長さの拡大はゲノムＤＮＡプローブにおけるそれぞれのシトシンのメチル化の状況に依存し；

（ｅ）リガーゼの存在下で前記オリゴヌクレオチドを一定温度で培養し、ここでポリメラーゼ反応による長さが拡大したタイプＢの第１のオリゴヌクレオチドとタイプＣの第２のオリゴヌクレオチドは隣接して結合し、それにより連結生成物が得られる。ただし、これは、タイプＢのオリゴヌクレオチドの長さが拡大する先行のステップにおいて、長さが拡大されたオリゴヌクレオチドの存在する３

’－ヒドロキシ官能基を有する３’－末端基が、タイプＣの前記オリゴヌクレオチドの５’－末端基に、直接、隣接しているように生じる場合に起こり；

（ｆ）連結生成物が生成しているか否か検出する；

を行うことを特徴とする前記方法。

【請求項２】　請求項１に記載の方法において、前記第１オリゴヌクレオチド（タイプＢ）の５’－末端基が固相に固定されていることを特徴とする前記方法。

【請求項３】　請求項１に記載の方法において、前記第２オリゴヌクレオチド（タイプＣ）の３’－末端基が固相に固定されていることを特徴とする前記方法。

【請求項４】　請求項１に記載の方法において、ステップｂにおいてつくられた前記増幅体が規定された部位で固相に結合していることを特徴とする前記方法。

【請求項５】　請求項４に記載の方法において、前記増幅において少なくとも一つのプライマー（タイプＡ）が固相に結合していることを特徴とする前記方法。

【請求項６】　請求項１，４または５に記載の方法において、様々な増幅体が固相において直角格子または六角格子の形で配置されている前記方法。

【請求項７】　請求項２から６までのいずれか一つの項に記載の方法において、様々なオリゴヌクレオチド配列が平らな固相において直角格子または六角格子の形で配置されている前記方法。

【請求項８】　請求項２から７までのいずれか一つの項に記載の方法において、長さが拡大された前記オリゴヌクレオチドに取り付けられたマーキングにより前記固相の各位置において、オリゴヌクレオチド配列があることが識別できる前記方法。

【請求項９】　請求項２から８までのいずれか一つの項に記載の方法において、前記固相表面がケイ素，ガラス，ポリスチレン，アルミニウム，鋼，鉄，銅，ニッケル，銀または金からなることを特徴とする前記方法。

【請求項１０】　前項までの請求項のいずれか一つの項に記載の方法におい

て、前記増幅に先だってＤＮＡの処理を重亜硫酸塩溶液（＝ジ亜硫酸塩，水素亜硫酸塩）を用いて行うことを特徴とする前記方法。

【請求項１１】　前項までの請求項のいずれか一つの項に記載の方法において、前記増幅がポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）により行われることを特徴とする前記方法。

【請求項１２】　前項までの請求項のいずれか一つの項に記載の方法において、用いたタイプＡのオリゴヌクレオチドには、前記塩基Ｔ，ＡおよびＣ、または前記塩基Ｔ，ＡおよびＧのみが含まれていることを特徴とする前記方法。

【請求項１３】　前項までの請求項のいずれか一つの項に記載の方法において、用いた前記タイプＢおよび／またはタイプＣのオリゴヌクレオチドには、前記塩基Ｔ，ＡおよびＣ、または前記塩基Ｔ，ＡおよびＧのみが含まれていることを特徴とする前記方法。

【請求項１４】　前項までの請求項のいずれか一つの項に記載の方法において、前記連結生成物および／または長さを拡大した生成物は、検出のために、検出可能なマーキングを具備していることを特徴とする前記方法。

【請求項１５】　前項までの請求項のいずれか一つの項に記載の方法において、前記マーキングが蛍光マーキングであることを特徴とする前記方法。

【請求項１６】　請求項1から１４までのいずれか一つの項に記載の方法において、前記マーキングが放射性核種であることを特徴とする前記方法。

【請求項１７】　請求項1から１４までのいずれか一つの項に記載の方法において、前記マーキングが解離可能な質量マーキングであり、前記質量マーキングが質量分析計で検出できることを特徴とする前記方法。

【請求項１８】　請求項1から１４までのいずれか一つの項に記載の方法において、長さを拡大された前記オリゴヌクレオチドと連結生成物を合わせて、マススペクトルメーターにおいて検出でき、したがって、その質量により一義的にマーキングできる前記方法。

【請求項１９】　請求項1から１４までのいずれか一つの項に記載の方法において、それぞれ、長さの拡大および／または連結されたオリゴヌクレオチドのフラグメントがマススペクトルメーターにおいて検出できることを特徴とする前

記方法。

【請求項２０】　請求項１９に記載の方法において、一つまたはいくつかのエキソヌクレアーゼまたはエンドヌクレアーゼを用いた加水分解によりフラグメントをつくることを特徴とする前記方法。

【請求項２１】　請求項１９または２０に記載の方法において、質量分光器における検出感度を上げるために生成したフラグメントに個々の正電荷と負電荷があることを特徴とする前記方法。

【請求項２２】　前項までの請求項のいずれか一つの項に記載の方法において、長さを拡大された前記オリゴヌクレオチドおよび／または連結生成物の検出をマトリックス・アシスト・レーザー脱着／イオン化質量分光法（ＭＡＬＤＩ）または電子スプレイ質量分光法（ＥＳＩ）によって行い且つビジュアル化することを特徴とする前記方法。

【請求項２３】　前項までの請求項のいずれか一つの項に記載の方法において、前記ポリメラーゼが耐熱性のＤＮＡ－ポリメラーゼおよび／または前記リガーゼが熱安定性のリガーゼである前記方法。

【請求項２４】　前項までの請求項のいずれか一つの項に記載の方法において、さらに、ＤＮＡのメチル化に加えて、ＳＮＰｓも検出し且つビジュアル化する前記方法。

【請求項２５】　前項までの請求項のいずれか一つの項に記載の方法において、用いたヌクレオチドが期間限定されたヌクレオチド（タイプＤ２）および／または鎖長拡大ヌクレオチド（タイプＤ１）である前記方法。

【請求項２６】　請求項２５に記載の方法において、連鎖期間限定ヌクレオチド（タイプＤ２）が一つのグループから選択され、一つのグループは塩基ＴとＣ、または塩基ＧとＡが含まれている前記方法。

【請求項２７】　請求項２５または２６に記載の方法において、鎖長拡大ヌクレオチド（タイプＤ１）が一つのグループから選択され、一つのグループはヌクレオベースＡ，ＴとＣ、またはＧとＡとＴが含まれている前記方法。

【請求項２８】　請求項２７に記載の方法において、前記蛍光マーキングされたｄＣＴＰ誘導体がＣｙ３－ｄＣＴＰまたはＣｙ５－ｄＣＴＰのであることを

特徴とする前記方法。

【請求項２９】　前項までの請求項のいずれか一つの項に記載の方法において、いくつかのＤＮＡ切片の増幅が反応において行われることを特徴とする前記方法。

【請求項３０】　請求項１に記載の方法において、ステップａ）でゲノムＤＮＡがＤＮＡ－プローブから得られ、ここでＤＮＡの源は、たとえば、細胞株，血液，痰，便，尿，脳脊髄液，パラフィンに埋め込んだ組織，組織的スライドガラスおよびこれらの可能なすべての組み合わせが含まれていることを特徴とする前記方法。

【請求項３１】　前項までの請求項のいずれか一つの項に記載の方法において、ステップｄで長さを拡大したタイプＢのオリゴヌクレオチドの３’－末端基はヌクレオチド２’－デスオキシアデノシンにより形成し、前記アデノシン誘導体はその３’－ヒドロキシ基によりステップｅで連結が可能になり、一方、２’，３’－ジデスオキシグアノシンはオリゴヌクレオチドの３’－末端基で連結を行うことができないことを特徴とする前記方法。

【請求項３２】　前項までの請求項のいずれか一つの項に記載の方法において、ステップｄで長さを拡大したタイプＢのオリゴヌクレオチドの３’－末端基はヌクレオチド２’－デスオキシアデノシンにより形成し、前記アデノシン誘導体はその３’－ヒドロキシ基によりステップｅで連結が可能になり、一方、２’，３’－ジデスオキシアデノシンはオリゴヌクレオチドの３’－末端基で連結を行うことができないことを特徴とする前記方法。

