

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006年4月13日 (13.04.2006)

PCT

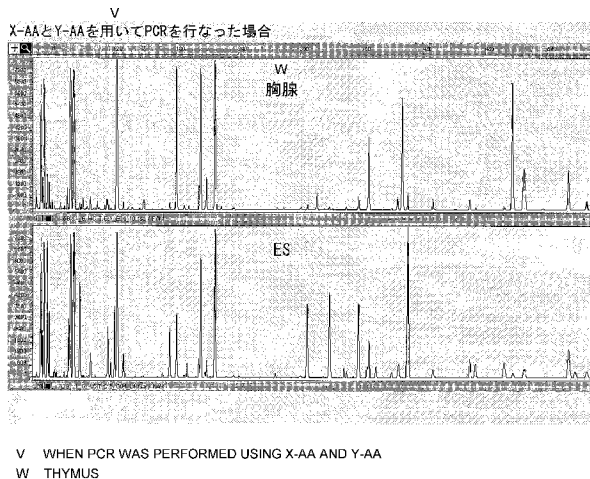
(10) 国際公開番号
WO 2006/038416 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12Q 1/68, C12N 15/09
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/016344
- (22) 国際出願日: 2005年9月6日 (06.09.2005)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2004-293671 2004年10月6日 (06.10.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政
法人放射線医学総合研究所 (NATIONAL INSTITUTE
OF RADIOLOGICAL SCIENCES) [JP/JP]; 〒2638555
千葉県千葉市稲毛区穴川 4-9-1 Chiba (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 安倍 真澄 (ABE,
Masumi) [JP/JP]; 〒2638555 千葉県千葉市稲毛区穴川
4-9-1 独立行政法人放射線医学総合研究所内
Chiba (JP).
- (74) 代理人: 阿部 正博 (ABE, Masahiro); 〒2740825 千葉
県船橋市前原西二丁目 14番 1号ダイアパレス津田
沼 1001号 Chiba (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護
が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF EXHAUSTIVE ANALYSIS OF TRANSCRIPTIONALLY-ACTIVE DOMAIN (NON-METHYLATED DOMAIN) ON GENOME

(54) 発明の名称: ゲノム上の転写活性領域 (非メチル化領域) の網羅的解析法



(57) Abstract: A method of exhaustive comparison and analysis through simultaneous detection of a multiplicity of non-methylated domains on two or more types of cellular genomes. There is provided a method in which using a methylation-sensitive enzyme as at least either first restriction enzyme X or second restriction enzyme Y, there is prepared a group consisting only of DNA fragments derived from non-methylated domains and in which using the principle of HiCEP, the non-methylated domains on genomes are detected. Further, there is provided a method of analyzing any change of transcriptionally-active domain on genome, comprising detecting non-methylated domains on two or more types of cellular genomes according to the above method and comparing results thereof (for example, change of the magnitude of each of peaks corresponding to the amounts of non-methylated domains) with each other to thereby analyze any non-methylated domain differences.

(57) 要約: 本発明の目的は、二種類以上の細胞のゲノム上の非メチル化領域を同時に多数検出し、網羅的に比較し解析することができる方法を提供することである。本発明は、第一の制限酵素X及び第二の制限酵素Yの少なくともいずれか一方はメチル化センシティブな酵素を使用して、非メチル化領域に由来するDNA断片のみから構成された集団を調製し、次いで、HiCEPの原理を用いてゲノム上の非メチル化領域を検出する方法、及び、該方法によって、二種類以上の細胞由来のゲノム上の非メチル化領域を検

[続葉有]

WO 2006/038416 A1



(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

ゲノム上の転写活性領域(非メチル化領域)の網羅的解析法

技術分野

[0001] 本発明は、ゲノム多様性解析を行なう方法、より具体的には、ゲノム上の転写活性領域(非メチル化領域)の網羅的検出法に関する。

背景技術

[0002] ヒトやマウスなどのゲノム塩基配列が決定されたあるいはほぼ決定されつつある現在、ポストゲノム解析の焦点は、個体や疾患間のゲノム塩基配列の違いやその因果関係に移行している。すなわち、患者と健常者の間でゲノムの塩基配列の違いがあるか、その違いと疾患の関連があるか、などが研究され始めている。

[0003] 例えば、多型マーカーとして、SNP(single nucleotide polymorphism:一塩基多型)による研究では、ゲノムの塩基配列中に存在するSNPを網羅的に同定し、それを個体間、疾患間(あるいは、健常者との間)などで比較し関連性を見出す方法、及び、マイクロサテライト(ゲノム中に点在する繰り返し配列であって、個体間で繰り返し単位の長さが異なる)を多型マーカーとして用いて比較する方法等が知られている。

[0004] こうした試みによって疾患と多型マーカーとの関連性が見出されつつあるが、これら多型マーカーはゲノム塩基配列の単に違いであって、この違いが直接的に疾患に関与しているかどうかは、今後の研究に委ねられている。ゲノム上の塩基配列の違いと疾患の関連性をもっと詳しく解析するためには、疾患関連遺伝子(その遺伝子そのものが異常になって疾患を引き起こす遺伝子群のみを指すのではなく、疾患に直接的又は間接的に関与している遺伝子群も含む。)が、どのように発現しているか、すなわち、網羅的な遺伝子発現頻度解析と関連づけて解析する必要がある。

[0005] 一方で、この様なゲノムの塩基配列の違いのみならず、遺伝子の転写発現機構に関与している要因として、ゲノム上の塩基の修飾がある。現在最もよく知られているのが、塩基配列CGのシチジン塩基のメチル化制御である。即ち、メチル化を受けているシチジン塩基(Met-C)が、ゲノム上で遺伝子の転写制御配列や転写配列に関与する位置で起こっている場合、関与する遺伝子の転写が妨げられる、あるいは、制御

されることが知られている(非特許文献1)。ゲノム上のCG配列の内、細胞の状態により、約60-90%がメチル化されていると言われており、このメチル化は遺伝子の転写調節の一端を担っている(非特許文献2)

[0006] これまでに、ゲノム上の特定部位のメチル化に関する解析方法として、メチル化感受性制限酵素及びメチル化非感受性制限酵素を用いてゲノムの特定部分を切断し、得られた切断断片を増幅して電気泳動等により解析する方法(非特許文献3)、及び、メチル化非感受性制限酵素で付着末端を生じるXmaI に特異的なアダプターを使用してメチル化部位を解析する方法(非特許文献4)が報告されている。

[0007] 更に、特許文献1には、ゲノム中のメチル化部位を検出する方法、及び、それに用いられるバイオチップ等が記載されている。

非特許文献1:木住野達也、新川詔夫、実験医学増刊, vol.21, 1442-1447, 2003.

非特許文献2:Razin A, Riggs AD., Science. 1980 Nov 7;210(4470):604-10.

