

【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18年2月9日(2006.2.9)

【公表番号】特表2005-512601(P2005-512601A)

【公表日】平成17年5月12日(2005.5.12)

【年通号数】公開・登録公報2005-018

【出願番号】特願2003-556548(P2003-556548)

【国際特許分類】

C 12 Q	1/44	(2006.01)
C 12 Q	1/26	(2006.01)
C 12 Q	1/28	(2006.01)
C 12 Q	1/42	(2006.01)
G 01 N	21/78	(2006.01)

【F I】

C 12 Q	1/44
C 12 Q	1/26
C 12 Q	1/28
C 12 Q	1/42
G 01 N	21/78

C

【手続補正書】

【提出日】平成17年12月16日(2005.12.16)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の工程を含む患者の便におけるアルカリ性スフィンゴミエリナーゼの検出方法：

- 1) 患者の便試料を収集し、それを乾燥する工程；
- 2) 乾燥させた試料から3-4グラムを計量し、それを20mlのホモゲニゼーション・バッファー(0.25Mスクロース、0.15M KCl、50mM KH₂PO₄含有、pH 7.4)に懸濁する工程；
- 3) 試料を4000rpm、+4で60分間遠心分離する工程；
- 4) 上清を回収し、4000rpm、+4で15分間再び遠心分離する工程；
- 5) 標準としてウシ血清アルブミンを用いてピアス・プロテイン・アッセイにより上清中のタンパク質含量を測定し、各試料についてタンパク質濃度範囲32mg/mlから40mg/mlを用い、そしてピベットにより25μlの各試料をウェルに移す工程；
- 6) 25μlの各試料に、65μlのアッセイ・バッファー(50mM Tris/HCl、2mM EDTA、0.15M NaCl含有、pH 9.0)および10μlの29μMスフィンゴミエリンを添加し、そしてアッセイ・バッファーに3mMの濃度で胆汁酸塩(TC、TDC、GC、GCDc)を添加する工程；
- 7) 37で1時間インキュベートする工程；
- 8) ピベットにより100μlの各標準凍結乾燥細菌スフィンゴミエリナーゼおよび10μlのスフィンゴミエリン(29μM)を取り、試料と同様に37で1時間インキュベートする工程；
- 9) 1時間後、100μlの反応バッファー(50mM Tris/HCl、pH 7.4、10mM -グリセロリン酸、750μM ATP、5mM EDTA、5mM E

G T A、 $100\text{ }\mu\text{M}$ アンプレックスレッド、 8 U/m1 アルカリホスファターゼ、 0.2 U/m1 コリンオキシダーゼ、 2 U/m1 西洋わさびペルオキシダーゼ含有)を添加する工程;

- 10) 反応物を1時間以上、37で光から保護してインキュベートする工程;
- 11) 蛍光マイクロプレート・リーダーにおいて励起範囲 $530 - 560\text{ nm}$ および発光検出 590 nm にて蛍光を測定する工程;
- 12) 各点について、バックグラウンドの蛍光をスフィンゴミエリナーゼ非含有コントロールから得た値を差し引くことにより補正する工程。

【請求項2】

体液に対して行う、請求項1の方法。

【請求項3】

以下の試薬の試料を別々に含有する試験管を含む、患者の便または体液におけるアルカリ性スフィンゴミエリナーゼを検出するためのキット:

- a) 便または体液中に存在する、アルカリ性スフィンゴミエリナーゼによってコリンリン酸へと加水分解されるべきスフィンゴミエリン;
- b) コリンリン酸からコリンへの加水分解を触媒するアルカリホスファターゼ;
- c) コリンを過酸化水素へと酸化するコリンオキシダーゼ;
- d) 過酸化水素とe)との反応を補助するための西洋わさびペルオキシダーゼ
- e) その蛍光が便または体液に存在するアルカリ性S M a s e のマーカーとなる蛍光化合物レゾルフィンをもたらす、アンプラー・レッド試薬((10-アセチル-3.7-ジヒドロキシフェノキサジン)); および、
- f) 濃度標準として用いる凍結乾燥した細菌スフィンゴミエリナーゼ。

【請求項4】

以下の工程を含む患者からの生物学的材料におけるアルカリ性スフィンゴミエリナーゼの検出方法:

- 1) 生物学的材料の試料を収集する工程;
- 2) 試料をホモゲニゼーション・バッファー($0.24 - 0.26\text{ M}$ スクロース、 $0.14 - 0.16\text{ M}$ KCl、 $45 - 55\text{ mM}$ KH_2PO_4 含有、pH7.4に調整)に懸濁する工程;
- 3) 試料を少なくとも1回遠心分離して上清を回収する工程;
- 4) 上清中のタンパク質含量を測定する工程;
- 5) 上清の試料に、アッセイ・バッファー($44 - 55\text{ mM}$ Tris/HCl、 $1.9 - 2.2\text{ mM}$ EDTA、 $0.14 - 0.16\text{ M}$ NaCl含有、pH8.9-9.1)および $28 - 30\text{ }\mu\text{M}$ スフィンゴミエリンおよびアッセイ・バッファー($2.9 - 3.1\text{ mM}$ の濃度の胆汁酸塩(TC、TDC、GC、GCDc)含有)を添加する工程;
- 6) アッセイ混合物を37で1時間インキュベートする工程;
- 7) 工程6)からの試料と、 $28 - 31\text{ }\mu\text{M}$ のスフィンゴミエリンを混合し、37で1時間インキュベートする工程;
- 8) 反応バッファー($45 - 55\text{ mM}$ Tris/HCl、pH7.3-7.5、9-11mM-グリセロリン酸、 $745 - 755\text{ }\mu\text{M}$ ATP、 $4 - 6\text{ mM}$ EDTA、 $4 - 6\text{ mM}$ EGTA、 $95 - 105\text{ }\mu\text{M}$ アンプレックスレッド試薬、 $7 - 9\text{ U/m1}$ アルカリホスファターゼ、 $0.1 - 0.3\text{ U/m1}$ コリンオキシダーゼおよび $1.5 - 2.5\text{ U/m1}$ 西洋わさびペルオキシダーゼ含有)を添加する工程;
- 9) 反応混合物を少なくとも1時間、37で光から保護してインキュベートする工程;
- 10) 励起範囲 $530 - 560\text{ nm}$ および発光検出 590 nm にて蛍光を測定する工程。

【請求項5】

各試料について、蛍光の読みをスフィンゴミエリナーゼ非含有コントロールから得た値を差し引くことによりバックグラウンドの蛍光について補正する、請求項4の方法。

【請求項6】

ピアス・プロテイン・アッセイによりタンパク質含量を測定する請求項4または5の方

法。

【請求項 7】

以下を含む患者から得た生物学的試料におけるアルカリ性スフィンゴミエリナーゼを検出するためのキット：

- a) スフィンゴミエリン
- b) アルカリホスファターゼ，
- c) コリンオキシダーゼ，
- d) 西洋わさびペルオキシダーゼ，
- e) アンプラー・レッド試薬
- f) 凍結乾燥した細菌スフィンゴミエリナーゼ。