

(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2004-511235

(P2004-511235A)

(43) 公表日 平成16年4月15日(2004.4.15)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	2 G 0 4 5
C 1 2 N 15/09	G O 1 N 21/77	2 G 0 5 4
G O 1 N 21/77	G O 1 N 21/78	4 B 0 2 4
G O 1 N 21/78	G O 1 N 27/62	4 B 0 6 3
G O 1 N 27/62	G O 1 N 33/53	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 91 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2002-534551 (P2002-534551)	(71) 出願人	500247105 エビゲノミクス アーゲー
(86) (22) 出願日	平成13年10月10日 (2001.10.10)		ドイツ国、デー-10435 ベルリン、 カスターンアレー 24
(85) 翻訳文提出日	平成15年4月9日 (2003.4.9)	(74) 代理人	100093735 弁理士 荒井 鐘司
(86) 国際出願番号	PCT/DE2001/003901	(74) 代理人	100105429 弁理士 河野 尚孝
(87) 国際公開番号	W02002/031186	(74) 代理人	100108143 弁理士 嶋崎 英一郎
(87) 国際公開日	平成14年4月18日 (2002.4.18)	(72) 発明者	ベルリン、クルト ドイツ国、14532 スターンスドルフ 、マリーンケーフェルヴェーク 4
(31) 優先権主張番号	100 50 942.8	Fターム(参考)	2G045 AA35 DA13 DA14 FB02 FB12 GC15 GC30
(32) 優先日	平成12年10月10日 (2000.10.10)		最終頁に続く
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		

(54) 【発明の名称】 シトシンのメチル化の検出方法

(57) 【要約】

下記の各ステップからなることを特徴とするゲノムDNAのシトシンのメチル化の検出方法。第一ステップで、ゲノムDNA試料を反応剤で処理して、5-メチルシトシンは変化せず、シトシンをウラシルまたはその塩基対挙動がウラシルに類似する他の塩基に化学的に変換する。次いで、前処理されたDNAをポリメラーゼ及び少なくともプライマーオリゴヌクレオチッドを使用し増幅する。この増幅産物を新たに反応剤で処理して、5-メチルシトシンは変化せず、シトシンをウラシルまたはその塩基対挙動がウラシルに類似する他の塩基に化学的に変換する。最終ステップで、増幅産物中に新たな化学的処理後に残存しているシトシン塩基及び/またはグアニン塩基の存在を再度実証する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記の各ステップからなることを特徴とするゲノム DNA のシトシンのメチル化の検出方法。

- a) ゲノム DNA 試料を反応剤で処理して、5 - メチルシトシンは変化せず、シトシンをウラシルまたはその塩基対挙動がウラシルに類似する他の塩基に化学的に変換する。
- b) 前処理された DNA をポリメラーゼ及び少なくともプライマーオリゴヌクレオチッドを使用し、増幅する。
- c) 増幅産物を新たに反応剤で処理して、5 - メチルシトシンは変化せず、シトシンをウラシルまたはその塩基対挙動がウラシルに類似する他の塩基に化学的に変換する。
- d) 増幅産物中に新たな化学的処理後に残存しているシトシン塩基及び/またはグアニン塩基の存在を実証する。

10

【請求項 2】

下記の各ステップからなることを特徴とする請求項 1 に記載のゲノム DNA のシトシンのメチル化の検出方法。

- a) ゲノム DNA 試料を反応剤で処理して、5 - メチルシトシンは変化せず、シトシンをウラシルまたはその塩基対挙動がウラシルに類似する他の塩基に化学的に変換する。
- b) 前処理された DNA をポリメラーゼ及び少なくともプライマーオリゴヌクレオチッドを使用し増幅する。
- c) 増幅産物を新たに反応剤で処理して、5 - メチルシトシンは変化せず、シトシンをウラシルまたはその塩基対挙動がウラシルに類似する他の塩基に化学的に変換する。
- d) 化学的に前処理されたステップ c) の増幅産物を新たに増幅する。
- e) 増幅産物中に残存しているシトシン塩基及び/またはグアニン塩基の存在を実証する。

20

【請求項 3】

化学的処理が重亜硫酸ソーダ (= 亜硫酸水素ナトリウム、酸性亜硫酸ソーダ) によることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

化学的処理が DNA のアガロース中への埋め込みであることを特徴とする請求項 3 に記載の方法。

30

【請求項 5】

化学的処理において、二本鎖 DNA の変性剤及び/またはラジカル捕捉剤が存在することを特徴とする請求項 1 から 4 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

変性剤が下記の物質の一つから選択されることを特徴とする請求項 5 に記載の方法。
 ポリエチレングリコールジアルキルエーテル、ジオキサン及びその置換誘導体、尿素またはその誘導体、アセトニトリル、第一級アルコール、第二級アルコール、第三級アルコール、ジエチレングリコールジアルキルエーテル、トリエチレングリコールジアルキルエーテル、テトラエチレングリコールジアルキルエーテル、ペンタエチレングリコールジアルキルエーテル、ヘキサエチレングリコールジアルキルエーテル、DMSO または THF。

40

【請求項 7】

ラジカル捕捉剤が下記の物質の一つから選択されることを特徴とする請求項 5 または 6 に記載の方法。

ジ - 、トリ - ヒドロキシベンゾール、緑茶抽出物、パインバーク抽出物 (ピクノゲノール)、二葉性銀杏抽出物 (EGb761)、数種の果実および野菜の抽出物のフラボノイド混合物 (GNLD)、バイオ - ノーマライザー (Sun-O Corp)、DPPH (1, 1 - ジフェニル - 2 - ピクリルヒドラジル)、NDGA (ノルジヒドログアヤレート - 酸)、トロロックス (6 - ヒドロキシ - 2, 5, 7, 8 - テトラメチルクロマン - 2 - カルボン酸)、2, 6 - ジ - ターシャリー - ブチルフェノール、4 - メチル - ジ - ターシャリー - ブチルフェノール、4 - メトキシ - ジ - ターシャリー - ブチルフェノール、2, 6

50

- ジ - ターシャリー - プチル - p - クレゾール、 3 , 4 - ジヒドロキシ安息香酸、 ビタミン C、 E、 Q、 ハイドロキノン、 ユビキノン、 リグナン、 ヒドロキシテルペン、 フラボノイド、 ウコン、 タンニン、 レチン酸化合物、 Ge - 132 - ビス - カルボキシエチルゲルマニウムセスキオキサイド、 過酸化ジスムターゼ、 過酸化カタラーゼ、 - ナフトフラボン、 ジ (2 - メチル - 5 - クロロフェニル) ジチオネート及び Cu (II) - 誘導体、

メベンダゾール、 CS (クロロホルムソリュブル) アルカロイド抽出物、 4 - (3 , 5 - ジ - ターシャリー - プチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 1 , 2 - ナフトキノ

ン、 4 - (3 , 5 - ジ - ターシャリー - プチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 1 , 2 - ナフトキノ

ン、 4 - (3 , 5 - ジ - ターシャリー - プチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 1 , 2 - ナフトキノ

ン、 2 - (3 , 5 - ジ - ターシャリー - プチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - プロモ - 1 , 4 - ナフトキノ

ン、 2 - (3 , 5 - ジ - ターシャリー - プチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - クロロ - 1 , 4 - ナフトキノ

ン、 2 - (3 , 5 - ジ - ターシャリー - プチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 1 , 4 - ナフトキノ

ン、 2 - (3 , 5 - ジ - ターシャリー - プチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 1 , 4 - ナフトキノ

ン、 2 - (3 , 5 - ジ - ターシャリー - プチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 1 , 4 - ナフトキノ

ン、 4 - (3 , 5 - ジ - ターシャリー - プチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5 , 5 , 8 , 8 - テトラメチル - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - 1 , 2 - アンスラキノ

ン、 4 - (3 , 5 - ジ - ターシャリー - プチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 5 , 5 , 8 , 8 - テトラメチル - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - 1 , 2 - アンスラキノ

ン、 4 - (3 , 5 - ジ - ターシャリー - プチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 5 , 5 , 8 , 8 - テトラメチル - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - 1 , 2 - アンスラキノ

ン、 3 - プロモ - 4 - (3 , 5 - ジ - ターシャリー - プチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 5 , 5 , 8 , 8 - テトラメチル - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - 1 , 2 - アンスラキノ

ン、 2 - (3 , 5 - ジ - ターシャリー - プチル - 4 - オキソシクロヘキサ - 2 , 5 - ジエニリデン) - インダン - 1 , 3 - チオン、 2 - (3 , 5 - ジ - ターシャリー - プチル - 4 - オキソシクロヘキサ - 2 , 5 - ジエニリデン) - 3 , 4 - エポキシ - 3 - ヒドロキシ - 4 - メトキシ - 3 , 4 - ジヒドロ - 2 H - ナフタリン - 1 - オン、 2 - (3 , 5 - ジ - ターシャリー - プチル - 4 - オキソシクロヘキサ - 2 , 5 - ジエニリデン) - 3 , 4 - エポキシ - 3 , 4 - ジメトキシ - 3 , 4 - ジヒドロ - 2 H - ナフタリン - 1 - オン、 2 - (3 , 5 - ジ - ターシャリー - プチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - インダン - 1 - オン、 3 , 3 - Bi - [2 - (3 , 5 - ジ - ターシャリー - プチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - インデン - 1 - オン] - 3 - イ

ル、 2 - (3 , 5 - ジ - ターシャリー - プチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - プロモ - 5 , 5 , 8 , 8 - テトラメチル - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - 1 , 4 - アンスラキノ

ン、 2 - (3 , 5 - ジ - ターシャリー - プチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - クロロ - 5 , 5 , 8 , 8 - テトラメチル - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - 1 , 4 - アンスラキノ

ン、 2 - (3 , 5 - ジ - ターシャリー - プチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 5 , 5 , 8 , 8 - テトラメチル - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - 1 , 4 - アンスラキノ

ン、 2 - (3 , 5 - ジ - ターシャリー - プチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5 , 5 , 8 , 8 - テトラメチル - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - 1 , 4 - アンスラキノ

ン、 2 - (3 , 5 - ジ - ターシャリー - プチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 5 , 5 , 8 , 8 - テトラメチル - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - 1 , 4 - アンスラキノ

ン、 2 - プロモ - 3 - (3 - プロモ - 5 - ターシャリー - プチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 5 , 5 , 8 , 8 - テトラメチル - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - 1 , 4 - アンスラキノ

ン、 2 - プロモ - 3 - (3 , 5 - ジプロモ - 4 - ヒドロキシフェニル) - 5 , 5 , 8 , 8 - テトラメチル - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - 1 , 4 - アンスラキノ

ン、 2 - プロモ - 3 - (3 - プロモ - 5 - ターシャリー - プチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5 , 5 , 8 , 8 - テトラメチル - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - 1 , 4 - アンスラキノ

ン、 3 - プロモ - 2 - (3 , 5 - ジ - ターシャリー - プチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 1 , 4 - アンスラキノ

ン、 2 - (3 , 5 - ジ - ターシャリー - プチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 1 , 4 - アンスラキノ

ル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 1, 4 - アンスラキノン、 2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 1, 4 - アンスラキノン、 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロナフタリン - 1, 3 - ジオール、 3 - メトキシ - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロナフタリン - 1 - オール、 4 - (3 - クロロ - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 1, 4 - ジオキソ - 1, 4, 5, 6, 7, 8 - ヘキサヒドロアンスラセン - 2 - イル) - 安息香酸、メチル - 4 - (3 - クロロ - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 1, 4 - ジオキソ - 1, 4, 5, 6, 7, 8 - ヘキサヒドロアンスラセン - 2 - イル) - ベンゾエート、 4 - (3 - ヒドロキシ - 1, 4 - ジオキソ - 1, 4 - ジヒドロナフタリン - 2 - イル) - 安息香酸、メチル - (3 - メトキシ - 1, 4 - ジオキソ - 1, 4 - ジヒドロナフタリン - 2 - イル) - 安息香酸、 4 - (3 - ヒドロキシ - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 1, 4 - ジオキソ - 1, 4, 5, 6, 7, 8 - ヘキサヒドロアンスラセン - 2 - イル) - 安息香酸、メチル - 4 - (3 - ヒドロキシ - 1, 4 - ジオキソ - 1, 4 - ジヒドロナフタリン - 2 - イル - アゾ) - ベンゾエート、 4 - (3 - ヒドロキシ - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 1, 4 - ジオキソ - 1, 4, 5, 6, 7, 8 - ヘキサヒドロアンスラセン - 2 - イル - アゾ) - 安息香酸、 3 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - オキソシクロヘキサ - 2, 5 - ジエニリデン) - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロシクロペンタ [b] ナフタリン - 1, 2 - ジオン、 3 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - オキソシクロヘキサ - 2, 5 - ジエニリデン) - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロアンスラセン - 3 H - 1, 2, 4 - トリオン、 2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 5, 8 - ジメチル - 1, 4 - ナフトキノン、 2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 6, 7 - ジメチル - 1, 4 - ナフトキノン、 2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 5 - メチル - 1, 4 - ナフトキノン、 2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - メトキシ - 5 - メチル - 1, 4 - ナフトキノン、 2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 6 - メチル - 1, 4 - ナフトキノン、 3 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - メトキシ - 6 - メチル - 1, 4 - ナフトキノン、 2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 5, 6 - ジメチル - 1, 4 - ナフトキノン、 3 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - メトキシ - 5, 6 - ジメチル - 1, 4 - ナフトキノン、 2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 5, 7 - ジメチル - 1, 4 - ナフトキノン、 3 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - メトキシ - 5, 7 - ジメチル - 1, 4 - ナフトキノン、 2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - エチルチオ - 5 - メチル - 1, 4 - ナフトキノン、 2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - エチルチオ - 6 - メチル - 1, 4 - ナフトキノン、 2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5, 8 - ジメチル - 1, 4 - ナフトキノン、 2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 6, 7 - ジメチル - 1, 4 - ナフトキノン、 2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5 - メチル - 1, 4 - ナフトキノン、 3 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - ヒドロキシ - 5 - メチル - 1, 4 - ナフトキノン、 2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 6 - メチル - 1, 4 - ナフトキノン、 3 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - ヒドロキシ - 6 - メチル - 1, 4 - ナフトキノン、 2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5, 6 - ジメチル - 1, 4 - ナフトキノン、 2 - (3 - プロモ - 5 - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5, 6 - ジメチル - 1, 4 - ナフトキノン、 3 - (3, 5 - ジ - ターシャリー

- ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - ヒドロキシ - 5 , 6 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノン、2 - (3 , 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5 , 7 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノン、3 - (3 , 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - ヒドロキシ - 5 , 7 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノン。

【請求項 8】

DNA の化学的処理に使用される反応剤を後続する増幅の前にその都度、完全に、または部分的に、除去することを特徴とする請求項 1 から 7 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

化学的処理後であって、増幅の前に、試料を希釈することを特徴とする請求項 1 から 8 の何れか 1 項に記載の方法。 10

【請求項 10】

多くの DNA 断片の増幅を同時に、一つの反応器で行なうことを特徴とする請求項 1 から 9 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

増幅に耐熱性 DNA ポリメラーゼを使用することを特徴とする請求項 1 から 10 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

請求項 1 または 2 における増幅前に DNA の脱硫を行なうことを特徴とする請求項 1 から 11 の何れか 1 項に記載の方法。 20

【請求項 13】

第二回目の化学的処理後に残存するシトシン塩基及び/またはグアニン塩基をハイブリッド化により実証することを特徴とする請求項 1 から 12 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

第二回目の化学的処理後に残存するシトシン塩基及び/またはグアニン塩基をシトシン塩基及び/またはグアニン塩基に施された実証可能なマーカースの特殊な組込みによって実証及び/または定量することを特徴とする請求項 1 から 12 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

請求項 1 のステップ d) または請求項 2 のステップ e) において、前処理された DNA の検出のために、増幅産物をオリゴヌクレオチッドアレーにハイブリッド化させ、次いで、以下の部分的ステップを実施することを特徴とする請求項 1 から 12 の何れか 1 項に記載の方法。 30

a) 増幅されたゲノム DNA が少なくとも、一つのオリゴヌクレオチッドに二本鎖構造の形成下にハイブリッド化され、その際、前記ハイブリッド化されたオリゴヌクレオチッドが、その 3' - 末端で直接または 10 塩基の間隔を置いた、ゲノム DNA 試料のメチル化が調べられる位置に配置される。

b) オリゴヌクレオチッドを既知の配列の n ヌクレオチッドで、ポリメラーゼによって、少なくともヌクレオチッド一個分だけ伸長させる。その際、ヌクレオチッドは実証できるマーカースを帯びており、その都度、伸長はゲノム DNA 試料のシトシンのメチル化状態に依存する。 40

【請求項 16】

第二回目の化学的処理後に残存するシトシン塩基及び/またはグアニン塩基を配列化反応によって実証することを特徴とする請求項 1 から 12 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

請求項 1 のステップ d) または請求項 2 のステップ e) において、前処理された DNA の検出のために、増幅産物をオリゴヌクレオチッドアレーにハイブリッド化させ、次いで、以下の部分的ステップを実施することを特徴とする請求項 1 から 12 の何れか 1 項に記載の方法。

a) 一揃いのオリゴヌクレオチッドを増幅されたゲノム DNA に二本鎖の形成下ハイブリッド化させ、その際、この一揃いのオリゴヌクレオチッドが二つの異なるスペースから 50

なり、最初のスペースのハイブリッド化オリゴヌクレオチッドは、その3'-末端で直接または10塩基の間隔を置いた、ゲノムDNA試料のメチル化が調べられる位置に配置され、第二のスペースの第二のオリゴヌクレオチッドは、目的分子の第二の領域下にハイブリッド化され、その結果、第二のスペースの第二のオリゴヌクレオチッドの5'-末端が、個々のヌクレオチッドの大きさの隙間を通るかまたは、第一のスペースのハイブリッド化オリゴヌクレオチッドの3'-末端から前記選択された位置だけ、離れているようにする。

b) 第一のスペースのオリゴヌクレオチッドを既知の配列のnヌクレオチッドで、ポリメラーゼによって、高々、第一のスペースのオリゴヌクレオチッドの3'-末端と第二のスペースのオリゴヌクレオチッドの5'-末端の間のヌクレオチッド数だけ、伸長させる。その際、ヌクレオチッドは実証できるマーカーを帯びており、伸長はゲノムDNA試料のシトシンのメチル化状態に依存する。 10

c) リガーゼの存在下、オリゴヌクレオチッドを培養する。その際、隣接する、ポリメラーゼ反応により、伸長される第一のスペースのオリゴヌクレオチッド及び第二のスペースのオリゴヌクレオチッドが結合し、それまでのステップで、第一のスペースのオリゴヌクレオチッドの伸長が、3'-末端が伸長されたオリゴヌクレオチッドの3'-ヒドロキシ機能で直接、第二のスペースのオリゴヌクレオチッドの5'-末端に隣接するように、為されるかぎり、それによりライゲーション反応産物が得られる。

【請求項18】

請求項1のステップd)における前処理されたDNAの検出のために、PCR産物をオリゴヌクレオチッドアレーにハイブリッド化させ、次いで、以下の部分的ステップを実施することを特徴とする請求項1から12の何れか1項に記載の方法。 20

a) 増幅されたゲノムDNAを少なくとも、一つの既知のnヌクレオチッド配列のオリゴヌクレオチッドに、二本鎖構造の形成下に、ハイブリッド化し、その際、前記ハイブリッド化されたオリゴヌクレオチッドが、その3'-末端で部分的または完全に、その、ゲノムDNA試料のメチル化に関して、調べられる位置でハイブリッド化される。

b) オリゴヌクレオチッドを、その3'-末端で、予め、塩基対欠失なしで、調べる位置にポリメラーゼによって、少なくともヌクレオチッド一個分だけ、ハイブリッド化して伸長させ、その際、少なくとも、一個のヌクレオチッドが実証可能なマーカーを帯び、伸長はゲノムDNA試料の、その都度の、シトシンのメチル化状態に依存する。 30

【請求項19】

PCR産物及び/または伸長産物及び/またはライゲーション産物に実証可能なマーカーを、検出が可能なように、帯びさせることを特徴とする請求項1から18の何れか1項に記載の方法。

【請求項20】

マーカーが蛍光マーカーであることを特徴とする請求項1から19の何れか1項に記載の方法。

【請求項21】

マーカーが放射性核種であることを特徴とする請求項1から19の何れか1項に記載の方法。 40

【請求項22】

質量分析計で実証されるマーカーが分離可能であることを特徴とする請求項1から19の何れか1項に記載の方法。

【請求項23】

一つの増幅において、プライマーの一つが固相に結合していることを特徴とする請求項1から22の何れか1項に記載の方法。

【請求項24】

PCR産物及び/または伸長産物及び/またはライゲーション産物を全て質量分析計で実証し、これらの質量によって一義的に、これらの各々を同定することを特徴とする請求項1から19の何れか1項に記載の方法。 50

【請求項 25】

PCR産物及び/または伸長産物及び/またはライゲーション産物の一断片を質量分析計で実証することを特徴とする請求項1から19の何れか1項に記載の方法。

【請求項 26】

PCR産物及び/または伸長産物及び/またはライゲーション産物の断片を一種または複数種のエキソヌクレアーゼまたはエンドヌクレアーゼによる分解によって得ることを特徴とする請求項25に記載の方法。

【請求項 27】

質量分析計の検出精度改善のために、得られた断片が各々陽または陰電荷の帯電を示すことを特徴とする請求項25または26に記載の方法。

10

【請求項 28】

PCR産物及び/または伸長産物及び/またはライゲーション産物がマトリックス補助レーザー脱離/イオン化質量分析(MALDI-TOF)または電子シュプレー質量分析(ESI)によって検出され、且つ映像化されることを特徴とする請求項1から19の何れか1項に記載の方法。

【請求項 29】

DNA試料から採取されるゲノムDNAの供給源が、例えば、細胞列、血液、喀痰、便、尿、脳脊髄液；パラフィン埋め込み組織、例えば、眼、腸、腎臓、脳、心臓、前立腺、肺、乳房または肝臓の組織；組織の顕微鏡スライドガラス及びこれらから得られる全ての可能な組み合わせであることを特徴とする請求項1から28の何れか1項に記載の方法。

20

【請求項 30】

患者または健常者の体調に現われる、好ましくない出来事についての診断または予診のための請求項1から29の何れか1項に記載の方法の使用。

この好ましくない出来事は少なくとも以下のカテゴリーに属する。薬の副作用；癌；CNS-機能欠失、障害、疾病；攻撃的徴候または異常行動；脳障害による臨床的、心理的及び社会的帰結；精神異常及び人格異常；痴呆及び/または結合する徴候；心臓血管系疾患、その機能欠失及び傷害；胃腸の領域の機能欠失、傷害または疾病；呼吸器系の機能欠失、傷害または疾病；障害、炎症、感染、免疫性及び/または回復期；発育期の偏向的な機能欠失、傷害または疾病；皮膚、筋肉、結合組織、または骨の機能欠失、傷害または疾病；内分泌系及び代謝系の機能欠失、傷害または疾病；頭痛または性的機能欠失。

30

【請求項 31】

細胞型または組織の調査または細胞区分の研究のために、請求項1から29の何れか1項に記載の方法の使用。

【請求項 32】

重亜硫酸塩含有反応剤、変性剤または溶剤及びラジカル捕捉剤及び増幅産物製造用の選択的プライマー及び請求項1から29の何れか1項に記載のアッセイ実施用の選択的マニュアルからなるキット。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本発明はゲノムDNA試料のメチル化状態の検出方法に関する。