非特許文献3:Toshikazu U., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA Vol.94, pp.2284-2289, March 1997

非特許文献4:Minoru T., et al., Cancer Research 59, 2307-2312 (1999)

特許文献1:特開2003-38183

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0008] 既に述べたように、疾患関連遺伝子を同定するためには、ゲノム塩基配列の違いを見出すのみならずゲノムの転写活性領域(非メチル化修飾領域)も把握して相関解析する必要がある。即ち、本発明の目的は、二種類以上の細胞のゲノム上の非メチル化領域を同時に多数検出し、網羅的に比較し解析することができる方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0009] 即ち、本発明は第一の態様として、ゲノム上の非メチル化領域を検出する方法であって、

(a)ゲノムDNAを第一の制限酵素Xで切断する工程、

(b)工程(a)で切断されたDNA断片の第一の制限酵素Xによる切断部位へ、該切断

部位の配列に相補的な配列及びXプライマーに相補的な配列を含み、該切断部位の配列に相補的な配列末端とは反対側の末端にタグ物質が付加されたXアダプターを結合させて、Xアダプターが結合しているDNA断片を得る工程、

(c) 工程(b)で得られたXアダプターが結合しているDNA断片を該Xプライマーに相補的な配列部分を切断しない第二の制限酵素Yで切断する工程、

(d) 工程(c)で切断されたXアダプターが結合しているDNA断片を、Xアダプターに付加されたタグ物質高親和性を有する物質を用いて分離精製する工程、

(e) 工程(d)で精製されたXアダプターが結合しているDNA断片の第二の制限酵素Yによる切断部位へ、該切断部位の配列に相補的な配列及びYプライマーに相補的な配列を含むYアダプターを結合させて、両端にXアダプターとYアダプターが結合しているDNA断片を得る工程、

(g) 該Xプライマーを基準として3'末端に2塩基配列である $N_1 N_2$ (N_1 及び N_2 は同一又は異なってもよい、アデニン、チミン、グアニン及びシトシンからなる群より選ばれる塩基である)を含むX1プライマーと、該Yプライマーを基準として3'末端に2塩基配列である $N_3 N_4$ (N_3 及び N_4 は同一又は異なってもよい、アデニン、チミン、グアニン及びシトシンからなる群より選ばれる塩基である)を含むY1プライマーとからなるプライマーセットを用いて、工程(e)で得られた二本鎖配列を鋳型としてPCR反応を行う工程、及び

(h) 得られたPCR産物をその鎖長に基づき、分離して検出する工程、

から成り、第一の制限酵素X及び第二の制限酵素Yの少なくともいずれか一方はメチル化センシティブな酵素である、前記方法に係る。

[0010] 本発明の第二の態様として、上記方法によって、二種類以上の細胞由来のゲノム上の非メチル化領域を検出し、その結果(例えば、非メチル化領域の量に相当する各ピークの大きさの変化等)を比較することにより非メチル化領域の差異を解析するから成る、ゲノム上の転写活性領域の変化を解析する方法に係る。ここで、ゲノムの由来に特に制限はなく、例えば、真核細胞、特にヒト及びマウスなどの哺乳類細胞由来のゲノムを挙げることができる。又、「二種類以上の細胞」とは、細胞の由来する生物種、臓器、組織、発生・分化段階、病態等のような、細胞の任意の性質が互いに異

なる場合を広く意味する。

発明の効果

- [0011] 本発明のゲノム上の非メチル化領域を検出する方法では、第一の制限酵素X及び第二の制限酵素Yの少なくともいずれか一方に、メチル化修飾シチジンが存在する場合に切断できない制限酵素(メチル化センシティブ制限酵素)を利用することにより、ゲノム上のメチル化領域あるいは、非メチル化領域を含むゲノム領域を断片化(フラグメンテーション)し、このフラグメント集団(フラグメントライブラリー)を網羅的に、且つ、高感度で分離、検出することが出来る。
- [0012] 更に、例えば、疾患患者由来細胞と健常者由来細胞、又は、異なる発生・分化段階にある細胞間等のような、何らかの相違点を有する二種類以上の細胞について、本発明の検出方法を実施して得られた結果を比較することにより、ゲノム上の非メチル化領域、すなわち、転写活性領域の差異を容易に見出し、解析することができる。

図面の簡単な説明

- [0013] [図1]工程(h)の結果で工程(g)のX-AAとY-AAの組合せの場合を図1に示す。
[図2]工程(h)の結果で工程(g)のX-CAとY-ACの組合せの場合を図2に示す。
[図3]工程(h)の結果で工程(g)のX-CAとY-ACの組合せの場合を図3に示す。

発明を実施するための最良の形態

- [0014] 本発明の検出方法において、出発材料であるゲノムDNAの量が十分でないような場合でも、十分な検出感度が得られるように、更に、工程(e)で得られた両末端がXアダプターとYアダプターで囲まれているDNA断片を鋳型として、XプライマーとYプライマーとからなるプライマーセットを用いてPCRを行ないDNA断片を増幅することからなる工程(f)を、(e)工程と(g)工程の間に含むことが好ましい。その結果、XプライマーとYプライマーが付加された二本鎖DNA数を増大させることができる。当業者であれば、工程(f)においてPCRの条件を適当に設定することにより、例えば、PCRサイクル数を7~10回とすることにより、DNA断片の数を128~1024倍に増幅することが出来る。
- [0015] 本発明の検出方法において得られたPCR産物を分離及び検出した後に、更に、検出されたピークを同定する工程(i)を含むことが出来る。このような同定は当業者に

公知の任意の方法で行うことが可能である。例えば、検出されたピークを回収し、適当なシーケンシング等の適当な実験的手法によって具体的にその塩基配列を決定することが出来る。或いは、コンピューター上でかかる配列を理論的に求めることも出来る。例えば、GenBank, EMBL 及びDDBJ 等の当業者に公知の任意のデータベースから得られるデータを利用し、本発明方法で使用した制限酵素による切断で得られることが予想されるDNA断片の理論的に求めることが出来る。従って、これを本発明の検出方法から得られた実測データと比較すれば、当該DNA断片がどの遺伝子(ゲノムDNA)に由来するものであるかを同定することが可能である。

[0016] 本発明方法において、ゲノム上の非メチル化領域を検出するためには、第一の制限酵素X及び第二の制限酵素Yの少なくともいずれか一方はメチル化センシティブな酵素である必要がある。

[0017] 具体的には、好適な態様として、例えば、第一の制限酵素Xがメチル化センシティブな酵素であり、且つ、第二の制限酵素Yがメチル化センシティブ又はメチル化アンセンシティブな酵素である場合、又は、第一の制限酵素Xがメチル化アンセンシティブな酵素であり、且つ、第二の制限酵素Yがメチル化センシティブな酵素である場合を挙げる事が出来る。尚、第一の制限酵素X及び第二の制限酵素Yは、当業者に公知の任意の酵素を適宜使用することが出来る。

[0018] しかしながら、ゲノムの位置を特定しやすくするために、第一の制限酵素Xとしては、出現頻度が比較的少ない酵素が望ましく、例えば、6塩基認識で且つメチル化センシティブなSall(タカラバイオ社製、認識配列GTCGAC)、BssHII(タカラバイオ社製、認識配列GCGCGC)、8塩基認識で且つメチル化センシティブなNotI(タカラバイオ社製、認識配列GCGGCCG)、AscI(New England BioLabs社製、GGCGGCC)などを好適例として挙げる事が出来る。

[0019] 同様に、第一の制限酵素Xとして適している出現頻度が比較的少ないメチル化アンセンシティブ酵素の例として、XmaI(New England BioLabs社製、CCCGGG)、BssSI(New England BioLabs社製、CTCGTG)、BsoBI(New England BioLabs社製、CYCGRG)等を挙げる事が出来る。