【請求項３３】　前項までの請求項のいずれか一つの項に記載の方法において、ステップｄで長さを拡大したタイプＢのオリゴヌクレオチドの３’－末端基はヌクレオチドを介してチミジンを形成し、前記チミジンはその３’－ヒドロキシ基によりステップｅで連結が可能になり、一方、２’，３’－ジデスオキシシチジンはオリゴヌクレオチドの３’－末端基で連結を行うことができないことを特徴とする前記方法。

【請求項３４】　前項までの請求項のいずれか一つの項に記載の方法において、ステップｄで長さを拡大したタイプＢのオリゴヌクレオチドの３’－末端基

はヌクレオチド２’－デスオキシシチジンにより形成し、前記シチジン誘導体はその３’－ヒドロキシ基によりステップｅで連結が可能になり、一方、２’，３’－ジデスオキシチミジンはオリゴヌクレオチドの３’－末端基で連結を行うことができないことを特徴とする前記方法。

【請求項３５】　前項までの請求項のいずれか一つの項に記載の方法において、上下のＤＮＡ－ストランドのメチル化分析を同時に行う前記方法。

【請求項３６】　請求項１に記載の方法において、前記ステップｃ－ｅを溶液中で行い、連結されたオリゴヌクレオチドを検出するために固相に取り付けることを特徴とする前記方法。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【発明の属する技術分野】

本発明はゲノムＤＮＡ－プローブにおいて５－メチルシトシンを検出する方法に関する。

【０００２】

【従来の技術】

分子生物学における最近の方法論的開発によりよく研究され観察された面は、遺伝子自身，これらの遺伝子のＲＮＡへの翻訳およびＲＮＡから生成するタンパク質である。個体が発達する過程でその個体の遺伝子にスイッチが入れられると、特定の細胞や組織の特定の遺伝子の活性化や阻害が制御される方法は、遺伝子またはゲノムのメチル化の規模と特性と相関関係がある。この仮定が当然正しい限り、変更したメチル化モデルにおけるパソーゲン状態個々の遺伝子またはゲノムが現れる。

【０００３】

本発明の発明には、ゲノムのＤＮＡプローブのメチル化状態の検出方法が記載されている。この方法は同時に点突然範囲の検出および単一ヌクレオチド多形性（ＳＮＰｓ）を利用することができる。

【０００４】

５－メチルシトシンは真核細胞のＤＮＡにおいて最も頻繁に共有結合的に修飾された塩基である。これらの塩基は、たとえば、遺伝子インプリンティング（Ｉｍｐｒｉｎｔｉｎｇ）に際して転写の規制および腫瘍発生においてある役割を果たしている。遺伝情報の成分としての５－メチルシトシンの識別は、したがって、かなり興味深いことである。しかし、５－メチルシトシンの位置は、５－メチルシトシンがシトシンと同じ塩基対挙動をするので、配列決定により識別することはできない。それだけでなく、ＰＣＲ増幅の際に５－メチルシトシンが持っている後成学の情報が完全に失われる。

【０００５】

相対的に新しく且つその間に５－メチルシトシンについてＤＮＡの研究に最も

頻繁に用いられた方法は、シトシンと重亜硫酸塩の特異的反応に基づいており、シトシンは次いで行われるアルカリ性加水分解によりウラシルに変換され、ウラシルはその塩基対挙動においてチミジンに対応している。一方、５－メチルシトシンはこのような条件下では修飾されない。したがって、元のＤＮＡは転化されるので、本来シトシンのハイブリッド化特性によってシトシンと区別できないメチルシトシンは、今や「普通の」分子生物学的技法により、たとえば、増幅やハイブリッド化または配列決定により唯一の残留シトシンとして検出することができる。これらすべての技法は、塩基対に基づくものであり、今では完全に利用されている。感度に関係する技術水準は、調査対象のＤＮＡがアガロース・マトリックスに閉じ込められている方法により規定され、それによりＤＮＡ（重亜硫酸塩ＤＮＡの個々のストランドとのみ反応する）の拡散や再生は阻害され、すべての沈殿操作や精製工程は迅速な透析により置換される（Ｏｌｅｋ，Ａ．ら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ．Ｒｅｓ．１９９６，２４，５０６４－５０６６）。この方法を用いると、個々の細胞の研究について、この方法のポテンシャルの程度を具体的に示すことができる。とくに、これまでは個々の領域のみ約３０００塩基対の長さまで研究できたが、メチル化分析が可能な数千までの細胞の包括的な研究はできない。とはいうものの、この方法では、少量のプローブからなる非常に小さなフラグメントでは信頼できる分析はできない。このフラグメントは拡散に対する保護があってもマトリックスにより失われる。５－メチルシトシンを検出する周知の別の可能性に関する概要は、下記論文から引用することができる：Ｒｅｉｎ，Ｔ．ＤｅＰａｍｐｈｉｌｉｓ，Ｍ．Ｌ．，Ｚｏｒｂａｓ，Ｈ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ，Ｒｅｓ．１９９８，２６，２２５５。

【０００６】

重亜硫酸塩法は、これまで、わずかな例外（たとえば、ｚ．Ｂ．Ｚｅｃｈｎｉｇｋ，Ｍ．ら、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｈｕｍ．Ｇｅｎ．１９９７，５，９４－９８）を除いて、学術研究のみに使われてきた。しかし、最近は、周知の遺伝子の特異的切片が重亜硫酸塩処理の後増幅され、完全な配列決定（Ｏｌｅｋ，Ａ．およびＷａｌｔｅｒ，Ｊ．，Ｎａｔ．Ｇｅｎｅｔ．１９９７，１７，２７５－２７６）または「プライマー拡張反応による個々のシトシンの位置（Ｇｏｎｚａｌｇｏ，Ｍ．

L．およびJｏｎｅｓ，P．A．，Nｕｃｌ．Aｃｉｄｓ Rｅｓ．１９９７，２５，２５２９－２５３１）（WO特許９５００６６９）」または酵素切断（Xｉｏｎｇ，Z．およびLａｉｒｄ，P．W．，Nｕｃｌ．Aｃｉｄｓ Rｅｓ．１９９７，２５，２５３２－２５３４）で検出された。それに加えて、ハイブリッド化による検出方法も記載されている（Oｌｅｋら、WO ９９ ２８４９８）。

【０００７】

個々の遺伝子のメチル化の検出に重亜硫酸塩法の適用に取り組んでいる別の刊行物には、Xｉｏｎｇ，Z．およびLａｉｒｄ，P．W．（１９９７），Nｕｃｌ．Aｃｉｄｓ Rｅｓ．２５，２５３２；Gｏｎｚａｌｇｏ，M．L．およびJｏｎｅｓ，P．A．（１９９７），Nｕｃｌ．Aｃｉｄｓ Rｅｓ．２５，２５２９；Gｒｉｇｇ，S．およびCｌａｒｋ，S．（１９９４），Bｉｏａｓｓａｙｓ １６，４３１；Zｅｓｃｈｎｉｋ，M．ら（１９９７），Hｕｍａｎ Mｏｌｅｃｕｌａｒ Gｅｎｅｔｉｃｓ ６，３８７；Tｅｉｌ，R．ら（１９９４）、Nｕｃｌ．Aｃｉｄｓ Rｅｓ．２２，６９５；Mａｒｔｉｎ，V．ら（１９９５）、Gｅｎｅ １５７，２６１；WO ９７ ４６７０５，WO ９５ １５３７３およびWO ４５５６０ がある。

【０００８】

オリゴマー・アレイ製造における技術水準に関する概要は、１９９９年1月に発行されたNａｔｕｒｅ Gｅｎｅｔｉｃｓの特別号（Nａｔｕｒｅ Gｅｎｅｔｉｃｓ Sｕｐｐｌｅｍｅｎｔ，Vｏｌ．21，Jａｎｕａｒｙ １９９９）およびそこで引用された文献から取り出すことができる。

【０００９】

ＤＮＡを固定化するためにはいろいろな方法がある。周知の方法はＤＮＡの固定結合で、ＤＮＡはストレプタビディンをコーティングした表面でビオチンを用いて機能化される（Uｈｌｅｎ，M．ら、１９８８，Nｕｃｌｅｉｃ Aｃｉｄｓ Rｅｓ．１６，３０２５－３０３８）。このシステムの結合強度は共有化学結合の強度に相当する。標的ＤＮＡを化学的に予備処理した表面に共有結合させられるためには、標的ＤＮＡの対応する官能基を必要とする。ＤＮＡ自身には、