40

【0002】

近年の分子生物学における手法的開発による研究的観察は遺伝子自体、この遺伝子のRNAの解読、そこから発生する蛋白などについてである。個々の開発過程で、どの遺伝子が評価されるか、そして、いかにして、特定の細胞および組織における特定の遺伝子の活動及び阻害が制御されるか、は遺伝子またはゲノムのメチル化の程度及び性格と関連づけることができる。個々の遺伝子またはゲノムの変化させられたメチル化サンプルにおいて、病気の状態が表現される。

【0003】

5-メチルシトシンはしばしば、共有結合反応させられる、真核細胞のDNAの塩基である。これは例えば、遺伝子刷り込み時の転写規制及び腫瘍遺伝子において、一定の役割を

50

演じる。遺伝子情報の構成部分としての5 - メチルシトシンの同定は、それ故に、非常に興味ある問題である。PCR増幅では5 - メチルシトシンを有する後成的情報は完全に失われている。

【0004】

比較的新しい、最も頻繁に使用されるDNAの5 - メチルシトシンの調査方法は、シトシンと重亜硫酸塩との特殊な反応に基づく。このシトシンは後続するアルカリ加水分解により、ウラシルに変化し、これはその塩基対挙動がチミンに対応する。それに対して、5 - メチルシトシンは、この条件下では変化しない。このようにして、元のDNAが変化し、元来、シトシンのハイブリッド化挙動によってはシトシンと区別できなかった5 - メチルシトシンは、今や、通常の分子生物学的技法によって、唯一、残存するシトシンが、例えば、増幅及びハイブリッド化または配列化によって、実証され得るようになった。これら全ての技法は、現在、完全に利用し尽くされている塩基対に基づく。従来の技術では、感度に関して、調査するDNAをアガロースマトリックスに封入し、それによって、DNAの拡散及び変成還元化（重亜硫酸塩は単鎖DNAとのみ反応する）が阻害され、全ての沈殿および精製工程が迅速な透析によって、取って代られる（Olek A、Oswald J、Walter J. 変化し、改善された重亜硫酸塩ベースのシトシンメチル化分析。Nucleic Acids Res. 1996 Dec 15; 24 (24) : 5064 ~ 6）。これらの方法によって、個々の細胞を調べることができ、この方法の潜在的効果が具体的に説明される。勿論、これまでに、単に、個々の領域で、約3,000塩基対長までが調べられたに過ぎず、数千に及ぶ細胞のメチル化解析の調査は可能ではない。またこれらの方法では、僅かな量の試料からの小さな断片から信頼性のある解析は不可能である。これらの方法では拡散防止の措置にも拘らず、マトリックスから逸失される。

【0005】

5 - メチルシトシンを実証する既知の可能性についての概観は、以下の概観の刊行物から知ることができる。即ち、Rein T、DePamphilis ML、Zorbas H. Identifying 5 - methylcytosine and related modifications in DNA genomes. Nucleic Acids Res. 1998 May 15; 26 (10) : 2255 ~ 64。重亜硫酸塩を使用した技法は、これまで僅かな例外 [Z. B. Zeschneigk M、Lich C、Buiting K、Doerfler W、Horsthemke B. A single - tube PCR test for the diagnosis of Angelman and Prader - Willi syndrome based on allelic methylation differences at the SNRPN locus. Eur J Hum Genet. 1997 Mar ~ Apr; 5 (2) : 94 ~ 8] が研究の中で使用されていたに過ぎない。常に、既知の遺伝子の、短い、特殊な断片が、重亜硫酸塩処理によって、増幅されるか、または、相補的に配列されるか [Olek A、Walter J. The pre - implantation ontogeny of the H19 methylation imprint. Nat Genet. 1997 Nov; 17 (3) : 275 ~ 6] または、個々のシトシン位置を、プライマー伸長反応 [Gonzalvo ML、Jones PA. Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylation - sensitive single nucleotide primer extension (Ms - SNUPE). Nucleic Acids Res. 1997 Jun 15; 25 (12) : 2529 ~ 31、WO - Patent 9500669] によって、または、一つの酵素断片 [Xiong Z、Laird PW. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. Nucleic Acids Res. 1997 Jun 15; 25 (12) : 2532 ~ 4] によって実証される。そのために、ハイブリッド化により実証される (Olek et al.、WO 9928498)。

10

20

30

40

50

【0006】

その他の、個々の遺伝子のメチル化実証のために重亜硫酸塩技法を使用することについて、記載されている刊行物は以下のものである。

Grigg G、Clark S. Sequencing 5-methylcytosine residues in genomic DNA. *Bioassays*. 1994 Jun; 16 (6): 431~6、431; Zeschnick M、Schmitz B、Dittrich B、Buiting K、Horsthemke B、Doerfler W. Imprinted segments in the human genome: different DNA methylation patterns in the Parader-Willi/Angelman syndrome region as determined by the genomic sequencing method. *Hum Mol Genet*. 1997 Mar; 6 (3): 387~95; Feil R、Charlton J、Bird AP、Walter J、Reik W. Methylation analysis on individual chromosomes: improved protocol for bisulphite genomic sequencing. *Nucleic Acids Res*. 1994 Feb 25; 22 (4): 695~6; Martin V、Ribieras S、Song-Wong X、Rio MC、Dante R. Genomic sequencing indicates a correlation between DNA hypomethylation in the 5' region of the pS2 gene and its expression in human breast cancer cell lines. *Gene*. 1995 May 19; 157 (1~2): 261~4; WO 9746705、WO 9515373及びWO 9545560。

【0007】

オリゴマーアレーの製造における従来の技術の概観は1999年1月のネイチャージェネティックスの特別版に記載がある(Nature Genetics特別版、21巻1999年1月)。そこで引用されている文献及び、米国特許5994065号には、非特異的背景信号での、オリゴヌクレオチッドのような目的分子の個体担体による製造方法が記載されている。

【0008】

固定DNAアレーの調査には多重蛍光マーカーを付されたゾンデが使用されている。特に、その都度、ゾンデの5'-OHにCy3及びCy5色素を一回付す蛍光マーカーが好適である。ハイブリッド化ゾンデの蛍光の検出は、例えば、コンフォカール顕微鏡を使用して行なわれる。Cy3及びCy5色素は他の類似物と共に、市販されている。

【0009】

マトリックス補助レーザー脱離/イオン化質量分析(MALDI-TOF)は分子生物学の解析において非常に有力な発展を齎した[Karas M、Hillenkamp F. 10,000ダルトンを超える分子量の蛋白のレーザー脱離イオン化. *Anal Chem*. 1988 Oct 15; 60 (20): 2299~301]。ある被分析物は光吸収性マトリックス中に埋め込まれる。短時間のレーザー照射によって、マトリックスが蒸発し、被分析分子は断片化せずに、ガス相に移行する。マトリックス分子の衝撃により、被分析物のイオン化が達成される。電圧をかけられてイオンが飛行管中へ加速される。分子量の差により、イオンは異なる強さで加速される。小さいイオンは大きいイオンよりも早い時期に検出器に達する。

【0010】

MALDI-TOF質量分析は蛋白質及びペプチッドの解析(分析)にとりわけ優れている。核酸の分析用としてはやや難点がある[Gut、I. G. und Beck S. (1995)、DNA and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. *Molecular Biology: Current Innovations and Futur*

e Trends 1: 147~157]。核酸については、検出感度がペプチッドの場合の100倍も悪く、断片の衝撃が増えるに従って、超比例的に減少する。骨格に多くの負電荷を有している核酸は、マトリックスによるイオン化が本質的に非効率的である。MALDI-TOF質量分析ではマトリックスの選択が、非常に重要な役割を演じる。ペプチッドの脱離には、非常に細かい結晶の、有用なマトリックスを使用することが発見された。DNAには、幾つかの請求項記載のマトリックスがあり、その使用によって、感度の差異は減少しない。感度の差異は、DNAをペプチッドに類似するように化学変化させることにより、減少させることができる。通常骨格の燐酸塩が、チオ燐酸塩によって、置換されるところの、核酸リンチオエートは、簡単なアルキル化反応によって、電荷的に中性なDNAに変換される [Gut I, Gund Beck, S. (1995)、DNAの選択的アルキル化及び質量分析による検出法。Nucleic Acids Res. 23: 1367~1373]。チャージタグスのこの変化したDNAへの結合は、ペプチッドに見られるのと同じ程度の感度上昇を齎す。更なるチャージタギングの利点は、変化しない基質の実証を著しく困難にする不純物の分析安定性を高めることである。

10

【0011】

ゲノムDNAは標準的方法によって、細胞、組織または他の試料から得られる。この標準的方法はフリッチェ及びマニアティスによる、分子クローン：研究手引1989年のような参考文献に載っている。

【0012】

尿素はゲノムDNAの5-メチルシトシンの配列前の重亜硫酸塩の処理の効率を高める [Paulin R, Grigg GW, Davey MW, Piper AA. 尿素はゲノムDNAの5-メチルシトシンの配列前の重亜硫酸塩の処理の効率を高める。Nucleic Acids Res. 1998 Nov 1; 26(21): 5009~10]。

20

【0013】

全ての、非メチル化シトシンが特定の塩基に変換され、非メチル化シトシンは増幅後、なお、シトシンとして存在することにより、シトシンのメチル化が証明される方法がある。増幅時に、対向する鎖で、シトシンがなお常に相補体として、非変換グアニンに組込まれるので、逆に、増幅後に、なお存在する全てのシトシン塩基をメチル化シトシン以前に、配置することが容易にできる。もし、メチル化位置を決めるか、または、増幅された断片におけるメチル化の範囲を決めるために、簡単な方法で、シトシンに特徴的な反応を施したいと思えば、これが邪魔する。これらの問題点を本発明の方法が解決する。

30

【0014】

本発明の課題は、増幅された二本鎖DNAに、ゲノムDNA試料内のシトシンのメチル化を一義的に同定するために利用できるマーキングを施す方法を用意することである。これらマーカには、簡単な、新たに考案された分子生物学的方法が使用できる。

【0015】

課題は本発明のゲノムDNAのシトシンのメチル化の検出方法によって解決され、その際、以下のステップが実行される。

40

- a) ゲノムDNA試料を反応剤で処理して、5-メチルシトシンは変化せず、シトシンをウラシルまたはその塩基対挙動がウラシルに類似する他の塩基に化学的に変換する。
- b) 前処理されたDNAをポリメラーゼ及び少なくともプライマーオリゴヌクレオチッドを使用し増幅する。
- c) 増幅産物を新たに反応剤で処理して、5-メチルシトシンは変化せず、シトシンをウラシルまたはその塩基対挙動がウラシルに類似する他の塩基に化学的に変換する。
- d) 新たな化学的前処理の後、増幅産物中に残存しているシトシン塩基及び/またはグアニン塩基の存在を実証する。

【0016】

課題は、更に、本発明のゲノムDNAのシトシンのメチル化の検出方法によって解決され

50

、その際、以下のステップが実行される。

- a) ゲノム DNA 試料を反応剤で処理して、5 - メチルシトシンは変化せず、シトシンをウラシルまたはその塩基対挙動がウラシルに類似する他の塩基に化学的に変換する。
- b) 前処理された DNA をポリメラーゼ及び少なくともプライマーオリゴヌクレオチッドを使用し増幅する。
- c) 増幅産物を新たに反応剤で処理して、5 - メチルシトシンは変化せず、シトシンをウラシルまたはその塩基対挙動がウラシルに類似する他の塩基に化学的に変換する。
- d) 化学的に前処理された c) の増幅産物を新たに、e) 増幅産物中に残存しているシトシン塩基及び / またはグアニン塩基の存在を実証する。これらの本発明の変法は二つの増幅ステップを含む。

10

【0017】

本発明の方法において、特に好ましい化学的処理は、重亜硫酸ソーダ (= 亜硫酸水素ナトリウム、酸性亜硫酸ソーダ) による方法で、更に、化学的処理が DNA のアガロース中への埋め込みによって行なわれることが、特に好ましい。

【0018】

本発明においては、二本鎖 DNA の化学的処理において、変性剤及び / またはラジカル捕捉剤が存在することが好ましい。その際、変性剤が下記の物質の一つから選択されることが特に好ましい。

ポリエチレングリコールジアルキルエーテル、ジオキサン及びその置換誘導体、尿素またはその誘導体、アセトニトリル、第一級アルコール、第二級アルコール、第三級アルコール、ジエチレングリコールジアルキルエーテル、トリエチレングリコールジアルキルエーテル、テトラエチレングリコール - ジアルキルエーテル、ペンタエチレングリコールジアルキルエーテル、ヘキサエチレングリコールジアルキルエーテル、DMSO または THF 及び / または下記の物質の一つから選択されるラジカル捕捉剤。

20

ジ - 、トリ - ヒドロキシベンゾール、緑茶抽出物、パインバーク抽出物 (ピクノゲノール)、二葉性銀杏抽出物 (EGb761)、数種の果実および野菜の抽出物のフラボノイド混合物 (GNLD)、バイオ - ノーマライザー (Sun - O Corp)、DPPH (1, 1 - ジフェニル - 2 - ピクリルヒドラジル)、NDGA (ノルジヒドログアヤレート - 酸)、トロロックス (6 - ヒドロキシ - 2, 5, 7, 8 - テトラメチルクロマン - 2 - カルボン酸)、2, 6 - ジ - ターシャリー - ブチルフェノール、4 - メチル - ジ - ターシャリー - ブチルフェノール、4 - メトキシ - ジ - ターシャリー - ブチルフェノール、2, 6 - ジ - ターシャリー - ブチル - p - クレゾール、3, 4 - ジヒドロキシ安息香酸、ビタミン C、E、Q、ヒドロキノン、ユビキノン、リグナン、ヒドロキシテルペン、フラボノイド、ウコン、タンニン、レチン酸化合物、Ge - 132 - ビス - カルボキシエチルゲルマニウムセスキオキサイド、過酸化ジスムターゼ、過酸化カタラーゼ、ナフトフラボン、ジ (2 - メチル - 5 - クロロフェニル) ジチオネート及び Cu (II) - 誘導体、メベンダゾール、CS (クロロホルムソリュブル) アルカロイド抽出物、4 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 1, 2 - ナフトキノン、4 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 1, 2 - ナフトキノン、4 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - プロモ - 1, 4 - ナフトキノン、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - クロロ - 1, 4 - ナフトキノン、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 1, 4 - ナフトキノン、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 1, 4 - ナフトキノン、4 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 2 - アンスラキノン、4 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 5, 5, 8, 8 - テト

30

40

50

ラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 2 - アンスラキノ、 4 - (3, 5 - ジ
 - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル -
 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 2 - アンスラキノ、 3 - ブロモ - 4 - (3, 5 -
 ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル
 - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 2 - アンスラキノ、 2 - (3, 5 - ジ - ターシ
 ャリー - ブチル - 4 - オキソシクロヘキサ - 2, 5 - ジエニリデン) - インダン - 1, 3
 - チオン、 2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - オキソシクロヘキサ - 2, 5
 - ジエニリデン) - 3, 4 - エポキシ - 3 - ヒドロキシ - 4 - メトキシ - 3, 4 - ジヒド
 ロ - 2 H - ナフタリン - 1 - オン、 2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - オキ
 ソシクロヘキサ - 2, 5 - ジエニリデン) - 3, 4 - エポキシ - 3, 4 - ジメトキシ - 3 10
 , 4 - ジヒドロ - 2 H - ナフタリン - 1 - オン、 2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチ
 ル - 4 - ヒドロキシフェニル) - インダン - 1 - オン、 3, 3 - Bi - [2 - (3, 5 -
 ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - インデン - 1 - オン] - 3 - イ
 ル、 2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ブロモ
 - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 4 - アンスラキ
 ノン、 2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - クロ
 ロ - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 4 - アンスラ
 キノン、 2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メ
 トキシ - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 4 - アン
 スラキノ、 2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 20
 - ヒドロキシ - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 4
 - アンスラキノ、 2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル
) - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 4 - アンスラ
 キノン、 2 - ブロモ - 3 - (3 - ブロモ - 5 - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフ
 ェニル) - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 4 - アン
 スラキノ、 2 - ブロモ - 3 - (3, 5 - ジブロモ - 4 - ヒドロキシフェニル) - 5,
 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 4 - アンスラキノ、
 2 - ブロモ - 3 - (3 - ブロモ - 5 - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル)
 - 3 - ヒドロキシ - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1 30
 , 4 - アンスラキノ、 3 - ブロモ - 2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒ
 ドロキシフェニル) - 1, 4 - アンスラキノ、 2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチ
 ル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 1, 4 - アンスラキノ、 2 - (3, 5
 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 1, 4 - アン
 スラキノ、 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロナフタリ
 ン - 1, 3 - ジオール、 3 - メトキシ - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8
 - テトラヒドロナフタリン - 1 - オール、 4 - (3 - クロロ - 5, 5, 8, 8 - テトラメ
 チル - 1, 4 - ジオキソ - 1, 4, 5, 6, 7, 8 - ヘキサヒドロアンスラセン - 2 - イ
 ル) - 安息香酸、メチル - 4 - (3 - クロロ - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 1, 4 -
 ジオキソ - 1, 4, 5, 6, 7, 8 - ヘキサヒドロアンスラセン - 2 - イル) - ベンゾエ
 ート、 4 - (3 - ヒドロキシ - 1, 4 - ジオキソ - 1, 4 - ジヒドロナフタリン - 2 - イ 40
 ル) - 安息香酸、メチル - (3 - メトキシ - 1, 4 - ジオキソ - 1, 4 - ジヒドロナフタ
 リン - 2 - イル) - 安息香酸、 4 - (3 - ヒドロキシ - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル -
 1, 4 - ジオキソ - 1, 4, 5, 6, 7, 8 - ヘキサヒドロアンスラセン - 2 - イル) -
 安息香酸、メチル - 4 - (3 - ヒドロキシ - 1, 4 - ジオキソ - 1, 4 - ジヒドロナフタ
 リン - 2 - イル - アゾ) - ベンゾエート、 4 - (3 - ヒドロキシ - 5, 5, 8, 8 - テト
 ラメチル - 1, 4 - ジオキソ - 1, 4, 5, 6, 7, 8 - ヘキサヒドロアンスラセン - 2
 - イル - アゾ) - 安息香酸、 3 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - オキソシク
 ロヘキサ - 2, 5 - ジエニリデン) - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 -
 テトラヒドロシクロペンタ [b] ナフタリン - 1, 2 - ジオン、 3 - (3, 5 - ジ - ター
 シャリー - ブチル - 4 - オキソシクロヘキサ - 2, 5 - ジエニリデン) - 5, 5, 8, 8 50

- テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロアンスラセン - 3H - 1, 2, 4 - トリオン、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 5, 8 - ジメチル - 1, 4 - ナフトキノ、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 6, 7 - ジメチル - 1, 4 - ナフトキノ、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 5 - メチル - 1, 4 - ナフトキノ、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - メトキシ - 5 - メチル - 1, 4 - ナフトキノ、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 6 - メチル - 1, 4 - ナフトキノ、3 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - メトキシ - 6 - メチル - 1, 4 - ナフトキノ、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 5, 6 - ジメチル - 1, 4 - ナフトキノ、3 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - メトキシ - 5, 6 - ジメチル - 1, 4 - ナフトキノ、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 5, 7 - ジメチル - 1, 4 - ナフトキノ、3 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - メトキシ - 5, 7 - ジメチル - 1, 4 - ナフトキノ、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - エチルチオ - 5 - メチル - 1, 4 - ナフトキノ、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - エチルチオ - 6 - メチル - 1, 4 - ナフトキノ、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5, 8 - ジメチル - 1, 4 - ナフトキノ、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 6, 7 - ジメチル - 1, 4 - ナフトキノ、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5 - メチル - 1, 4 - ナフトキノ、3 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - ヒドロキシ - 5 - メチル - 1, 4 - ナフトキノ、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 6 - メチル - 1, 4 - ナフトキノ、3 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - ヒドロキシ - 6 - メチル - 1, 4 - ナフトキノ、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5, 6 - ジメチル - 1, 4 - ナフトキノ、2 - (3 - プロモ - 5 - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5, 6 - ジメチル - 1, 4 - ナフトキノ、3 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - ヒドロキシ - 5, 6 - ジメチル - 1, 4 - ナフトキノ、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5, 7 - ジメチル - 1, 4 - ナフトキノ、3 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - ヒドロキシ - 5, 7 - ジメチル - 1, 4 - ナフトキノ。

【0019】

本発明においては、DNAの化学的処理に使用される反応剤を後続する増幅の前に、その都度、完全に、または、部分的に、除去することが好ましい。また、化学的処理後であって、増幅の前に、試料を希釈することが好ましい。更に多くのDNA断片の増幅を同時に、一つの反応器で行なうこと、及び/または、増幅に耐熱性DNAポリメラーゼを使用することが好ましい。

【0020】

本発明においては、増幅前にDNAの脱硫を行なうことが好ましい。

【0021】

第二回目の化学的処理後に残存するシトシン塩基及び/またはグアニン塩基をハイブリッド化で実証すること及び/または、第二回目の化学的処理後に残存するシトシン塩基及び/またはグアニン塩基をシトシン塩基及び/またはグアニン塩基に施された実証可能なマーカーの特殊な組込みによって実証することが好ましい。

【0022】

10

20

30

40

50

本発明においては、最初の変法におけるステップ d) または第二の変法におけるステップ e) において、前処理された DNA の検出のために、増幅産物をオリゴヌクレオチッドアレーにハイブリッド化させ、次いで、以下の部分的ステップを実施することが好ましい。

a) 増幅されたゲノム DNA が少なくとも、一つのオリゴヌクレオチッドに二本鎖構造の形成下にハイブリッド化され、その際、前記ハイブリッド化されたオリゴヌクレオチッドが、その 3' - 末端で、直接または 10 塩基の間隔を置いた、ゲノム DNA 試料のメチル化が調べられる位置に配置される。

b) オリゴヌクレオチッドを既知の配列の n ヌクレオチッドで、ポリメラーゼによって、少なくとも、ヌクレオチッド一個分だけ伸長させる。その際、ヌクレオチッドは実証できるマーカーを帯びており、伸長はゲノム DNA 試料のシトシンのメチル化状態に依存する。

10

【0023】

第二回目の化学的処理後に残存するシトシン塩基及びノまたはグアニン塩基を配列化反応によって実証することが好ましい。

【0024】

最初の変法におけるステップ d) または第二の変法におけるステップ e) において、前処理された DNA の検出のために、増幅産物をオリゴヌクレオチッドアレーにハイブリッド化させ、次いで、以下の部分的ステップを実施することが、更に好ましい

a) 一揃いのオリゴヌクレオチッドを増幅されたゲノム DNA に二本鎖の形成下ハイブリッド化させ、その際、この一揃いは、オリゴヌクレオチッドが二つの異なるスペースからなり、最初のスペースのハイブリッド化オリゴヌクレオチッドは、その 3' - 末端で直接または 10 塩基の間隔を置いた、ゲノム DNA 試料のメチル化が調べられる位置に配置され、第二のスペースの第二のオリゴヌクレオチッドは、目的分子の第二の領域下にハイブリッド化され、その結果、第二のスペースの第二のオリゴヌクレオチッドの 5' - 末端が、個々のヌクレオチッドの大きさの隙間を通るか、または、第一のスペースのハイブリッド化オリゴヌクレオチッドの 3' - 末端から前記選択された位置だけ、離れているようになる。

20

b) 第一のスペースのオリゴヌクレオチッドを既知の配列の n ヌクレオチッドで、ポリメラーゼによって、高々、第一のスペースのオリゴヌクレオチッドの 3' - 末端と第二のスペースのオリゴヌクレオチッドの 5' - 末端の間のヌクレオチッド数だけ、伸長させる。その際、ヌクレオチッドは実証できるマーカーを帯びており、伸長はゲノム DNA 試料のシトシンのメチル化状態に依存する。