[0020] 例えば、New England BioLabs社2002-3年版カタログ263頁(或いは、同社ホームペ

ージhttp://www.neb.com/nebecomm/tech_reference/restriction_enzymes/fragment_size_by_cleavage.asp)に記載されている報告では、マウスゲノム中に出現するSallサイト確立は、平均48kbpに1回の割合であり、マウスゲノムを26.4億塩基対と仮定する(National Center for Biotechnology Information U.S. National Library of Medicine 2004年10月1日現在の記述。<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>)と約55,000箇所、NotIは、平均120kbpで22,000箇所、AscIでは、平均280kbpで約9,400箇所存在する。

[0021] 従って、Sallを第一の制限酵素として使用した場合、マウスゲノムでは、約55,000個のDNA断片が得られることになるが、Sallは、メチル化センシティブであるので、ゲノム上のCG配列中70%が、メチル化されていると仮定する(非特許文献1)と、Sallでも、55,000箇所の内、70%にあたる約38,500箇所は切断できないことになるので、切断できる箇所は、30%にあたる約16,500箇所と成り、16,500個のDNA断片が得られる。しかしながら、このDNA断片の鎖長は、26.4億塩基対割る16,500になるので、平均160kbpと予想される。現実問題として、このような平均160kbpの長いDNA断片を扱うのは、非常に困難である。

[0022] このDNA断片に対して第二の制限酵素Yを作用させ、約160kbpを短く切り刻み、扱い易い断片サイズにする。従って、第二の制限酵素Yは、第一の制限酵素と違い、出現頻度が豊富な、4塩基認識制限酵素を使うのが望ましく、これにより、扱いやすいDNA断片サイズを得ることができる。その為には、第二の制限酵素Yは、メチル化アンセンシティブな酵素にすることが望ましいが、第二の制限酵素Yもメチル化センシティブな酵素にするとメチル化が起こっている広範囲な領域の特定に役立つので、解析対象によって使い分けることが可能である。

[0023] このような第二の制限酵素Yとして使用するのに適当な酵素の例として、メチル化アンセンシティブな酵素としては、MspI(タカラバイオ社、認識配列CCGG)、及びTaqI(New England BioLabs社製、TCGA)等を挙げることができ、又、メチル化センシティブな酵素としては、HpaII(New England BioLabs社製、CCGG)及びHhaI(New England BioLabs社製、GCGC)等を挙げることが出来る。

[0024] こうして作製された第一制限酵素X及び第二制限酵素Yで切断されたDNA断片集団(DNA断片ライブラリ)は、非メチル化領域に由来するDNA断片のみから構成され

たものとなる。

[0025] こうして得られたDNA

断片ライブラリから各要素であるDNA断片をそれらの鎖長(分子サイズ)に基づき分離、検出する。その具体的な方法は当業者に公知であり、例えば、電気泳動、液体クロマトグラフ(HPLC)、飛行時間型質量分析装置(TOF/MS)を用いることが一般的である。例えば、電気泳動法を用いた場合では、PCR産物の電気泳動における移動距離及びピークに基づき、分離検出することができる。

[0026] 具体的には、アクリルアミド系のゲルを用いたゲル電気泳動法では、通常20塩基から1000塩基の鎖長を持つDNA断片が対象で、この範囲で分離能力が非常によく、1塩基の分解能がある。しかしながら、第一の制限酵素Xと第二の制限酵素Y組合せを、夫々SalIとMspI(タカラバイオ社、認識配列CCGG)とした場合、上述のようにメチル化の影響を70%と考えると、第一の制限酵素SalIによる切断約16,500種のDNA断片が得られ、これを第二の制限酵素MspIによる切断によって、両末端が、SalI-MspIで囲まれたDNA断片が約16,500の倍の約33,000種類得られることになる。このような場合、電気泳動の分解能を1baseとしても、約33,000種類以上ものぼるDNA断片を鎖長だけで十分に分離することは困難である。

[0027] そこで、本発明方法においては、このような多種類のDNA断片を場合分けする為に、国際公開WO02/48352号パンフレットに開示される高カバー率遺伝子発現プロファイル解析法(HiCEP:High coverage expression profiling analysis)に用いられている方法を利用する。これによって、第一制限酵素X及び第二制限酵素Yで切断されたDNA断片配列の制限酵素認識配列に隣接する2塩基の配列から成る計256通りの組合せでDNA断片ライブラリを場合分けすることが出来、その結果、約33,000種のDNA断片は、2塩基一つの組合せあたり約129種に分類されることとなる。この約129種は電気泳動にて現実的に分離定量できる数である。又、この方法によれば、仮にCGメチル化率が60%であったとしても、2塩基一つの組合せあたり約172種類に留まり、十分に分離解析が可能である。

[0028] 「アダプター」は、PCR反応においてプライマーを結合させるために使用され、使用する制限酵素及びプライマーの構造に種類等に応じて適宜設計することが出来る。

安定したPCR反応を行わせるためには、通常プライマーの長さは30塩基程度である。

[0029] 「Xプライマー」、「X1プライマー」、「Yプライマー」及び「Y1プライマー」は、対象RNA配列と出来るだけ一致させないために、16塩基以上の長さを有することが好ましい。更に、例えば、「バイオラッド実験イラストレイテッド(3)新版 本当にふえるPCR」中山広樹 著、秀潤社、2002年、第2版、第4刷に記載されているような、PCRプライマーとして一般的に要求される条件を満たしている必要がある。また、各プライマーは当業者に公知の一般的なプライマー合成方法(Letsinger et al., Nucleic Acids Research, 20, 1879-1882, 1992; 特開平11-08018号公報)に従い調製することができる。

[0030] 更に、PCR反応後の検出を容易にするために、これらプライマーの少なくともいずれかの末端に、当業者に公知の任意の蛍光物質等の標識物質が結合していることが好ましい。例えば、適当な蛍光物質として、6-カルボキシフルオレッセイン(FAM)、4, 7, 2', 4', 5', 7'-ヘキサクロロ-6-カルボキシフルオレッセイン(HEX)、NED(アプライドシステムズジャパン社)及び6-カルボキシ-X-ローダミン(Rox)等を挙げることが出来る。

[0031] 「タグ物質」及び「タグ物質に高親和性を有する物質」とは、互いに高親和性をもって特異的に結合することが可能な結合対を構成する一方の物質を意味する。互いに高親和性をもって特異的に結合することが可能な結合対であれば使用することが可能である。本発明に使用可能なタグ物質とタグ物質に高親和性を有する物質との組合せの例には、ビオチンとストレプトアビジン、ビオチンとアビジン、FITCとFITC抗体、DIGとanti-DIG及びプロテインAとマウスIgG及びラテックス粒子等が含まれるが、これらに限られるものではない。タグ物質のDNA配列への付加は、当業者に公知の適当な条件により達成することが可能である。タグ物質が付加されている二本鎖cDNA断片を回収する場合には、該タグ物質に高い親和性を有する物質との特異的な反応を利用する。

[0032] 更に、HiCEP法の実施に際してのPCR等のその他の条件及び使用する装置等は、当業者に公知の情報、例えば、国際公開WO02/48352号パンフレット中の記載を