適切な官能基はない。標的ＤＮＡに適切な官能基を導入する種々の変形態様がある：すなわち、２個の容易に操作できる官能基は１級脂肪族アミンとチオールである。この種のアミンは、Ｎ－ヒドロキシこはく酸イミドエステルと定量的に反応し、一方、チオールは適切な条件下で沃化アルキルと定量的に反応する。このような官能基をＤＮＡに導入するのは困難である。最も簡単な変形態様は、ＰＣＲのプライマーによる導入である。５’－修飾プライマー（NH_2およびＳＨ）および２官能性結合剤を用いる変形態様がある。

【００１０】

表面への固定化の本質的な要素はその性状である。今まで述べたシステムは主としてケイ素と金属からなる。標的ＤＮＡへの結合を形成する別の方法は、表面に固定されたオリゴヌクレオチドとハイブリッド化する標的ＤＮＡにおいて短い認識配列（たとえば、塩基数２０個）を用いることである。標的ＤＮＡに化学的に活性化された位置を導入する酵素的変形態様にも言及されている。この場合、標的ＤＮＡにおいて５’－NH_2－基の導入が酵素を用いて行われる。

【００１１】

固定されたＤＮＡ－アレイを走査する場合、種々の蛍光でマーキングされたゾンデが使われる。蛍光マーキングとしてとくに適切なのは、それぞれのゾンデの５’－ＯＨにおけるＣｙ３およびＣｙ５染料の取付である。ハイブリッド化されたゾンデの蛍光の検出は、たとえば、共焦点顕微鏡によって行われる。Ｃｙ３やＣｙ５染料などは商業的に入手できる。

【００１２】

オリゴマー・アレイ製造における技術水準に関する概要は、１９９９年１月に発行されたＮａｔｕｒｅ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓの特別号（Ｎａｔｕｒｅ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ，Ｖｏｌ．２１，Ｊａｎｕａｒｙ　１９９９）およびそこで引用された文献、および非特異的背景信号を減らすことにより、オリゴヌクレオチドのような標的分子に関する固体キャリアーの製造方法に関する米国特許第５９９４０６５号から取り出すことができる。

【００１３】

突然変異を検出する新しい方法は、以下の文献で取りあげられている：

配列決定の特別な場合として、個々の塩基－プライマー－拡大（遺伝子ビット［Ｂｉｔ］分析）は言及に値する（Ｈｅａｄ，ＳR．，Ｒｏｇｅｒｓ，YH．，Ｐａｒｉｋｈ K．，Ｌａｎ，Ｇ．，Ａｎｄｅｒｓｏｎ．Ｓ．，Ｇｏｅｌｅｔ，Ｐ．，Ｂｏｙｃｅｊａｃｉｎｏ MT．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ．２５（２４）；５０６５－５０７１，１９９７；Ｐｉｃｏｕｌｔ-Ｎｅｗｂｅｒｇ，Ｌ．，Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｓ．９（2）：１６７－１７４，１９９９）。増幅と配列決定の組み合わせは、米国特許第５９２８９０６号に記載され、そこではマトリックス分子に対する塩基特異的期間限定が使われている。さらに別の方法では、ヌクレオチドの識別にリガーゼ／ポリメラーゼ反応が使われている（米国特許第５９５２１７４号）。

【００１４】

マトリックス・アシスト・レーザー脱着／イオン化質量分光法（ＭＡＬＤＩ）は、バイオ分子の分析に関する非常に性能のよい方法である（Ｋａｒａｓ，M.およびＨｉｌｌｅｎｋａｍｐ，Ｆ．（１９８８），１００００ドールトンを超えた分子量を有するタンパク質のレーザー脱着イオン化，Ａｎａｌ． Ｃｈｅｍ. ６０：２２９９－２３０１）。分析対象物質は、光吸収性マトリックスに埋め込まれる。短いレーザー・パルスによりマトリックスは蒸発し、分析対象分子は分解せずに気相に運ばれる。マトリックス分子との衝突により分析対象物質はイオン化する。印加された電圧が場のない飛行管内でイオンを加速する。種々の質量に基づいてイオンは様々に加速される。小さなイオンは大きなイオンよりも速く検出器に到達する。

【００１５】

Ｍａｌｄｉはペプチドやタンパク質の分析によく適合している。拡散の分析はやや難しく（Ｇｕｔ，Ｉ．Ｇ．およびＢｅｃｋ，Ｓ．(１９９５)，DNAおよびマトリックス・アシスト・レーザー脱着／イオン化質量分光法。分子生物学：現在の技術革新と将来のトレンド　１：１４７－１５７）。拡散の場合、ペプチドの場合より感度が１００倍悪く、フラグメントのサイズが大きくなると、均衡がとれないほど減少する。いろいろ負に荷電した骨格を有する核酸では、マトリックスによるイオン化は本質的には有効ではない。ＭＡＬＤＩでは、マトリックス

の選択が重要な役割を果たす。ペプチドの脱着では、二三の非常に性能のよいマトリックスが発見され、これらのマトリックスでは非常に細かい結晶が得られる。ＤＮＡでは、平均的期間に二三反応を示すマトリックスがあるが、それにより感度の区別は低下しない。ＤＮＡを化学的に修飾するとＤＮＡはペプチドに似た物質になり、感度の区別を低下させることができる。

【００１６】

ホスホロチオエート核酸では、骨格の普通のホスフェートは、チオホスフェートにより置換され、簡単なアルキル化の化学により荷電中和ＤＮＡに変換することができる（Ｇｕｔ，Ｉ．Ｇ．およびＢｅｃｋ，Ｓ．（１９９５），ＤＮＡの選択的アルキル化および質量分光法による検出の手順，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ． ２３：１３６７－１３７３）。この修飾されたＤＮＡにおける「電荷タグ」の結合により、感度がペプチドの場合に発見される程度に上昇する結果になる。「電荷とタギング」の別の利点は、不純物に対する分析対象物質の安定性が向上することで、不純物は非修飾基質の検出をひどく困難にする。

【００１７】

ゲノムＤＮＡは、標準的方法により細胞，組織またはその他のテスト試料のＤＮＡから得られる。この標準的方法は、Ｆｒｉｔｓｃｈ、およびＭａｎｉａｔｉｓ編の分子クローニング：ラボラトリー・マニュアル，１９８９などの文献に記載されている。

【００１８】

プロモーターの間の共通点は、ＴＡＴＡ－ボックスやＧＣ－ボックスの存在においてのみではなく、それらを転写する場合プロモーターには結合部位があり、その間隔でこれらは互いに見つける。特定のタンパク質の既存の結合部位はタンパク質の配列が完全に一致しておらず、少なくとも４つの塩基からなる保存された結果があり、これら４つの塩基は「ウッブルス(Ｗｏｂｂｌｅｓ)」挿入により、すなわち、それぞれ様々な塩基が存在する位置において、まだ長さを拡大することができる。さらに、これの結合部位は互いに特定の間隔で存在する。

【００１９】

核容積の大部分を占めるクロマチン界面におけるＤＮＡの分割は、全く特殊な

順番で行われる。したがって、核マトリックスにおけるいくつかの部位でＤＮＡは核メンブランの内側にフィラメント状の構造で取り付けられる。この領域はマトリックス取付領域（ＭＡＲ）またはスカフフォールド(ｓｃａｆｆｏｌｄ)取付領域（ＳＡＲ）と呼ばれる。この取付は、本質的には転写または複製への影響がある。このＭＡＲ－フラグメントには保存された配列はなく、７０％まではＡまたはＴから構成され、ｃｉｓ行動の近くにあり、この領域では、一般に、転写は規制され、そしてトポイソメラーゼ(Ｔｏｐｏｉｓｏｍｅｒａｓｅ)ＩＩ－認識部位である。

【００２０】

プロモーターとエンハンサーのほかに、種々の遺伝子に関する別の規制エレメント、いわゆるインシュレーターが存在する。このインシュレーターは、たとえば、プロモーターに対するエンハンサーの作用を防止することができる。これは、インシュレーターがエンハンサーとプロモーターの間にある場合、またはヘテロクロマチンと遺伝子の間にある場合に生じ、活性な遺伝子がヘテロクロマチンに影響を受ける前に保護する。たとえば、このようなインシュレーターとして、１．いわゆるＬＣＲ（遺伝子座制御領域）、ＬＣＲはＤＮＡａｓｅ Ｉに比べて過敏感ないくつかの部位からなり；２．ＳＣＳ（特殊なクロマチン構造）またはＳＣＳ’，長さ３５０または２００ｂｐおよびＤＮＡａｓｅ Ｉによる変質に対して高い耐久性および過敏感な部位の両側に並ぶ（間隔はそれぞれ１００ｂｐ）。ＳＣＳ’には、タンパク質ＢＥＡＦ－３２が結合している。これらのインシュレーターは前記遺伝子の両面に存在することができる。