30

c) リガーゼの存在下、オリゴヌクレオチッドを培養する。その際、隣接する、ポリメラーゼ反応により、伸長される第一のスペースのオリゴヌクレオチッド及び第二のスペースのオリゴヌクレオチッドが結合し、それ以前のステップで、第一のスペースのオリゴヌクレオチッドの伸長が、3' - 末端が伸長されたオリゴヌクレオチッドの 3' - ヒドロキシ機能で直接、第二のスペースのオリゴヌクレオチッドの 5' - 末端に隣接するように、為されるかぎり、それによりライゲーション反応産物が得られる。

【0025】

このとき、更に、前処理された DNA の検出のための、最初の変法におけるステップ d) において、PCR 産物をオリゴヌクレオチッドアレーにハイブリッド化させ、次いで、以下の部分的ステップを実施することが好ましい。

40

a) 増幅されたゲノム DNA を少なくとも、一つの既知の n ヌクレオチッド配列のオリゴヌクレオチッドに、二本鎖構造の形成下に、ハイブリッド化し、その際、前記ハイブリッド化されたオリゴヌクレオチッドが、その 3' - 末端で部分的または完全に、その、ゲノム DNA 試料のメチル化に関して、調べられる位置でハイブリッド化される。

b) オリゴヌクレオチッドを、その 3' - 末端で、予め、塩基対欠失なしで、調べる位置にポリメラーゼによって、少なくともヌクレオチッド一個分だけ、ハイブリッド化して伸長させ、その際、少なくとも、一個のヌクレオチッドが実証可能なマーカーを帯び、伸長はゲノム DNA 試料の、その都度の、シトシンのメチル化状態に依存する。

50

【0026】

本発明においては、PCR産物及び/または伸長産物及び/またはライゲーション産物に実証可能なマーカーを検出可能なように帯びさせることが好ましい。マーカーが蛍光マーカーまたは放射性核種マーカーまたは、質量分析計で実証される分離可能な質量マーカーであることが好ましい。

【0027】

一つの増幅において、プライマーの一つが固相に結合していることが好ましい。

【0028】

PCR産物及び/または伸長産物及び/またはライゲーション産物を全て質量分析計で実証し、これらの質量によって一義的に、これらの各々を同定することが特に好ましい。また、PCR産物及び/または伸長産物及び/またはライゲーション産物の一断片を質量分析計で実証することも好ましい。ここで、PCR産物及び/または伸長産物及び/またはライゲーション産物の断片を一種または複数種のエキソヌクレアーゼまたはエンドヌクレアーゼによる分解によって得ることが特に好ましい。ここでは、質量分析計の検出精度改善のために、得られた断片が各々陽または陰電荷の帯電を示すことが、極めて、特に好ましい。

10

【0029】

本発明の方法においては、PCR産物及び/または伸長産物及び/またはライゲーション産物がマトリックス補助レーザー脱離/イオン化質量分析(MALDI-TOF)または電子シュブレーション質量分析(ESI)によって検出され、且つ映像化されることが好ましい。

20

【0030】

本発明の方法においては、DNA試料から採取されるゲノムDNAの供給源が、例えば、細胞列、血液、喀痰、便、尿、脳脊髄液；パラフィン埋め込み組織、例えば、眼、腸、腎臓、脳、心臓、前立腺、肺、乳房または肝臓の組織；組織の顕微鏡スライドガラス及びこれらから得られる全ての可能な組み合わせを包含するものであることが特に好ましい。

【0031】

本発明の更なる対象は、本発明の方法を患者または健常者の体調に現われる好ましくない出来事についての診断または予診に適用することである。この好ましくない出来事は少なくとも以下のカテゴリーに属する。即ち、薬の副作用；癌；CNS-機能欠失、障害、疾病；攻撃的徴候または異常行動；脳障害による臨床的、心理的及び社会的帰結；精神異常及び人格異常；痴呆及び/または結合した徴候；心臓血管系疾患、その機能欠失及び傷害；胃腸の領域の機能欠失、傷害または疾病；呼吸器系の機能欠失、傷害または疾病；障害、炎症、感染、免役性及び/または回復期；発育期の偏向的な機能欠失、傷害または疾病；皮膚、筋肉、結合組織、または骨の機能欠失、傷害または疾病；内分泌系及び代謝系の機能欠失、傷害または疾病；頭痛または性的機能欠失である。

30

【0032】

本発明の方法の好ましい適用は、細胞型または組織の調査または細胞差別化の調査のために適用することである。

【0033】

更に、本発明の対象は重亜硫酸塩含有反応剤、変性剤または溶剤及びラジカル捕捉剤及び増幅産物製造用の選択的プライマー及び請求項1から28の何れか1項に記載のアッセイ実施用の選択的マニュアルからなるキットである。

40

【0034】

本発明においては、ゲノムDNA試料からの二本鎖DNAの製造方法が記載されている。ゲノムDNA試料は、そのCG塩基対が、予め、ゲノムDNA内のメチルシトシン塩基が存在する位置に存在するという特徴を有する。続いて、ゲノムDNA内のメチルシトシン塩基が存在する位置を、識別し易くするために、CG塩基対の化学的、生物学的または物理学的特性を利用する。専門家が、この、CG塩基対を実証すること及び挙げられた目的を役立てることのできるという、本線からずれた、または、別の、容易に推測できる可能

50

性を見出すことができるかと仮定して、そのために、以下に、多くの変化した実施例を挙げる。

【0035】

本発明の方法に組込まれたゲノムDNAはDNA試料から得られるが、そのDNA供給源が、例えば、細胞列、血液、喀痰、便、尿、脳脊髄液；パラフィン埋め込み組織、例えば、眼、腸、腎臓、脳、心臓、前立腺、肺、乳房または肝臓の組織；組織の顕微鏡スライドガラス及びこれらから得られる全ての可能な組み合わせを包含するものであることが好ましい。

【0036】

ゲノムDNA中のシトシンのメチル化の検出方法は次ぎの各ステップからなることを特徴とする。最初に、ゲノムDNA試料を反応剤で処理して、5-メチルシトシンは変化せず、シトシンをウラシルまたはその塩基対挙動がウラシルに類似する他の塩基に化学的に変換する。次いで、前処理されたDNAをポリメラーゼ及び少なくともプライマーオリゴヌクレオチッドを使用し増幅する。第3ステップで、増幅産物を新たに反応剤で処理して、5-メチルシトシンは変化せず、シトシンをウラシルまたはその塩基対挙動がウラシルに類似する他の塩基に化学的に変換する。最後のステップで、増幅産物中に新たな化学的処理後に残存しているシトシン塩基及び/またはグアニン塩基の存在を実証する。

10

【0037】

本発明の方法の特に好ましい変法は、次ぎの各ステップからなることを特徴とする。ゲノムDNAのシトシンのメチル化の検出方法は下記の各ステップからなることを特徴とする。最初に、ゲノムDNA試料を反応剤で処理して、5-メチルシトシンは変化せず、シトシンをウラシルまたはその塩基対挙動がウラシルに類似する他の塩基に化学的に変換する。第2ステップで、前処理されたDNAをポリメラーゼ及び少なくともプライマーオリゴヌクレオチッドを使用し増幅する。第3ステップで、増幅産物を新たに反応剤で処理して、5-メチルシトシンは変化せず、シトシンをウラシルまたはその塩基対挙動がウラシルに類似する他の塩基に化学的に変換する。第4ステップで、化学的に前処理されたステップc)の増幅産物を、新たに、増幅する。最後のステップで、増幅産物中に、新たな化学的処理後も残存しているシトシン塩基及び/またはグアニン塩基の存在を実証する。

20

【0038】

化学的処理は重亜硫酸ソーダ(=亜硫酸水素ナトリウム、酸性亜硫酸ソーダ)溶液によるのが特に好ましい。この処理は、専門家が知っているように、好適な条件下、非メチル化シトシン塩基へ重亜硫酸塩を加えるものである。この反応では、アルカリ加水分解で、ウラシルに移行するスルホン化ウラシルが生成するように、シトシンのアミノ官能基のケト官能基への量的変換が行なわれる。そして、この経路で非メチル化シトシン塩基のウラシルへの変換が行なわれる。一方、5-メチルシトシンは変化しないのでそのままである。この反応はDNAが単鎖のときにのみ、行なわれる。本発明の特に好ましい変法では、DNAの化学的処理が、これをアガロース中に埋め込んで行なわれる。これにより、二本鎖の形成が阻害される。

30

【0039】

本発明の特に好ましい変法において、化学的処理では、二本鎖DNAを変性する溶剤または反応剤が添加される。この溶剤または反応剤としては下記の化合物が好ましく、重要である。

40

ポリエチレングリコールジアルキルエーテル、ジオキサン及びその置換誘導体、尿素またはその誘導体、アセトニトリル、第一級アルコール、第二級アルコール、第三級アルコール、ジエチレングリコールジアルキルエーテル、トリエチレングリコールジアルキルエーテル、テトラエチレングリコール-ジアルキルエーテル、ペンタエチレングリコールジアルキルエーテル、ヘキサエチレングリコールジアルキルエーテル、DMSOまたはTHF。

【0040】

更に、反応条件下で、DNAの分解を妨げるラジカル捕捉剤を添加することが好ましい。

50

ラジカル捕捉剤としては下記の化合物が好ましく、重要である。

ジ -、トリ - ヒドロキシベンゾール、緑茶抽出物、パインバーク抽出物 (ピクノゲノール)、二葉性銀杏抽出物 (EGb761)、数種の果実および野菜の抽出物のフラボノイド混合物 (GNLD)、バイオ - ノーマライザー (Sun - O Corp)、DPPH (1, 1 - ジフェニル - 2 - ピクリルヒドラジル)、NDGA (ノルジヒドログアヤレート - 酸)、トロロックス (6 - ヒドロキシ - 2, 5, 7, 8 - テトラメチルクロマン - 2 - カルボン酸)、2, 6 - ジ - ターシャリー - ブチルフェノール、4 - メチル - ジ - ターシャリー - ブチルフェノール、4 - メトキシ - ジ - ターシャリー - ブチルフェノール、2, 6 - ジ - ターシャリー - ブチル - p - クレゾール、3, 4 - ジヒドロキシ安息香酸、ビタミン C、E、Q、ヒドロキノン、ユビキノン、リグナン、ヒドロキシテルペン、フラボノイド、ウコン、タンニン、レチン酸化合物、Ge - 132 - ビス - - カルボキシエチルゲルマニウムセスキオキサイド、過酸化ジスムターゼ、過酸化カタラーゼ、 - ナフトフラボン、ジ (2 - メチル - 5 - クロロフェニル) ジチオネート及び Cu (II) - 誘導体、メベンダゾール、CS (クロロホルムソリュブル) アルカロイド抽出物、4 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 1, 2 - ナフトキノ、4 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 1, 2 - ナフトキノ、4 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 1, 2 - ナフトキノ、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - プロモ - 1, 4 - ナフトキノ、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - クロロ - 1, 4 - ナフトキノ、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 1, 4 - ナフトキノ、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 1, 4 - ナフトキノ、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 1, 4 - ナフトキノ、4 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 2 - アンスラキノ、4 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 2 - アンスラキノ、4 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 2 - アンスラキノ、3 - プロモ - 4 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 2 - アンスラキノ、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - オキソシクロヘキサ - 2, 5 - ジエニリデン) - インダン - 1, 3 - チオン、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - オキソシクロヘキサ - 2, 5 - ジエニリデン) - 3, 4 - エポキシ - 3 - ヒドロキシ - 4 - メトキシ - 3, 4 - ジヒドロ - 2 H - ナフタリン - 1 - オン、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - オキソシクロヘキサ - 2, 5 - ジエニリデン) - 3, 4 - エポキシ - 3, 4 - ジメトキシ - 3, 4 - ジヒドロ - 2 H - ナフタリン - 1 - オン、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - インダン - 1 - オン、3, 3 - Bi - [2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - インデン - 1 - オン] - 3 - イル、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - プロモ - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 4 - アンスラキノ、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - クロロ - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 4 - アンスラキノ、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 4 - アンスラキノ、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 4 - アンスラキノ、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 4 - アンスラ

10

20

30

40

50

キノン、2 - ブロモ - 3 - (3 - ブロモ - 5 - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 4 - アンスラキノン、2 - ブロモ - 3 - (3, 5 - ジブロモ - 4 - ヒドロキシフェニル) - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 4 - アンスラキノン、2 - ブロモ - 3 - (3 - ブロモ - 5 - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 1, 4 - アンスラキノン、3 - ブロモ - 2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 1, 4 - アンスラキノン、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 1, 4 - アンスラキノン、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 1, 4 - ア
 10
 ンスラキノン、5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロナフタリン - 1, 3 - ジオール、3 - メトキシ - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロナフタリン - 1 - オール、4 - (3 - クロロ - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 1, 4 - ジオキソ - 1, 4, 5, 6, 7, 8 - ヘキサヒドロアンスラセン - 2 - イル) - 安息香酸、メチル - 4 - (3 - クロロ - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 1, 4 - ジオキソ - 1, 4, 5, 6, 7, 8 - ヘキサヒドロアンスラセン - 2 - イル) - ベンゾエート、4 - (3 - ヒドロキシ - 1, 4 - ジオキソ - 1, 4 - ジヒドロナフタリン - 2 - イル) - 安息香酸、メチル - (3 - メトキシ - 1, 4 - ジオキソ - 1, 4 - ジヒドロナフタリン - 2 - イル) - 安息香酸、4 - (3 - ヒドロキシ - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 1, 4 - ジオキソ - 1, 4, 5, 6, 7, 8 - ヘキサヒドロアンスラセン - 2 - イル) -
 20
 安息香酸、メチル - 4 - (3 - ヒドロキシ - 1, 4 - ジオキソ - 1, 4 - ジヒドロナフタリン - 2 - イル - アゾ) - ベンゾエート、4 - (3 - ヒドロキシ - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 1, 4 - ジオキソ - 1, 4, 5, 6, 7, 8 - ヘキサヒドロアンスラセン - 2 - イル - アゾ) - 安息香酸、3 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - オキソシクロヘキサ - 2, 5 - ジエニリデン) - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロシクロペンタ [b] ナフタリン - 1, 2 - ジオン、3 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - オキソシクロヘキサ - 2, 5 - ジエニリデン) - 5, 5, 8, 8 - テトラメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロアンスラセン - 3 H - 1, 2, 4 - トリ
 30
 オン、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 5, 8 - ジメチル - 1, 4 - ナフトキノ、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 6, 7 - ジメチル - 1, 4 - ナフトキノ、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 5 - メチル - 1, 4 - ナフトキノ、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - メトキシ - 5 - メチル - 1, 4 - ナフトキノ、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 6 - メチル - 1, 4 - ナフトキノ、3 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - メトキシ - 6 - メチル - 1, 4 - ナフトキノ、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 5, 6 - ジメチル - 1, 4 - ナフトキノ、3 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - メトキシ - 5, 6 - ジメチル - 1, 4 - ナフトキノ、2 - (3, 5 - ジ -
 40
 ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - メトキシ - 5, 7 - ジメチル - 1, 4 - ナフトキノ、3 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - メトキシ - 5, 7 - ジメチル - 1, 4 - ナフトキノ、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - エチルチオ - 5 - メチル - 1, 4 - ナフトキノ、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - エチルチオ - 6 - メチル - 1, 4 - ナフトキノ、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5, 8 - ジメチル - 1, 4 - ナフトキノ、2 - (3, 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5 - メチル - 1, 4 -
 50

ナフトキノン、3 - (3 , 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - ヒドロキシ - 5 - メチル - 1 , 4 - ナフトキノン、2 - (3 , 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 6 - メチル - 1 , 4 - ナフトキノン、3 - (3 , 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - ヒドロキシ - 6 - メチル - 1 , 4 - ナフトキノン、2 - (3 , 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5 , 6 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノン、2 - (3 - プロモ - 5 - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5 , 6 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノン、3 - (3 , 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - ヒドロキシ - 5 , 6 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノン、2 - (3 , 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 3 - ヒドロキシ - 5 , 7 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノン、3 - (3 , 5 - ジ - ターシャリー - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - ヒドロキシ - 5 , 7 - ジメチル - 1 , 4 - ナフトキノン。

10

【 0 0 4 1 】

本発明の変法においては、DNAの化学的処理に使用された反応剤を後続する増幅の前に、完全に、または、部分的に、除去することが好ましい。これは例えば、DNAの固相への結合と反応剤の洗浄ステップによって達成できる。本発明の特に好ましい変法において、化学的処理後に、反応剤が後続する増幅を直接妨害しない程度の低い濃度になるように、その都度、単に、試料が希釈される。本発明の特に好ましい変法において、多くのDNA断片の増幅が一つの反応器で行われる。本発明の特に好ましい変法において、増幅には耐熱性DNAポリメラーゼが使用され、専門家が原理を熟知しているPCRが増幅に組み込まれる。

20

【 0 0 4 2 】

本発明において、同様の化学的前処理に基づいて、スルホン酸基を意のままにできるので、好ましくは、増幅の前に脱硫が行なわれる。特に好ましくは、この脱硫は塩基性バッファ中、好ましくは、増幅反応のために用意されるバッファ中で行なわれる。

【 0 0 4 3 】

次の多くの圧倒的に、専門家にとって原理的に周知の方法によって、本発明の実施後、残存する、最初のゲノムDNA試料内のシトシンメチル化の実施の指標となるシトシンまたはグアニン塩基が証明され得る。

30

【 0 0 4 4 】

本発明においては、残存するシトシン及び/またはグアニン塩基またはシトシン - グアニン塩基対がハイブリッド化反応によって実証されることが特に好ましい。この実証が、増幅産物がオリゴヌクレオチッドアレーにハイブリッド化されるように実施されることが好ましい。次いで、以下の各ステップが実施される。第一ステップで、増幅されたゲノムDNAが少なくとも、一つのオリゴヌクレオチッドに二本鎖構造の形成下にハイブリッド化され、その際、前記ハイブリッド化されたオリゴヌクレオチッドが、その3' - 末端で、直接または10塩基の間隔を置いた、ゲノムDNA試料のメチル化が調べられる位置に配置される。オリゴヌクレオチッドを既知の配列のnヌクレオチッドで、ポリメラーゼによって、少なくともヌクレオチッド一個分だけ伸長させる。その際、ヌクレオチッドは実証できるマーカーを帯びており、伸長は最初のゲノムDNA試料のシトシンのメチル化状態に依存する。テンプレートDNAにおけるオリゴヌクレオチッドの3' - 末端に、マーカーを帯びたシトシンの構造を許容するグアニンが隣接していると、例えば、伸長反応が行なわれる。オリゴヌクレオチッドへのマーカーを帯びたシトシンの結合は最終的に、最初のゲノム試料のメチル化シトシンの存在を実証する反応として役立つ。

40

【 0 0 4 5 】

更に、第二回目の化学的処理（及び通常第二の増幅）後に残存するシトシン塩基及び/またはグアニン塩基を配列化反応によって実証することが可能である。専門家にとっては、なかんずく、サンガー（Sanger）の配列化及びマクスアム - ギルバート（Maxam - Gilbert）の配列化は周知である。最初のゲノムDNA試料のメチル化シトシ

50

ンが存在する二本鎖構造に、C G塩基対のみが存在するので、とりわけ、後者がここで提供される。C及び/またはGの特殊な分割反応によって、その大きさが直接試料のメチル化状態に結びつく断片を生成させることができる。この断片は例えば、配列化または毛管電気泳動法によりその大きさが決定される。従来技術のように一回の重亜硫酸塩処理に対して、本発明の方法はその変法において、これがCもGも含まないので、対向する鎖の分割は為されないという特別な利点を与える。それによって、生成する断片の数が、はっきりと減少し、多くの増幅産物が、同時に調べられる場合は、多くの概括的な評価が可能になる。

【0046】

前処理されたDNAの検出のために、増幅産物がオリゴヌクレオチッドアレーにハイブリッド化され、次いで、以下のステップが行なわれることが、本発明の変法では好ましい。即ち、最初のステップで、一揃いのオリゴヌクレオチッドを増幅されたゲノムDNAに、二本鎖の形成下、ハイブリッド化させ、その際、この一揃いのオリゴヌクレオチッドが二つの異なるスペースからなり、最初のスペースのハイブリッド化オリゴヌクレオチッドは、その3'-末端で直接または10塩基の間隔を置いた、ゲノムDNA試料のメチル化が調べられる位置に配置され、第二のスペースの第二のオリゴヌクレオチッドは、目的分子の第二の領域下に、ハイブリッド化され、その結果、第二のスペースの第二のオリゴヌクレオチッドの5'-末端が、個々のヌクレオチッドの大きさの隙間を通るかまたは、第一のスペースのハイブリッド化オリゴヌクレオチッドの3'-末端から前記選択された位置だけ、離れているようになる。

第二のステップで、第一のスペースのオリゴヌクレオチッドを既知の配列のnヌクレオチッドで、ポリメラーゼによって、高々、第一のスペースのオリゴヌクレオチッドの3'-末端と第二のスペースのオリゴヌクレオチッドの5'-末端の間のヌクレオチッド数だけ伸長させる。その際、ヌクレオチッドは実証できるマーカーを帯びており、伸長はゲノムDNA試料のシトシンのメチル化状態に依存する。例えば、もし、化学的前処理において、シトシンの代わりにチミンが対象になっているときに、3'-末端の伸長は可能である。それは例えば、使用されたヌクレオチッド混合物でグアニンだけが末端に散在し、それに伴って伸長が、シトシンが対象の場合、中断されるからである。シトシンは、最初のDNAの当該位置に5-メチルシトシンが存在するとき、化学的処理後再びそこに存在する。

【0047】

最後のステップで、リガーゼの存在下、オリゴヌクレオチッドを培養する。その際、隣接する、ポリメラーゼ反応により、伸長される第一のスペースのオリゴヌクレオチッド及び第二のスペースのオリゴヌクレオチッドが結合し、それまでのステップで、第一のスペースのオリゴヌクレオチッドの伸長が、3'-末端が伸長されたオリゴヌクレオチッドの3'-ヒドロキシ機能で直接、第二のスペースのオリゴヌクレオチッドの5'-末端に隣接するように、為されるかぎり、それによりライゲーション産物が得られる。

【0048】

前処理されたDNAの検出のために、PCR産物をオリゴヌクレオチッドアレーにハイブリッド化させ、次いで、以下の部分的ステップを実施することが好ましい。第一のステップで、増幅されたゲノムDNAを少なくとも、一つの既知のnヌクレオチッド配列のオリゴヌクレオチッドに、二本鎖構造の形成下に、ハイブリッド化し、その際、前記ハイブリッド化されたオリゴヌクレオチッドが、その3'-末端で部分的または完全に、その、ゲノムDNA試料のメチル化に関して、調べられる位置でハイブリッド化される。第二のステップで、オリゴヌクレオチッドを、その3'-末端で、予め、塩基対欠失なしで、調べる位置にポリメラーゼによって、少なくともヌクレオチッド一個分だけ、ハイブリッド化して伸長させ、その際、少なくとも、一個のヌクレオチッドが実証可能なマーカーを帯び、伸長はゲノムDNA試料のその都度のシトシンのメチル化状態に依存する。例えば、ゲノムDNAが、上記オリゴヌクレオチッドがその3'-末端と結合する位置に、最初は非メチル化状態で存在するとき、伸長が行われる。それは、化学前処理後、この位置に、

10

20

30

40

50

シトシンが残存し、これはオリゴヌクレオチッドの結合後、伸長を妨げる、3' - 末端でのミスマッチの原因になる。メチル化が存在しないとき、プライマーはミスマッチもなく、3' - 末端でテンプレートDNAと結合する。