参照することが出来る。尚、得られた遺伝子発現プロファイルは、当業者に公知の解析ソフトウェア、例えば、GeneScan(登録商標:アプライドバイオシステムズジャパン社)を使用して解析することが出来る。

[0033] 尚、本発明方法でプライマーのミスアニーリングに起因する偽ピークの発生を減少させるためには、Xプライマー又はX1プライマー、及びYプライマー又はY1プライマーのそれぞれXアダプター及びYアダプターへのアニーリングをプライマーの T_m MAX+6°C~ T_m MAX+14°Cの温度で行うことが好ましい。

実施例

[0034] 以下、実施例に基づき本発明を更に詳細に説明するが、これらの実施例は本発明の技術的範囲を何等限定するものではない。当業者であれば、本明細書の記載に基づき、本発明の技術的範囲を逸脱せずに、多くの変形及び修飾を実施することが可能である。

[0035] 材料として、マウスES細胞とマウス胸腺細胞からゲノムDNAを抽出、精製した。それぞれ5 μ gを用いた。

[0036] (a)ゲノム DNAを認識配列中にCG配列を有し且つメチル化センシティブな第一の制限酵素Xで切断する工程:

[0037] [表1]

Genomic DAN	5 μ g
10x Sali buffer	40 μ l
Sali (タカラバイオ製)	60U
<hr/>	
蒸留水にて 400 μ l にした。	

[0038] 37°C 3時間 反応させた。エタノール沈殿法でDNAを濃縮、精製した。乾燥後、20 μ lのTE溶液でDNAを溶解した。

[0039] (b)工程(a)で切断されたDNA断片の第一の制限酵素Xによる切断部位へ、該切断部位の配列に相補的な配列、Xプライマーに相補的な配列を含み、該切断部位の配列に相補的な配列末端とは反対側の末端にタグ物質が付加されたXアダプターを結

合させて、Xアダプターが結合しているDNA断片を得る工程：

Xアダプター

1. 5'-

Biotin-AAGTATCGTCACGAGGCGTCCTACTGGC - 3' (配列番号1)

2. 5'- TCGAGCCAGTAGGACGCCTCGTGACGATACTT- 3' (配列番号2)

[0040] 1と2のオリゴマーをアニーリングし、

5'- Biotin-AAGTATCGTCACGAGGCGTCCTACTGGC -3'

3'- TTCATAGCAGTGCTCCGCAGGATGACCGAGCT -5'

の構造をとる、Xアダプター溶液100mMを作製した。

[0041] [表2]

SaI で切断、精製された DAN	20 μ l
100 μ M Xアダプター溶液	2 μ l
10x T4 DNA ligase buffer	2.5 μ l
10mM ATP 溶液	1 μ l
T4 DNA ligase (タカラバイオ製)	350U

蒸留水にて 27 μ l にした。

[0042] 16°C 6時間 反応させた。エタノール沈殿法でDNAを濃縮、精製した。乾燥後、50 μ l のTE溶液でDNAを溶解した。

[0043] (c)工程(b)で得られたXアダプターが結合しているDNA断片を該Xプライマーに相補的な配列部分を切断しない第二の制限酵素Yで切断する工程：

[0044] [表3]

Xアダプターを結合させた DNA 溶液	50 μ l
10x MspI buffer	10 μ l
0.1% BSA	10 μ l
MspI (タカラバイオ製)	60U

蒸留水にて 100 μ l にした。37°C 3時間 反応させた。

[0045] (d)工程(c)で切断されたXアダプターが結合しているDNA断片をXアダプターに付

加されたタグ物質を利用して、分離精製する工程：

MspI切断DNA溶液に100 μ lのストレプトアビジンコート磁気ビーズ溶液(ダイナル社製)を加え懸濁し、Biotinタグ付きXアダプターDNA断片を吸着させた。マグネットを利用して、磁気ビーズを集め、上清を捨てた。1xB/W(磁気ビーズ洗浄溶液)500 μ lを加え、懸濁した。マグネットを利用して、磁気ビーズを集め、上清を捨てた。得られた磁気ビーズを20 μ lの蒸留水に懸濁させた。

[0046] (e)工程(d)で精製されたXアダプターが結合しているDNA

Fragmentの第二の制限酵素Yによる切断部位へ、該切断部位の配列に相補的な配列及びYプライマーに相補的な配列を含むYアダプターを結合させて、両端にXアダプターとYアダプターが結合しているDNA断片を得る工程：

Yアダプター

5'-

AATGGCTACACGAACTCGGTTCATGACA - 3' (配列番号3)

4. 5'- CGTGTCATGAACCGAGTTCGTGTAGCCATT- 3' (配列番号4)

[0047] 3と4のオリゴマーをアニーリングし、

5'- AATGGCTACACGAACTCGGTTCATGACA -3'

3'- TTACCGATGTGCTTGAGCCAAGTACTGTGC -5'

の構造をとる、Yアダプター溶液、100 μ Mを作製した。

[0048] [表4]

磁気ビーズ懸濁溶液	20 μ l
100 μ M Yアダプター溶液	1 μ l
10x T4 DNA ligase buffer	2.5 μ l
10mM ATP 溶液	1 μ l
T4 DNA ligase (タカラバイオ製)	350U

蒸留水にて27 μ lにした。

[0049] 25°C 6時間 反応させた。マグネットを利用して、磁気ビーズを集め、上清を捨てた。1 x B/W(磁気ビーズ洗浄溶液)500 μ lを加え、懸濁させた。マグネットを利用して、磁

気ビーズを集め、上清を捨てた。得られた磁気ビーズを40 μ lの蒸留水に懸濁させた。

[0050] (f) 工程(e)で得られた両末端がXアダプターとYアダプターで囲まれているDNA断片を鋳型として、XプライマーとYプライマーとからなるプライマーセットを用いてPCRを行ないDNA断片を増幅する工程:

Xプライマー (Xアダプターに相補的な配列を含む)

5. 5' - AAGTATCGTCACGAGGCGTCCTACTGGCTCGA -3' (配列番号5)

Yプライマー (Yアダプターに相補的な配列を含む)

6. 5' - AATGGCTACACGAACTCGGTTTCATGACACGG -3' (配列番号6)

これらXプライマーとYプライマーを各100pmol/ μ l溶液に調整した。

[0051] [表5]

工程 (e) 溶液	10 μ l
10x PCR Buffer	5 μ l
25mM MgCl ₂	5 μ l
dNTP Mixture (各 2.5mM)	8 μ l
Taq Polymerase (5u/ μ l)	1 μ l
X Primer (100pmol/ μ l)	0.5 μ l
Y Primer (100pmol/ μ l)	0.5 μ l

蒸留水にて 50 μ l にした。PCR 装置にセットし、PCR を行った。

[0052] [表6]

PCR 温度ステップ

ステップ 1 95°C 5min

ステップ 2 (95°C 20sec、68°C 15min) x 7回

ステップ 3 60°C 30min

[0053] PCR溶液をPCR産物精製キットを用いて精製し、未反応Xプライマー及びYプライマーを除去した。回収した、DNA溶液を40 μ lの蒸留水で溶解した。