【００２１】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、ゲノムＤＮＡプローブ中のシトシンのメチル化とＳＮＰｓを同時に検出するのにとくに適した方法を提供することである。その際、多数のフラグメントを同時に調べられるのが好ましい。

【００２２】

【課題を解決するための手段】

この課題は、この発明では、ゲノムＤＮＡプローブ中の５－メチルシトシンを

検出する方法により解決され、ここでは以下のステップが行われる：

（ａ）ＤＮＡ－プローブからのゲノムＤＮＡを試薬と化学的に反応させ、ここで５－メチルシトシンとシトシンは違った形で反応させ、したがって、これらは反応後ＤＮＡ二重らせんにおいて違った塩基対挙動を示し；

（ｂ）プライマーとして少なくとも一つのオリゴヌクレオチド（タイプA）およびポリメラーゼを用いて予備処理したＤＮＡを増幅し；

（ｃ）一組のオリゴヌクレオチドをハイブリッド化し、増幅されたゲノムＤＮＡから二重らせんを形成し、ここでこの組のオリゴヌクレオチドをタイプＢとタイプＣの種々の種から構成し、ここで、タイプＢの前述のハイブリッド化されたオリゴヌクレオチドはその３’－末端基と直接または塩基１０個までの間隔において位置に隣接し、この位置はゲノムＤＮＡ－プローブにおけるメチル化について調査し、そして第２のオリゴヌクレオチド（タイプC）は標的分子の第２の領域でハイブリッド化するので、第２のオリゴヌクレオチド（タイプC）の５’－末端基は個々のヌクレオチドまたは１０個までのヌクレオチドの隙間を介して第１のハイブリッド化されたオリゴヌクレオチド（タイプB）の３’－末端基により前述の選択された部位において分離され；

（ｄ）ｎ個のヌクレオチドからなる周知の配列を用いたオリゴヌクレオチド（タイプB）の長さの拡大は、せいぜいヌクレオチドと同数のポリメラーゼを介して行い、ポリメラーゼはタイプＢのオリゴヌクレオチドの３’－末端基とタイプＣのオリゴヌクレオチドの５’－末端基の間にあり、ここで長さの拡大はゲノムＤＮＡプローブのそれぞれのシトシンのメチル化状況に依存し；

（ｅ）リガーゼの存在下で前記オリゴヌクレオチドを一定温度で培養し、ここでポリメラーゼ反応による長さが拡大したタイプＢの第１のオリゴヌクレオチドとタイプＣの第２のオリゴヌクレオチドは隣接して結合し、それにより連結生成物が得られる。ただし、これは、タイプＢのオリゴヌクレオチドの長さが拡大する先行のステップにおいて、長さが拡大されたオリゴヌクレオチドの存在する３’－ヒドロキシ官能基を有する３’－末端基が、タイプＣの前記オリゴヌクレオチドの５’－末端基に、直接、隣接しているように生じる場合に起こり；

（ｆ）連結生成物が生成しているか否か検出する。

【００２３】

その際、本発明では第１オリゴヌクレオチド（タイプB）の５’－末端基が固相に固定されているか、または前記第２オリゴヌクレオチド（タイプC）の３’－末端基が固相に固定されていることが好ましい。

【００２４】

本発明では、さらに、ステップｂにおいてつくられた前記増幅体が規定された部位で固相に結合していることが好ましい。その際、とくに、増幅において少なくとも一つのプライマー（タイプA）が固相に結合していることが好ましい。

【００２５】

さらに、様々な増幅体が固相において直角格子または六角格子の形で配置されているのが好ましい。

【００２６】

さらに、様々なオリゴヌクレオチド配列が平らな固相において直角格子または六角格子の形で配置されているのが好ましい。

【００２７】

長さが拡大された前記オリゴヌクレオチドに取り付けられたマーキングにより、前記固相の各位置において、オリゴヌクレオチド配列があることが識別できることも好ましい。

【００２８】

この発明では、さらに、固相表面が、ケイ素，ガラス，ポリスチレン，アルミニウム，鋼，鉄，銅，ニッケル，銀または金からなることが好ましい。

【００２９】

増幅の前の処理を重亜硫酸塩溶液（＝ジ亜硫酸塩，水素亜硫酸塩）を用いて行うことは、とくに、好ましい。

【００３０】

この発明では、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）による増幅が行われることは好ましい。

【００３１】

さらに、用いたタイプAのオリゴヌクレオチドには、塩基Ｔ，AおよびC、ま

たは塩基Ｔ，ＡおよびＧのみが含まれ、および／または用いたタイプＢおよび／またはタイプＣのオリゴヌクレオチドには、塩基Ｔ，ＡおよびＣ、または塩基Ｔ，ＡおよびＧのみが含まれている。

【００３２】

さらに、連結生成物および／または長さを拡大した生成物は、検出のために、検出可能なマーキングを具備していることはとくに好ましい。その際、マーキングが蛍光マーキングであるか、またはマーキングが放射性核種であるか、またはマーキングが解離可能な質量マーキングであり、質量マーキングがマススペクトルメーターで検出できることはとくに好ましい。

【００３３】

その際、長さを拡大されたオリゴヌクレオチドおよび連結生成物を合わせて、マススペクトルメーターにおいて検出でき、したがって、その質量により一義的にマーキングできることも好ましい。さらに、この発明では、それぞれ、長さの拡大および／または連結されたオリゴヌクレオチドのフラグメントがマススペクトルメーターにおいて検出できることが好ましい。

【００３４】

さらに、この発明の方法では、一つまたはいくつかのエキソヌクレアーゼまたはエンドヌクレアーゼを用いた加水分解によりフラグメントをつくることが好ましい。この際、とくに好ましいのは、質量分光器における検出感度を上げるために生成したフラグメントに個々の正電荷と負電荷があることである。

【００３５】

この発明の方法では、さらに、長さを拡大された前記オリゴヌクレオチドおよび／または連結生成物の検出をマトリックス・アシスト・レーザー脱着／イオン化質量分光法（ＭＡＬＤＩ）または電子スプレイ質量分光法（ＥＳＩ）によって行い且つビジュアル化することが好ましい。

【００３６】

ここで、ポリメラーゼが耐熱性のＤＮＡ－ポリメラーゼか、および／またはリガーゼが熱安定性のリガーゼである方法も好ましい。

【００３７】

さらに、ＤＮＡのメチル化に加えて、ＳＮＰｓも検出し且つビジュアル化する方法は好ましい。

【００３８】

ここで、用いたヌクレオチドが期間限定ヌクレオチド（タイプＤ２）および／または鎖長拡大ヌクレオチド（タイプＤ１）である方法も好ましい。この場合、連鎖鎖長を定められたヌクレオチド（タイプＤ２）が一つのグループから選択され、一つのグループは塩基ＴとＣ、または塩基ＧとＡが含まれ、および／または鎖長拡大ヌクレオチド（タイプＤ１）が一つのグループから選択され、一つのグループは塩基Ａ，ＴとＣ、または塩基ＧとＡとＴが含まれている方法もとくに好ましい。

【００３９】

蛍光マーキングがＣｙ３－ｄＣＴＰまたはＣｙ５－ｄＣＴＰのｄＣＴＰ誘導体であることも好ましい。

【００４０】

この発明では、いくつかのＤＮＡ－切片の増幅が反応において行われることも好ましい。

【００４１】

ここで、ステップａ）でゲノムＤＮＡがＤＮＡ－プローブから得られ、ここでＤＮＡの源は、たとえば、細胞株，血液，痰，便，尿，脳脊髄液，パラフィンに埋め込んだ組織，組織的スライドガラスおよびこれらの可能なすべての組み合わせが含まれていることはこの発明の方法ではとくに好ましい。

【００４２】

そのほかに、この発明では、タイプＢのステップｄで長さを拡大したオリゴヌクレオチドの３’－末端基はヌクレオチド２’－デスオキシアデノシンにより形成し、前記アデノシン誘導体はその３’－ヒドロキシ基によりステップｅで連結が可能になり、一方、２’，３’－ジデスオキシグアノシンはオリゴヌクレオチドの３’－末端基で連結を行うことができず、および／または、ステップｄで長さを拡大したタイプＢのオリゴヌクレオチドの３’－末端基はヌクレオチド２’－デスオキシアデノシンにより形成し、前記アデノシン誘導体はその３’－ヒド