【0049】

シトシンのメチル化の実証に役立つ、生成したDNAオリゴマーの解析は、例えば、マークされたヌクレオチッドとしてDNA中に組込まれた蛍光マーカールによって行なわれる。

【0050】

関与するオリゴヌクレオチッドが固相に結合するように、前記実証反応の大部分を実施することは専門家にとって容易である。

【0051】

PCRを例えば、二番目の化学的処理の後に、放射性核種または蛍光マーカールを帯びたC及び/またはGヌクレオチッドが組込まれ、そして、PCRプライマーの一つが固相に結合するように、実施することが、例えば、特に好ましい。固相に結合していない、全ての抽出物及び産物の除去後、固相に結合しているPCR産物が残存する。この産物では組込まれたマーカールの数が、二番目の化学的処理の後に残存する、グアニン及び/またはシトシン塩基の数に比例し、そして、直接ゲノム試料のシトシンのメチル化に依存する。かくして、このPCR産物のシトシンのメチル化の直接の数量化が可能になる。

10

【0052】

PCR産物及び/または伸長産物及び/またはライゲーション産物が検出のために実証可能なマーカールを備えていることが特に好ましい。

20

【0053】

これらのマーカールが質量分析計で実証可能な蛍光マーカール、放射性核種マーカールまたは分析可能な質量マーカールまたはこれらの組み合わせであることが特に好ましい。

【0054】

更に、特に好ましい本発明の方法の変法においては、PCR産物及び/または伸長産物及び/またはライゲーション産物を全部合わせて、質量分析計で実証し、それらの質量によって、一義的に、それらを特徴付ける。更に、好ましい変法においては、その都度、PCR産物及び/または伸長産物及び/またはライゲーション産物の一断片が質量分析計で実証される。更に、PCR産物及び/または伸長産物及び/またはライゲーション産物のこれらの断片が一種または二種以上のエキソまたはエンドヌクレアーゼの酵素作用によって、生成されることが好ましい。更に、本発明の方法の実施においては、生成する断片が、質量分析計の感度向上のために、各々陽電荷または陰電荷を帯びることが特に好ましい。

30

【0055】

更に、PCR産物及び/または伸長産物及び/またはライゲーション産物をマトリックス補助レーザー脱離/イオン化質量分析(MALDI-TOF)または電子シュブレーション質量分析(ESI)によって検出し、且つ映像化することが好ましい。

【0056】

本発明の対象は前記方法を患者または健常者の体調に現われる、好ましくない出来事についての診断または予診のために使用することである。この好ましくない出来事は少なくとも以下のカテゴリーに属する。薬の副作用；癌；CNS-機能欠失、障害、-疾病；攻撃的徴候または異常行動；脳障害による臨床的、心理的及び社会的帰結；精神異常及び人格異常；痴呆及び/または結合した徴候；心臓血管系疾患、その機能欠失及び傷害；胃腸の領域の機能欠失、傷害または疾病；呼吸器系の機能欠失、傷害または疾病；障害、炎症、感染、免疫性及び/または回復期；発育期の偏向的な機能欠失、傷害または疾病；皮膚、筋肉、結合組織、または骨の機能欠失、傷害または疾病；内分泌系及び代謝系の機能欠失、傷害または疾病；頭痛または性的機能欠失。

40

【0057】

更に、本発明の方法を細胞タイプまたは組織の区別または細胞区分の研究に使用することが特に好ましい。

【0058】

50

本発明の対象は、重亜硫酸塩含有反応剤、変性剤または溶剤及びラジカル捕捉剤及び/または増幅産物製造用のプライマー及び選択的に本発明の方法実施用のマニュアルからなるキットである。

【0059】

【実施例】

以下の実施例で本発明を解説するが、本発明はこれらの実施例によっては限定されない。

(実施例1) 2回の重亜硫酸塩による処理でゲノム配列を変換する。

本発明の方法の解説用として、ここでは、下記の、潜在的にメチル化されたCGジヌクレオチッドを含む二本鎖DNA配列を使用する。

A 3' - T G A T C T A G C A T G A C T A C - 5' 10

B 5' - A C T A G A T C G T A C T G A T G - 3'

二本鎖配列は、患者または健常者の体調に現われる好ましくない出来事について調べるために使用する。制限酵素(ここではMss1)で処理された、あるゲノムの、未知の、メチル化DNA試料(20ng)を使用する。処理されたDNAは昇温させて、重亜硫酸水素塩(重亜硫酸塩、酸性亜硫酸塩)とラジカル捕捉剤で化学変化される。変性を補助する反応剤または溶剤が添加される。DNAは先ず熱変性され、次いで、重亜硫酸塩、ラジカル捕捉剤及び変性剤が加えられ、長時間、昇温状態で、培養される。重亜硫酸塩反応が全ての非メチル化シトシン塩基をウラシルに変化させる。重亜硫酸塩処理DNAの精製のために、これを逆相C18固相上に結合させ、好適な化合物の緩衝液で洗浄して分離させる。次いで、DNAは例えば、アセトニトリルまたは水のような極性溶剤で溶出され、濃縮される。重亜硫酸塩処理断片のアルカリ加水分解は直接、特殊な増幅の前に塩基性条件下に行なわれる。次いで、試料は特殊なプライマーオリゴヌクレオチッド(CGジヌクレオチッドを含まない)25pmolによって希釈される。亜硫酸水素塩溶液による最初の処理後、非メチル化シトシン塩基のウラシルへの変化が行なわれ、後続する、亜硫酸水素塩による化学的処理後、もはや、相補的鎖を増幅せず、且つ、ウラシルが本質的にチミンで代替されるところの、PCRが下記の二本鎖DNA配列を齎す。

A) CG(+)メチル化である場合

下記B鎖から:

C (+) 3' - T A A T C T A G C A T A A C T A C - 5' 30

B' (+) 5' - A T T A G A T C G T A T T G A T G - 3' 配列L(up) 30

上記A鎖から:

A' (+) 3' - T G A T T T A G C A T G A T T A T - 5'

D (+) 5' - A C T A A A T C G T A C T A A T A - 3' 配列U(up) 30

B) CG(-)非メチル化である場合

下記B鎖から:

C (-) 3' - T A A T C T A A C A T A A C T A C - 5'

B' (-) 5' - A T T A G A T T G T A T T G A T G - 3' 配列L(down) 30

上記A鎖から:

A' (-) 3' - T G A T T T A G T A T G A T T A T - 5' 40

D (-) 5' - A C T A A A T C A T A C T A A T A - 3' 配列U(down) 40

【0060】

二番目の亜硫酸水素塩処理は一番目と類似した操作で行なわれる。増幅は先ず、熱変性する、このとき、試薬または溶剤の投与が補助的に行なわれる。次いで、化学反応が起こり、続いて増幅される。そのとき、アルカリ加水分解が増幅に先立ち、もう一度、短時間行なわれる。二番目の特殊な増幅は重亜硫酸塩処理した試料の一部を使用して行なうことができる。反応溶液は亜硫酸水素塩反応で必要とする化合物がPCRを妨げない程度に希釈される。他方、試料は再度、逆相C18固相によって精製される。二度、亜硫酸水素塩処理されたDNA試料は特殊なプライマーオリゴヌクレオチッド(CGジヌクレオチッドを

含まない) 25 pmol によって希釈される。そのとき、第一、第二の増幅時のプライマーオリゴヌクレオチドの配列は一致してはならない。

【0061】

第二の亜硫酸水素塩溶液による処理後、もう一度、非メチル化シトシン塩基のウラシルへの変換が行なわれる。そして、後続の、亜硫酸水素塩による化学的処理後、もはや、相補的鎖を増幅せず、且つ、ウラシルが本質的にチミンで代替されるところの、PCRが下記の二本鎖DNA配列を齎す。

A) CG (+)メチル化である場合

下記B'及びC鎖から：

E (+) 3' - T A A T C T A A C A T A A C T A C - 5' 10

B' (+) 5' - A T T A G A T T G T A T T G A T G - 3' 配列 LL (up)

C (+) 3' - T A A T T T A G T A T A A T T A T - 5'

F (+) 5' - A T T A A A T C A T A T T A A T A - 3' 配列 LU (up)

上記D及びA'鎖から：

G (+) 3' - T A A T T T A A C A T A A T T A T - 5'

D (+) 5' - A T T A A A T T G T A T T A A T A - 3' 配列 UL (up)

H (+) 3' - T G A T T T A G T A T G A T T A T - 5'

A' (+) 5' - A C T A A A T C A T A C T A A T A - 3' 配列 UU (up)

B) CG (-)非メチル化である場合

下記C及びB'鎖から：

E (-) 3' - T A A T C T A A C A T A A C T A C - 5' 20

B' (-) 5' - A T T A G A T T G T A T T G A T G - 3' 配列 LL (down)

C (-) 3' - T A A T T T A A T A T A A T T A T - 5'

F (-) 5' - A T T A A A T T A T A T T A A T A - 3' 配列 LU (down)

上記D及びA'鎖から、

G (-) 3' - T A A T T T A A T A T A A T T A T - 5'

D (-) 5' - A T T A A A T T A T A T T A A T A - 3' 配列 UL (down)

H (-) 3' - T G A T T T A G T A T G A T T A T - 5'

A' (-) 5' - A C T A A A T C A T A C T A A T A - 3' 配列 UU (down) 30

【0062】

配列UUは試料のメチル化状態に依存せず同一である。同様のことが配列LLに当てはまる。従って、両配列はメチル化状態の決定には使用できない。LU及びULはDNA試料(配列内で高められる)のメチル化状態への依存では、それ以前のCG位置で決定される。注目すべき方法の本来の利点は、特に、シトシンまたはグアニンが鎖中に、メチル化が行なわれるとき、思いがけなく現われることである。それで、実際、ゲノム試料のメチルシトシン塩基の二本鎖の特徴を有する塩基への移行が行なわれ、一方、一回の重亜硫酸塩処理で、塩基が二本鎖の一本でのみ、メチルシトシンの特徴を示す。これは事実、全ての、専門家に知られている配列化法(例えば、マクサムギルバートの配列化)または遺伝子型分類法の使用を、対向鎖を考慮することなく許容する。例えば、二回目の重亜硫酸塩処理後、増幅されるDNAの配列特異的分割がシトシン塩基の位置で行なわれるならば、一本鎖の分割が、他方が変化しないままで行なわれる。

【0063】

(実施例2) 2回の重亜硫酸塩処理によるゲノム配列の変化

サンプルとしてヒトゲノムのHSM DR1遺伝子が選択された。実験で、最初の重亜硫酸塩処理後、2010塩基対長の、この遺伝子のDNA断片が得られ、同時に、gcリッチの領域が5'-末端及び3'-末端に発生した。これらのPCR産物の人工的5'-及び3'-末端が最初の重亜硫酸塩処理後に生成したので、これらは二回目の重亜硫酸塩処理において、一回の変換の基礎になっている。なお、C's及びG'sを含むので(他の配

列への対比で)、これはこの領域のより高度の特殊性に通じる。それに伴って、これは特に2回目の重亜硫酸塩処理後、増幅用のプライマーのデザインに好適である。標的DNAの短い断片の増幅はA's及びT'sだけからなるプライマーによって行われる。ゲノム配列、1回の重亜硫酸塩処理及び2回の重亜硫酸塩処理によるDNAは末端に示される。

【0064】

(図面の説明)

図1: gc領域で、一回の重亜硫酸塩で処理されたDNAからPCR産物を製造する概略図である。

a) 5' g t g a t c c c g g g c g a g c t c c c T A A G T A T G T T G A A G A A A G A T T A T T G ;

10

b) 3' g c t t g g g c t g c a g g t c g a c c T T T T A A C C T T C T A T C T C A T C A A C ;

c) 重亜硫酸塩処理済みDNA、単鎖。

図2: HSM DR 1 遺伝子の周囲のゲノム配列: ロカス(遺伝子座) HSM DR 1 A 2 9 3 2 b p DNA P-グリコプロテイン用ヒトMDR 1(多薬剤の抵抗性)遺伝子。

図3: 第一回の重亜硫酸塩の後の、CG's、(プライマー1及び2によるPCR産物)の完全なメチル化の場合のための、前記鎖の配列。

図4: 二回目の重亜硫酸塩処理後全てのCG'sの完全なメチル化の場合のための下記の鎖の配列。

a) プライマー3及び4によるPCR産物(154bp)

20

b) プライマー5及び6によるPCR産物(2010bp)

【0065】

先行:

a) ヒトDNAの未知のメチル化状態のMss1による制限。

b) アガロース法による重亜硫酸塩処理。

c) 1936塩基対長のMDR1断片製造用の重亜硫酸塩特殊PCR。このとき、同時に、プライマー鎖分によりPCR産物に、合成のgcリッチの末端が生成する。

d) アガロース不使用の2回目の重亜硫酸塩処理に続くZipTip-精製。

e) 重亜硫酸塩処理二本鎖DNAのgc領域のプライマーによる増幅。

【0066】

30

実験に使用されたプライマー:

・重亜硫酸塩プライマー、産物の大きさ: 2010塩基対長

1 MDR1-B-U-gc g t g a t c c c g g g c g a g c t c c c T A A G T A T G T T G A A G A A A G A T T A T T G

2 MDR1-B-L-gc g c t t g g g c t g c a g g t c g a c C T T T T A A C C T T C T A T C T C A T C A A C

<-gc領域-----> <-遺伝子特殊性配列-->

・2回の重亜硫酸塩処理を施されるDNA用プライマー、gc領域がなく、産物の大きさ154bp。

3 MDR1-2B-U3 t t t t t t t t t a t t t t t t t a t t a t

40

4 MDR1-2B-L3 a t t t t t t t t t a t t a t t t t t t a a t

・2回の重亜硫酸塩処理を施されるDNA用プライマー、gc領域を有し、産物の大きさ2010bp。

5 MDR1-2B-L-gc G T T T G G G T T G T A G G T T G A T

6 MDR1-2B-U-gc a t a a t c c c a a a c a a a c t c c c

【0067】

試験条件:

ヒトゲノムDNA(Fa.プロメガ)の制限はMss1(Fa.ファーマンタス)で手引書に従って行なった。分解されたDNAの最初の重亜硫酸塩処理は従来公知のアガロース法で行なった。

50

【0068】

DNAの増幅は下記の条件で行った (F A . Q i a g e n) :

- ・ 1 μ l DNA (1 0 n g 亜硫酸塩処理DNA)
- ・ 0 . 2 μ l T a q (1 ユニット)
- ・ 0 . 2 μ l d N T P (各 2 5 m M) 最後に 0 . 2 5 m M
- ・ 1 μ l プライマー 1 (1 2 . 5 p m o l / μ l) 最後に 0 . 5 p m o l / μ l
- ・ 1 μ l プライマー 2 (1 2 . 5 p m o l / μ l) 最後に 0 . 5 p m o l / μ l
- ・ 2 . 5 μ l 1 0 倍 P C R 緩衝液
- ・ 1 9 . 1 水 (分子グレード)

【0069】

下記のサイクルプログラムが使用された。

- ・ 最初の亜硫酸塩処理後プライマー領域 (プライマー 1 及び 2) との P C R : 9 5 / 2 0 : 0 0 ; 9 5 / 1 : 0 0 ; 5 6 / 0 : 4 5 ; 7 2 / 2 : 0 0 ; サイクルス : 4 0 ; 7 2 / 1 0 : 0 0 ; 4 終了
- ・ 第二回の亜硫酸塩処理後 (プライマー 3 及び 4) との P C R : 9 5 / 2 0 : 0 0 ; 9 5 / 1 : 0 0 ; 4 0 / 0 : 4 5 ; 7 2 / 1 : 0 0 ; サイクルス : 4 0 ; 7 2 / 1 0 : 0 0 ; 4 終了
- ・ 第二回の亜硫酸塩処理後 (プライマー 5 及び 6) との P C R : 9 5 / 2 0 : 0 0 ; 9 5 / 1 : 0 0 ; 5 6 / 0 : 4 5 ; 7 2 / 2 : 0 0 ; サイクルス : 4 0 ; 7 2 / 1 0 : 0 0 ; 4 終了

【0070】

製造された P C R 産物の第二回の亜硫酸塩処理はアガロースなしで、溶液中で行った。塩及び化合物の除去のために、二回の亜硫酸塩処理を施された DNA が Z i p T i p[®] 法 (F A : ミリポア) で精製された。そのとき、以下の処理がなされた :

- ・ 新しいピペットで、2モルの T E A A 緩衝液の 1 0 μ l で 3 回洗浄する。
- ・ 3 5 μ l P C R 産物
- ・ 2 モルの T E A A の 1 0 μ l で 1 回洗浄する。
- ・ 0 . 1 モルの T E A A の 1 0 μ l で 3 回洗浄する。
- ・ 水 1 0 μ l で 3 回洗浄する。
- ・ 1 0 0 μ l シアン化メチルで産物を溶出する (新しいシアン化メチル 1 0 μ l で 1 0 回、チューブに溶出) 。
- ・ 1 0 0 μ l 溶出物真空乾燥、水 3 0 μ l 中で再懸濁、すぐに P C R へ。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 g c 領域で、一回の亜硫酸塩で処理された DNA から P C R 産物を製造する概略図である。

a) 5 ' g t g a t c c c g g g c g a g c t c c c T A A G T A T G T T G A A G A A A G A T T A T T G ;

b) 3 ' g c t t g g g c t g c a g g t c g a c c T T T T A A C C T T C T A T C T C A T C A A C ;

c) 亜硫酸塩処理済み DNA、単鎖。

【図 2】 H S M D R 1 - 遺伝子の周囲のゲノム配列 : ロカス (遺伝子座) H S M D R 1 A 2 9 3 2 b p DNA P - グリコプロテイン用ヒト M D R 1 (多薬剤の抵抗性) 遺伝子

【図 3】 第一回の亜硫酸塩の後の、C G ' s、(プライマー 1 及び 2 による P C R 産物) の完全なメチル化の場合のための、前記鎖の配列。

【図 4】 二回目の亜硫酸塩処理後全ての C G ' s の完全なメチル化の場合のための鎖の配列。

a) プライマー 3 及び 4 による P C R 産物 (1 5 4 b p)

b) プライマー 5 及び 6 による P C R 産物 (2 0 1 0 b p)

【国際公開パンフレット】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
18. April 2002 (18.04.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/31186 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68
- (72) Erfinder: und
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/03901
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BERLIN, Kurt [DE/DE]; Marienkirchweg 4, 14532 Stahnsdorf (DE)
- (22) Internationales Anmeldedatum: 10. Oktober 2001 (10.10.2001)
- (74) Anwalt: SCHUBERT, Klemens, Joachimstrasse 9, 10119 Berlin (DE)
- (25) Erteilungssprache: Deutsch
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, 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, NA, NZ, PI, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 100 50 942 K 10. Oktober 2000 (10.10.2000) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): EPIGENOMICS AG [DE/DE]; Kastanienallee 24, 10435 Berlin (DE)

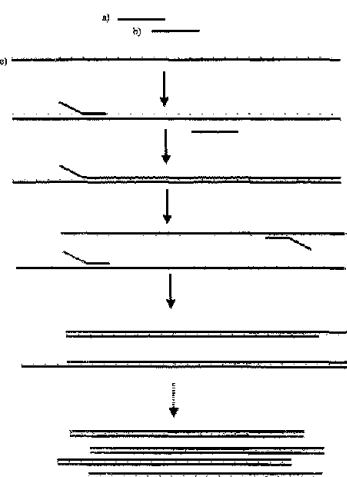
[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR THE DETECTION OF CYTOSINE METHYLATIONS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON CYTOSIN METHYlierUNGEN



WO 02/31186 A2



(57) Abstract: A method for the detection of cytosine methylations in genomic DNA is disclosed, whereby genomic DNA samples are firstly reacted with a chemical reagent, whereupon 5-methylcytosine and cytosine react differently and thus display a different base pair relationship in the DNA duplex after said reaction. The pre-treated DNA is then amplified by means of a polymerase and at least one primer oligonucleotide and the amplified material once again reacted with a chemical reagent as above. The cytosine bases and/or guanine bases remaining in the amplified material after the renewed chemical treatment are detected in the final step.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben wird ein Verfahren zur Detektion von Cytosin-Methylierung in genomischer DNA. Dazu wird zunächst genomische DNA-Probe mit einem Reagenz chemisch umgesetzt, wobei 5-Methylcytosin und Cytosin unterschiedlich reagieren und diese somit nach der Reaktion ein unterschiedliches Basenpaarungsverhalten in der DNA Duplex zeigen. Dann wird die vorbehandelte DNA unter Verwendung einer Polymerase und mindestens einem Primäroligonukleotid amplifiziert und das Amplifikat erneut mit einem Reagenz chemisch wie oben umgesetzt. Die in dem Amplifikat nach der erneuten chemischen Behandlung verbleibenden Cytosinbasen und/oder Guaninbasen werden im letzten Schritt nachgewiesen.

WO 02/31186 A2



(84) **Bestimmungsstaaten** (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CI, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NB, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:
ohne internationalen Recherchebericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierungen

Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Verfahren zur
5 Detektion des Methylierungszustandes genomischer DNA Pro-
ben.

Die nach den methodischen Entwicklungen der letzten Jahre
10 in der Molekularbiologie gut studierten Beobachtungsebe-
nen sind die Gene selbst, die Übersetzung dieser Gene in
RNA und die daraus entstehenden Proteine. Wann im Laufe
der Entwicklung eines Individuums welches Gen angeschal-
tet wird und wie Aktivieren und Inhibieren bestimmter Ge-
15 ne in bestimmten Zellen und Geweben gesteuert wird, ist
mit Ausmaß und Charakter der Methylierung der Gene bzw.
des Genoms korrelierbar. Insofern äußern sich pathogene
Zustände in einem veränderten Methylierungsmuster einzel-
ner Gene oder des Genoms.

20 5-Methylcytosin ist die häufigste kovalent modifizierte
Base in der DNA eukaryötischer Zellen. Sie spielt bei-
spielsweise eine Rolle in der Regulation der Transkripti-
on, beim genetischen Imprinting und in der Tumorgenese.
Die Identifizierung von 5-Methylcytosin als Bestandteil
25 genetischer Information ist daher von erheblichem Inte-
resse. 5-Methylcytosin-Positionen können jedoch nicht
durch Sequenzierung identifiziert werden, da 5-
Methylcytosin das gleiche Basenpaarungsverhalten aufweist
wie Cytosin. Darüber hinaus geht bei einer PCR-
30 Amplifikation die epigenetische Information, welche die
5-Methylcytosine tragen, vollständig verloren.

Eine relativ neue und die mittlerweile am häufigsten an-
gewandte Methode zur Untersuchung von DNA auf 5-
35 Methylcytosin beruht auf der spezifischen Reaktion von
Bisulfit mit Cytosin, das nach anschließender alkalischer

Hydrolyse in Uracil umgewandelt wird, welches in seinem Basenpaarungsverhalten dem Thymin entspricht. 5-Methylcytosin wird dagegen unter diesen Bedingungen nicht modifiziert. Damit wird die ursprüngliche DNA so umgewandelt, dass Methylcytosin, welches ursprünglich durch sein Hybridisierungsverhalten vom Cytosin nicht unterschieden werden kann, jetzt durch „normale“ molekularbiologische Techniken als einzig verbliebenes Cytosin beispielsweise durch Amplifikation und Hybridisierung oder Sequenzierung nachgewiesen werden kann. Alle diese Techniken beruhen auf Basenpaarung, welche jetzt voll ausgenutzt wird. Der Stand der Technik, was die Empfindlichkeit betrifft, wird durch ein Verfahren definiert, welches die zu untersuchende DNA in einer Agarose-Matrix einschließt, dadurch die Diffusion und Renaturierung der DNA (Bisulfit reagiert nur an einzelsträngiger DNA) verhindert und alle Fällungs- und Reinigungsschritte durch schnelle Dialyse ersetzt (Olek A, Oswald J, Walter J. A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis. *Nucleic Acids Res.* 1996 Dec 15;24(24):5064-6). Mit dieser Methode können einzelne Zellen untersucht werden, was das Potential der Methode veranschaulicht. Allerdings werden bisher nur einzelne Regionen bis etwa 3000 Basenpaare Länge untersucht, eine globale Untersuchung von Zellen auf Tausenden von möglichen Methylierungsanalysen ist nicht möglich. Allerdings kann auch dieses Verfahren keine sehr kleinen Fragmente aus geringen Probenmengen zuverlässig analysieren. Diese gehen trotz Diffusionsschutz durch die Matrix verloren.