[0054] (g) 該Xプライマーを基準として3'末端に2塩基配列であるN₁N₂(N₁及びN₂は同一

又は異なってもよい、アデニン、チミン、グアニン及びシトシンからなる群より選ばれる塩基である)を含むX1プライマーと、該Yプライマーを基準として3'末端に2塩基配列である $N_3 N_4$ (N_3 及び N_4 は同一又は異なってもよい、アデニン、チミン、グアニン及びシトシンからなる群より選ばれる塩基である)を含むY1プライマーとからなるプライマーセットを用いて、工程(e)で得られた二本鎖配列を鋳型としてPCR反応を行う工程:

[0055] [表7]

X 1 プライマー：Xアダプターと相補的な配列と2塩基の組合せ配列を持ち、5'末端が蛍光色素で標識されているオリゴマー

F A M : fluorescein 標識

H E X : 5' -Hexafluorocerin 標識

N E D : Applied Biosystems社製蛍光色素標識

X-AA FAM-GCGTCCTACTGGCTCGACA**A**

X-AC FAM-GCGTCCTACTGGCTCGACA**C**

X-AG FAM-GCGTCCTACTGGCTCGACA**G**

X-AT FAM-GCGTCCTACTGGCTCGACA**T**

X-CA NED-GCGTCCTACTGGCTCGACA**A**

X-CC NED-GCGTCCTACTGGCTCGACA**C**

X-CG NED-GCGTCCTACTGGCTCGACA**G**

X-CT HEX-GCGTCCTACTGGCTCGACA**T**

X-GA NED-GCGTCCTACTGGCTCGACA**A**

X-GC HEX-GCGTCCTACTGGCTCGACA**C**

X-GG HEX-GCGTCCTACTGGCTCGACA**G**

X-GT FAM-GCGTCCTACTGGCTCGACA**T**

X-TA NED-GCGTCCTACTGGCTCGACA**A**

X-TC HEX-GCGTCCTACTGGCTCGACA**C**

X-TG HEX-GCGTCCTACTGGCTCGACA**G**

X-TT FAM-GCGTCCTACTGGCTCGACA**T**

[0056] [表8]

Y 1 プライマー：Yアダプターと相補的な配列と2塩基の組合せ配列からなるオリゴマー

Y-AA	ACTCGGTTTCATGACACGG AA
Y-AC	ACTCGGTTTCATGACACGG AC
Y-AG	ACTCGGTTTCATGACACGG AG
Y-AT	ACTCGGTTTCATGACACGG AT
Y-CA	ACTCGGTTTCATGACACGG CA
Y-CC	ACTCGGTTTCATGACACGG CC
Y-CG	ACTCGGTTTCATGACACGG CG
Y-CT	ACTCGGTTTCATGACACGG CT
Y-GA	ACTCGGTTTCATGACACGG GA
Y-GC	ACTCGGTTTCATGACACGG GC
Y-GG	ACTCGGTTTCATGACACGG GG
Y-GT	ACTCGGTTTCATGACACGG GT
Y-TA	ACTCGGTTTCATGACACGG TA
Y-TC	ACTCGGTTTCATGACACGG TC
Y-TG	ACTCGGTTTCATGACACGG TG
Y-TT	ACTCGGTTTCATGACACGG TT

[0057] 以上の合計32本のオリゴマーを合成し、各プライマーを2 μ M濃度に調整した。各

プライマー溶液を2 μ lずつX1プライマーとY1プライマーの組合せ表に従ってPCRチューブ256本へそれぞれ分注した。

[0058] [表9]

X 1 プライマーと Y 1 プライマーの組合せ表

X - Y	X - Y	X - Y	X - Y	X - Y	X - Y	X - Y	X - Y
AA - AA	AC - AA	AG - AA	AT - AA	TT - AA	GT - AA	CT - AA	TC - AA
AA - AC	AC - AC	AG - AC	AT - AC	TT - AC	GT - AC	CT - AC	TC - AC
AA - AG	AC - AG	AG - AG	AT - AG	TT - AG	GT - AG	CT - AG	TC - AG
AA - AT	AC - AT	AG - AT	AT - AT	TT - AT	GT - AT	CT - AT	TC - AT
AA - CA	AC - CA	AG - CA	AT - CA	TT - CA	GT - CA	CT - CA	TC - CA
AA - CC	AC - CC	AG - CC	AT - CC	TT - CC	GT - CC	CT - CC	TC - CC
AA - CG	AC - CG	AG - CG	AT - CG	TT - CG	GT - CG	CT - CG	TC - CG
AA - CT	AC - CT	AG - CT	AT - CT	TT - CT	GT - CT	CT - CT	TC - CT
AA - GA	AC - GA	AG - GA	AT - GA	TT - GA	GT - GA	CT - GA	TC - GA
AA - GC	AC - GC	AG - GC	AT - GC	TT - GC	GT - GC	CT - GC	TC - GC
AA - GG	AC - GG	AG - GG	AT - GG	TT - GG	GT - GG	CT - GG	TC - GG
AA - GT	AC - GT	AG - GT	AT - GT	TT - GT	GT - GT	CT - GT	TC - GT
AA - TA	AC - TA	AG - TA	AT - TA	TT - TA	GT - TA	CT - TA	TC - TA
AA - TC	AC - TC	AG - TC	AT - TC	TT - TC	GT - TC	CT - TC	TC - TC
AA - TG	AC - TG	AG - TG	AT - TG	TT - TG	GT - TG	CT - TG	TC - TG
AA - TT	AC - TT	AG - TT	AT - TT	TT - TT	GT - TT	CT - TT	TC - TT
TG - AA	CA - AA	GA - AA	TA - AA	CC - AA	CG - AA	GC - AA	GG - AA
TG - AC	CA - AC	GA - AC	TA - AC	CC - AC	CG - AC	GC - AC	GG - AC
TG - AG	CA - AG	GA - AG	TA - AG	CC - AG	CG - AG	GC - AG	GG - AG
TG - AT	CA - AT	GA - AT	TA - AT	CC - AT	CG - AT	GC - AT	GG - AT
TG - CA	CA - CA	GA - CA	TA - CA	CC - CA	CG - CA	GC - CA	GG - CA
TG - CC	CA - CC	GA - CC	TA - CC	CC - CC	CG - CC	GC - CC	GG - CC
TG - CG	CA - CG	GA - CG	TA - CG	CC - CG	CG - CG	GC - CG	GG - CG
TG - CT	CA - CT	GA - CT	TA - CT	CC - CT	CG - CT	GC - CT	GG - CT
TG - GA	CA - GA	GA - GA	TA - GA	CC - GA	CG - GA	GC - GA	GG - GA
TG - GC	CA - GC	GA - GC	TA - GC	CC - GC	CG - GC	GC - GC	GG - GC
TG - GG	CA - GG	GA - GG	TA - GG	CC - GG	CG - GG	GC - GG	GG - GG
TG - GT	CA - GT	GA - GT	TA - GT	CC - GT	CG - GT	GC - GT	GG - GT
TG - TA	CA - TA	GA - TA	TA - TA	CC - TA	CG - TA	GC - TA	GG - TA
TG - TC	CA - TC	GA - TC	TA - TC	CC - TC	CG - TC	GC - TC	GG - TC
TG - TG	CA - TG	GA - TG	TA - TG	CC - TG	CG - TG	GC - TG	GG - TG
TG - TT	CA - TT	GA - TT	TA - TT	CC - TT	CG - TT	GC - TT	GG - TT