ロキシ基によりステップｅで連結が可能になり、一方、２’，３’－ジデスオキシアデノシンはオリゴヌクレオチドの３’－末端基で連結を行うことができず、および／または、ステップｄで長さを拡大したタイプＢのオリゴヌクレオチドの３’－末端基はヌクレオチドを介してチミジンを形成し、前記チミジン誘導体はその３’－ヒドロキシ基によりステップｅで連結が可能になり、一方、２’，３’－ジデスオキシシチジンはオリゴヌクレオチドの３’－末端基で連結を行うことができず、および／または、ステップｄで長さを拡大したタイプＢのオリゴヌクレオチドの３’－末端基はヌクレオチド２’－デスオキシシチジンにより形成し、前記シチジン誘導体はその３’－ヒドロキシ基によりステップｅで連結が可能になり、一方、２’，３’－ジデスオキシチミジンはオリゴヌクレオチドの３’－末端基で連結を行うことができないことが好ましい。

【００４３】

さらに、この発明では、ＤＮＡの上下のストランドのメチル化分析を同時に行うことが好ましい。

【００４４】

最後に、この発明の方法では、前記ステップｃ－ｅを溶液中で行い、連結されたオリゴヌクレオチドを検出するために固相に取り付けることが好ましい。

【００４５】

ゲノムＤＮＡ－プローブにおいてメチルシトシンを検出する方法についても説明する。

【００４６】

この方法の内容は、ＤＮＡ全体またはこのフラグメントの増幅，ハイブリッド化および長さを拡大する反応が含まれている。この方法は、メチルシトシンの検出および同時に単一ヌクレオチド多形性（ＳＮＰｓ）および突然変異の検出にも利用することができる。

【００４７】

分析対象のゲノムＤＮＡは、たとえば、細胞株，血液，痰，便，尿，脳脊髄液，パラフィンに埋め込んだ組織，組織的スライドガラスおよびこれらの可能なすべての組み合わせなどの普通のＤＮＡ源から得られるのが好ましい。

【００４８】

この方法第１のステップでは、用いたＤＮＡを重亜硫酸塩溶液（＝ジ亜硫酸塩，水素亜硫酸塩）かその他の化学物質を用いて、すべてメチル化シトシンの塩基の５－位置では変わらないので、塩基対挙動について様々な塩基が生成し、一方、５－位置でメチル化シトシンは変わらない。重亜硫酸塩を用いると、メチル化されていないシトシン塩基では付加は行われない。次いで、アルカリ加水分解すると、メチル化されていないシトシン・ヌクレオベースはウラシルに変換される。用いたゲノムＤＮＡは、制限エンドヌクレアーゼを用いた化学処理の前に分解するのが好ましい。

【００４９】

この方法の第２ステップでは、耐熱性ポリメラーゼと少なくとも一つのプライマー（タイプA）を用いて予備処理したＤＮＡを増幅するのが好ましい。このプライマーには、１０－４０個の塩基対が含まれている。

【００５０】

この方法のとくに好適な変形態様では、タイプAのプライマーを用いた増幅はポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を介して行う。

【００５１】

この方法の好適な変形態様では、いくつかのＤＮＡのフラグメントの増幅が反応容器で行われる。これは、いわゆる、複合ＰＣＲであり、いろいろなプライマーにおいてそれぞれ規定されたフラグメントがつくられる。反応容器ではいろいろに規定された増幅が行われる。さらに、この方法のとくに好適な変形態様において、適切なプライマーおよび複製可能なそれぞれいくつかのフラグメントが増幅される。これは、たとえば、フラグメントが、たとえば、ゲノムのそれぞれのエレメントに結合することにより実現される。この方法のとくに好適な変形態様において、プライマーは転写要素結合部位，遺伝子のプロモーターまたはその他の規制されたエレメントに結合する。この方法のとくに好適な変形態様では、固相に結合しているプライマーの長さの拡大により増幅が行われる。複合ＰＣＲは別の意味でいろいろなプライマーを固相の様々に規定された箇所に結合することにより行うことができる。この態様では、増幅は常にそれぞれ相補的プライマー

（たとえば、フォワード・プライマー）の一つのストランドに固定することができ、そしてそれぞれ反対のストランドに対する相補的プライマー（たとえば、リバース・プライマー）は溶液に存在する。

【００５２】

第２のステップのやはり好適な変形態様では、固相は平らで、ここで、様々なオリゴヌクレオチド配列が直角格子または六角格子の形で配置されている。その結果として、固相上の様々な増幅体が直角格子または六角格子の形で配置されている。すでに上で述べたように、この場合いくつかの増幅体が直接固相上でつくられる。

【００５３】

固相表面は、好適には、ケイ素，ガラス，ポリスチレン，アルミニウム，鋼，鉄，銅，ニッケル，銀または金からなる。

【００５４】

この方法のとくに好適な変形態様では、タイプＡのオリゴヌクレオチドには、塩基Ｔ，ＡおよびＣ、または塩基Ｔ，ＡおよびＧのみが含まれている。

【００５５】

この方法の第３のステップでは、２種類のオリゴヌクレオチド、すなわち、増幅されたゲノムＤＮＡの選択された位置にある第１（タイプＢ）と第２（タイプＣ）オリゴヌクレオチドからなる一組のオリゴヌクレオチドをハイブリッド化する。第１のオリゴヌクレオチド（タイプＢ）は、第１の領域において調査対象の標的配列がその３’－末端基と直接または塩基１０個までの間隔において位置に隣接するようにハイブリッド化された、プライマーであり、ゲノムＤＮＡ－プローブにおけるメチル化に関して調べられている。第２のオリゴヌクレオチド（タイプＣ）は標的分子の第２の領域でハイブリッド化するので、第２のオリゴヌクレオチド（タイプＣ）の５’－末端基は個々のヌクレオチドまたは１０個までのヌクレオチドの隙間を介して第１のハイブリッド化されたオリゴヌクレオチド（タイプＢ）の３’－末端基により前述の選択された部位において分離される。

【００５６】

増幅体は、タイプＢのオリゴヌクレオチドとその５’－末端基またはその他の

塩基または固相と結合している背骨を介してハイブリッド化し、その３’－末端基を介してハイブリッド化することはできない。好適には５’－末端基を介して結合する。好適な変形態様では、固相は平らで、ここで、様々なオリゴヌクレオチド配列（タイプB）は直角状格子または六角状格子の形で配置される。

【００５７】

増幅体は、タイプCのオリゴヌクレオチドとその３’－末端基またはその他の塩基または固相と結合している背骨を介してハイブリッド化し、その５’－末端基を介してハイブリッド化することはできない。好適には３’－末端基を介して結合する。好適な変形態様では、固相は平らで、ここで、様々なオリゴヌクレオチド配列（タイプC）は直角状格子または六角状格子の形で配置される。タイプCのオリゴヌクレオチドとその５’－末端基は、リン酸化されねばならない。

【００５８】

要約すると、固相における固定化については、好適には、次のようないろいろな可能性があり：

１．第１のオリゴヌクレオチド（タイプB）の５’－末端基は、固相に固定化されている。

２．第２のオリゴヌクレオチド（タイプC）の３’－末端基は、固相に固定化されている。

３．増幅はすでに固相で行われ、その際好適にはプライマーの５’－末端基は固相と結合している。

４．増幅，ハイブリッド化，長さの拡大反応および連結は、好適には、溶液中で行い、そしてまず検出のための連結生成物を固相に取り付ける。

【００５９】

固相表面は、好適には、ケイ素，ガラス，ポリスチレン，アルミニウム，鋼，鉄，銅，ニッケル，銀または金からなる。

【００６０】

この方法のとくに好適な変形態様では、タイプBおよび／またはタイプCのオリゴヌクレオチドには、塩基T，AおよびC、または塩基T，AおよびGのみが含まれている。

【００６１】

ｎ個のヌクレオチドからなる周知の配列を用いたオリゴヌクレオチド（タイプＢ）は第４のステップで、せいぜいヌクレオチドと同数の耐熱性ポリメラーゼを用いて長さの拡大を行い、ポリメラーゼはタイプＢのオリゴヌクレオチドの３’－末端基とタイプＣのオリゴヌクレオチドの５’－末端基の間にある。その際、好適には、検出可能なマーキングには少なくとも一つのヌクレオチドがある。この方法のとくに好適な変形態様では、検出可能なマーキングに、タイプＢのオリゴヌクレオチドか、またはタイプＣのオリゴヌクレオチドがある。ここで長さの拡大の技術はゲノムＤＮＡプローブのそれぞれのシトシンのメチル化状況、または偶発的に存在するＳＮＰｓ，点突然変異または欠失変異，挿入変異および逆位に依存する。