Eine Übersicht über die weiteren bekannten Möglichkeiten, 5-Methylcytosine nachzuweisen, kann aus dem folgenden Übersichtsartikel entnommen werden: Rein T, DePamphilis ML, Zorbas H. Identifying 5-methylcytosine and related modifications in DNA genomes. *Nucleic Acids Res.* 1998 May 15;26(10):2255-64.

WO 02/31186

PCT/DE01/03901

3

Die Bisulfit-Technik wird bisher bis auf wenige Ausnahmen (z. B. Zesch-nigk M, Lich C, Buiting K, Doerfler W, Horsthemke B. A single-tube PCR test for the diagnosis of Angelman and Prader-Willi syndrome based on allelic methylation differences at the SNRPN locus. Eur J Hum Genet. 1997 Mar-Apr;5(2):94-8) nur in der Forschung angewendet. Immer aber werden kurze, spezifische Stücke eines bekannten Gens nach einer Bisulfit-Behandlung amplifiziert und entweder komplett sequenziert (Olek A, Walter J. The pre-implantation ontogeny of the H19 methylation imprint. Nat Genet. 1997 Nov;17(3):275-6) oder einzelne Cytosin-Positionen durch eine „Primer-Extension-Reaktion“ (Gonzalzo ML, Jones PA. Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE). Nucleic Acids Res. 1997 Jun 15;25(12):2529-31, WO-Patent 9500669) oder einen Enzymschnitt (Xiong Z, Laird FW. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. Nucleic Acids Res. 1997 Jun 15;25(12):2532-4) nachgewiesen. Zudem ist auch der Nachweis durch Hybridisierung beschrieben worden (Olek et al., WO 99 28498).

Weitere Publikationen, die sich mit der Anwendung der Bisulfit-Technik zum Methylierungsnachweis bei einzelnen Genen befassen, sind:

Grigg G, Clark S. Sequencing 5-methylcytosine residues in genomic DNA. Bioessays. 1994 Jun;16(6):431-6, 431; Zesch-nigk M, Schmitz B, Dittrich B, Buiting K, Horsthemke B, Doerfler W. Imprinted segments in the human genome: different DNA methylation patterns in the Prader-Willi/Angelman syndrome region as determined by the genomic sequencing method. Hum Mol Genet. 1997 Mar;6(3):387-95; Feil R, Charlton J, Bird AP, Walter J, Reik W. Methylation analysis on individual chromosomes: improved protocol for bisulphite genomic sequencing. Nu-

WO 02/31186

PCT/DE01/03901

4

5 cleic Acids Res. 1994 Feb 25;22(4):695-6; Martin V, Ribieras S, Song-Wang X, Rio MC, Dante R. Genomic sequencing indicates a correlation between DNA hypomethylation in the 5' region of the p52 gene and its expression in human breast cancer cell lines. Gene. 1995 May 19;157(1-2):261-4; WO 97 46705, WO 95 15373 und WO 95 45560.

10 Eine Übersicht über den Stand der Technik in der Oligomer Array Herstellung läßt sich aus einer im Januar 1999 erschienenen Sonderausgabe von Nature Genetics (Nature Genetics Supplement, Volume 21, January 1999), der dort zitierten Literatur und dem US-Patent 5994065 über Methoden zur Herstellung von festen Trägern für Zielmoleküle wie
15 Oligonukleotide bei vermindertem nichtspezifischem Hintergrundsignal entnehmen.

Für die Abtastung eines immobilisierten DNA-Arrays sind vielfach fluoreszent markierte Sonden verwendet worden.
20 Besonders geeignet für Fluoreszenzmarkierungen ist das einfache Anbringen von Cy3 und Cy5 Farbstoffen am 5'-OH der jeweiligen Sonde. Die Detektion der Fluoreszenz der hybridisierten Sonden erfolgt beispielsweise über ein Konfokalmikroskop. Die Farbstoffe Cy3 und Cy5 sind, neben
25 vielen anderen, kommerziell erhältlich.

Matrix-assistierte Laser Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-TOF) ist eine sehr leistungsfähige Entwicklung für die Analyse von Biomolekülen (Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. Anal Chem. 1988 Oct 15;60(20):2299-301). Ein Analyt wird
30 in eine Lichtabsorbierende Matrix eingebettet. Durch einen kurzen Laserpuls wird die Matrix verdampft und das Analytmolekül so unfragmentiert in die Gasphase befördert. Durch Stöße mit Matrixmolekülen wird die Ionisation
35

des Analyten erreicht. Eine angelegte Spannung beschleunigt die Ionen in ein feldfreies Flugrohr. Auf Grund ihrer verschiedenen Massen werden Ionen unterschiedlich stark beschleunigt. Kleinere Ionen erreichen den Detektor
5 früher als größere.

MALDI-TOF Spektroskopie eignet sich ausgezeichnet zur Analyse von Peptiden und Proteinen. Die Analyse von Nukleinsäuren ist etwas schwieriger (Gut, I. G. und Beck, S.
10 (1995), DNA and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. Molecular Biology: Current Innovations and Future Trends 1: 147-157.) Für Nukleinsäuren ist die Empfindlichkeit etwa 100 mal schlechter als für Peptide und nimmt mit zunehmender Fragmentgröße überproportional ab. Für Nukleinsäuren, die ein vielfach negativ
15 geladenes Rückgrat haben, ist der Ionisationsprozeß durch die Matrix wesentlich ineffizienter. In der MALDI-TOF Spektroskopie spielt die Wahl der Matrix eine eminent wichtige Rolle. Für die Desorption von Peptiden sind einige sehr leistungsfähige Matrices gefunden worden, die eine sehr feine Kristallisation ergeben. Für DNA gibt es
20 zwar mittlerweile einige ansprechende Matrices, jedoch wurde dadurch der Empfindlichkeitsunterschied nicht verringert. Der Empfindlichkeitsunterschied kann verringert werden, indem die DNA chemisch so modifiziert wird, dass sie einem Peptid ähnlicher wird. Phosphorothioatnukleinsäuren, bei denen die gewöhnlichen Phosphate des Rückgrats durch Thiophosphate substituiert sind, lassen sich
25 durch einfache Alkylierung in eine ladungsneutrale DNA umwandeln (Gut, I. G. und Beck, S. (1995), A procedure for selective DNA alkylation and detection by mass spectrometry. Nucleic Acids Res. 23: 1367-1373). Die
30 Kopplung eines „charge tags“ an diese modifizierte DNA resultiert in der Steigerung der Empfindlichkeit um den gleichen Betrag, wie er für Peptide gefunden wird. Ein
35 weiterer Vorteil von „charge tagging“ ist die erhöhte

WO 02/31186

PCT/DE01/03901

6

Stabilität der Analyse gegen Verunreinigungen, die den Nachweis unmodifizierter Substrate stark erschweren.

5 Genomische DNA wird durch Standardmethoden aus DNA von Zell-, Gewebe- oder sonstigen Versuchsproben gewonnen. Diese Standardmethodik findet sich in Referenzen wie Fritsch und Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989.

10 Harnstoff verbessert die Effizienz der Bisulfit-Behandlung vor der Sequenzierung von 5-Methylcytosin in genomischer DNA (Paulin R, Grigg GW, Davey MW, Piper AA. Urea improves efficiency of bisulphite-mediated sequencing of 5'-methylcytosine in genomic DNA. Nucleic Acids Res. 1998 Nov 1;26(21):5009-10).

Es gibt demnach Verfahren, die es erlauben, Cytosin-Methylierung dadurch zu identifizieren, dass alle nicht methylierten Cytosine in eine bestimmte Base umgewandelt werden und lediglich die methylierten Cytosine nach der Amplifikation noch als Cytosin vorliegen. Damit ist es jedoch nicht ohne weiteres möglich, umgekehrt nach der Amplifikation alle noch vorhandenen Cytosinbasen ehemals methylierten Cytosinen zuzuordnen, da bei der Amplifikation im Gegenstrang immer noch Cytosin als Komplementäres zu dem nicht umgewandelten Guanin eingebaut wird. Dies stört jedoch, will man in einem einfachen Verfahren für Cytosin charakteristische Reaktionen ausnutzen, um methylierte Positionen zu bestimmen oder das Ausmaß der Methylierung in dem amplifizierten Abschnitt festzustellen. Dieses Problem soll in der vorliegenden Erfindung gelöst werden.

35 Es ist Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren bereitzustellen, das es erlaubt, in eine amplifizierte doppelsträngige DNA Markierungen einzubauen, die zur eindeutigen Identifizierung

WO 02/31186

PCT/DE01/03901

7

tifizierung von Cytosin-Methylierungen in genomischen DNA-Proben genutzt werden können. Diese Markierungen sollen die Verwendung einfacher etablierter molekularbiologischer Methoden zur Methylierungsanalyse erlauben.

5

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein Verfahren zur Detektion von Cytosin-Methylierung in genomischer DNA gelöst, wobei man die folgenden Verfahrensschritte ausführt:

- 10 a) man setzt eine genomische DNA-Probe mit einem Reagenz chemisch um, wobei 5-Methylcytosin unverändert bleibt und Cytosin in Uracil oder eine andere im Basenpaarungsverhalten dem Uracil ähnliche Base umgewandelt wird;
- 15 b) man amplifiziert die vorbehandelte DNA unter Verwendung einer Polymerase und mindestens eines Primeroligonukleotids;
- c) man setzt das Amplifikat erneut mit einem Reagenz chemisch um, wobei 5-Methylcytosin unverändert bleibt und Cytosin in Uracil oder eine andere im Basenpaarungsverhalten dem Uracil ähnliche Base umgewandelt wird;
- 20 d) man weist die in dem Amplifikat nach der erneuten chemischen Behandlung verbleibenden Cytosinbasen und/oder Guaninbasen nach.

25 Die Aufgabe wird ferner durch ein Verfahren zur Detektion von Cytosin-Methylierung in genomischer DNA gelöst, wobei man die folgenden Verfahrensschritte ausführt:

- a) man setzt eine genomische DNA-Probe mit einem Reagenz chemisch um, wobei 5-Methylcytosin unverändert bleibt und Cytosin in Uracil oder eine andere im Basenpaarungsverhalten dem Uracil ähnliche Base umgewandelt wird;
- 30 b) man amplifiziert die vorbehandelte DNA unter Verwendung einer Polymerase und mindestens eines Primeroligonukleotids;
- 35 c) man setzt das Amplifikat erneut mit einem Reagenz chemisch um, wobei 5-Methylcytosin unverändert bleibt und

WO 02/31186

PCT/DE01/03901

8

Cytosin in Uracil oder eine andere im Basenpaarungsverhalten dem Uracil ähnliche Base umgewandelt wird;
d) man amplifiziert die chemisch behandelten Amplifikate aus Schritt c) erneut;

5 e) man weist die in dem Amplifikat verbleibenden Cytosinbasen und/oder Guaninbasen nach. Diese erfindungsgemäße Verfahrenvariante umfasst zwei Amplifizierungsschritte.

10 Besonders bevorzugt ist bei den erfindungsgemäßen Verfahren dass die chemische Behandlung mit Natriumbisulfit (=Hydrogensulfit, Disulfit) erfolgt. Dabei ist es ferner besonders bevorzugt, dass die chemische Behandlung nach Einbetten der DNA in Agarose erfolgt.

15 Beim erfindungsgemäßen Verfahren ist bevorzugt, dass bei der chemischen Behandlung ein die DNA-Duplex denaturierendes Reagenz und/oder ein Radikalfänger zugegen ist. Besonders bevorzugt ist dabei, dass das denaturierende Reagenz aus einer der folgenden Substanzen ausgewählt

20 ist:

Polyethylenglykoldialkylether, Dioxan und substituierte Derivate, Harnstoff oder Derivate, Acetonitril, primäre Alkohole, sekundäre Alkohole, tertiäre Alkohole, Diethylenglykoldialkylether, Triethylenglykoldialkylether, Tetraethylenglykol-dialkylether, Pentaethylenglykoldialkylether, Hexaethylenglykoldialkylether, DMSO oder THF

25 und/oder dass der Radikalfänger aus einer der folgenden Substanzen ausgewählt ist:
Di-, Trihydroxybenzole, green tea extract, pine bark extract (Pycnogenol), Ginkgo Biloba extract (EGb 761), a flavonoid blend of several fruit and vegetable extracts (GNLD), Bio-Normalizer (Sun-O Corp), DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl), NDGA (Nordihydroguajaret-säure), Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), 2,6-Di-tert-butylphenol, 4-Methyl-di-tert-butylphenol, 4-Methoxy-di-tert-butylphenol, 2,6-Di-tert-

35

WO 02/31186

PCT/DE01/03901

9

butyl-p-cresol, 3,4-Dihydroxybenzoesäure, Vitamin C, E, Q, Hydrochinon, Ubichinon, Lignane, Hydroxyterpene, Flavonoide, Curcumin, Tannine, Retinsäureverbindungen, Ge-
 5 132 Bisbetacarboxyethyl germanium sesquioxide, Superoxid dismutase (SOD), Superoxid katalase, Alpha-Naphthoflavone, Ginkgo biloba extract (EGb 761), Di(2-methyl-5-chlorophenyl)dithionate und Cu(II)-Derivate, Mebendazole, CS (Chloroform soluble) alkaloidal extract, 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,2-
 10 naphthochinon, 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-1,2-naphthochinon, 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,2-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-brom-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-chlor-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-
 15 Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,4-naphthochinon, 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-
 20 tetrahydro-1,2-anthrachinon, 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-anthrachinon, 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-anthrachinon, 3-Brom-4-(3,5-di-tert-butyl-4-
 25 hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-anthrachinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-indan-1,3-dion, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-3,4-epoxy-3-hydroxy-4-methoxy-3,4-dihydro-2H-naphthalin-1-on, 2-(3,5-Di-tert-
 30 butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-3,4-epoxy-3,4-dimethoxy-3,4-dihydro-2H-naphthalin-1-on, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-indan-1-on, 3,3-Bi-[2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-inden-1-on]-3-yl, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-brom-5,5,8,8-tetramethyl-
 35 5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-chlor-5,5,8,8-tetramethyl-

- 5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthracinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthracinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthracinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthracinon, 2-Brom-3-(3-brom-5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthracinon, 2-Brom-3-(3,5-dibrom-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthracinon, 2-Brom-3-(3-brom-5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthracinon, 3-Brom-2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,4-anthracinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-1,4-anthracinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,4-anthracinon, 5,5,8,8-Tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalin-1,3-diol, 3-Methoxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalin-1-ol, 4-(3-Chlor-5,5,8,8-tetramethyl-1,4-dioxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracen-2-yl)-benzoesäure, Methyl-4-(3-chlor-5,5,8,8-tetramethyl-1,4-dioxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracen-2-yl)-benzoat, 4-(3-Hydroxy-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalin-2-yl)-benzoesäure, Methyl-(3-methoxy-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalin-2-yl)-benzoesäure, 4-(3-Hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-1,4-dioxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracen-2-yl)-benzoesäure, Methyl-4-(3-hydroxy-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalin-2-yl-azo)-benzoat, 4-(3-Hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-1,4-dioxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracen-2-yl-azo)-benzoesäure, 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydrocyclopenta[b]naphthalin-1,2-dion, 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydroanthracen-3H-1,2,4-trion, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,8-dimethyl-1,4-

- naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-6,7-dimethyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5-methyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-5-methyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-6-methyl-1,4-naphthochinon, 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-6-methyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,6-dimethyl-1,4-naphthochinon, 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-5,6-dimethyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,7-dimethyl-1,4-naphthochinon, 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-5,7-dimethyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-ethylthio-5-methyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-ethylthio-6-methyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,8-dimethyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-6,7-dimethyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5-methyl-1,4-naphthochinon, 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-5-methyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-6-methyl-1,4-naphthochinon, 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-6-methyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,6-dimethyl-1,4-naphthochinon, 2-(3-Brom-5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,6-dimethyl-1,4-naphthochinon, 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-5,6-dimethyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,7-dimethyl-1,4-naphthochinon, 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-5,7-dimethyl-1,4-naphthochinon.
- 35 Erfindungsgemäß ist auch bevorzugt, dass man Reagenzien, die für die chemische Behandlung der DNA eingesetzt wer-

- den, vor der jeweils nachfolgenden Amplifikation ganz oder teilweise abtrennt. Bevorzugt ist auch, dass man die Probe nach der chemischen Behandlung vor der Amplifikation verdünnt. Weiterhin ist erfindungsgemäß bevorzugt,
- 5 dass man die Amplifikation von mehreren DNA-Abschnitten gleichzeitig in einem Reaktionsgefäß durchführt und/oder dass man für die Amplifikation eine hitzebeständige DNA-Polymerase verwendet.
- 10 Ganz besonders bevorzugt ist aber auch ein erfindungsgemäßes Verfahren, wobei man vor den Amplifikationen eine Desulfonierung der DNA durchführt.
- Bevorzugt ist auch, dass man die nach der zweiten chemischen Behandlung verbleibenden Cytosin- und/oder Guaninbasen durch Hybridisierungsreaktionen nachweist und/oder dass man die nach der zweiten chemischen Behandlung verbleibenden Cytosin- und/oder Guaninbasen durch spezi-
- 15 fischen Einbau von nachweisbaren Markierungen an den Cytosin- und/oder Guaninbasen nachweist und/oder quantifiziert.
- Bevorzugt ist erfindungsgemäß auch ein Verfahren, wobei man in Schritt d) gemäß der ersten Verfahrensvariante oder Schritt e) gemäß der zweiten Verfahrensvariante für die Detektion der vorbehandelten DNA die Amplifikationsprodukte an einen Oligonukleotid Array hybridisiert und man anschliessend die folgenden Teilschritte aus-
- 20 führt:
- 30 a) die amplifizierte genomische DNA wird an mindestens ein Oligonukleotid unter Ausbildung einer Duplex hybridisiert, wobei besagte hybridisierte Oligonukleotide mit ihrem 3'-Ende unmittelbar oder im Abstand von bis zu 10 Basen an die Positionen angrenzen, die hinsichtlich ihrer
- 35 Methylierung in der genomischen DNA-Probe zu untersuchen sind;

(b) man verlängert das Oligonukleotid mit bekannter Sequenz von n Nukleotiden mittels einer Polymerase mindestens um ein Nukleotid, wobei das Nukleotid eine nachweisbare Markierung trägt und die Verlängerung vom Methylierungsstatus des jeweiligen Cytosins in der genomischen DNA-Probe abhängt.

Bevorzugt ist dabei auch, dass man die nach der zweiten chemischen Behandlung verbleibenden Cytosin- und/oder Guaninbasen durch Sequenzierungsreaktionen nachweist.

Weiterhin ist bevorzugt, dass man in Schritt d) gemäß der ersten Verfahrenvariante oder Schritt e) gemäß der zweiten Verfahrensvariante für die Detektion der vorbehandelten DNA die Amplifikationsprodukte an einen Oligonukleotid Array hybridisiert und man anschließend die folgenden Teilschritte ausführt:

(a) man hybridisiert einen Satz von Oligonukleotiden an die amplifizierte genomische DNA unter Ausbildung einer Duplex, wobei dieser Satz von Oligonukleotiden aus zwei verschiedenen Spezies besteht und wobei die hybridisierten Oligonukleotide der ersten Spezies mit ihrem 3'-Ende unmittelbar oder im Abstand von bis zu 10 Basen an die Positionen angrenzen, die hinsichtlich ihrer Methylierung in der genomischen DNA-Probe zu untersuchen sind und wobei das zweite Oligonukleotid der zweiten Spezies an eine zweite Region des Zielmoleküls hybridisiert, so dass das 5'-Ende des Oligonukleotids der zweiten Spezies durch eine Lücke von der Größe eines Einzelnukleotides oder bis zu 10 Nukleotiden vom 3'-Ende des hybridisierten Oligonukleotids der ersten Spezies an der Stelle der besagten ausgewählten Position getrennt ist;

(b) man verlängert das Oligonukleotid der ersten Spezies mit bekannter Sequenz von n Nukleotiden mittels einer Polymerase um höchstens die Anzahl von Nukleotiden, die zwischen dem 3'-Ende des Oligonukleotids der 1. Spezies

- und dem 5'-Ende des Oligonukleotids der 2. Spezies liegen, wobei die Verlängerung vom Methylierungsstatus des jeweiligen Cytosins in der genomischen DNA-Probe abhängt;
- 5 (c) man inkubiert die Oligonukleotide in Gegenwart einer Ligase, wobei das angrenzende, durch die Polymerasereaktion verlängerte Oligonukleotid der ersten Spezies und das Oligonukleotid der zweiten Spezies verbunden werden und man dadurch ein Ligationsprodukt erhält, sofern im vorangehenden Schritt eine Verlängerung des Oligonukleotids der ersten Spezies derart erfolgte, dass nun das 3'-Ende mit vorhandener 3'-Hydroxyfunktion des verlängerten Oligonukleotids unmittelbar an das 5'-Ende des Oligonukleotids der zweiten Spezies angrenzt.
- 10
- 15 Dabei ist weiterhin besonders bevorzugt, dass man für die Detektion der vorbehandelten DNA gemäß Schritt d) in der ersten Verfahrensvariante die PCR-Produkte auf einen Oligonukleotid Array hybridisiert und man anschliessend die folgenden Teilschritte ausführt:
- 20 (a) man hybridisiert die amplifizierte genomische DNA an mindestens ein Oligonukleotid mit bekannter Sequenz von n Nukleotiden unter Ausbildung einer Duplex, wobei besagte hybridisierte Oligonukleotide mit ihrem 3'-Ende teilweise oder vollständig an die Positionen hybridisieren, die hinsichtlich ihrer Methylierung in der genomischen DNA-Probe zu untersuchen sind;
- 25 (b) man verlängert das Oligonukleotid, sofern es mit seinem 3'-Terminus zuvor ohne Basenfehlpaarungen an die zu untersuchenden Position hybridisierte, mittels einer Polymerase mindestens um ein Nukleotid, wobei mindestens ein Nukleotid eine nachweisbare Markierung trägt und die Verlängerung vom Methylierungsstatus des jeweiligen Cytosins in der genomischen DNA-Probe abhängt.
- 30
- 35 Bevorzugt ist auch ein erfindungsgemäßes Verfahren, wobei man die PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte

und/oder Ligationsprodukte für die Detektion mit einer nachweisbaren Markierung versieht. Bevorzugt ist hierbei, dass die Markierungen Fluoreszenzmarkierungen sind oder dass die Markierungen Radionuklide sind oder dass die Markierungen ablösbare Massenmarkierungen sind, die in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden.

Bevorzugt ist auch, dass bei einer der Amplifikationen einer der Primer an eine Festphase gebunden ist.