[0059] [表10]

PCR反応溶液	
工程 (g) 溶液	5 μ l
水	2,515 μ l
10x PCR Buffer	600 μ l
25mM MgCl ₂	600 μ l
dNTP Mixture (各 2.5mM)	960 μ l
Taq Polymerase (5u/ μ l)	120 μ l
Total	4,800 μ l

[0060] 次に、PCR反応液を各チューブに16 μ lずつ分注し、PCR装置にセットし、PCRを行なった。

[0061] [表11]

PCR 温度ステップ

ステップ 1 95°C 1min

ステップ 2 (98°C 20sec、71.5°C 30sec、72°C 1min) x 28回

ステップ 3 60°C 30min

[0062] (h) 得られたPCR産物をその鎖長に基づき、分離して検出する工程:

工程 (g) で得られたPCR産物をApplied Biosystems社製ABI PRISM (登録商標) 3100 Genetic Analyzerにて、そのマニュアルに従って、電気泳動と解析を行なった。得られた、各サンプルの各Lotの256チューブを全て解析した結果、全てのサンプルに置いて同じXプライマーとYプライマーの組合せに関して、電気泳動波形パターンが異なることを見出した。

産業上の利用可能性

[0063] 本発明方法により、二種類以上の細胞のゲノム上の非メチル化領域を同時に多数検出し、網羅的に比較し解析することができる。

請求の範囲

- [1] ゲノム上の非メチル化領域を検出する方法であって、
- (a) ゲノムDNAを第一の制限酵素Xで切断する工程、
 - (b) 工程(a)で切断されたDNA断片の第一の制限酵素Xによる切断部位へ、該切断部位の配列に相補的な配列及びXプライマーに相補的な配列を含み、該切断部位の配列に相補的な配列末端とは反対側の末端にタグ物質が付加されたXアダプターを結合させて、Xアダプターが結合しているDNA断片を得る工程、
 - (c) 工程(b)で得られたXアダプターが結合しているDNA断片を該Xプライマーに相補的な配列部分を切断しない第二の制限酵素Yで切断する工程、
 - (d) 工程(c)で切断されたXアダプターが結合しているDNA断片を、Xアダプターに付加されたタグ物質高親和性を有する物質を用いて分離精製する工程、
 - (e) 工程(d)で精製されたXアダプターが結合しているDNA断片の第二の制限酵素Yによる切断部位へ、該切断部位の配列に相補的な配列及びYプライマーに相補的な配列を含むYアダプターを結合させて、両端にXアダプターとYアダプターが結合しているDNA断片を得る工程、
 - (g) 該Xプライマーを基準として3'末端に2塩基配列である $N_1 N_2$ (N_1 及び N_2 は同一又は異なってもよい、アデニン、チミン、グアニン及びシトシンからなる群より選ばれる塩基である)を含むX1プライマーと、該Yプライマーを基準として3'末端に2塩基配列である $N_3 N_4$ (N_3 及び N_4 は同一又は異なってもよい、アデニン、チミン、グアニン及びシトシンからなる群より選ばれる塩基である)を含むY1プライマーとからなるプライマーセットを用いて、工程(e)で得られた二本鎖配列を鋳型としてPCR反応を行う工程、及び
 - (h) 得られたPCR産物をその鎖長に基づき、分離して検出する工程、
- から成り、第一の制限酵素X及び第二の制限酵素Yの少なくともいずれか一方はメチル化センシティブな酵素である、前記方法。
- [2] 更に、(f) 工程(e)で得られた両末端がXアダプターとYアダプターで囲まれているDNA断片を鋳型として、XプライマーとYプライマーとからなるプライマーセットを用いてPCRを行ないDNA断片を増幅する工程を、(e)工程と(g)工程の間に含む、請求

- 項1記載の方法。
- [3] 工程(f)において、PCRサイクル数を7～10回とすることにより、DNA断片の数を128～1024倍に増幅する、請求項2記載の方法。
- [4] 更に、(i)検出されたピークを同定する工程を含む、請求項1ないし3のいずれか一項に記載の方法。
- [5] 第一の制限酵素Xがメチル化センシティブな酵素である、請求項1ないし4のいずれか一項に記載の方法。
- [6] 第一の制限酵素Xが、6塩基又は8塩基を認識するメチル化センシティブな酵素である、請求項5に記載の方法。
- [7] 第一の制限酵素Xがメチル化アンセンシティブな酵素であり、且つ、第二の制限酵素Yがメチル化センシティブな酵素である、請求項1ないし4のいずれか一項に記載の方法。
- [8] 第一の制限酵素Xが6塩基を認識するメチル化センシティブな酵素SalIであり、第二の制限酵素Yがメチル化アンセンシティブな酵素MspIである、請求項1ないし7のいずれか一項に記載の方法。
- [9] PCR産物の鎖長に基づく分離及び検出を、PCR産物の電気泳動における移動距離及びピークに基づき行う、請求項1ないし8のいずれか一項に記載の方法。
- [10] 請求項1ないし9のいずれか一項に記載の方法によって、二種類以上の細胞由来のゲノム上の非メチル化領域を検出し、その結果を比較することにより非メチル化領域の差異を解析するから成る、ゲノム上の転写活性領域の変化を解析する方法。