【００６２】

この方法の好適な変形態様では、用いたヌクレオチドは期間限定型（タイプＤ２）および／または鎖長拡大ヌクレオチド（タイプＤ１）である。その際、期間限定型（タイプＤ２）は、２’，３’－ジデスオキシヌクレオチドであり、鎖長拡大ヌクレオチドは２’－デスオキシヌクレオチドである。この方法のとくに好適な変形態様では、タイプＤ１のヌクレオベースは、塩基Ｔ，ＡおよびＣ、または塩基Ｔ，ＡおよびＧを含むグループから選択する。さらに、この方法のとくに好適な変形態様では、タイプＤ２のヌクレオベースは、塩基ＴおよびＣ、または塩基ＧおよびＡを含むグループから選択する。

【００６３】

タイプＢの長さを拡大されたオリゴヌクレオチドのマーキングは、好適には、吸収性染料および／または化学発光および／または放射性アイソトープおよび／または蛍光マーキングにより行われ、これらは第４のステップで添加されたヌクレオチドまたはタイプＢまたはＣのオリゴヌクレオチドを介して導入される。基本的には、固定されたオリゴヌクレオチドのそれ自身のマーキングの場合、マーキングはない。同様に、長さを拡大され且つ連結されたオリゴヌクレオチドの部分質量を介したマーキングは好ましい。

【００６４】

これらのハイブリッド化されたオリゴヌクレオチドは、第５のステップにおいて、好適には、熱安定性リガーゼの存在下で一定温度で培養し、ここでポリメラーゼ反応による長さが拡大した（タイプＢ）の第１のオリゴヌクレオチドと（タイプＣ）の第２のオリゴヌクレオチドは隣接して結合し、それにより連結生成物が得られる。ただし、これは、タイプＢのオリゴヌクレオチドの長さが拡大する先行のステップにおいて、オリゴヌクレオチドの長さの拡大が、デスオキシヌクレオシドが直接タイプＣのオリゴヌクレオチドの５’－末端基に隣接しているように生じる場合に起こる。

【００６５】

第６のステップでは、連結生成物が生成しているか否か検出する。さらに、固相の各位置で長さが拡大されたオリゴヌクレオチドがオリゴヌクレオチド配列に存在しているか、マーキングの存在で調べる。

【００６６】

この方法のとくに好適な変形態様では、長さを拡大されたオリゴヌクレオチドの検出はその蛍光を介して行われる。その際、好適には、様々な連結生成物には様々な蛍光度の状態があり、たとえば、様々な染料を用いてマーキングして組み込まれたヌクレオシドにより達成することができる。

【００６７】

この方法の好適な変形態様では、一つまたはいくつかのエキソヌクレアーゼまたはエンドヌクレアーゼを用いた加水分解によりフラグメントをつくる。

【００６８】

この方法の好適な変形態様では、ヌクレオチドのマーキングはマーキングが解離可能な質量マーキングであり、質量マーキングがマススペクトルメーターで検出できる。

【００６９】

解離可能な質量マーキング、すなわち、長さを拡大されたオリゴヌクレオチドが全体としてまたはフラグメントとして、この質量マーキングにより、この方法に基づいて、マトリックス・アシスト・レーザー脱着／イオン化質量分光法（ＭＡＬＤＩ－ＭＳ）を介して、または電子スプレイー質量分光法（ＥＳＩ）を介し

てこの方法のとくに好適な変形態様において一義的に質量を実証し且つビジュアル化する。

【００７０】

好適には、マススペクトルメーターで検出されたフラグメントには、正または負の個々の正味の電荷がある。

【００７１】

この方法のとくに好適な変形態様では、ＳＮＰｓ（単一ヌクレオチド多形性）およびシトシン・メチル化を一つの実験で分析することができる。

【００７２】

この方法のとくに好適な変形態様では、化学的予備処理後のＤＮＡプローブの上下のストランドを一つの実験で分析し、内部の実験的制御を保証する。

【００７３】

本発明のもう一つのテーマはキットで、これには重亜硫酸塩反応および／または増幅，ハイブリッド化，長さを拡大する反応および連結反応を行うための化学物質や助剤、および／またはポリメラーゼおよび／またはこの方法を行うためのドキュメンテーションが含まれている。

【００７４】

【発明の実施の形態】

以下実施例により本発明の説明を行う。

【００７５】

【実施例】

実施例１：

以下の実施例は、ファクターVIII－遺伝子のＥｘｏｎ２３のフラグメントに関連し、このフラグメントでは特定のＣＧ位置のメチル化について調べる。

【００７６】

第１のステップではタイプAのプライマーによるフラグメント、すなわち、ＡＴＴＡＴＧＴＴＧＧＡＧＴＡＧＴＡＧＡＧＴＴＴＡＡＡＴＧＧＴＴ（配列ＩＤ番号１）およびＡＣＴＴＡＡＣＡＣＴＴＡＣＴＡＴＴＴＡＡＡＴＣＡＣＡＡＣＣＣＡＴ（配列ＩＤ番号２）により増幅する。増幅されたＤＮＡはタイプBのオリ

ゴヌクレオチド（たとえば、ＡＴＧＴＴＧＧＡＴＧＴＴＧＴＴＧＡＧ（配列ＩＤ番号３））、およびタイプＣの５’－リン酸化オリゴヌクレオチド（たとえば、ＧＴＡＴＡＡＡＧＴＡＡＡＴＴＡＧＡＡＧＧＡＡＧＡＴ（配列ＩＤ番号４））においてハイブリッド化される。次いで、２’，３’－ジデスオキシシチジントリホスフェート（タイプＤ２としてのｄｄＣＴＰ）、チミジントリホスフェート（タイプＤ１としてのｄＴＴＰ）および２’－デスオキシアデノシントリホスフェート（タイプＤ１としてのｄＡＴＰ）を用いた長さを拡大する反応を行う。メチル化されたシトシンが存在する場合は、３’－末端基にヒドロキシ基がない長さを拡大した生成物ＡＴＧＴＴＧＧＡＴＧＴＴＧＴＴＧＡＧＡＡＡＣ（配列ＩＤ番号５）が生成し、一方、調査対象の配列にメチル化されていないシトシンが存在する場合は、３’－末端基にヒドロキシ基がある長さを拡大した生成物ＡＴＧＴＴＧＧＡＴＧＴＴＧＴＴＧＡＧＡＡＡＴ（配列ＩＤ番号６）が生成する。次の連結反応では、したがって、連結生成物ＡＴＧＴＴＧＧＡＴＧＴＴＧＴＴＧＡＧＡＡＡＴ　ＧＴＡＴＡＡＡＧＴＡＡＡＴＴＡＧＡＡＧＧＡＡＧＡＴ（配列ＩＤ番号７）のみが生成する。タイプＣのオリゴヌクレオチドＧＴＡＴＡＡＡＧＴＡＡＡＴＴＡＧＡＡＧＧＡＡＧＡＴ（配列ＩＤ番号４）は蛍光マーキングされているので、調査対象のＤＮＡプローブにメチル化されていないシトシンが存在する場合は蛍光マーキングのみを組み込むことができる。

【００７７】

同じ配列を用いるが、トリホスフェートの組を変えると反対の制御を行うことができる。上の例と同様に、２’，３’－ジデスオキシチミジントリホスフェート（タイプＤ２としてのｄｄＴＴＰ）の長さを拡大する反応において、２’－デスオキシシチジントリホスフェート（タイプＤ１としてのｄＣＴＰ）および２’－デスオキシアデノシントリホスフェート（タイプＤ１としてのｄＡＴＰ）を用いると、連結反応後調査対象のＤＮＡプローブにおいてシトシンのメチル化が存在すると、マーキングの組み込みのみが反対になる。

