

【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 1 部門第 1 区分

【発行日】平成23年1月13日(2011.1.13)

【公表番号】特表2008-520212(P2008-520212A)

【公表日】平成20年6月19日(2008.6.19)

【年通号数】公開・登録公報2008-024

【出願番号】特願2007-541638(P2007-541638)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/68 Z N A A

C 1 2 N 15/00 A

【誤訳訂正書】

【提出日】平成22年11月17日(2010.11.17)

【誤訳訂正 1】

【訂正対象書類名】特許請求の範囲

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

バイオチップをベースにした核酸結合タンパク質を検出するための方法であって、該方法は、以下：

1) 数種のグループの核酸捕捉プローブを含有する溶液を、標的核酸結合タンパク質を含有する生物学的サンプルに加える工程であって、該工程によって、該核酸捕捉プローブと該核酸結合タンパク質との間で複合体が形成され、該核酸捕捉プローブは、少なくとも 1 つの該標的核酸結合タンパク質が結合し得る配列を含み、そして各グループの該核酸捕捉プローブの一本の鎖が、3' 突出末端配列を含む、工程；

2) 該核酸捕捉プローブ - 核酸結合タンパク質複合体を単離して、該複合体中の該核酸捕捉プローブを収集する工程；

3) プライマーを用いた一本鎖増幅によって該収集された核酸捕捉プローブを増幅する工程であって、該プライマーは、該核酸捕捉プローブの 3' 突出末端配列にハイブリダイズする、工程；

4) 工程 3) において増幅した捕捉プローブを、バイオチップの基板上に固定化した一本鎖固定化プローブとハイブリダイズさせる工程であって、該固定化プローブは、該増幅した核酸捕捉プローブに対して相補的な配列を含む、工程；および

5) 該ハイブリダイゼーションの結果を検出する工程を包含する、方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法であって、前記工程 2) における核酸捕捉プローブ - 核酸結合タンパク質複合体を単離する工程が、前記工程 1) からの混合物サンプルをゲル電気泳動し、ゲルスライスを切り出し、そして、ゲル精製キットもしくは電気溶出法によって回収して、単離された核酸捕捉プローブ - 核酸結合タンパク質複合体を得るプロセスである、方法。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の方法であって、前記工程 2) における核酸捕捉プローブ - 核酸結合タンパク質複合体を単離する工程が、前記工程 1) からの混合物サンプルをクロマトグラフィ

ーに供し、単離された核酸捕捉プローブ - 核酸結合タンパク質複合体を得る工程である、方法。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の方法であって、前記工程 2) における核酸捕捉プローブ - 核酸結合タンパク質複合体を単離する工程が、前記工程 1) からの混合物サンプルを、タンパク質を吸着し得る膜を用いて濾過して、単離された核酸捕捉プローブ - 核酸結合タンパク質複合体を得る工程である、方法。

【請求項 5】

請求項 1 に記載の方法であって、前記工程 2) における核酸捕捉プローブ - 核酸結合タンパク質複合体を単離する工程が、各核酸結合タンパク質を特異的に認識する抗体を前記工程 1) からの混合物サンプルに加え、そして、抗体精製法により単離して、単離された核酸捕捉プローブ - 核酸結合タンパク質複合体を得るプロセスである、方法。

【請求項 6】

請求項 1 に記載の方法であって、前記工程 2) における核酸捕捉プローブ - 核酸結合タンパク質複合体を単離する工程が、キャピラリー電気泳動によって前記工程 1) からの混合物サンプルを分離し、そして、該核酸捕捉プローブ - 核酸結合タンパク質複合体を収集するプロセスである、方法。

【請求項 7】

請求項 1 に記載の方法であって、前記核酸結合タンパク質が、二本鎖 DNA (ds DNA) 結合タンパク質、RNA 結合タンパク質、一本鎖 DNA (ss DNA) 結合タンパク質、または、試験管内進化法によって生成された天然に存在しないタンパク質結合核酸アダプターである、方法。

【請求項 8】

前記 ds DNA 結合タンパク質が、転写因子である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記核酸捕捉プローブが、核酸結合タンパク質によって結合され得る核酸配列を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

各固定化プローブが、その対応する核酸捕捉プローブの突出末端配列に対して相補的である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記核酸捕捉プローブの突出末端が、標識分子によって標識されている、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記標識分子が、ビオチン、ジゴキシン、蛍光色素、量子ドット、金粒子、またはナノ粒子である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