Insbesondere ist bevorzugt, dass man die PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte insgesamt im Massenspektrometer nachweist und somit durch ihre Masse eindeutig charakterisiert sind. Bevorzugt ist auch, dass man jeweils ein Fragment der PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte im Massenspektrometer nachweist. Hierbei ist besonders bevorzugt, dass man das Fragment des PCR-Produkts und/oder Verlängerungsprodukts und/oder Ligationsprodukts durch Verdau mit einer oder mehrerer Exo- oder Endonukleasen erzeugt. Ganz besonders bevorzugt ist hierbei, dass zur besseren Detektierbarkeit im Massenspektrometer die erzeugten Fragmente eine einzelne positive oder negative Nettoladung aufweisen.

Bevorzugt ist erfindungsgemäß auch dass man die PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte mittels Matrix assistierter Laser Desorption/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI-TOF) oder mittels Elektrospray Massenspektrometrie (ESI) detektiert und visualisiert.

Besonders bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren, wobei die genomische DNA aus einer DNA-Probe erhalten wurde, wobei Quellen für DNA z. B. Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Pa-

raffin einbettetes Gewebe, beispielsweise Gewebe von Augen, Darm, Niere, Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust oder Leber, histologische Objektträger und alle möglichen Kombinationen hiervon umfassen.

5 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Verwendung eines erfindungsgemäßen Verfahrens zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens einer der folgenden Kategorien angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebskrankungen; 10 CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; Aggressionssymptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; 15 Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; 20 Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine 25 und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion.

Bevorzugt ist die Verwendung eines erfindungsgemäßen Verfahrens zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung. 30

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner ein Kit, bestehend aus einem Bisulfit enthaltenen Reagenz, denaturierenden Reagenzien oder Lösungsmitteln, sowie Radikalfängern und optional Primern zur Herstellung der Amplifi- 35

WO 02/31186

17

PCT/DE01/03901

kate, sowie optional einer Anleitung zur Durchführung eines Assays nach einem der Ansprüche 1-28.

5 Beschrieben wird in der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur Herstellung doppelsträngiger DNA aus einer genomischen DNA-Probe, die nach Durchführung des Verfahrens die Eigenschaft hat, dass CG Basenpaare nur noch an den Positionen vorliegen, an denen sich zuvor in der genomischen DNA Methylcytosinbasen befanden. Nachfolgend können jegliche Verfahren verwendet werden, die chemische, biologische oder physikalische Eigenschaften der CG Basenpaare ausnutzen, um die Positionen, an denen sich in der genomischen DNA-Probe Methylcytosinbasen befanden, kenntlich zu machen. Es werden dazu auch im folgenden viele bevorzugte Ausführungsvarianten aufgeführt, jedoch wird es unterstellt, dass der Fachmann von diesen abgeleitet oder alternativ weitere naheliegenden Möglichkeiten finden mag, CG Basenpaarungen nachzuweisen und für den hier vorgegebenen Zweck zu nutzen.

20 Die in dem Verfahren eingesetzte genomische DNA wird bevorzugt aus einer DNA-Probe erhalten, wobei Quellen für DNA z. B. Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Gehirnrückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin eingebettetes Gewebe, beispielsweise Gewebe von Augen, Darm, Niere, Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust oder Leber, histologische Objektträger und alle möglichen Kombinationen hiervon umfassen.

30 Das Verfahren zur Detektion von Cytosin-Methylierung in genomischer DNA wird durch folgende Schritte charakterisiert: Zuerst setzt man eine genomische DNA-Probe mit einem Reagenz chemisch um, wobei 5-Methylcytosin unverändert bleibt und Cytosin in Uracil oder eine andere im Basenpaarungsverhalten dem Uracil ähnliche Base umgewandelt wird. Anschließend wird im zweiten Schritt die vorbehandelte DNA unter Verwendung einer Polymerase und mindes-

35

- tens einem Primeroligonukleotid amplifiziert. Im dritten Schritt wird das Amplifikat erneut mit einem Reagenz chemisch umgesetzt, wobei 5-Methylcytosin unverändert bleibt und Cytosin in Uracil oder eine andere im Basenpaarungsverhalten dem Uracil ähnliche Base umgewandelt wird. Im letzten Schritt werden die in dem Amplifikat nach der erneuten chemischen Behandlung verbleibenden Cytosinbasen und/oder Guaninbasen nachgewiesen.
- 10 In einer besonders bevorzugten Variante wird das Verfahren durch die folgenden Schritte charakterisiert: Das Verfahren zur Detektion von Cytosin-Methylierung in genomischer DNA wird durch folgende Schritte charakterisiert: Zuerst setzt man eine genomische DNA-Probe mit einem Reagenz chemisch um, wobei 5-Methylcytosin unverändert bleibt und Cytosin in Uracil oder eine andere im Basenpaarungsverhalten dem Uracil ähnliche Base umgewandelt wird. Anschließend wird im zweiten Schritt die vorbehandelte DNA unter Verwendung einer Polymerase und mindestens einem Primeroligonukleotid amplifiziert. Im dritten Schritt wird das Amplifikat erneut mit einem Reagenz chemisch umgesetzt, wobei 5-Methylcytosin unverändert bleibt und Cytosin in Uracil oder eine andere im Basenpaarungsverhalten dem Uracil ähnliche Base umgewandelt wird. Im vierten Schritt werden die chemisch behandelten Amplifikate aus dem dritten Schritt erneut amplifiziert. Im letzten Schritt werden die in dem Amplifikat nach der erneuten chemischen Behandlung verbleibenden Cytosinbasen und/oder Guaninbasen nachgewiesen.
- 30 Die chemische Behandlung erfolgt besonders bevorzugt mit einer Lösung eines Hydrogensulfits (= Disulfit, Bisulfit). Diese Behandlung führt unter geeigneten Bedingungen, wie dem Fachmann an sich bekannt, zu einer Addition des Hydrogensulfits an nicht methylierte Cytosinbasen. Auf diese Reaktion folgt eine praktisch quantitative Um-
- 35

wandlung der Aminofunktion des Cytosins in eine Ketofunktion, so dass ein sulfoniertes Uracil entsteht, welches durch alkalische Hydrolyse in Uracil überführt wird. Es erfolgt also auf diesem Wege eine selektive Umwandlung der nicht methylierten Cytosinbasen in Uracil, während die 5-Methylcytosine unverändert bleiben. Diese Reaktion findet nur statt, wenn die DNA einzelsträngig vorliegt. In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens erfolgt daher die chemische Behandlung der DNA derart, dass diese in Agarose eingebettet vorliegt. Dadurch wird die Ausbildung von Duplexes verhindert.

In einer weiteren besonders bevorzugten Variante des Verfahrens wird bei der chemischen Behandlung ein Lösungsmittel oder ein Reagenz zugesetzt, welches die DNA-Duplex denaturiert. Bei diesen Lösungsmitteln oder Reagenzien handelt es sich bevorzugt um Polyethylenglykoldialkylether, Dioxan und substituierte Derivate, Harnstoff oder Derivate, Acetonitril, primäre Alkohole, sekundäre Alkohole, tertiäre Alkohole, Diethylenglykoldialkylether, Triethylenglykoldialkylether, Tetraethylenglykoldialkylether, Pentaethylenglykoldialkylether, Hexaethylenglykoldialkylether, DMSO oder THF.

Bevorzugt ist es zudem, einen Radikalfänger zuzusetzen, welcher den Abbau der DNA unter den Reaktionsbedingungen verhindert. Bei diesen Radikalfängern handelt es sich bevorzugt um Di-, Trihydroxybenzole, green tea extract, pine bark extract (Pycnogenol), Ginkgo Biloba extract (EGb 761), a flavonoid blend of several fruit and vegetable extracts (GNLD), Bio-Normalizer (Sun-O Corp), DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl), NDGA (Nordihydroguajaretensäure), Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), 2,6-Di-tert-butylphenol, 4-Methyl-di-tert-butylphenol, 4-Methoxy-di-tert-butylphenol, 2,6-Di-tert-butyl-p-cresol, 3,4-Dihydroxybenzoesäure, Vitamin C,

WO 02/31186

20

PCT/DE01/03901

E, Q, Hydrochinon, Ubichinon, Lignane, Hydroxyterpene, Flavonoide, Curcumin, Tannine, Retinsäureverbindungen, Ge-132 Bisbetacarboxyethyl germanium sesquioxide, Superoxid dismutase (SOD), Superoxid katalase, Alpha-Naphthoflavone, Ginkgo biloba extract (EGb 761), Di(2-methyl-5-chlorophenyl)dithionate und Cu(II)-Derivate, Mebendazole, CS (Chloroform soluble) alkaloidal extract, 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,2-naphthochinon, 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-1,2-naphthochinon, 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,2-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-brom-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-chlor-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,4-naphthochinon, 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-anthrachinon, 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-anthrachinon, 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-anthrachinon, 3-Brom-4-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-anthrachinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-indan-1,3-dion, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-3,4-epoxy-3-hydroxy-4-methoxy-3,4-dihydro-2H-naphthalin-1-on, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-3,4-epoxy-3,4-dimethoxy-3,4-dihydro-2H-naphthalin-1-on, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-indan-1-on, 3,3-Bi-[2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-inden-1-on]-3-yl, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-brom-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-chlor-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon, 2-(3,5-Di-tert-

- butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon, 2-Brom-3-(3-brom-5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon, 2-Brom-3-(3,5-dibrom-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon, 2-Brom-3-(3-brom-5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon, 3-Brom-2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,4-anthrachinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-1,4-anthrachinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,4-anthrachinon, 5,5,8,8-Tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalin-1,3-diol, 3-Methoxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalin-1-ol, 4-(3-Chlor-5,5,8,8-tetramethyl-1,4-dioxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracen-2-yl)-benzoesäure, Methyl-4-(3-chlor-5,5,8,8-tetramethyl-1,4-dioxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracen-2-yl)-benzoat, 4-(3-Hydroxy-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalin-2-yl)-benzoesäure, Methyl-(3-methoxy-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalin-2-yl)-benzoesäure, 4-(3-Hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-1,4-dioxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracen-2-yl)-benzoesäure, Methyl-4-(3-hydroxy-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalin-2-yl-azo)-benzoat, 4-(3-Hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-1,4-dioxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracen-2-yl-azo)-benzoesäure, 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydrocyclopenta(b)naphthalin-1,2-dion, 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydroanthracen-3H-1,2,4-trion, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,8-dimethyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-

hydroxyphenyl)-3-methoxy-6,7-dimethyl-1,4-naphthochinon,
 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5-methyl-
 1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-
 2-methoxy-5-methyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-
 5 butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-6-methyl-1,4-
 naphthochinon, 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-
 methoxy-6-methyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-
 4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,6-dimethyl-1,4-
 naphthochinon, 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-
 10 methoxy-5,6-dimethyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-
 butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,7-dimethyl-1,4-
 naphthochinon, 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-
 methoxy-5,7-dimethyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-
 butyl-4-hydroxyphenyl)-3-ethylthio-5-methyl-1,4-
 15 naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-
 ethylthio-6-methyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-
 butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,8-dimethyl-1,4-
 naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-
 hydroxy-6,7-dimethyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-
 20 butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5-methyl-1,4-
 naphthochinon, 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-
 hydroxy-5-methyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-
 butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-6-methyl-1,4-naphthochinon, 3-
 (3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-6-methyl-
 25 1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-
 3-hydroxy-5,6-dimethyl-1,4-naphthochinon, 2-(3-Brom-5-
 tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,6-dimethyl-1,4-
 naphthochinon, 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-
 hydroxy-5,6-dimethyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-
 30 butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,7-dimethyl-1,4-
 naphthochinon, 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-
 hydroxy-5,7-dimethyl-1,4-naphthochinon.

Bevorzugt ist zudem eine Variante des Verfahrens, in wel-
 35 cher die Reagenzien, die für die chemische Behandlung der
 DNA eingesetzt werden, vor der nachfolgenden Amplifikati-

on ganz oder teilweise abgetrennt werden. Dies kann beispielsweise durch Bindung der DNA an eine Festphase und Entfernen der Reagenzien durch Waschschriffe durchgeführt werden. In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens wird die Probe nach der chemischen Behandlung jedoch lediglich verdünnt, so dass die Reagenzien in einer

5 derart niedrigen Konzentration vorliegen, dass sie die unmittelbar nachfolgende Amplifikation nicht stören. In einer weiteren besonders bevorzugten Variante des Verfahrens wird die Amplifikation von mehreren DNA-

10 Abschnitten gleichzeitig in einem Reaktionsgefäß durchgeführt. Besonders bevorzugt wird zudem eine hitzebeständige DNA-Polymerase verwendet und die PCR für die Amplifikation eingesetzt, wie es dem Fachmann im Prinzip bekannt

15 ist.

Bevorzugt ist es zudem, jeweils vor den Amplifikationen eine Desulfonierung der DNA durchzuführen, da selbige aufgrund der chemischen Vorbehandlung noch über Sulfonsäuregruppen verfügen kann. Besonders bevorzugt erfolgt diese Desulfonierung in einem basischen Puffer, und idealerweise handelt es sich bei diesem basischen Puffer um den Puffer, der auch für die Amplifikationsreaktion eingesetzt wird.

25 Im folgenden werden nun mehrere, dem Fachmann überwiegend im Prinzip geläufige Verfahren beschrieben, wie die nach der Durchführung des Verfahrens verbleibenden Cytosin bzw. Guaninbasen, die nunmehr als Indikatoren für das Vorliegen von Cytosin-Methylierung in der ursprünglichen genomischen DNA-Probe dienen, nachgewiesen werden können.

Besonders bevorzugt werden die verbleibenden Cytosin- und/oder Guaninbasen bzw. Cytosin-Guanin Basenpaare durch

35 Hybridisierungsreaktionen nachgewiesen. Bevorzugt kann man diesen Nachweis derart ausführen, dass die Amplifika-

tionsprodukte an einen Oligonukleotid Array hybridisiert werden und man anschliessend die folgenden Teilschritte ausführt: Im ersten Schritt wird die amplifizierte DNA an mindestens ein Oligonukleotid unter Ausbildung einer Duplex hybridisiert, wobei besagte hybridisierte Oligonukleotide mit ihrem 3'-Ende unmittelbar oder im Abstand von bis zu 10 Basen an die Positionen angrenzen, die hinsichtlich ihrer Methylierung in der genomischen DNA-Probe zu untersuchen sind. Das Oligonukleotid oder die Oligonukleotide mit jeweils bekannter Sequenz von n Nukleotiden werden nun im nächsten Schritt mittels einer Polymerase mindestens um ein Nukleotid verlängert, wobei das Nukleotid eine nachweisbare Markierung trägt und die Verlängerung vom Methylierungsstatus des jeweiligen Cytosins in der ursprünglichen genomischen DNA-Probe abhängt. So ist es beispielsweise möglich, dass nur dann eine Verlängerungsreaktion stattfindet, wenn an das 3'-Ende des Oligonukleotids auf der Template-DNA ein Guanin angrenzt, das den Einbau eines markierten Cytosins erlaubt. Die Anknüpfung des markierten Cytosins an das Oligonukleotid dient dann letztendlich als Nachweisreaktion für das Vorliegen eines methylierten Cytosins in der ursprünglichen genomischen Probe.

Weiterhin ist es möglich, dass die nach der zweiten chemischen Behandlung (und optionalen zweiten Amplifikation) verbleibenden Cytosin- und/oder Guaninbasen durch Sequenzierungsreaktionen nachgewiesen werden. Dem Fachmann sind vor allem die Sequenzierung nach Sanger und die Sequenzierung nach Maxam-Gilbert geläufig. Vor allem letztere bietet sich hier an, da in der Duplex nur noch dort CG Basenpaare vorliegen, wo sich zuvor ein Methylcytosin in der ursprünglichen genomischen DNA-Probe befand. Es ist also möglich, durch die C und/oder die G spezifischen Spaltungsreaktionen Fragmente zu erzeugen, deren Grösse unmittelbar von dem Methylierungszustand der Probe anhängt.

gen. Diese Fragmente können dann beispielsweise auf Sequenziergelen oder durch Kapillarelektrophorese hinsichtlich ihrer Grösse bestimmt werden. Gegenüber einer nur einfachen Bisulfitbehandlung, wie sie im Stand der Technik beschrieben wird, spielt das hier beschriebene Verfahren in dieser Variante auch den besonderen Vorteil aus, dass die Spaltung des jeweiligen Gegenstranges nicht erfolgen kann, da dieser entweder kein C oder kein G enthalten kann. Dadurch ist die Zahl der entstehenden Fragmente deutlich reduziert und auch, falls mehrere Amplifikate gleichzeitig untersucht werden, eine viel übersichtlichere Auswertung möglich.

Bevorzugt ist zudem eine Variante des Verfahrens, in der für die Detektion der vorbehandelten DNA die Amplifikationsprodukte an einen Oligonukleotid Array hybridisiert werden und anschliessend die folgenden Teilschritte ausgeführt werden: Im ersten Schritt hybridisiert man einen Satz von Oligonukleotiden an die amplifizierte genomische DNA unter Ausbildung einer Duplex, wobei dieser Satz von Oligonukleotiden aus zwei verschiedenen Spezies besteht und wobei die hybridisierten Oligonukleotide der ersten Spezies mit ihrem 3'-Ende unmittelbar oder im Abstand von bis zu 10 Basen an die Positionen angrenzen, die hinsichtlich ihrer Methylierung in der genomischen DNA-Probe zu untersuchen sind und wobei das zweite Oligonukleotid der zweiten Spezies an eine zweite Region des Zielmoleküls hybridisiert, so dass das 5'-Ende des Oligonukleotids der zweiten Spezies durch eine Lücke von der Grösse eines Einzelnukleotides oder bis zu 10 Nukleotiden vom 3'-Ende des hybridisierten Oligonukleotids der ersten Spezies an der Stelle der besagten ausgewählten Position getrennt ist. Im zweiten Schritt wird das Oligonukleotid der ersten Spezies mit bekannter Sequenz von n Nukleotiden mittels einer Polymerase um höchstens die Anzahl von Nukleotiden verlängert, die zwischen dem 3'-Ende des Oli-

gonukleotids der 1. Spezies und dem 5'-Ende des Oligonukleotids der 2. Spezies liegen, wobei die Verlängerung vom Methylierungsstatus des jeweiligen Cytosins in der genomischen DNA-Probe abhängt. Beispielsweise ist es möglich, dass eine Verlängerung des 3'-Endes nur dann erfolgt, wenn in der chemisch vorbehandelten DNA ein Thymin anstelle eines Cytosins vorliegt, da beispielsweise in dem verwendeten Nukleotidmix Guanin nur als Terminator vorhanden ist und damit die Verlängerung, falls ein Cytosin vorliegt, unterbrochen wird. Ein Cytosin wiederum ist nach der chemischen Behandlung nur dann zugegen, wenn an der betreffenden Position in der ursprünglichen DNA-Probe ein 5-Methylcytosin vorlag.

Im letzten Schritt inkubiert man die Oligonukleotide in Gegenwart einer Ligase, wobei das angrenzende, durch die Polymerasereaktion verlängerte Oligonukleotid der ersten Spezies und das Oligonukleotid der zweiten Spezies verbunden werden und man dadurch ein Ligationsprodukt erhält, sofern im vorangehenden Schritt eine Verlängerung des Oligonukleotids der ersten Spezies derart erfolgte, dass nun das 3'-Ende mit vorhandener 3'-Hydroxyfunktion des verlängerten Oligonukleotids unmittelbar an das 5'-Ende des Oligonukleotids der zweiten Spezies angrenzt.

Bevorzugt ist zudem ein Verfahren, wobei für die Detektion der vorbehandelten DNA die PCR-Produkte auf einen Oligonukleotid Array hybridisiert werden und anschliessend die folgenden Teilschritte ausgeführt werden: Im ersten Schritt hybridisiert man die amplifizierte genomische DNA an mindestens ein Oligonukleotid mit bekannter Sequenz von n Nukleotiden unter Ausbildung einer Duplex, wobei besagte hybridisierte Oligonukleotide mit ihrem 3'-Ende teilweise oder vollständig an die Positionen hybridisieren, die hinsichtlich ihrer Methylierung in der genomischen DNA-Probe zu untersuchen sind. Im zweiten Schritt

wird das Oligonukleotid, sofern es mit seinem 3'-Terminus zuvor ohne Basenfehlpaarungen an die zu untersuchenden Position hybridisierte, mittels einer Polymerase mindestens um ein Nukleotid verlängert, wobei mindestens ein Nukleotid eine nachweisbare Markierung trägt und die Verlängerung vom Methylierungsstatus des jeweiligen Cytosins in der genomischen DNA-Probe abhängt. So kann beispielsweise eine Verlängerung nur dann stattfinden, wenn die genomische DNA an der Position, an die das oben genannte Oligonukleotid mit seinem 3'-Ende bindet, ursprünglich unmethyliert vorlag, weil sonst nach der chemischen Vorbehandlung an dieser Position ein Cytosin verbleibt, welches nach der Bindung des Oligonukleotids einen Mismatch am 3'-Ende verursacht welche die Verlängerung unterbindet. Liegt keine Methylierung vor, so kann der Primer dagegen ohne Mismatch mit dem 3'-Ende an die Template-DNA binden.

Die Analyse der entstandenen DNA-Oligomere, die zum Nachweis der Cytosin-Methylierung dienen, kann beispielsweise über Fluoreszenzmarkierungen erfolgen, welche über markierte Nucleotide in die DNA eingebaut werden.

Dem Fachmann ist zudem geläufig, dass man die meisten der beschriebenen Nachweisreaktionen auch derart ausführen kann, dass beteiligte Oligonukleotide an eine Festphase gebunden sind.

So ist es beispielsweise besonders bevorzugt möglich, die PCR nach der zweiten chemischen Behandlung derart auszuführen, dass radioaktiv oder fluoreszent markierte C und/oder G Nucleotide eingebaut werden und zudem einer der PCR-Primer an eine Festphase gebunden ist. Nach der Entfernung aller nicht an die Festphase gebundenen Edukte und Produkte verbleibt ein an die Festphase gebundenes PCR-Produkt, in welchem die Anzahl der eingebauten Mar-

kierungen proportional ist zur Anzahl der der nach der zweiten chemischen Behandlung verbliebenen Guanin- und/oder Cytosinbasen und damit unmittelbar von der Anzahl der Cytosin-Methylierungen in der genomischen Probe abhängt. Damit ist eine direkte Quantifizierung der methylierten Cytosine in diesem PCR-Produkt möglich.

Besonders bevorzugt ist ein Verfahren, wobei die PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte für die Detektion mit einer nachweisbaren Markierung versehen sind.

Besonders bevorzugt sind diese Markierungen Fluoreszenzmarkierungen, Radionuklide oder ablösbare Massenmarkierungen, die in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden, oder Kombinationen davon.

In einer weiteren bevorzugten Variante des Verfahrens werden die PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte insgesamt im Massenspektrometer nachgewiesen und sind somit durch ihre Masse eindeutig charakterisiert. In einer weiteren besonders bevorzugten Variante des Verfahrens wird jeweils ein Fragment der PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte im Massenspektrometer nachgewiesen. Bevorzugt werden diese Fragmente der PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukts und/oder Ligationsprodukts durch Verdau mit einer oder mehrerer Exo- oder Endonukleasen erzeugt. In einer wiederum besonders bevorzugten Ausführung des Verfahrens weisen die erzeugten Fragmente zur besseren Detektierbarkeit im Massenspektrometer eine einzelne positive oder negative Nettoladung auf.

Besonders bevorzugt werden die PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte mittels Matrix assistierter Laser Desorptions/Ionisations Mas-

senspektrometrie (MALDI-TOF) oder mittels Elektrospray Massenspektrometrie (ESI) detektiert und visualisiert.