【００７８】

実施例２：

以下の実施例は、ファクターVIII－遺伝子のＥｘｏｎ２３のフラグメントに関

連し、このフラグメントでは特定のＣＧ位置のメチル化について調べる。

【００７９】

第１のステップではタイプAのプライマーによるフラグメント、すなわち、ＡＴＴＡＴＧＴＴＧＧＡＧＴＡＧＴＡＧＡＧＴＴＴＡＡＡＴＧＧＴＴ（配列ＩＤ番号１）およびＡＣＴＴＡＡＣＡＣＴＴＡＣＴＡＴＴＴＡＡＡＴＣＡＣＡＡＣＣＣＡＴ（配列ＩＤ番号２）により増幅する。増幅されたＤＮＡはその５’－末端基を用いて固相表面においてタイプＢの固定化されたオリゴヌクレオチド（たとえば、ＡＴＧＴＴＧＧＡＴＧＴＴＧＴＴＧＡＧ（配列ＩＤ番号３））、およびタイプＣの５’－リン酸化オリゴヌクレオチド（たとえば、ＧＴＡＴＡＡＡＧＴＡＡＡＴＴＡＧＡＡＧＧＡＡＧＡＴ（配列ＩＤ番号４））においてハイブリッド化される。次いで、２’，３’－ジデスオキシシチジントリホスフェート（タイプＤ２としてのｄｄＣＴＰ）、チミジントリホスフェート（タイプＤ１としてのｄＴＴＰ）および２’－デスオキシアデノシントリホスフェート（タイプＤ１としてのｄＡＴＰ）を用いた長さを拡大する反応を行う。メチル化されたシトシンが存在する場合は、３’－末端基にヒドロキシ基がない長さを拡大した生成物ＡＴＧＴＴＧＧＡＴＧＴＴＧＴＴＧＡＧＡＡＡＣ（配列ＩＤ番号５）が生成し、一方、調査対象の配列にメチル化されていないシトシンが存在する場合は、３’－末端基にヒドロキシ基がある長さを拡大した生成物ＡＴＧＴＴＧＧＡＴＧＴＴＧＴＴＧＡＧＡＡＡＴ（配列ＩＤ番号６）が生成する。次の連結反応では、したがって、連結生成物ＡＴＧＴＴＧＧＡＴＧＴＴＧＴＴＧＡＧＡＡＡＴ　ＧＴＡＴＡＡＡＧＴＡＡＡＴＴＡＧＡＡＧＧＡＡＧＡＴ（配列ＩＤ番号７）のみが生成する。タイプＣのオリゴヌクレオチドＧＴＡＴＡＡＡＧＴＡＡＡＴＴＡＧＡＡＧＧＡＡＧＡＴ（配列ＩＤ番号４）は蛍光マーキングされているので、調査対象のＤＮＡプローブにメチル化されていないシトシンが存在する場合は蛍光マーキングのみを組み込むことができる。

【００８０】

同じ配列を用いるが、トリホスフェートの組を変えると反対の制御を行うことができる。上の例と同様に、２’，３’－ジデスオキシチミジントリホスフェート（タイプＤ２としてのｄｄＴＴＰ）の長さを拡大する反応において、２’－デ

スオキシシチジントリホスフェート（タイプＤ１としてのｄＣＴＰ）および２’－デスオキシアデノシントリホスフェート（タイプＤ１としてのｄＡＴＰ）を用いると、連結反応後調査対象のＤＮＡプローブにおいてシトシンのメチル化が存在すると、マーキングの組み込みのみが反対になる。

【００８１】

実施例３：

以下の実施例は、ファクターVIII－遺伝子のＥｘｏｎ２３のフラグメントに関連し、このフラグメントでは特定のＣＧ位置のメチル化について調べる。

【００８２】

第１のステップではタイプAのプライマーによるフラグメント、すなわち、ＡＴＴＡＴＧＴＴＧＧＡＧＴＡＧＴＡＧＡＧＴＴＴＡＡＡＴＧＧＴＴ（配列ＩＤ番号１）およびACＴＴＡＡＣＡＣＴＴＡＣＴＡＴＴＴＡＡＡＴＣＡＣＡＡＣＣＣＡＴ（配列ＩＤ番号２）により増幅する。増幅されたＤＮＡはタイプＢのオリゴヌクレオチド（たとえば、ＡＴＧＴＴＧＧＡＴＧＴＴＧＴＴＧＡＧ（配列ＩＤ番号３））、およびタイプCの５’－リン酸化オリゴヌクレオチド（たとえば、ＧＴＡＴＡＡＡＧＴＡＡＡＴＴＡＧＡＡＧＧＡＡＧＡＴ（配列ＩＤ番号４））においてハイブリッド化される。次いで、２’，３’－ジデスオキシシチジントリホスフェート（タイプＤ２としてのｄｄＣＴＰ）、チミジントリホスフェート（タイプＤ１としてのｄＴＴＰ）および２’－デスオキシアデノシントリホスフェート（タイプＤ１としてのｄＡＴＰ）を用いた長さを拡大する反応を行う。メチル化されたシトシンが存在する場合は、３’－末端基にヒドロキシ基がない長さを拡大した生成物ＡＴＧＴＴＧＧＡＴＧＴＴＧＴＴＧＡＧＡＡＡＣ（配列ＩＤ番号５）が生成し、一方、調査対象の配列にメチル化されていないシトシンが存在する場合は、３’－末端基にヒドロキシ基がある長さを拡大した生成物ＡＴＧＴＴＧＧＡＴＧＴＴＧＴＴＧＡＧＡＡＡＴ（配列ＩＤ番号６）が生成する。次の連結反応では、したがって、連結生成物ＡＴＧＴＴＧＧＡＴＧＴＴＧＴＴＧＡＧＡＡＡＴ　ＧＴＡＴＡＡＡＧＴＡＡＡＴＴＡＧＡＡＧＧＡＡＧＡＴ（配列ＩＤ番号７）のみが生成する。タイプＢのオリゴヌクレオチドＡＴＧＴＴＧＧＡＴＧＴＴＧＴＴＧＡＧ（配列ＩＤ番号３）は蛍光マーキングされているので、調査対象の

ＤＮＡプローブにメチル化されていないシトシンが存在する場合は蛍光マーキングのみを組み込むことができる。

【００８３】

同じ配列を用いるが、トリホスフェートの組を変えると反対の制御を行うことができる。上の例と同様に、２’，３’－ジデスオキシチミジントリホスフェート（タイプＤ２としてのｄｄＴＴＰ）の長さを拡大する反応において、２’－デスオキシシチジントリホスフェート（タイプＤ１としてのｄＣＴＰ）および２’－デスオキシアデノシントリホスフェート（タイプＤ１としてのｄＡＴＰ）を用いると、連結反応後調査対象のＤＮＡプローブにおいてシトシンのメチル化が存在すると、マーキングの組み込みのみが反対になる。

【配列表】

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Epigenomics AG

<120> Ligase/Polymerase-Verfahren zur Detektion von Cytosin-Methylierung in DNA-Proben

<130> E01-1178-WO

<140>
<141>

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 31
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 1
attatgttgg agtagtagag tttaaatggt t 31

<210> 2
<211> 32
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Oligonukleotid

<400> 2
acttaacact tactatttaa atcacaaccc at 32

<210> 3
<211> 18
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotid

<400> 3
atgttggatg ttgttgag 18

<210> 4
<211> 25
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotid

<400> 4
gtataaagta aattagaagg aagat 25

<210> 5
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotid

<400> 5
atgttggatg ttgttgagaa ac 22

<210> 6
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotid

<400> 6
atgttggatg ttgttgagaa at 22

<210> 7
<211> 47
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotid

<400> 7
atgttggatg ttgttgagaa atgtataaag taaattagaa ggaagat 47

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 01/00749

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68

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)
IPC 7 C12Q

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

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

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99 28498 A (OLEK ALEXANDER ;WALTER JOERN (DE); EPIGENOMICS GMBH (DE); OLEK SVE) 10 June 1999 (1999-06-10) claims 1-21 ---	1-36
Y	WO 95 21271 A (MOLECULAR TOOL INC) 10 August 1995 (1995-08-10) cited in the application claims 1-24 ---	1-36
	-/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in 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 document 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	Date of mailing of the international search report
3 August 2001	16/08/2001

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Tilkorn, A-C

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 01/00749

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GONZALGO M L AND JONES P A: "Rapid quantification of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE)" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, vol. 25, no. 12, 1997, pages 2529-2531, XP002106409 ISSN: 0305-1048 cited in the application page 2529, column 2, paragraph 2 ---	1-36
A	XIONG Z AND LAIRD P W: "COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, vol. 25, no. 12, 1997, pages 2532-2534, XP002106407 ISSN: 0305-1048 cited in the application the whole document ---	1-36
A	GRIGG G AND CLARK S: "Sequencing 5-methylcytosine residues in genomic DNA" BIOESSAYS, GB, CAMBRIDGE, vol. 16, no. 6, June 1994 (1994-06), pages 431-436, XP002106411 ISSN: 0265-9247 cited in the application page 433, column 2, paragraph 3 -page 435, column 2, paragraph 3 -----	1-36