請求項 1 に記載の方法であって、前記 3 ' 突出末端を有する核酸捕捉プローブの各グループにおける 3 ' 突出末端配列は同一であり、そして、前記プライマーの配列は、該 3 ' 突出末端配列に対して完全に相補的である、方法。

【請求項 14】

前記プライマーを増幅のために使用する場合、該プライマーは、標識分子で標識される、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記プライマーの 5 ' 末端が標識される、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記標識分子が、ビオチン、ジゴキシン、蛍光色素、量子ドット、金粒子、またはナノ粒子である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記プライマーを増幅のために使用する場合、標識分子で標識されたヌクレオチドが、前

記増幅プロセスに加えられる、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 18】

前記標識分子が、ビオチン、ジゴキシン、蛍光色素、量子ドット、金粒子、またはナノ粒子である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

請求項 1 に記載の方法によって、核酸結合タンパク質を検出するためのキットであって、該キットは、以下：

数種のグループの核酸捕捉プローブであって、該核酸捕捉プローブは、少なくとも 1 つの生物学的サンプル中の標的核酸結合タンパク質が結合し得る配列を含み、そして、各グループの該核酸捕捉プローブの一本の鎖が、3' 突出末端配列を含む、数種のグループの核酸捕捉プローブ；

一本鎖増幅を実施するためのプライマーであって、該プライマーは、該核酸捕捉プローブの 3' 突出末端配列にハイブリダイズする、プライマー；

バイオチップの基板上に固定化された一本鎖固定化プローブを含むバイオチップであって、該固定化プローブは、該核酸捕捉プローブに対して相補的な配列を含む、バイオチップ
を備える、キット。

【請求項 20】

請求項 19 に記載のキットであって、さらに以下：

前記核酸捕捉プローブ - 核酸結合タンパク質複合体を単離するためのゲル電気泳動キット；および

該単離された核酸捕捉プローブ - 核酸結合タンパク質複合体を得るためのゲル精製キットまたは電気溶出キット
を備える、キット。

【請求項 21】

請求項 19 に記載のキットであって、さらに以下：

前記単離された核酸捕捉プローブ - 核酸結合タンパク質複合体を得るためのクロマトグラフィーキット
を備える、キット。

【請求項 22】

請求項 19 に記載のキットであって、さらに以下：

前記単離された核酸捕捉プローブ - 核酸結合タンパク質複合体を得るための、タンパク質を吸着し得る膜
を備える、キット。

【請求項 23】

請求項 19 に記載のキットであって、さらに以下：

前記単離された核酸捕捉プローブ - 核酸結合タンパク質複合体を得るための、各核酸結合タンパク質を特異的に認識する抗体
を備える、キット。

【請求項 24】

請求項 19 に記載のキットであって、さらに以下：

前記核酸捕捉プローブ - 核酸結合タンパク質複合体を収集するための、キャピラリー電気泳動キット
を備える、キット。

【請求項 25】

請求項 19 に記載のキットであって、前記核酸結合タンパク質は、二本鎖 DNA (ds DNA) 結合タンパク質、RNA 結合タンパク質、一本鎖 DNA (ss DNA) 結合タンパク質、または、試験管内進化法によって生成された天然に存在しないタンパク質結合核酸アプタマーである、キット。

【請求項 26】

前記 d s D N A 結合タンパク質が、転写因子である、請求項 2 5 に記載のキット。

【請求項 2 7】

前記核酸捕捉プローブが、核酸結合タンパク質によって結合され得る核酸配列を含む、請求項 1 9 ~ 2 6 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 2 8】

各固定化プローブが、その対応する核酸捕捉プローブの突出末端配列に対して相補的である、請求項 1 9 に記載のキット。

【請求項 2 9】

前記核酸捕捉プローブの突出末端が、標識分子によって標識されている、請求項 2 8 に記載のキット。

【請求項 3 0】

前記標識分子が、ビオチン、ジゴキシン、蛍光色素、量子ドット、金粒子、またはナノ粒子である、請求項 2 9 に記載のキット。

【請求項 3 1】

請求項 3 0 に記載のキットであって、前記 3 ' 突出末端を有する核酸捕捉プローブの各グループにおける 3 ' 突出末端配列は同一であり、そして、前記プライマーの配列は、該 3 ' 突出末端配列に対して完全に相補的である、キット。