5 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist zudem die Verwendung des beschriebenen Verfahrens zur Diagnose
und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens einer der folgenden Kategorien angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-
10 Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; Aggressionssymptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit,
15 Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion,
20 Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion.

25 Weiterhin besonders bevorzugt ist die Verwendung des Verfahrens zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.

30 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist zudem ein Kit, bestehend aus einem Bisulfit enthaltenen Reagenz, denaturierenden Reagenzien oder Lösungsmitteln, sowie Radikalfängern und/oder Primern zur Herstellung der Amplifikate, sowie optional einer Anleitung zur Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens.
35

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung ohne diese einzuschränken.

Beispiel 1:

- 5 Veränderung einer genomischen Sequenz durch zweifache Behandlung mit Bisulfit

Als Beispiel zur Erläuterung des Verfahrens soll hier die folgende doppelsträngige DNA-Sequenz dienen, die ein potentiell methyliertes CG Dinukleotid enthält:

A 3'-TGATCTAGCATGACTAC-5'
B 5'-ACTAGATCGTACTGATG-3'

- 15 Die doppelsträngige Sequenz kann verwendet werden, um nachteilige Ereignisse einer bestimmten Kategorie für Patienten oder Individuen zu untersuchen. Man setzt eine genomische, unbekannt methylierte DNA-Probe (20 ng), die mit einem Restriktionsenzym, hier MspI, verdaut wurde,
20 ein. Die verdaute DNA wird mit Hydrogensulfit (Bisulfit, Disulfit) und einem Radikalfänger bei erhöhter Temperatur chemisch umgewandelt. Ein Reagenz oder Lösungsmittel, welches die Denaturierung unterstützt, wird zugesetzt. Die DNA wird zuerst thermisch denaturiert und anschließend mit Bisulfit, dem Radikalfänger und dem denaturierenden Reagenz versetzt und längere Zeit bei erhöhter Temperatur inkubiert. Die Bisulfitreaktion führt zur Umwandlung aller nicht methylierten Cytosinbasen in Uracil. Zur Reinigung der Bisulfit behandelten DNA wird diese auf
30 eine Reversed Phase C18 Festphase gebunden und durch Waschen mit einer geeigneten Pufferlösung von Chemikalien befreit. Anschließend wird die DNA mit einem polaren Lösungsmittel wie z. B. Acetonitril oder Wasser eluiert und auf ein kleineres Volumen konzentriert. Die alkalische
35 Hydrolyse der mit Bisulfit behandelten Fragmente erfolgt unmittelbar vor der spezifischen Amplifikation unter ba-

5 sischen Bedingungen. Danach wird die Probe unter Verwen-
 dung von je 25 pmol an spezifischen Primeroligonukleoti-
 den (enthalten keine CG Dinukleotide) vervielfältigt.
 Nach der ersten Behandlung mit einer Lösung eines Hydro-
 gensulfits, wobei eine Umwandlung der nicht methylierten
 10 Cytosinbasen in Uracil erfolgt, und nachfolgender PCR,
 die die nach der chemischen Behandlung mit Hydrogensulfit
 nicht mehr komplementären Stränge amplifiziert und
 zugleich Uracil im wesentlichen durch Thymin ersetzt, er-
 15 geben sich die folgenden doppelsträngigen DNA-Sequenzen:

A) für den Fall, dass CG (+) methyliert vorlag:

aus dem unteren Strang B:

15 C (+) 3'-TAATCTAGCATAACTAC-5'
 B' (+) 5'-ATTAGATCGTATTGATG-3' Sequenz L(up)

aus dem oberen Strang A:

20 A' (+) 3'-TGATTTAGCATGATTAT-5'
 D (+) 5'-ACTAATCGTACTAATA-3' Sequenz U(up)

B) für den Fall, dass CG (-) unmethyliert vorlag:

25 aus dem unteren Strang B:

C (-) 3'-TAATCTAACAATAACTAC-5'
 B' (-) 5'-ATTAGATTGTATTGATG-3' Sequenz L(down)

aus dem oberen Strang A:

30 A' (-) 3'-TGATTTAGTATGATTAT-5'
 D (-) 5'-ACTAATCATACTAATA-3' Sequenz U(down)

Die zweite Behandlung Hydrogensulfit wird analog der ers-
 35 ten durchgeführt. Die Amplifikate werden zuerst thermisch
 denaturiert und dabei durch Zugabe eines Reagenzes oder
 Lösungsmittels unterstützt, dann chemisch umgesetzt und

anschließend amplifiziert, wobei die alkalische Hydrolyse wiederum kurz vor der Amplifikation durchgeführt wird. Die zweite spezifische Amplifikation kann mit einem Teil der Bisulfit behandelten Probe durchgeführt werden. Die Reaktionslösung kann so lange verdünnt werden, dass die in der Hydrogensulfitreaktion benötigten Chemikalien die PCR nicht mehr stören. Andererseits kann die Probe wieder mittels einer Reversed Phase C18 Festphase gereinigt werden. Die doppelt hydrogensulfitbehandelte DNA wird unter Verwendung von je 25 pmol an spezifischen Primeroligonukleotiden (enthalten keine CG Dinukleotide) vervielfältigt. Dabei müssen die Sequenzen der Primeroligonukleotide der ersten und zweiten Amplifikation nicht übereinstimmen.

Nach der zweiten Behandlung mit einer Lösung eines Hydrogensulfits, wobei wiederum eine Umwandlung der nicht methylierten Cytosinbasen in Uracil erfolgt, und nachfolgender PCR, die die nach der chemischen Behandlung mit Hydrogensulfit nicht mehr komplementären Stränge amplifiziert und zugleich Uracil im wesentlichen durch Thymin ersetzt, ergeben sich nunmehr die folgenden doppelsträngigen DNA-Sequenzen:

A) für den Fall, dass CG (+) methyliert vorlag:

aus dem unteren Strang B' und C:

E (+) 3'-TAATCTACATAACTAC-5' Sequenz LL(up)
 30 B'' (+) 5'-ATTAGATTGTATTGATG-3'

C' (+) 3'-TAATTTAGTATAATTAT-5'
 F (+) 5'-ATTAAATCATATTATA-3' Sequenz LU(up)

35 aus dem oberen Strang D und A':

WO 02/31186

33

PCT/DE01/03901

G (+) 3'-TAATTTAACATAATTAT-5'
 D' (+) 5'-ATTAAATTGTATTAAATA-3' Sequenz UL(up)

H (+) 3'-TGATTTAGTATGATTAT-5'
 5 A'' (+) 5'-ACTAAATCATACTAATA-3' Sequenz UU(up)

B) für den Fall, dass CG (-) unmethyliert vorlag:

10 aus dem unteren Strang C und E':

E (-) 3'-TAATCTAACATAACTAC-5'
 B'' (-) 5'-ATTAGATTGTATTGATG-3' Sequenz LL(down)

15 C' (-) 3'-TAATTTAATATAATTAT-5'
 F (-) 5'-ATTAAATTATATTAAATA-3' Sequenz LU(down)

aus dem oberen Strang D und A':

G (-) 3'-TAATTTAATATAATTAT-5'
 20 D' (-) 5'-ATTAAATTATATTAAATA-3' Sequenz UL(down)

H (-) 3'-TGATTTAGTATGATTAT-5'
 A'' (-) 5'-ACTAAATCATACTAATA-3' Sequenz UU(down)

25 Die Sequenzen UU sind unabhängig vom Methylierungsstatus der Probe identisch; das gleiche gilt für die Sequenzen LL. Somit sind beide Sequenzen für die Bestimmung des Methylierungsstatus nicht verwendbar. LU und UL jedoch unterscheiden sich an den ehemaligen CG Positionen in Abhängigkeit vom Methylierungsstatus der DNA-Probe (in den Sequenzen hervorgehoben). Bemerkenswert und der eigentlich Vorteil der Methode ist insbesondere, dass in den jeweiligen Strängen Cytosin bzw. Guanin nur dann auftauchen, wenn zuvor eine Methylierung vorlag. Damit liegt

30 praktisch eine Übersetzung der Methylcytosinbasen in der genomischen Probe in eine auch für den Doppelstrang cha-

35

rakteristische Base vor, während bei der einfachen Bisulfit-Behandlung die Base jeweils nur in einem der beiden Stränge für Methylcytosin charakteristisch ist. Dies erlaubt nun die Anwendung praktisch aller, dem Fachmann bekannten Methoden zur Sequenzierung (wie zum Beispiel Sequenzierung nach Maxam-Gilbert) oder zur Genotypisierung, ohne dass auf den Gegenstrang Rücksicht genommen werden muss. Wird beispielsweise eine sequenzspezifische Spaltung der nach der zweiten Bisulfit-Behandlung amplifizierten DNA an Cytosinbasen durchgeführt, so erfolgt nur eine Spaltung des einen Stranges, der andere bleibt unverändert.

Beispiel 2: Veränderung einer genomischen Sequenz durch zweifache Behandlung mit Bisulfit

Als Beispiel wurde das Gen HSM2R1 des humanen Genoms gewählt. Im Experiment wurden nach einer ersten Bisulfitbehandlung DNA-Fragmente der Länge 2010 bp dieses Gens erzeugt und gleichzeitig gc-reiche Domänen am 5'- und 3'-Ende generiert. Da diese „künstlichen“ Enden am 5'- und 3'-Ende der PCR-Produkte nach der ersten Bisulfitbehandlung erzeugt wurden, unterliegen sie in der zweiten Bisulfitbehandlung einer einfachen Umwandlung. Dies führt zu einer höheren Spezifität dieser Domänen, da sie (im Gegensatz zur übrigen Sequenz) noch C's und G's enthalten. Damit eignen sie sich besonders für das Design von Primern für eine Amplifikation nach der zweiten Bisulfitbehandlung. Die Amplifikation eines kurzen Stückes der Ziel-DNA erfolgt mit Primern die ausschließlich aus A's und T's bestehen. Die Sequenzen der genomischen, einfach bisulfitbehandelten und doppelt bisulfitbehandelten DNA sind am Ende dargestellt.

Beschreibung der Figuren:

Figur 1:

WO 02/31186

35

PCT/DE01/03901

Schema zur Herstellung von PCR-Produkt mit gc-Domäne aus einfach bisulfitbehandelter DNA:

- a) 5'gtgatccccggcgagctcccTAAGTATGTTGAAGAAAGATTATTG;
- b) 3'gcttgggtgcaggtcgacctTTTAACTTCTATCTCATCAAC;
- 5 c) bisulfitbehandelte DNA, Einzelstrang

Figur 2:

- Genomische Sequenz der Umgebung des HSMDR1-Gens: LOCUS HSMDR1A2932 bp DNA humanes MDRI (multidrug resistance) Gen für das P-Glycoprotein
- 10

Figur 3:

- Sequenz des oberen Strangs nach der ersten Bisulfitbehandlung für den Fall vollständiger Aufmethylierung der CG's (PCR-Produkt mit Primer 1 und 2)
- 15

Figur 4:

- Sequenzen des unteren Strangs nach der zweiten Bisulfitbehandlung für den Fall vollständiger Aufmethylierung aller CG's
- 20 a) PCR-Produkt mit Primer 3 und 4 (154 bp)
 - b) PCR-Produkt mit Primer 5 und 6 (2010 bp)

Vorgehen:

- 25 a) Restriktion von humaner DNA unbekanntem Methylierungsstatus mit MssI
- b) Bisulfitbehandlung mit der Agarosemethode

WO 02/31186

36

PCT/DE01/03901

c) Bisulfit-spezifische PCR zur Herstellung von MDR1-Fragmenten einer Länge 1936bp. Dabei werden gleichzeitig mittels Domäne-Primern „künstliche“ gc-reiche Enden an die PCR-Produkte generiert

5

d) Zweite Bisulfitbehandlung ohne Agarose mit anschließender ZipTip-Aufreinigung

e) Amplifikation der doppelt bisulfitbehandelten DNA mittels Primern für die gc-Domäne

10

Verwendete Primer:

Bisulfit Primer, Produktgröße: 2010 bp

1 MDR1-B-U-gc *gtgatccggcgagctcccTAAGTATGTTGAAGAAAGATTATPG*
 2 MDR1-B-L-gc *gcttggctgcaggtcgacCTTTTAACTTCATCTCATCAC*
 <--gc-domaine-----><-genspezifische Sequenz-->

15

Primer für doppelt bisulfitierte DNA ohne gc-Domäne, Produktgröße: 154 bp

3 MDR1-2B-U3 *ttttttttttttttttttttat*
 4 MDR1-2B-L3 *attttttttttttttttttaa*

Primer für doppelt bisulfitierte DNA mit gc-Domäne, Produktgröße: 2010 bp

20

5 MDR1-2B-L-gc *GTTGGGTTGTAGGTTGAT*
 6 MDR1-2B-U-gc *ataatcccaacaaactccc*

Versuchsbedingungen:

25 Die Restriktion von humaner genomische DNA (Fa. Promega) erfolgte mit MseI (Fa. Fermentas) nach Herstellerangaben.

WO 02/31186

PCT/DE01/03901

37

Die erste Bisulfitbehandlung der verdauten DNA erfolgte mit der Agarosemethode, wie sie im Stand der Technik beschrieben ist.

5

Die Amplifikation von DNA erfolgte unter folgenden PCR-Bedingungen (FA. Qiagen):

10 •1 µl DNA (10 ng bisulfitbehandelte DNA)
 •0.2 µl Taq (1 Unit)
 •0,2 µl dNTP (25 mM each) 0,25 mM final
 •1 µl Primer1 (12,5 pmol/µl) 0,5 pmol/µl final
 •1 µl Primer2 (12,5 pmol/µl) 0,5 pmol/µl final
15 •2,5 µl 10fach PCR-Puffer
 •19,1 H₂O (molecular grade)

Folgende Cyclor-Programme wurden verwendet:

20 •PCR mit Domäneprimern (Primer1 und 2) nach erster Bisul-
 fitbehandlung:
 95°C/20:00; 95°C/1:00; 56 °C/0:45; 72°C/2:00; cy-
 cles:40; 72°C/10:00; 4°C/end
25 •PCR nach zweiter Bisulfitbehandlung(Primer 3 und 4):
 95°C/20:00; 95°C/1:00; 40 °C/0:45; 72°C/1:00; cy-
 cles:40; 72°C/10:00; 4°C/end
 •PCR nach zweiter Bisulfitbehandlung(Primer 5 und 5):
 95°C/20:00; 95°C/1:00; 56 °C/0:45; 72°C/2:00; cy-
 cles:40; 72°C/10:00; 4°C/end
30

Die zweite Bisulfitbehandlung des hergestellten PCR-Productes erfolgte ohne Agarose in Lösung. Zur Entfernung der Salze und Chemikalien wurde die doppelt bisulfitierte DNA mit Hilfe der

WO 02/31186

38

PCT/DE01/03901

ZipTip®-Methode (FA: Millipore) aufgereinigt. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen:

- 5 •neue Spitze 3x mit 10 µl 2M TEAA Puffer gespült
- 35 µl PCR-Produkt aufgezogen
- 1x Spülen mit 10 µl 2M TEAA
- 3x Spülen mit 10 µl 0.1M TEAA
- 3x Spülen mit 10 µl Wasser (bidest.)
- 10 •Eluieren des Produktes mit 100 µl MeCN (10x10 µl frisches MeCN aufgezogen und in ein Tube eluiert
- 100 µl Eluat wurden unter Vacuum eingetrocknet, in 30 µl Wasser (bidest) resuspendiert und sofort in die PCR eingesetzt

15

Patentansprüche

1. Verfahren zur Detektion von Cytosin-Methylierung in
5 genomischer DNA, dadurch gekennzeichnet, dass man die
folgenden Verfahrensschritte ausführt:
a) man setzt eine genomische DNA-Probe mit einem Rea-
genz chemisch um, wobei 5-Methylcytosin unverändert
bleibt und Cytosin in Uracil oder eine andere im Ba-
10 senpaarungsverhalten dem Uracil ähnliche Base unge-
wandelt wird;
b) man amplifiziert die vorbehandelte DNA unter Ver-
wendung einer Polymerase und mindestens eines Prime-
roligonukleotids;
15 c) man setzt das Amplifikat erneut mit einem Reagenz
chemisch um, wobei 5-Methylcytosin unverändert bleibt
und Cytosin in Uracil oder eine andere im Basenpaar-
ungsverhalten dem Uracil ähnliche Base umgewandelt
wird;
20 d) man weist die in dem Amplifikat nach der erneuten
chemischen Behandlung verbleibenden Cytosinbasen
und/oder Guaninbasen nach.
2. Verfahren zur Detektion von Cytosin-Methylierung in
25 genomischer DNA nach Anspruch 1, dadurch gekennzeich-
net, dass man die folgenden Verfahrensschritte aus-
führt:
a) man setzt eine genomische DNA-Probe mit einem Rea-
genz chemisch um, wobei 5-Methylcytosin unverändert
30 bleibt und Cytosin in Uracil oder eine andere im Ba-
senpaarungsverhalten dem Uracil ähnliche Base unge-
wandelt wird;
b) man amplifiziert die vorbehandelte DNA unter Ver-
wendung einer Polymerase und mindestens eines Prime-
35 roligonukleotids;
c) man setzt das Amplifikat erneut mit einem Reagenz

- chemisch um, wobei 5-Methylcytosin unverändert bleibt und Cytosin in Uracil oder eine andere im Basenpaarungsverhalten dem Uracil ähnliche Base umgewandelt wird;
- 5 d) man amplifiziert die chemisch behandelten Amplifikate aus Schritt c) erneut;
- e) man weist die in dem Amplifikat verbleibenden Cytosinbasen und/oder Guaninbasen nach.
- 10 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die chemische Behandlung mit Natriumbisulfit (=Hydrogensulfit, Disulfit) erfolgt.
- 15 4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die chemische Behandlung nach Einbetten der DNA in Agarose erfolgt.
- 20 5. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass bei der chemischen Behandlung ein die DNA-Duplex denaturierendes Reagenz und/oder ein Radikalfänger zugegen ist.
- 25 6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass das denaturierende Reagenz aus einer der folgenden Substanzen ausgewählt ist:
- 30 Polyethylenglykoldialkylether, Dioxan und substituierte Derivate, Harnstoff oder Derivate, Acetonitril, primäre Alkohole, sekundäre Alkohole, tertiäre Alkohole, Diethylenglykoldialkylether, Triethylenglykoldialkylether, Tetraethylenglykoldialkylether, Pentaethylenglykoldialkylether, Hexaethylenglykoldialkylether, DMSO oder THF.
- 35 7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, dass der Radikalfänger aus einer der folgenden Substanzen ausgewählt ist:

Di-, Trihydroxybenzole, green tea extract, pine bark
 extract (Pycnogenol), Ginkgo Biloba extract (EGB
 761), a flavonoid blend of several fruit and vege-
 table extracts (GNLD), Bio-Normalizer (Sun-O Corp),
 5 DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl), NDGA (Nordi-
 hydroguajaret-säure), Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-
 tetramethylchroman-2-carboxylic acid), 2,6-Di-tert-
 butylphenol, 4-Methyl-di-tert-butylphenol, 4-Methoxy-
 di-tert-butylphenol, 2,6-Di-tert-butyl-p-cresol, 3,4-
 10 Dihydroxybenzoesäure, Vitamin C, E, Q, Hydrochinon,
 Ubichinon, Lignane, Hydroxyterpene, Flavonoide, Cur-
 cumin, Tannine, Retinsäureverbindungen, Ge-132 Bisbe-
 tacarboxyethyl germanium sesquioxide, Superoxid dis-
 mutase (SOD), Superoxid katalase, Alpha-
 15 Naphthoflavone, Ginkgo biloba extract (EGB 761),
 Di(2-methyl-5-chlorophenyl)dithionat und Cu(II)-
 Derivate, Mebendazole, CS (Chloroform löslich) alka-
 loidal extract, 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-
 hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,2-naphthochinon, 4-(3,5-
 20 Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-1,2-
 naphthochinon, 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-
 1,2-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-
 hydroxyphenyl)-3-brom-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-
 tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-chlor-1,4-
 25 naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-
 3-methoxy-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-
 hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-
 Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,4-naphthochinon, 4-
 (3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-
 30 5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-
 anthrachinon, 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-
 3-methoxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-
 anthrachinon, 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-
 5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-
 35 anthrachinon, 3-Brom-4-(3,5-di-tert-butyl-4-
 hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-

tetrahydro-1,2-anthracinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-indan-1,3-dion, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-3,4-epoxy-3-hydroxy-4-methoxy-3,4-dihydro-2H-naphthalin-1-on, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-3,4-epoxy-3,4-dimethoxy-3,4-dihydro-2H-naphthalin-1-on, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-indan-1-on, 3,3-Bi-[2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-inden-1-on]-3-yl, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-brom-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthracinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-chlor-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthracinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthracinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthracinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthracinon, 2-Brom-3-(3-brom-5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthracinon, 2-Brom-3-(3,5-dibrom-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthracinon, 2-Brom-3-(3-brom-5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthracinon, 3-Brom-2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,4-anthracinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-1,4-anthracinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,4-anthracinon, 5,5,8,8-Tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalin-1,3-diol, 3-Methoxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalin-1-ol, 4-(3-Chlor-5,5,8,8-tetramethyl-1,4-dioxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracen-2-yl)-benzoesäure, Methyl-4-(3-chlor-5,5,8,8-tetramethyl-1,4-dioxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracen-2-yl)-benzoat, 4-(3-

Hydroxy-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalin-2-yl)-
 benzoessäure, Methyl-(3-methoxy-1,4-dioxo-1,4-
 dihydronaphthalin-2-yl)-benzoessäure, 4-(3-Hydroxy-
 5,5,8,8-tetramethyl-1,4-dioxo-1,4,5,6,7,8-
 5 hexahydroanthracen-2-yl)-benzoessäure, Methyl-4-(3-
 hydroxy-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalin-2-yl-azo)-
 benzoat, 4-(3-Hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-1,4-dioxo-
 1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracen-2-yl-azo)-benzoessäure,
 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-
 10 5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydrocyclo-
 penta[h]naphthalin-1,2-dion, 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-
 oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-5,5,8,8-tetramethyl-
 5,6,7,8-tetrahydroanthracen-3H-1,2,4-trion, 2-(3,5-
 Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,8-
 15 dimethyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-
 hydroxyphenyl)-3-methoxy-6,7-dimethyl-1,4-
 naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-
 3-methoxy-5-methyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-
 butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-5-methyl-1,4-
 20 naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-
 3-methoxy-6-methyl-1,4-naphthochinon, 3-(3,5-Di-tert-
 butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-6-methyl-1,4-
 naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-
 3-methoxy-5,6-dimethyl-1,4-naphthochinon, 3-(3,5-Di-
 25 tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-5,6-dimethyl-
 1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxy-
 phenyl)-3-methoxy-5,7-dimethyl-1,4-naphthochinon, 3-
 (3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-5,7-
 dimethyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-
 30 hydroxyphenyl)-3-ethylthio-5-methyl-1,4-naphth-
 ochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-
 ethylthio-6-methyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-
 butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,8-dimethyl-1,4-
 naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-
 35 3-hydroxy-6,7-dimethyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-
 tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5-methyl-1,4-

- naphthochinon, 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-5-methyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-6-methyl-1,4-naphthochinon, 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-6-methyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,6-dimethyl-1,4-naphthochinon, 2-(3-Brom-5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,6-dimethyl-1,4-naphthochinon, 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-5,6-dimethyl-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,7-dimethyl-1,4-naphthochinon, 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-5,7-dimethyl-1,4-naphthochinon.
- 5
- 10
- 15 8. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man Reagenzien, die für die chemische Behandlung der DNA eingesetzt werden, vor der jeweils nachfolgenden Amplifikation ganz oder teilweise abtrennt.
- 20 9. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man die Probe nach der chemischen Behandlung vor der Amplifikation verdünnt.
- 25 10. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man die Amplifikation von mehreren DNA-Abschnitten gleichzeitig in einem Reaktionsgefäß durchführt.
- 30 11. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man für die Amplifikation eine hitzebeständige DNA-Polymerase verwendet.
- 35 12. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man vor den Amplifikati-

onen in den Ansprüchen 1 oder 2 eine Desulfonierung der DNA durchführt.

