

【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 18 年 2 月 9 日 (2006.2.9)

【公表番号】特表 2005-513507 (P2005-513507A)

【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 2003-556815 (P2003-556815)

【国際特許分類】

**G 0 1 N 33/68 (2006.01)**

**C 1 2 Q 1/37 (2006.01)**

**G 0 1 N 27/62 (2006.01)**

**G 0 1 N 30/88 (2006.01)**

**G 0 1 N 33/483 (2006.01)**

**G 0 1 N 33/58 (2006.01)**

【F I】

G 0 1 N 33/68

C 1 2 Q 1/37

G 0 1 N 27/62 C

G 0 1 N 27/62 V

G 0 1 N 30/88 J

G 0 1 N 33/483 Z

G 0 1 N 33/58 Z

【手続補正書】

【提出日】平成 17 年 12 月 13 日 (2005.12.13)

【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】

以下の工程を含む少なくとも 1 つのタンパク質またはポリペプチドを標識し、標識タンパク質 / ポリペプチドの量を測定する方法：

( a ) 少なくとも 1 セットの細胞から少なくとも 1 つのタンパク質またはポリペプチドを抽出する工程；

( b ) 抽出したタンパク質 / ポリペプチドを消化し、ペプチドまたはタンパク質断片の混合物を得る工程；

( c ) 得られたペプチド混合物を、同位体標識した M S / M S 脆弱性試薬分子で誘導体化する工程（ここで該試薬はタンパク質断片の特定の部位に結合する）；

( d ) ペプチド混合物を多次元クロマトグラフィーによって分離する工程；

( e ) 質量分析（M S）によってペプチド混合物を分析する工程（ここで各ペプチドに特異的なサイン・イオンが生成し、標識化ペプチドの量が親イオンスキニング・モードまたはニュートラル・ロス・スキニング・モードで検出される）。

【請求項 2】

抽出がドデシル硫酸ナトリウムを含むバッファーを用いて行われる請求項 1 の方法。

【請求項 3】

抽出が 1 % ドデシル硫酸ナトリウムを含むバッファーを用いて行われる請求項 1 の方法

## 【請求項 4】

抽出したタンパク質 / ポリペプチドを消化の前にスクシニル化する請求項 1 から 3 のいずれかの方法。

## 【請求項 5】

抽出したタンパク質 / ポリペプチドが膜タンパク質および / または膜結合性タンパク質を含む請求項 1 から 4 のいずれかの方法。

## 【請求項 6】

工程 ( e ) において、標識化されたタンパク質 / ポリペプチドの発現レベルが測定される請求項 1 から 5 のいずれかの方法。

## 【請求項 7】

消化がまず臭化シアンを用いて行われ、次いで p H 4 から 5 にて V 8 プロテアーゼを用いて行われるかあるいは、p H 7 から 9 にて L y s C プロテアーゼを用いて行われる請求項 1 から 6 のいずれかの方法。

## 【請求項 8】

試薬分子が少なくとも結合部分、架橋部分および標識部分を含み、該架橋部分がチオエーテル架橋である請求項 1 から 7 のいずれかの方法。

## 【請求項 9】

試薬分子の結合部分がアミン誘導体である請求項 8 の方法。

## 【請求項 10】

アミン誘導体試薬が塩基性部分を有するペプチドの N - 末端を共有結合により修飾する能力を有する請求項 9 の方法。

## 【請求項 11】

標識が質量に基づいて識別され、同位体標識が C 1 2 / C 1 4、H / D および C 1 3 5 / C 1 3 7 からなる群から選択される少なくとも 1 つの原子である請求項 8 から 10 のいずれかの方法。

## 【請求項 12】

試薬が N - スクシニミジル - 2 - ( 4 - ピリジルメチルチオ ) - アセテート、および / または N - スクシニミジル - 2 - [ 4 - ( 2 , 3 , 5 , 6 - テトラジュウテリオ - ピリジル ) ] - メチルチオアセテートである請求項 8 から 11 のいずれかの方法。