【請求項 3 2】

前記プライマーを増幅のために使用する場合、該プライマーは、標識分子で標識される、請求項 3 1 に記載のキット。

【請求項 3 3】

前記プライマーの 5 ' 末端が標識される、請求項 3 2 に記載のキット。

【請求項 3 4】

前記標識分子が、ビオチン、ジゴキシン、蛍光色素、量子ドット、金粒子、またはナノ粒子である、請求項 3 3 に記載のキット。

【請求項 3 5】

標識分子で標識されたヌクレオチドをさらに含む、請求項 3 1 に記載のキット。

【請求項 3 6】

前記標識分子が、ビオチン、ジゴキシン、蛍光色素、量子ドット、金粒子、またはナノ粒子である、請求項 3 5 に記載のキット。

【誤訳訂正 2】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 0 0 3

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 0 0 3】

d s D N A 結合タンパク質は、d s D N A の特定の配列に結合する、タンパク質またはタンパク質分子複合体のグループである。d s D N A 結合タンパク質は、原核生物のリプレッサータンパク質およびオペレータータンパク質、ならびに、真核生物の転写因子 (T F) などを含む。これらの d s D N A 結合タンパク質は、d s D N A の特定の配列 (オペレーター / プロモーター) への結合によって、標的遺伝子の発現を活性化、阻害、減少または増強し得る。原核生物において、リプレッサータンパク質およびオペレータータンパク質の機能は、比較的単純である。これらは、細胞の代謝に関する酵素をコードする遺伝子、および、抗生物質耐性遺伝子を調節して、外部環境に対する細胞の生理学的な活性を調節する。真核生物において、転写因子は、多くの活動に關与する。細胞周期、アポトーシスおよび腫瘍新生などは、全て、特定の転写因子に關連する。生物系、特に、真核生物の遺伝子発現調節ネットワークにおいて、遺伝子をコードするタンパク質の発現としては、転写因子を介した転写の活性化、転写、転写後修飾 (スプライシング、ならびに、R N A の 5 ' および 3 ' のキャッピング)、翻訳、翻訳後修飾 (リン酸化、グリコシル化、ア

セチル化など)が挙げられ、そして、転写前、転写後、および翻訳後の段階で調節される。

【誤訳訂正 3】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0011

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0011】

いくつかの実施形態において、工程2)における核酸捕捉プローブ-核酸結合タンパク質複合体を単離する工程は、以下に記載される5つのプロセスのいずれかを用いて行われ得る：a)工程1)からの混合物サンプルをゲル電気泳動し、ゲルスライスを切り出し、そして、ゲル精製キットもしくは電気溶出法によって回収して、単離された核酸捕捉プローブ-核酸結合タンパク質複合体を得る；b)工程1)からの混合物サンプルをクロマトグラフィーに供し、単離された核酸捕捉プローブ-核酸結合タンパク質複合体を得る；c)工程1)からの混合物サンプルを、タンパク質を吸着し得る膜を用いて濾過して、単離された核酸捕捉プローブ-核酸結合タンパク質複合体を得る；d)各核酸結合タンパク質を特異的に認識する抗体を工程1)からの混合物サンプルに加え、そして、抗体精製法(例えば、抗体に結合させるために、プロテインA/Gコーティングアガロースビーズを用いる)により単離して、単離された核酸捕捉プローブ-核酸結合タンパク質複合体を得る；ならびに、e)キャピラリー電気泳動装置によって工程1)からの混合物サンプルを分離し、そして、核酸捕捉プローブ-核酸結合タンパク質複合体を自動的に収集する。

【誤訳訂正 4】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0016

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0016】

ハイブリダイゼーションシグナルを検出するために、核酸捕捉プローブの突出末端は、標識分子で標識される。好ましい標識分子は、ビオチン、ジゴキシン、蛍光色素、量子ドット、金粒子またはナノ粒子である。より高い感度に達するために、以下のような改善がなされている(「ハイブリダイゼーション前の一本鎖増幅法」)：上記核酸捕捉プローブの各々の一本の鎖は、3'突出末端を有し；工程3)のハイブリダイゼーション反応の前に、収集された核酸捕捉プローブが、1つのプライマーを用いて増幅され、このプライマーの配列は、後の核酸増幅手順のための3'突出末端配列とハイブリダイズし得る。

