

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第6部門第1区分

【発行日】平成26年10月16日(2014.10.16)

【公開番号】特開2014-163749(P2014-163749A)

【公開日】平成26年9月8日(2014.9.8)

【年通号数】公開・登録公報2014-048

【出願番号】特願2013-33567(P2013-33567)

【国際特許分類】

G 0 1 N 33/50 (2006.01)

G 0 1 N 33/68 (2006.01)

【F I】

G 0 1 N 33/50 Q

G 0 1 N 33/68

【手続補正書】

【提出日】平成26年8月15日(2014.8.15)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0028

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0028】

(1) HaCaT細胞培養および過酸化水素(H₂O₂)処理による酸化ストレスの負荷ならびにsiRNA処理によるDJ-1遺伝子のノックダウン操作

HaCaT細胞をPBS(-)にて洗浄後、トリプシン処理により細胞を剥離し、1200rpmで3min遠心し、細胞を得た。培養は10%FBS含有DMEM培地を用い、5000cells/cm²の密度でフラスコに播種し、2~3日置きにサブコンフルエントの状態で継代した。

HaCaT細胞を10%FBS含有DMEM培地にて12ウェルプレートに2.1×10⁵cells / well播種し2時間培養後、siRNA(終濃度3nM、Hs_PARK7_6 FlexiTube siRNA, SI02662107, Qiagen社製)、トランスクレクション試薬(2μl/well、HiPerFect Transfection Reagent, 30170, Qiagen社製)を前記培養培地と混合し、室温に10分放置した。ついでこの混合液を、100μl/well添加した。未処理の細胞をコントロールとした。

また、ノックダウン操作のネガティブコントロールとして、AllStars Negative Control siRNA(Qiagen社製)を用いて同様に操作した。

48時間培養後に、H₂O₂(Wako製)を0、250、500、750、1000μM添加し、24時間後に培養上清を回収し、細胞をPBS(-)で洗浄後、Cell lysis buffer(50mM Tris-HCl, 1mM Na₃VO₄, 0.4%NP-40, 120mM NaCl)を100μl/well添加し、細胞溶解液を得た。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0048

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0048】

<角層中DJ-1測定>

ガラスピーズとT-PERバッファー(Thermo scientific社)500μlの入ったチューブに角層を採取した角層チェックカードを入れ、25分ボルテックスミキサーにて振とうし、角層タンパクを抽出した。各サンプルのタンパク量はBCA protein Assay Kit(Thermo Scientific社)で測定した。測定には角層サンプルを10μlにreagentA: reagentB=50:1で混和した液200μlを加え、60~30分でインキュベーションしたのち、562nmの吸光度で測定した。同

時にウシ血清アルブミン（BSA）で検量線を作成した。この検量線と吸光度の値からタンパク量を算出した。

角層抽出液中に含まれるDJ-1量はHuman Park7/DJ-1 DuoSet（R&D systems社）を用いて定量した。