## 【請求項 13】

工程 ( c ) の後に混合物がヒドロキシルアミンで処理される請求項 1 から 12 のいずれかの方法。

## 【請求項 14】

工程 ( d ) が二次元クロマトグラフィーを含み、第一次元がアニオン交換クロマトグラフィーを用い、第二次元が逆相クロマトグラフィー ( R P C ) を用いる請求項 1 から 13 のいずれかの方法。

## 【請求項 15】

第一次元の流速が 1 から 1 0 0  $\mu$  l / 分であり第二次元の流速が 1 から 2 0 0 n l / 分である請求項 14 の方法。

## 【請求項 16】

検出される標識がシステイン含有ペプチド上に存在する請求項 1 から 15 のいずれかの方法。

## 【請求項 17】

質量分析が 1 0 6 および / または 1 1 0 m / z にて行われる請求項 1 から 16 のいずれかの方法。

## 【請求項 18】

工程 ( e ) においてサンプルが 2 つの画分に分割され、一方が M S 用であり、一方がフラクションコレクター用である請求項 1 から 17 のいずれかの方法。

## 【請求項 19】

2 セットの細胞からタンパク質 / ポリペプチドが抽出され、各セットの細胞が異なる試

薬によって標識化されることにより、2セットの細胞のタンパク質発現の比較が可能となる請求項1から18のいずれかの方法。

【請求項20】

異なる試薬が質量に基づいて識別される請求項19の方法。

【請求項21】

第一のセットが軽い同位体標識によって標識化され、第二のセットが重い同位体標識によって標識化されるか、あるいはその逆である、請求項20の方法。

【請求項22】

第一のセットの細胞がN-スクシニミジル-2-(4-ピリジルメチルチオ)-アセテートで標識化され、第二のセットの細胞がN-スクシニミジル-2-[4-(2,3,5,6-テトラジュウテリオ-ピリジル)]-メチルチオアセテートで標識化される請求項21の方法。

【請求項23】

2セットの細胞が工程(d)の前に混合される請求項20から22のいずれかの方法。

【請求項24】

以下の工程によってタンパク質断片混合物が分析される請求項20から23のいずれかの方法：

(i) 106 m/zでのスキニングによって、第一のセットの細胞のスペクトルを得る工程、

(ii) 110 m/zでのスキニングによって、第二のセットの細胞のスペクトルを得る工程、

(iii) 110 m/zスキンの強度値を反転し、これを106 m/zスキンに加え、示差スペクトルを得る工程。

【請求項25】

以下の工程によってタンパク質断片混合物が分析される請求項20から23のいずれかの方法：

(i) 105 m/zでのニュートラル・ロス・スキニングにより第一のセットの細胞のスペクトルを得る工程、

(ii) 109 m/zでのニュートラル・ロス・スキニングにより第二のセットの細胞のスペクトルを得る工程、

(iii) 109 m/zのロス・スキンの強度値を反転し、これを105 m/zスキンに加え、示差スペクトルを得る工程。

【請求項26】

MS/MS-分析を、示差スペクトルから選択されるタンパク質/ポリペプチドからのペプチドを行う請求項24または25の方法。

【請求項27】

アミノ酸配列を少なくとも1つの標識化ペプチドについて同定する請求項26の方法。

【請求項28】

イオン捕捉質量分析計を用いる請求項26または27の方法。

【請求項29】

少なくとも結合部分、架橋部分および標識部分を含み、架橋部分がチオエーテル架橋である試薬分子の分析の使用であって、請求項1から28のいずれかのタンパク質断片の混合物を標識するための該使用。

【請求項30】

別々の区画において、N-スクシニミジル-2-(4-ピリジルメチルチオ)-アセテートおよびN-スクシニミジル-2-[4-(2,3,5,6-テトラジュウテリオ-ピリジル)]-メチルチオアセテートを含む請求項1から28のいずれかの方法において使用するためのキット。