

【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19年2月15日(2007.2.15)

【公表番号】特表2003-509051(P2003-509051A)

【公表日】平成15年3月11日(2003.3.11)

【出願番号】特願2001-523773(P2001-523773)

【国際特許分類】

C 12 N	15/09	(2006.01)
C 12 N	1/15	(2006.01)
C 12 N	1/19	(2006.01)
C 12 N	1/21	(2006.01)
C 12 N	9/02	(2006.01)
C 12 N	9/10	(2006.01)
C 12 N	9/12	(2006.01)
C 12 N	9/24	(2006.01)
C 12 N	9/38	(2006.01)
C 12 Q	1/02	(2006.01)
C 12 Q	1/66	(2006.01)
G 01 N	21/78	(2006.01)
C 12 N	5/10	(2006.01)

【F I】

C 12 N	15/00	Z N A A
C 12 N	1/15	
C 12 N	1/19	
C 12 N	1/21	
C 12 N	9/02	
C 12 N	9/10	
C 12 N	9/12	
C 12 N	9/24	
C 12 N	9/38	
C 12 Q	1/02	
C 12 Q	1/66	
G 01 N	21/78	C
C 12 N	5/00	A

【手続補正書】

【提出日】平成18年12月21日(2006.12.21)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 参照甲虫ルシフェラーゼのインヒビターに比べて増強された耐性について選択された変異ルシフェラーゼ、ここで当該参照甲虫ルシフェラーゼは任意には天然の甲虫ルシフェラーゼである。

【請求項2】 前記インヒビターの存在下で、前記参照ルシフェラーゼに比べて少なくとも50%多くの活性を維持する、請求項1に記載の変異ルシフェラーゼ。

【請求項3】 前記参照ルシフェラーゼに比べて複数のアミノ酸置換を含んでなり、

当該アミノ酸置換が任意にはコンセンサスアミノ酸についてである、請求項1に記載の変異ルシフェラーゼ。

【請求項4】 前記参照甲虫ルシフェラーゼがLucPp1又はLucPpe2である、請求項1に記載の変異ルシフェラーゼ。

【請求項5】 配列番号：14、配列番号：19、配列番号：24、配列番号：26、配列番号：44、配列番号：45若しくは配列番号：47のアミノ酸配列又はそれらの酵素活性を有する部分を含んで成るルシフェラーゼ。

【請求項6】 請求項1～4のいずれか1項に記載の変異体ルシフェラーゼ又は請求項5に記載のルシフェラーゼをコードする核酸セグメントを含んでなる核酸分子。

【請求項7】 前記核酸セグメントが、配列番号：1、配列番号：6、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：42、配列番号：43又は配列番号：46の塩基配列を含んでなる、請求項6に記載の核酸分子。

【請求項8】 請求項6又は7に記載の核酸分子を含むベクター又は宿主細胞。

【請求項9】 請求項1～4のいずれか1項に記載の変異体ルシフェラーゼ又は請求項5に記載のルシフェラーゼを有する固体基体。

【請求項10】 請求項1～4のいずれか1項に記載の変異体ルシフェラーゼ又は請求項5に記載のルシフェラーゼを含んでなる融合タンパク質をコードする核酸セグメントを含む核酸分子。

【請求項11】 請求項1～4のいずれか1項に記載の変異体ルシフェラーゼ又は請求項5に記載のルシフェラーゼに試薬を連結して標識された試薬を生じさせることを含んでなるルシフェラーゼの使用方法。

【請求項12】 請求項1～4のいずれか1項に記載の変異体ルシフェラーゼ又は請求項5に記載のルシフェラーゼの使用であって、ATPを検出するため、遺伝的レポーターとして分子を標識するため、固体表面に固定化するため、ハイブリッドタンパク質を製造するため、高温反応のため、又は発光性溶液を形成するための使用。

【請求項13】 ルシフェラーゼをコードするベクターの使用方法であって、

a) 請求項8に記載のベクターを宿主細胞に導入し；そして

b) 当該宿主細胞中のルシフェラーゼの存在を検出又は決定する；  
ことを含む方法。

【請求項14】 請求項1～4のいずれか1項に記載の変異体ルシフェラーゼ又は請求項5に記載のルシフェラーゼを含む容器を含むキット。

【請求項15】 前記容器が、ルシフェラーゼを含んで成る水性混合物を含むか、又は凍結乾燥したルシフェラーゼを含む、請求項14に記載のキット。

【請求項16】 ルシフェラーゼを含む容器を更に含む、請求項15に記載のキット。

【請求項17】 インヒビターに対して耐性の酵素の製造方法において、

a) 又クレオチド変異を生じさせる条件に付された、酵素をコードする第一の単離されたポリヌクレオチド配列から得られる複数のポリヌクレオチドの第一集団から、インヒビターに対して耐性である酵素を子オドする1又は複数の単離されたポリヌクレオチドを選択し、ここで前記1又は複数の選択され、単離されたポリヌクレオチド配列によりコードされた酵素は、前記第一の単離されたポリヌクレオチド配列によりコードされた酵素に比べてインヒビターに対する増加した耐性を有し；

b) 前記選択され、単離されたポリヌクレオチド配列を変異させて、ポリヌクレオチド配列の第二の集団を得、ここで当該変異は、任意には、コンセンサスアミノ酸をコードする少なくとも1個のコドンを有するオリゴヌクレオチドを用いて行い；そして

c) 前記工程a)及び工程b)を反復して、インヒビターに対して耐性であり且つ前記第一のポリヌクレオチド配列によりコードされる酵素に比べて複数のアミノ酸置換を含む酵素をコードする更なるポリヌクレオチド配列を得る；  
ことを含んでなる方法。

【請求項18】 前記更なるポリヌクレオチド配列を単離することを更に含んでなる、請求項17に記載の方法。

【請求項 19】 前記工程 b )において、前記工程 a )の選択され、単離されたポリヌクレオチド配列の混合物を変異処理する、請求項17又は18に記載の方法。

【請求項 20】 前記更なるポリヌクレオチド配列が、前記第一のポリヌクレオチド配列に比べて、増加した熱安定性を有する酵素をコードする、請求項17~19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 21】 前記酵素が、DNAポリメラーゼ若しくはRNAポリメラーゼ又はルシフェラーゼである、請求項17~20のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 22】 前記酵素が、当該酵素の基質類似体による阻害に対して耐性である、請求項17~21のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 23】 前記第一のポリヌクレオチド配列を、組換え変異誘発又は点変異誘発に付する、請求項17~22のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 24】 前記ルシフェラーゼが、増加した発光強度、増加したシグナル安定性、又は低下したK<sub>m</sub>を有する、請求項21に記載の方法。

【請求項 25】 請求項17~24のいずれか1項に記載の方法により得られるポリヌクレオチド。