- 5 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass man die nach der zweiten chemischen Behandlung verbleibenden Cytosin- und/oder Guaninbasen durch Hybridisierungsreaktionen nachweist.
- 10 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass man die nach der zweiten chemischen Behandlung verbleibenden Cytosin- und/oder Guaninbasen durch spezifischen Einbau von nachweisbaren Markierungen an den Cytosin- und/oder Guaninbasen nachweist und/oder quantifiziert.
- 15 15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass man in Schritt d) gemäß Anspruch 1 oder Schritt e) gemäß Anspruch 2 für die Detektion der vorbehandelten DNA die Amplifikationsprodukte an einen Oligonukleotid Array hybridisiert und man anschliessend die folgenden Teilschritte ausführt:
- 20 a) die amplifizierte genomische DNA wird an mindestens ein Oligonukleotid unter Ausbildung einer Duplex hybridisiert, wobei besagte hybridisierte Oligonukleotide mit ihrem 3'-Ende unmittelbar oder im Abstand von bis zu 10 Basen an die Positionen angrenzen, die hinsichtlich ihrer Methylierung in der genomischen DNA-Probe zu untersuchen sind;
- 25 (b) man verlängert das Oligonukleotid mit bekannter Sequenz von n Nukleotiden mittels einer Polymerase mindestens um ein Nukleotid, wobei das Nukleotid eine nachweisbare Markierung trägt und die Verlängerung vom Methylierungsstatus des jeweiligen Cytosins in der genomischen DNA-Probe abhängt.
- 30
- 35

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass man die nach der zweiten chemischen Behandlung verbleibenden Cytosin- und/oder Guaninbasen durch Sequenzierungsreaktionen nachweist.
- 5
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass man in Schritt d) gemäß Anspruch 1 oder Schritt e) gemäß Anspruch 2 für die Detektion der vorbehandelten DNA die Amplifikationsprodukte an einen Oligonukleotid Array hybridisiert und man anschließend die folgenden Teilschritte ausführt:
- 10
- (a) man hybridisiert einen Satz von Oligonukleotiden an die amplifizierte genomische DNA unter Ausbildung einer Duplex, wobei dieser Satz von Oligonukleotiden aus zwei verschiedenen Spezies besteht und wobei die hybridisierten Oligonukleotide der ersten Spezies mit ihrem 3'-Ende unmittelbar oder im Abstand von bis zu 10 Basen an die Positionen angrenzen, die hinsichtlich ihrer Methylierung in der genomischen DNA-Probe zu untersuchen sind und wobei das zweite Oligonukleotid der zweiten Spezies an eine zweite Region des Zielmoleküls hybridisiert, so dass das 5'-Ende des Oligonukleotids der zweiten Spezies durch eine Lücke von der Größe eines Einzelnukleotides oder bis zu 10 Nukleotiden vom 3'-Ende des hybridisierten Oligonukleotids der ersten Spezies an der Stelle der besagten ausgewählten Position getrennt ist;
- 15
- (b) man verlängert das Oligonukleotid der ersten Spezies mit bekannter Sequenz von n Nukleotiden mittels einer Polymerase um höchstens die Anzahl von Nukleotiden, die zwischen dem 3'-Ende des Oligonukleotids der 1. Spezies und dem 5'-Ende des Oligonukleotids der 2. Spezies liegen, wobei die Verlängerung vom Methylierungsstatus des jeweiligen Cytosins in der genomischen DNA-Probe abhängt;
- 20
- (c) man inkubiert die Oligonukleotide in Gegenwart
- 25
- 30
- 35

einer Ligase, wobei das angrenzende, durch die Polymerasereaktion verlängerte Oligonukleotid der ersten Spezies und das Oligonukleotid der zweiten Spezies verbunden werden und man dadurch ein Ligationsprodukt erhält, sofern im vorangehenden Schritt eine Verlängerung des Oligonukleotids der ersten Spezies derart erfolgte, dass nun das 3'-Ende mit vorhandener 3'-Hydroxyfunktion des verlängerten Oligonukleotids unmittelbar an das 5'-Ende des Oligonukleotids der zweiten Spezies angrenzt.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-12, dadurch gekennzeichnet, dass man für die Detektion der vorbehandelten DNA gemäß Schritt d) in Anspruch 1 die PCR-Produkte auf einen Oligonukleotid Array hybridisiert und man anschliessend die folgenden Teilschritte ausführt:
- (a) man hybridisiert die amplifizierte genomische DNA an mindestens ein Oligonukleotid mit bekannter Sequenz von n Nucleotiden unter Ausbildung einer Duplex, wobei besagte hybridisierte Oligonukleotide mit ihrem 3'-Ende teilweise oder vollständig an die Positionen hybridisieren, die hinsichtlich ihrer Methylierung in der genomischen DNA-Probe zu untersuchen sind;
- (b) man verlängert das Oligonukleotid, sofern es mit seinem 3' Terminus zuvor ohne Basenfehlpaarungen an die zu untersuchenden Position hybridisierte, mittels einer Polymerase mindestens um ein Nucleotid, wobei mindestens ein Nucleotid eine nachweisbare Markierung trägt und die Verlängerung vom Methylierungsstatus des jeweiligen Cytosins in der genomischen DNA-Probe abhängt.
19. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man die PCR-Produkte

- und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte für die Detektion mit einer nachweisbaren Markierung versteht.
- 5 20. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen Fluoreszenzmarkierungen sind.
- 10 21. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen Radionuklide sind.
- 15 22. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen ablösbare Massemarkierungen sind, die in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden.
- 20 23. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass bei einer der Amplifikationen einer der Primer an eine Festphase gebunden ist.
- 25 24. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass man die PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte insgesamt im Massenspektrometer nachweist und somit durch ihre Masse eindeutig charakterisiert sind.
- 30 25. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass man jeweils ein Fragment der PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte im Massenspektrometer nachweist.
- 35 26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass man das Fragment des PCR-Produkts und/oder Verlängerungsprodukts und/oder Ligationsprodukts durch

- Verdau mit einer oder mehrerer Exo- oder Endonukleasen erzeugt.
- 5 27. Verfahren nach Anspruch 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, dass zur besseren Detektierbarkeit im Massenspektrometer die erzeugten Fragmente eine einzelne positive oder negative Nettoladung aufweisen.
- 10 28. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass man die PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte mittels Matrix assistierter Laser Desorption/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI-TOF) oder mittels Elektrospray Massenspektrometrie (ESI) detektiert und visualisiert.
- 15 29. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, wobei die genomische DNA aus einer DNA-Probe erhalten wurde, wobei Quellen für DNA z. B. Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin einbettetes Gewebe, beispielsweise Gewebe von Augen, Darm, Niere, Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust oder Leber, histologische Objektträger und alle möglichen Kombinationen hiervon umfassen.
- 25 30. Verwendung eines Verfahrens nach einem der voranstehenden Ansprüche zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens
- 30 einer der folgenden Kategorien angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; Aggressions-symptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kar-
- 35

- diovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion.
31. Verwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 29 zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.
32. Kit, bestehend aus einem Bisulfit enthaltenen Reagenz, denaturierenden Reagenzien oder Lösungsmitteln, sowie Radikalfängern und optional Primern zur Herstellung der Amplifikate, sowie optional einer Anleitung zur Durchführung eines Assays nach einem der Ansprüche 1-29.

WO 02/31186

FCT/DE01/03901

1/5

Fig. 1

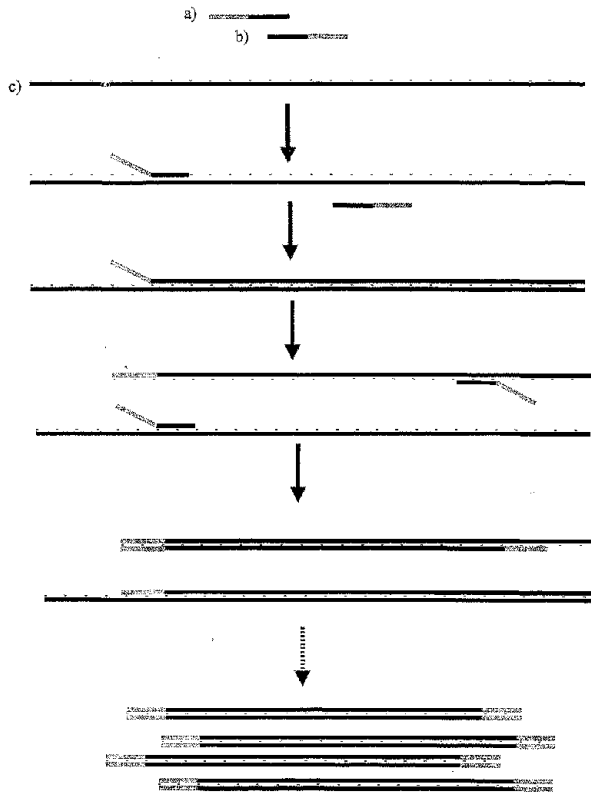


Fig. 2

1 gccagaacaaatataatcaagataaggaaattgtgtcaagaatagaaaaattat
 61 ggctttgaagtatgagttattaaagaagtggaacacccctcagactgtagtaaaa
 121 acaaaagtattttcttctaaacttatgcaataaactgataggtatgtaaaagtc
 181 atagaatgtagactagaggatacaacaacctattctctatgttcalaagaagtaaga
 241 aaagctctgatgtgagtagcattgcttacaatttgaattgtgcagattgcacgtact
 301 ttcttcaagtttgaagtaaatagtgacaggaaaaaatattaatgttggcagtaaatat
 361 ggaaggaaattacaactaatgtaatatgctaaacatgctatgtttatttactaattg
 421 aatataaatgtaagaatttaaatgccctggaaaaacacgggcatgtgactgactga
 481 agttttaaaattatacacatttgaastagcattgtacctgaaatacctgtctata
 541 tatttttaaaactccctttcttctcatttatcraataaaggatgaacaga
 601 tghtaactcagaactgtcaagcattgctgaagaagaccactgcagaaaaattctctag
 661 cctttcaagtggttagggaagcagaaggtgatacagaattggagaggtcggattttt
 721 gtattactgtattaatgcgaatcccgagaaaatttccctactactctgtagtta
 781 tatggatgaagactatgtgaactttgaagcgtgtctactaagttgaaatgtccc
 841 caatgattcagctgatgcggttctctactctcccttctagagaggtgcaacggaagc
 901 cagaacattctctggaattcaactgtttctgcagtttctcggaggaatcagcattcag
 961 tcaatccggcgggagcagctatctgtgtgagcctgaltgctggcaggaacagcgc
 1021 cggggcgtgggtgagcagccgcttctctcttctccacaggaagcctgagctcatt
 1081 cgagtagcggctctccaagctcaagaagcagagggcgtgttcttcttaggtct
 1141 ttccactaaagtcggagatcttctccaaaatttcacgtctgtgtgcccgttccaagga
 1201 gcgcgaggtaggggcagcaaaagctggagctactatgggacagttcccaaggtcagggc
 1261 tticagatttctgaaactgttcttccgggagaagggcttcttggagctggataggt
 1321 gaagctctctggcaagctcatgggaccaagtggttagatctagactcagagctcct
 1381 ggagcagcgcaccaaacgtatgtggcactggaccatgttgcggagcgcgcaagcccgc
 1441 gcgggtcggggacctgctctgagcccgggcggtgggtgggaggaagcactgtccgc
 1501 ggcgactggaaccgggagggaatcgcactggcggcggcaagtcagaacgctgtg
 1561 cagaccaccactctgcttctgtgagatgctggagaccccgccagcaggaaagccctg
 1621 cagtcccatcggcggcagagcagctgggcalcaacggcgggctcctcttactgct
 1681 ctctgcttgcaggggactagaggttagtctcaccctcagcggcctgagctcatgc
 1741 attggctaagtagctcgggttctctcaggtcgggatggatctgaaggggacgcaa
 1801 tggaggagcaagaagaagaacttttaaaatgaaataaaaggtaactagctgttt
 1861 cattttcatgttacatagttgcgagatttagtaatttattctagcctcagctctg
 1921 aaataaatgacatgttgttttaatttttaagaaacgcaagctagccttggaa
 1981 tcaatatccctgcttagagcagaagttgttgcgtgagtgagcagcatabgcaattt

ERSATZBLATT (REGEL 26)

WO 02/31186

PCT/DE01/03901

3/5

Fortsetzung Fig. 2

2041 cctgtctttttgtctcttttttaagatacataatatttacaatattatgaaatgg
2101 ggtaacatggaagcgtttttacatgcccgaatgtgtaatgatcaagtcgggtattiga
2161 aggatacatcaccttaggtatattcatctctatgtgtgataacatttaagcttcta
2221 gctacttgaaatatacaatataattgctaactgtagtcacctcgtctgctatogaacat
2281 tggaaactatttgcctatccaaccgtcttagtcattccaacccttttcatctcac
2341 cttttaccttccggcctcttcccttagcttgggtgctctttctcagcttctt
2401 gccccagacaggggatgctcatatgtgttctgtctatgaacttctgctttcaagtg
2461 gtgttgctgcccaacgtagccatctgctgctgatctgctgtgtccaggctc
2521 ttgctccggtaaatggctatgtaaacatcgcttggcctggctgatgagacagaag
2581 gtcaaaagtacatttaggttgaactggcaataatctgtatataataggtaatg
2641 taatcatatgggaaataattttaagtaaatggatggtgctctgcttnt
2701 agaataattaaaacttcaataatagatcattgttagtgaatgtaaatgacta
2761 gtaagttataatattagaactgtaatgtaaatataagetaaattagctaaacacat
2821 taatattatagaaccaagctttcagtgtaagagaaaaatacaaatgtggaatcaa
2881 atacattttaaaaataatgttaagttgaattagaatttcaataigaatt

ERSATZBLATT (REGEL 26)

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
18. April 2002 (18.04.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/031186 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation: C12Q 1/68
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DI01/03901
- (22) Internationales Anmeldedatum: 10. Oktober 2001 (10.10.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 100 50 942.8 10. Oktober 2000 (10.10.2000) DE
- (71) Anmelder für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von (5): EPFGENOMICS AG [DE/DE]; Kastanienallee 24, 10435 Berlin (DE).
- (72) Erfinder, und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BERLIN, Kurt [DE/DE]; Marienkielweg 4, 14552 Stahnsdorf (DE).
- (74) Anwalt: SCHUBERT, Klemens; Neue Promenade 3, 10178 Berlin (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AF, AG, AT, AM, AU, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GM, GR, 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, MY, NZ, NG, NI, NO, PL, PT, RO, RU, SD, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW); europäisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IL, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR); OAPI-Patent (BF, BJ, CI, CG, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht: mit internationalem Recherchenbericht
- (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 13. März 2003



(54) Title: METHOD FOR THE DETECTION OF CYTOSINE METHYLATIONS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON CYTOSIN-METHYLIERUNGEN

(57) Abstract: A method for the detection of cytosine methylations in genomic DNA is disclosed, whereby genomic DNA samples are firstly reacted with a chemical reagent, wherein 5-methylcytosine and cytosine react differently and thus display a different base pair relationship in the DNA duplex after said reaction. The pre-treated DNA is then amplified by means of a polymerase and at least one primer oligonucleotide and the amplified material once again reacted with a chemical reagent as above. The cytosine bases and/or guanine bases remaining in the amplified material after the renewed chemical treatment are detected in the final step.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben wird ein Verfahren zur Detektion von Cytosin-Methylierung in genomischer DNA. Dazu wird zunächst genomische DNA-Probe mit einem Reagenz chemisch umgesetzt, wobei 5-Methylcytosin und Cytosin unterschiedlich reagieren und diese somit nach der Reaktion ein unterschiedliches Basenpaarungsverhalten in der DNA Duplex zeigen. Dann wird die vorbehandelte DNA unter Verwendung einer Polymerase und mindestens einem Primeroligonucleotid amplifiziert und das Amplifikat erneut mit einem Reagenz chemisch wie oben umgesetzt. Die in dem Amplifikat nach der erneuten chemischen Behandlung verbleibenden Cytosinbasen und/oder Guaninbasen werden im letzten Schritt nachgewiesen.

WO 02/031186 A3

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/DE 01/03901
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 bases consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 28498 A (OLEK ALEXANDER ;WALTER JOERN (DE); EPIGENOMICS GMBH (DE); OLEK SVE) 10 June 1999 (1999-06-10) page 23 -page 55; claim 22	32
A	REIN ET AL: "Identifying 5-methylcytosine and related modifications in DNA genomes" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 26, no. 10, 1998, pages 2255-2264, XP002143106 ISSN: 0305-1048 page 2258, right-hand column, paragraph 2 -page 2261, right-hand column, paragraph 1 -/-	1-32
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 *I* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles 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 ** 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 *M* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 17 December 2002	Date of mailing of the international search report 23/12/2002	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 6818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2340, Tx: 31 651 500 nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Lanzrein, M	

Form PCT/ISA210 (second of two) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inventor's name
 PCT/DE 01/03901

G.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	OLEK A ET AL: "A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 24, no. 24, 1996, pages 5064-5066, XP002106408 ISSN: 0305-1048 the whole document	4
A	PAULIN RICHARD ET AL: "Urea improves efficiency of bisulphite-mediated sequencing of 5'-methylcytosine in genomic DNA" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 26, no. 21, 1 November 1998 (1998-11-01), pages 5009-5010, XP002210104 ISSN: 0305-1048	

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inventor Application No.
PCT/DE 01/03901

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9928498	A	10-06-1999	DE 19754482 A1
			AT 217348 T
			AU 753368 B2
			AU 2408599 A
			CA 2310384 A1
			CN 1283235 T
			WO 9928498 A2
			DE 59804090 D1
			DK 1034309 T3
			EP 1034309 A2
			ES 2173669 T3
			HU 0100424 A2
			JP 2001525181 T
			NZ 504586 A
			PL 341681 A1
			SI 1034309 T1
			US 6214556 B1
			01-07-1999
			15-05-2002
			17-10-2002
			16-06-1999
			10-06-1999
			07-02-2001
			10-06-1999
			13-06-2002
			26-08-2002
			13-09-2000
			16-10-2002
			28-06-2001
			11-12-2001
			25-10-2002
			23-04-2001
			31-08-2002
			10-04-2001

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

		nr als Astenszeichen PCT/DE 01/03901
A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C12Q1/68		
Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierte Mindestprüfstoffe (Klassifikationsystem und Klassifikationsymbole) IPK 7 C12Q		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruchs Nr.
X	WO 99 28498 A (OLEK ALEXANDER ;WALTER JOERN (DE); EPIGENOMICS GMBH (DE); OLEK SVE) 10. Juni 1999 (1999-06-10) Seite 23 -Seite 55; Anspruch 22 ---	32
A	REIN ET AL: "Identifying 5-methylcytosine and related modifications in DNA genomes" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 26, Nr. 10, 1998, Seiten 2255-2264, XP002143106 ISSN: 0305-1048 Seite 2258, rechte Spalte, Absatz 2 -Seite 2261, rechte Spalte, Absatz 1 ----- -/--	1-32
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zu belegen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Researchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie eingetragelt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Systematische Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindungsfähiger Tätigkeit beruhen betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindungsfähiger Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Verbindung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 17. Dezember 2002		Abschließdatum des internationalen Researchenberichts 23/12/2002
Name und Postanschrift der internationalen Recherchebehörde Europäisches Patentamt, P.B. 8016 Patentstr. 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 840 2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax. (+31-70) 840 3016		Bevollmächtigter Beauftragter Lanzrein, M

Formblatt PCT/ISA/10 (Teil 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

II	Internationales Abkommen
PCT/DE 01/03901	

G.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
A	OLEK A ET AL: "A modified an improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 24, Nr. 24, 1996, Seiten 5064-5066, XP002106408 ISSN: 0305-1048 das ganze Dokument	4
A	PAULIN RICHARD ET AL: "Urea improves efficiency of bisulphite-mediated sequencing of 5'-methylcytosine in genomic DNA" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 26, Nr. 21, 1. November 1998 (1998-11-01), Seiten 5009-5010, XP002210104 ISSN: 0305-1048	

Formblatt PCT/ISA/210 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1999)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

In
des Abzweigen
PCT/DE 01/03901

In: Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9928498 A	10-06-1999	DE 19754482 A1	01-07-1999
		AT 217348 T	15-05-2002
		AU 753368 B2	17-10-2002
		AU 2408599 A	16-06-1999
		CA 2310384 A1	10-06-1999
		CN 1283235 T	07-02-2001
		WO 9928498 A2	10-06-1999
		DE 59804090 D1	13-06-2002
		DK 1034309 T3	26-08-2002
		EP 1034309 A2	13-09-2000
		ES 2173669 T3	16-10-2002
		HU 0100424 A2	28-06-2001
		JP 2001525181 T	11-12-2001
		NZ 504586 A	25-10-2002
		PL 341681 A1	23-04-2001
		SI 1034309 I1	31-08-2002
US 6214556 B1	10-04-2001		

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566	C 1 2 N 15/00	Z N A A
// G 0 1 N 33/50	C 1 2 N 15/00	A
	G 0 1 N 33/50	P

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 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, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, 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, PH, 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) 2G054 CA22 CE02 EA03
 4B024 AA11 AA20 CA01 CA11 CA20 HA08 HA11 HA19 HA20
 4B063 QA01 QA13 QA17 QA20 QQ42 QQ52 QR08 QR32 QR35 QR38
 QR50 QR51 QR62 QS25 QS36 QS39 QX02 QX07 QX10

专利名称(译)	检测胞嘧啶甲基化的方法		
公开(公告)号	JP2004511235A	公开(公告)日	2004-04-15
申请号	JP2002534551	申请日	2001-10-10
[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	ベルリンクルト		
发明人	ベルリン,クルト		
IPC分类号	G01N27/62 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/6827 G01N21/77 G01N21/78 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	C12Q1/6827 C12Q2565/501 C12Q2527/125 C12Q2523/125		
FI分类号	C12Q1/68.A G01N21/77.Z G01N21/78.C G01N27/62.V G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.A G01N33/50.P		
F-TERM分类号	2G045/AA35 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/FB02 2G045/FB12 2G045/GC15 2G045/GC30 2G054/CA22 2G054/CE02 2G054/EA03 4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/CA01 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/HA08 4B024/HA11 4B024/HA19 4B024/HA20 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA17 4B063/QA20 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR38 4B063/QR50 4B063/QR51 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX02 4B063/QX07 4B063/QX10		
优先权	10050942 2000-10-10 DE		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种检测基因组DNA中胞嘧啶甲基化的方法，包括以下步骤：在第一步骤中，通过用试剂中的基因组DNA样品，5-甲基胞嘧啶不改变，胞嘧啶或尿嘧啶碱基配对行为化学转化为类似于尿嘧啶其它碱。然后使用聚合酶和至少一种引物寡核苷酸扩增预处理的DNA。当用反应物新处理该扩增产物时，5-甲基胞嘧啶不会改变并且胞嘧啶化学转化成尿嘧啶或其碱基对行为类似于尿嘧啶的另一碱基。在最后的步骤中，再次验证在扩增产物中新化学处理后剩余的胞嘧啶碱基和/或鸟嘌呤碱基的存在。

【图 1】

