

【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17年4月7日(2005.4.7)

【公表番号】特表2000-516091(P2000-516091A)

【公表日】平成12年12月5日(2000.12.5)

【出願番号】特願平10-509139

【国際特許分類第7版】

C 1 2 P 19/34

C 1 2 N 1/06

// C 0 7 H 21/02

C 0 7 H 21/04

【F I】

C 1 2 P 19/34

C 1 2 N 1/06

C 0 7 H 21/02

C 0 7 H 21/04

A

【手続補正書】

【提出日】平成16年7月21日(2004.7.21)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】補正の内容のとおり

【補正方法】変更

【補正の内容】

手 続 補 正 書

16.7.21



平成 年 月 日

特許庁長官 小川 洋 殿

1. 事件の表示 平成10年特許願第509139号

2. 補正をする者

事件との関係 出願人

名称 プロメガ コーポレイション

3. 代理人

住所 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号
電話(代) 3211-8741

方審

式査

氏名 (5995) 弁理士 中村 稔



4. 補正命令の日付 自 発

5. 補正対象書類名 明細書

6. 補正対象項目名 請求の範囲

7. 補正の内容 別紙記載の通り



請求の範囲

1. 核酸物質及びタンパク質を含む核酸溶液をアルカリプロテアーゼで処理する方法であつて、
 - (a)該核酸溶液のpHを少なくともpH約9に調整して、アルカリ核酸溶液を形成する工程；
 - (b)該アルカリ核酸溶液を該アルカリプロテアーゼの存在下に該タンパク質が実質的に不活性化されるまでインキュベートする工程；及び
 - (c)プロテアーゼ活性を十分低下させるだけ該溶液のpHを下げる工程を含むことを特徴とする方法。
2. 該核酸溶液が少なくともpH約9に調整される、請求項1記載の方法。
3. 該方法のインキュベート工程(b)において実質的に不活性化される該タンパク質が該核酸物質を分解することができる、請求項1記載の方法。
4. 工程(c)において該液のpHを下げることにより沈殿の形成が引き起こされ、該沈殿が遠心分離により除去される、請求項1記載の方法。
5. 該核酸物質がDNAであり、該方法の工程(b)において不活性化されるタンパク質がDNAを分解することができるヌクレアーゼを含む、請求項1記載の方法。
6. 該方法の工程(a)において形成された該アルカリ核酸溶液がアルカリライゼート液であり、アルカリプロテアーゼがインキュベーション前に該液に添加される、請求項1記載の方法。
7. 該核酸物質及び該タンパク質を含む生物試料を溶液に懸濁する段階；及び塩基及びアニオン清浄剤を含むアルカリ溶解液を加えることにより該懸濁試料液のpHを少なくともpH約9に調整する段階による該アルカリライゼート液を形成する工程を更に含む、請求項6記載の方法。
8. タンパク質及び核酸物質を含む生物試料から核酸物質を単離する方法であつて、
 - (a)該生物試料を溶液に懸濁する工程；
 - (b)該溶液のpHをアルカリ溶解液を加えることにより少なくともpH約9に調整して、アルカリライゼート液を形成する工程；

(c)該アルカリライゼート液をアルカリプロテアーゼの存在下に該核酸物質を分解することができるタンパク質が実質的不活性化されるまでインキュベートする工程；
(d)プロテアーゼ活性を十分低下させるだけ該アルカリライゼート液のpHを下げる工程
を含むことを特徴とする方法。