図1

X-AAとY-AAを用いてPCRを行なった場合

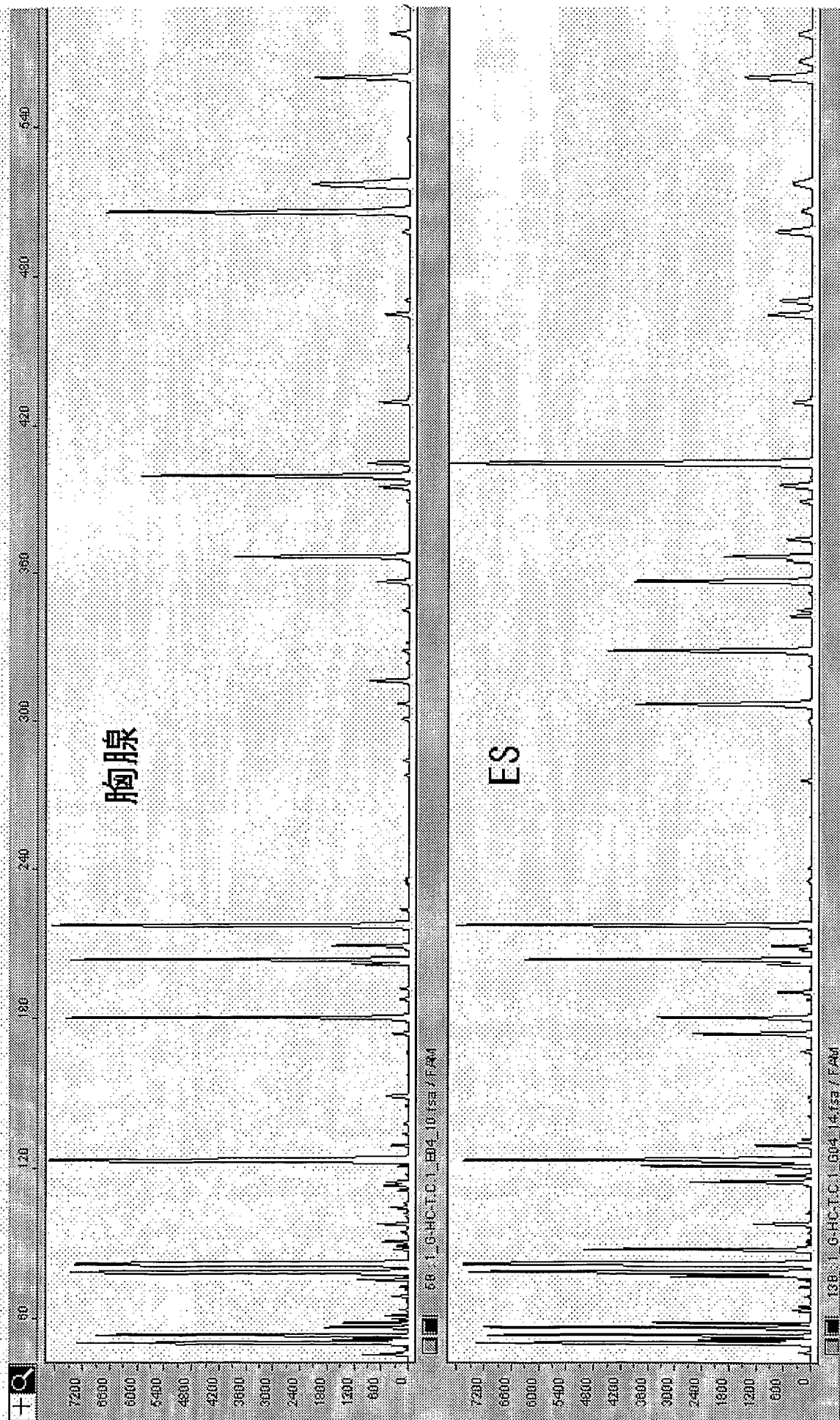


図2

X-CAとY-ACを用いてPCRを行なった場合

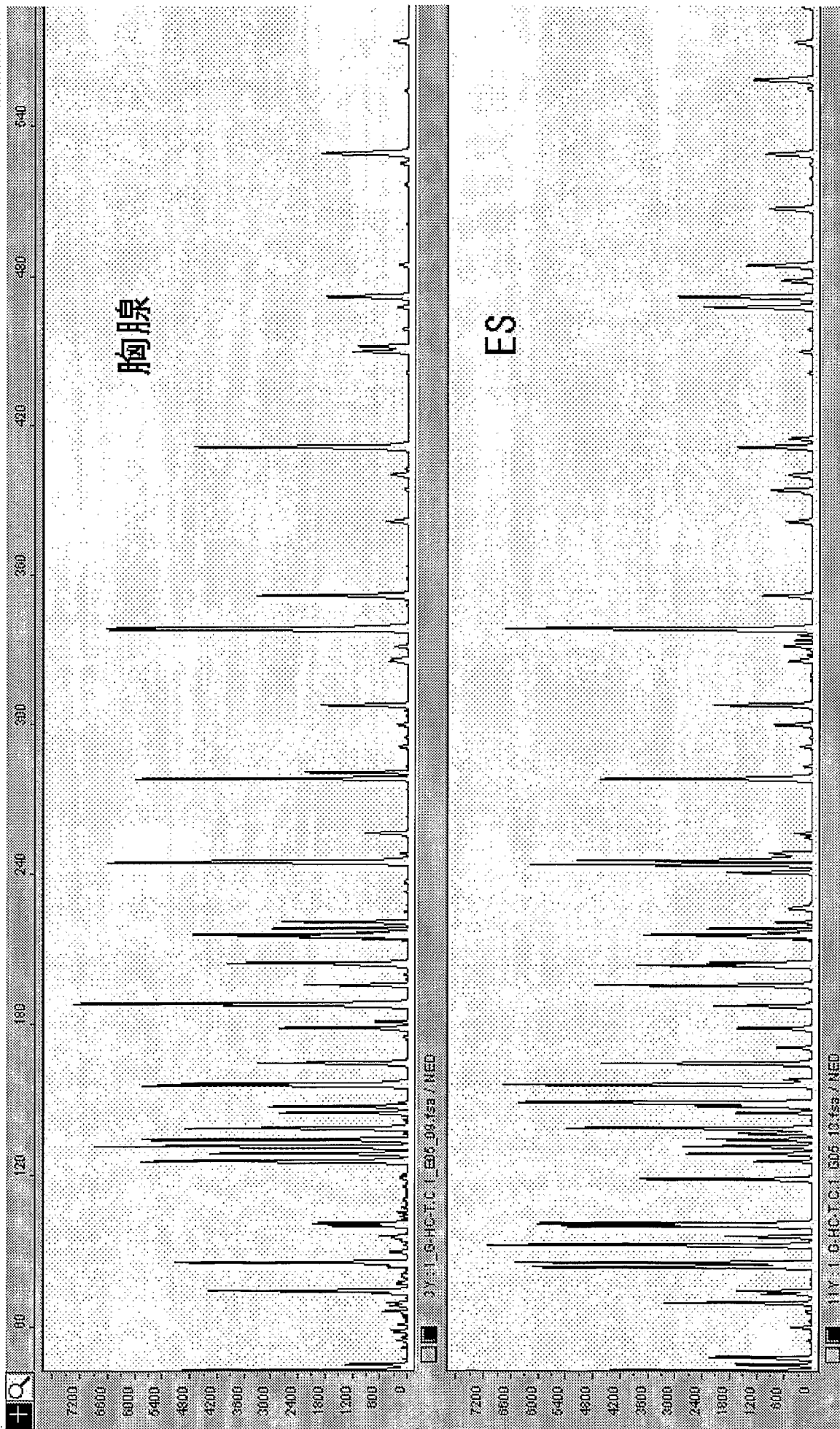
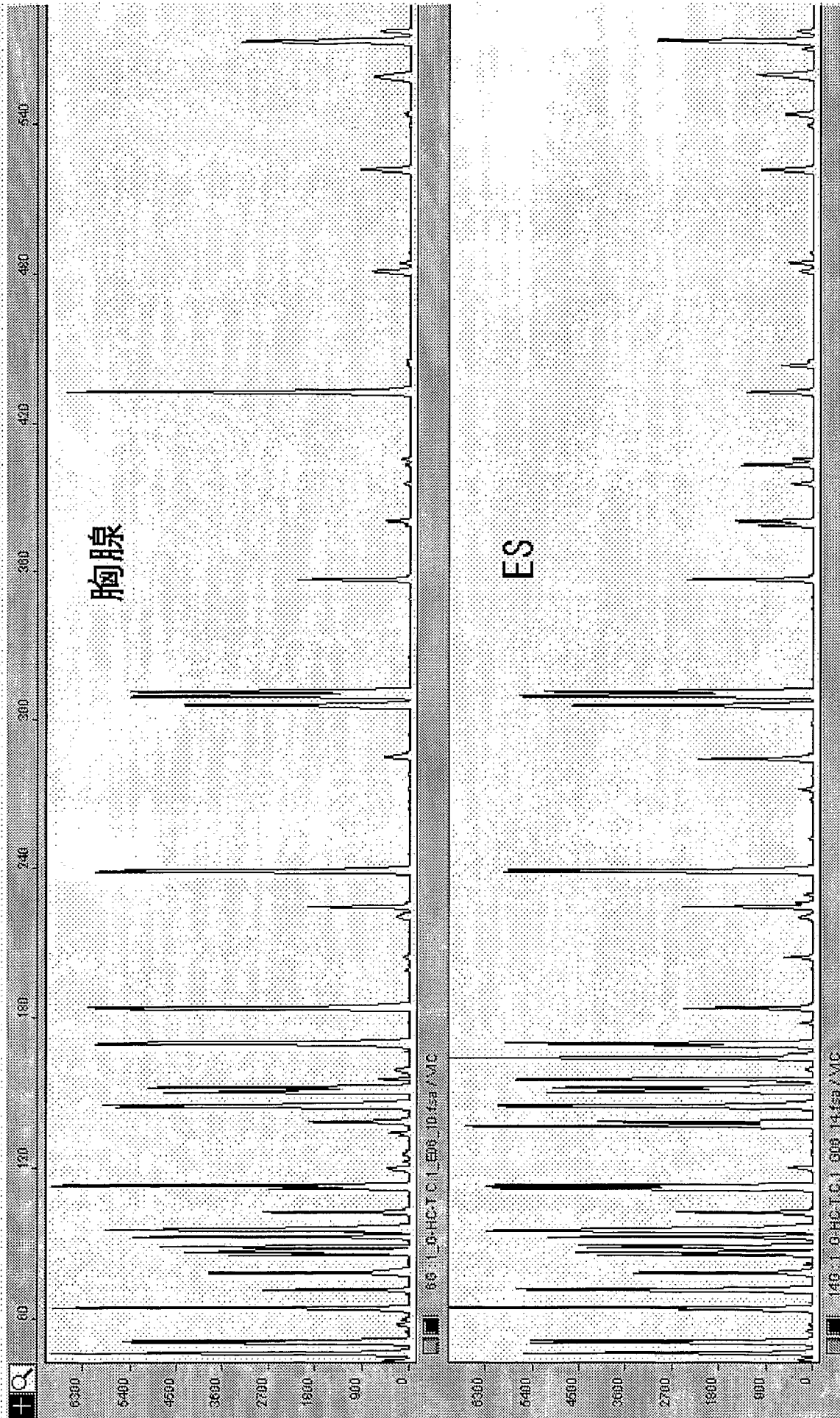