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PCT/DE 01/00749

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9928498 A	10-06-1999	DE 19754482 A	01-07-1999
		AU 2408599 A	16-06-1999
		CN 1283235 T	07-02-2001
		EP 1034309 A	13-09-2000
		HU 0100424 A	28-06-2001
		PL 341681 A	23-04-2001
		US 6214556 B	10-04-2001
WO 9521271 A	10-08-1995	AU 694187 B	16-07-1998
		AU 1840795 A	21-08-1995
		CA 2182517 A	10-08-1995
		EP 0754240 A	22-01-1997
		JP 9508527 T	02-09-1997
		US 5679524 A	21-10-1997
		US 5952174 A	14-09-1999

フロントページの続き

(81)指定国 ＥＰ(ＡＴ，ＢＥ，ＣＨ，ＣＹ，ＤＥ，ＤＫ，ＥＳ，ＦＩ，ＦＲ，ＧＢ，ＧＲ，ＩＥ，ＩＴ，ＬＵ，ＭＣ，ＮＬ，ＰＴ，ＳＥ，ＴＲ)，ＯＡ(ＢＦ，ＢＪ，ＣＦ，ＣＧ，ＣＩ，ＣＭ，ＧＡ，ＧＮ，ＧＷ，ＭＬ，ＭＲ，ＮＥ，ＳＮ，ＴＤ，ＴＧ)，ＡＰ(ＧＨ，ＧＭ，ＫＥ，ＬＳ，ＭＷ，ＭＺ，ＳＤ，ＳＬ，ＳＺ，ＴＺ，ＵＧ，ＺＷ)，ＥＡ(ＡＭ，ＡＺ，ＢＹ，ＫＧ，ＫＺ，ＭＤ，ＲＵ，ＴＪ，ＴＭ)，ＡＥ，ＡＧ，ＡＬ，ＡＭ，ＡＴ，ＡＵ，ＡＺ，ＢＡ，ＢＢ，ＢＧ，ＢＲ，ＢＹ，ＢＺ，ＣＡ，ＣＨ，ＣＮ，ＣＲ，ＣＵ，ＣＺ，ＤＥ，ＤＫ，ＤＭ，ＤＺ，ＥＥ，ＥＳ，ＦＩ，ＧＢ，ＧＤ，ＧＥ，ＧＨ，ＧＭ，ＨＲ，ＨＵ，ＩＤ，ＩＬ，ＩＮ，ＩＳ，ＪＰ，ＫＥ，ＫＧ，ＫＰ，ＫＲ，ＫＺ，ＬＣ，ＬＫ，ＬＲ，ＬＳ，ＬＴ，ＬＵ，ＬＶ，ＭＡ，ＭＤ，ＭＧ，ＭＫ，ＭＮ，ＭＷ，ＭＸ，ＭＺ，ＮＯ，ＮＺ，ＰＬ，ＰＴ，ＲＯ，ＲＵ，ＳＤ，ＳＥ，ＳＧ，ＳＩ，ＳＫ，ＳＬ，ＴＪ，ＴＭ，ＴＲ，ＴＴ，ＴＺ，ＵＡ，ＵＧ，ＵＳ，ＵＺ，ＶＮ，ＹＵ，ＺＡ，ＺＷ

Ｆターム(参考) 4B024 AA11 AA20 CA01 CA09 CA20
HA08 HA13 HA14 HA20
4B063 QA01 QQ02 QQ03 QQ08 QQ62
QR08 QR14 QR32 QR50 QR56
QR62 QR82 QS25 QS34 QX02
QX04

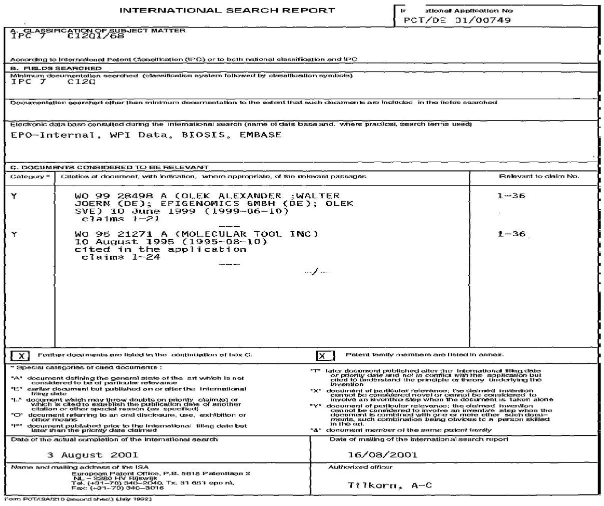
【要約の続き】

れたオリゴヌクレオチドの存在する３’－ヒドロキシ官能基を有する３’－末端基が、タイプＣの前記オリゴヌクレオチドの５’－末端基に、直接、隣接しているように生じる場合に起こり；（ｆ）連結生成物が生成しているか否か検出する；を行うことを特徴とする前記方法。

专利名称(译)	用于检测DNA探针中胞嘧啶甲基化的连接酶/聚合酶方法		
公开(公告)号	JP2003523752A	公开(公告)日	2003-08-12
申请号	JP2001561769	申请日	2001-02-23
[标]申请(专利权)人(译)	埃皮吉諾米克斯股份公司		
申请(专利权)人(译)	外延基因组学公司		
[标]发明人	オレクアレクサンダ ベルリンクルト		
发明人	オレク,アレクサンダ ベルリン,クルト		
IPC分类号	G01N27/62 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/6827 C12Q1/6834 G01N33/53 G01N37/00		
CPC分类号	C12Q1/6827 C12Q1/6834 C12Q2600/158 C12Q2561/125 C12Q2533/101 C12Q2525/186 C12Q2531/113 C12Q2523/125		
FI分类号	C12Q1/68.A G01N27/62.V G01N33/53.M G01N37/00.102 C12N15/00.ZNA.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA20 4B024/HA08 4B024/HA13 4B024/HA14 4B024/HA20 4B063/QA01 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ62 4B063/QR08 4B063/QR14 4B063/QR32 4B063/QR50 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR82 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B063/QX04		
优先权	10010281 2000-02-25 DE		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了一种特别适用于同时检测基因组DNA探针中的胞嘧啶甲基化和SNP的方法。 一种检测基因组DNA探针中的5-甲基胞嘧啶的方法，包括以下步骤：（a）使来自DNA探针的基因组DNA与化学试剂反应，其中5-甲基胞嘧啶和胞嘧啶彼此不同。 反应后，它们在DNA双螺旋结构中表现出不同的碱基配对行为；（b）用至少一种寡核苷酸（A型）和聚合酶作为引物扩增预处理的DNA；（c）一组寡核苷酸与扩增的基因组DNA杂交形成双螺旋，其中该组寡核苷酸由B型和C型以及B型的不同物种组成 上述杂交的寡核苷酸与该位置直接相邻，或者与其3'端基之间的距离最多为10个碱基，该位置为 必须在nom DNA探针中探测第二个寡核苷酸（C型）的甲基化，其中第二个寡核苷酸（C型）在靶分子的第二个区域杂交。 第一杂交寡核苷酸（B型）通过存在于最多10个核苷酸或最多10个核苷酸的大小单位的空隙，通过3'末端基团位于上述选择位置的位点 （D）已知的n个核苷酸序列用于通过至多多个核苷酸的聚合酶来延伸寡核苷酸（B型）的长度，该聚合酶是B型寡核苷酸中的3个。 它位于C型寡核苷酸的'末端基团和5'末端基团之间，其长度延伸为 取决于毒素的甲基化状态；（e）将寡核苷酸在连接酶存在下于恒温下孵育，其中第一个B型寡核苷酸和长型C型寡核苷酸通过聚合酶反应 第二寡核苷酸相邻连接，产生连接产物。 然而，这是由于以下事实：在延长B型寡核苷酸的长度的先前步骤中，存在于延长长度的寡核苷酸上的具有3'-羟基官能团的3'端基是 该方法是在与寡核苷酸的5'-末端基团直接相邻时发生的；和（f）检测是否产生了连接产物；



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/DE 01/00749

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68

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)
IPC 7 C12Q

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category°	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99 28498 A (OLEK ALEXANDER ;WALTER JOERN (DE); EPIGENOMICS GMBH (DE); OLEK SVE) 10 June 1999 (1999-06-10) claims 1-21	1-36
Y	WO 95 21271 A (MOLECULAR TOOL INC) 10 August 1995 (1995-08-10) cited in the application claims 1-24	1-36

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in 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 document 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	Date of mailing of the international search report
3 August 2001	16/08/2001

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Tilkorn, A-C

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)