9. 該生物試料を懸濁するために用いられる該溶液が水、緩衝剤及びキレート化剤を含む、請求項8記載の方法。
10. 単離した核酸がDNA物質であり、該試料をリボヌクレアーゼ酵素の存在下に該試料中のすべてのRNAが実質的に分解されるまでインキュベートする工程を更に含む、請求項8記載の方法。
11. 単離した核酸がDNA物質であり、工程(b)において該懸濁液に添加したアルカリ溶解液が水酸化ナトリウム及びアニオン清浄剤を含む、請求項8記載の方法。
12. 工程(d)においてpH3.5～4.5の酢酸塩緩衝液を含む酸性液を加えることにより該アルカリライゼート液のpHを下げる、請求項8記載の方法。
13. 工程(d)においてアルカリライゼート液のpHを下げることにより濁ったライゼート液の形成が引き起こされ、該濁ったライゼートを透明にして透明ライゼート液を形成する工程を更に含む、請求項8記載の方法。
14. 該濁ったライゼート液を遠心分離することにより該透明ライゼート液が形成される、請求項13記載の方法。
15. アルコール沈殿を用いて該透明ライゼート液中の他の物質から該核酸物質を単離する工程を更に含む、請求項13記載の方法。
16. 常磁性粒子を用いて該透明ライゼート液中の他の物質から該核酸物質を単離する工程を更に含む、請求項13記載の方法。
17. シリカ粒子を含む樹脂マトリックスを用いて該透明ライゼート液中の他の物質から該核酸物質を単離する工程を更に含む、請求項13記載の方法。
18. 該核酸物質がDNAであり、該樹脂がシリカを含み、カオトロピック剤を用いて該DNAを該樹脂に可逆的に結合させ、該樹脂を洗浄液で洗浄して混合液中の

他の物質を除去し、洗浄した後に溶離緩衝液又は水を用いて該樹脂から該DNAを遊離させる、請求項17記載の方法。

19. 工程(d)において該混合液のpHを下げた後に該アルカリプロテアーゼを加熱不活性化する工程を更に含む、請求項8記載の方法。

20. 該DNA物質とタンパク質を含む生物試料からDNA物質を単離する方法であつて、

- (a)リボヌクレアーゼ及び緩衝液を含む水溶液に該生物試料を懸濁する工程；
- (b)アニオン清浄剤及び塩基を含むアルカリ溶解液を加えることにより該溶液のpHを少なくともpH約9に調整して、アルカリライゼート液を形成する工程；
- (c)該アルカリライゼート液にアルカリプロテアーゼを加えて、プロテアーゼ/ライゼート混合液を形成する工程；
- (d)該混合液を該核酸物質を分解することが可能なタンパク質が実質的に不活性化されるまでインキュベートする工程；
- (e)酸性溶液を加えることにより該混合液のpHを下げて、濁ったライゼートの形成が引き起こされる工程；
- (f)該濁ったライゼートを遠心分離により透明にする工程；及び
- (g)該透明ライゼート中の他の物質から該DNA物質を単離する工程を含むことを特徴とする方法。

21. 該生物試料を懸濁するために用いられる該溶液が緩衝液及びキレート化剤を含む、請求項20記載の方法。

22. 該混合液のpHを下げるために用いられる該酸性溶液がpH3.5～4.5の酢酸緩衝液を含む、請求項20記載の方法。

23. 該DNA物質が、該核酸物質を可逆的に結合することができる、シリカ粒子を含む樹脂マトリックスを用いて該透明ライゼートから単離される、請求項20記載の方法。

24. (h)該樹脂マトリックスに該透明ライゼート及びカオトロピック剤を加えて、該DNA物質を該樹脂マトリックスに結合する工程；
(i)該樹脂マトリックスを洗浄液で少なくとも1回洗浄する工程；

(j)溶離緩衝液又は水を用いて該樹脂マトリックスから該DNA物質を遊離させる工程

を更に含む、請求項23記載の方法。

25. 工程(e)において該混合液のpHを下げた後に該アルカリプロテアーゼを加熱不活性化する工程を更に含む、請求項20記載の方法。

26. 別個の容器に

(a)少なくともpH約9で核酸物質を分解することが可能なタンパク質を不活性化することができるアルカリプロテアーゼのアリコート;及び

(b)該核酸物質を可逆的に結合することが可能な樹脂マトリックスを含むことを特徴とする核酸物質を単離するキット。

27. 該核酸物質がDNA物質である、請求項26記載のキット。