図3

X-GGとY-CCを用いてPCRを行なった場合



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/016344

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12Q1/68, C12N15/09

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)

Int.Cl⁷ C12Q1/68, C12N15/00-15/90

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

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

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	YAMAMOTO F et al., NotI-Msell methylation-sensitive amplified fragment length polymorphism for DNA methylation analysis of human cancers, Electrophoresis, 2001 Jun., 22(10), p.1946-56	1-10
Y	EP 976835 A1 (KEYGENE N.V.), 02 February, 2000 (02.02.00), & US 6300071 B1	1-10
Y	WO 2002/048352 A1 (Aisin Seiki Co., Ltd.), 20 June, 2002 (20.06.02), & EP 1348762 A1 & US 2004/0005625 A1	1-10

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
22 September, 2005 (22.09.05)

Date of mailing of the international search report
11 October, 2005 (11.10.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/016344

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GONZALGO M L et al., Identification and characterization of differentially methylated regions of genomic DNA by methylation-sensitive arbitrarily primed PCR, Cancer Res, 15 February, 1997 (15.02.97), 57(4), p.594-9	1-10
A	TOYOTA M et al., Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification, Cancer Res., 15 May, 1999 (15.05.99), 59(10), p.2307-12	1-10
A	KAWAI J et al., Comparison of DNA methylation patterns among mouse cell lines by restriction landmark genomic scanning, Mol. Cell Biol., 1994 Nov., 14(11), p.7421-7	1-10
A	USHIJIMA T et al., Establishment of methylation-sensitive-representational difference analysis and isolation of hypo- and hypermethylated genomic fragments in mouse liver tumors, Proc Natl.Acad.Sci.USA, 18 March, 1997 (18.03.18), 94(6), p.2284-9	1-10
A	HUANG T H et al., Identification of DNA methylation markers for human breast carcinomas using the methylation-sensitive restriction fingerprinting technique, Cancer Res., 15 March, 1997 (15.03.97), 57(6), p.1030-4	1-10
A	AKAMA T O et al., Restriction landmark genomic scanning (RLGS-M)-based genome-wide scanning of mouse liver tumors for alterations in DNA methylation status, Cancer Res., 01 August, 1997 (01.08.97), 57(15), p.3294-9	1-10
A	MCGREW M J et al., Quantitation of genomic methylation using ligation-mediated PCR, Biotechniques, 1993 , Oct., 15(4), p.722-4, 726, 728, 729	1-10

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl.⁷ C12Q1/68, C12N15/09

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl.⁷ C12Q1/68, C12N15/00-15/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)
 JSTPlus (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	YAMAMOTO F et al., NotI-MselI methylation-sensitive amplified fragment length polymorphism for DNA methylation analysis of human cancers, Electrophoresis, 2001 Jun, 22(10), p. 1946-56	1-10
Y	EP 976835 A1 (KEYGENE N.V.) 2000. 02. 02 &US 6300071 B1	1-10

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

* 引用文献のカテゴリー
 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献
 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
 22. 09. 2005

国際調査報告の発送日 11.10.2005

国際調査機関の名称及びあて先
 日本国特許庁 (ISA/JP)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
 伏見 邦彦
 電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 2002/048352 A1(アイシン精機株式会社) 2002. 06. 20 &EP 1348762 A1 &US 2004/0005625 A1	1-10
A	GONZALGO M L et al., Identification and characterization of differentially methylated regions of genomic DNA by methylation-sensitive arbitrarily primed PCR, Cancer Res, 1997 Feb 15, 57(4), p. 594-9	1-10
A	TOYOTA M et al., Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification, Cancer Res, 1999 May 15, 59(10), p. 2307-12	1-10
A	KAWAI J et al., Comparison of DNA methylation patterns among mouse cell lines by restriction landmark genomic scanning, Mol Cell Biol, 1994 Nov, 14(11), p. 7421-7	1-10
A	USHIJIMA T et al., Establishment of methylation-sensitive-representational difference analysis and isolation of hypo- and hypermethylated genomic fragments in mouse liver tumors, Proc Natl Acad Sci U S A, 1997 Mar 18, 94(6), p. 2284-9	1-10
A	HUANG T H et al., Identification of DNA methylation markers for human breast carcinomas using the methylation-sensitive restriction fingerprinting technique, Cancer Res, 1997 Mar 15, 57(6), p. 1030-4	1-10
A	AKAMA T O et al., Restriction landmark genomic scanning (RLGS-M)-based genome-wide scanning of mouse liver tumors for alterations in DNA methylation status, Cancer Res, 1997 Aug 1, 57(15), p. 3294-9	1-10
A	MCGREW M J et al., Quantitation of genomic methylation using ligation-mediated PCR, Biotechniques, 1993 Oct, 15(4), p. 722-4, 726, 728, 729	1-10