【誤訳訂正 5】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0019

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0019】

より高い感度に達するために、以下のような改善がなされている(「ハイブリダイゼーション前の二本鎖増幅法」)：上記核酸捕捉プローブの各々の一本の鎖は、3'突出末端および5'突出末端の両方を有し；工程3)のハイブリダイゼーション反応の前に、収集された核酸捕捉プローブが、2つのプライマーを用いて増幅され、このプライマーのうちの一方のプライマーは、3'突出末端および5'突出末端の両方を有する核酸捕捉プローブの鎖の3'突出末端とハイブリダイズし得、そして、もう一方のプライマー配列は、3'突出末端および5'突出末端の両方を有する核酸捕捉プローブの鎖の5'突出末端と同

じである。

【誤訳訂正 6】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0028

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0028】

C. 核酸 - タンパク質結合系の調製：3つの転写因子 (1.0 μ g AP1、300 ng NF Bおよび1.0 μ g Sp1) およびタンパク質捕捉プローブ (LPおよびFPのアニールさせた生成物) を混合した。一般的な結合緩衝液を、1倍の最終濃度に達するように加えた。この反応混合物を、室温で30分間インキュベートした。図3C、3Dおよび3Eに示される実験において、反応に、競合プローブを加えた。

【誤訳訂正 7】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0035

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0035】

(実験手順)

A. DNAプローブの調製：全てのプローブは、Bioasia Inc. (Shanghai, China) により合成され、その配列は表2に列挙する。プローブの各グループにおいて、LFPおよびLP'は対応する転写因子のための捕捉プローブを形成し；そして、IPプローブは、固定化プローブであった。各グループにおける固定化プローブの調製は、実施例1の「DNAプローブの調製」と同様である。タンパク質捕捉プローブを水中に溶解させ、そして、対応するプローブ (各グループにおいてLFPプローブおよびLP'プローブ) とアニールさせて、二本鎖DNAを形成させた。各プローブグループの最終濃度は60 nMであった。

【誤訳訂正 8】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0037

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0037】

C. 核酸 - タンパク質結合系の調製：3つの転写因子 (1.0 μ g AP1、100 ng NF Bおよび0.1 μ g Sp1) およびタンパク質捕捉プローブを混合した。一般的な結合緩衝液を、1倍の最終濃度に達するように加えた。この結合反応を、室温で30分間行った。

【誤訳訂正 9】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0045

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0045】

【図1】図1は、本発明において使用される「末端標識法」を用いた場合の、複数の核酸結合タンパク質の検出の概略を示す。

【図2】図2は、本発明において使用される「末端標識法」を用いた場合の、複数の核酸

結合タンパク質の検出のためのプローブ構造の概略を示す。

【図 3 A】図 3 A は、実施例 1 において使用されるアレイ形式を示す。

【図 3 B】図 3 B は、実施例 1 における、3 つの核酸結合タンパク質の同時検出の実験結果を示す。

【図 3 C】図 3 C は、競合因子である A P 1 結合プローブが加えられた場合の、実施例 1 における、3 つの核酸結合タンパク質の同時検出の実験結果を示す。

【図 3 D】図 3 D は、競合因子である N F B 結合プローブが加えられた場合の、実施例 1 における、3 つの核酸結合タンパク質の同時検出の実験結果を示す。

【図 3 E】図 3 E は、競合因子である S p 1 結合プローブが加えられた場合の、実施例 1 における、3 つの核酸結合タンパク質の同時検出の実験結果を示す。

【図 4】図 4 は、本発明において使用される「一本鎖増幅法」を用いた場合の、複数の核酸結合タンパク質の検出の作業概略を示す。

【図 5】図 5 は、本発明において使用される「一本鎖増幅法」を用いた場合の、複数の核酸結合タンパク質を検出するためのプローブおよびプライマーの設計の概略を示す。

【図 6 A】図 6 A は、実施例 2 における「一本鎖増幅法」を用いた場合の、3 つの核酸結合タンパク質 (A P 1、N F B および S p 1) の同時検出の実験結果を示す。

【図 6 B】図 6 B は、実施例 1 に記載される「末端標識法」を用いた場合の、実施例 2 における実験結果を示す。

【図 7】図 7 は、本発明において使用される「二本鎖増幅法」を用いた場合の、複数の核酸結合タンパク質の検出の作業概略を示す。

【図 8】図 8 は、本発明において使用される「二本鎖増幅法」を用いた場合の、複数の核酸結合タンパク質を検出するためのプローブおよびプライマーの設計の概略を示す。