

【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】令和1年8月8日(2019.8.8)

【公表番号】特表2017-506073(P2017-506073A)
 【公表日】平成29年3月2日(2017.3.2)
 【年通号数】公開・登録公報2017-009
 【出願番号】特願2016-549801(P2016-549801)
 【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/68 (2018.01)
 G 0 1 N 33/53 (2006.01)
 G 0 1 N 33/50 (2006.01)
 C 4 0 B 30/04 (2006.01)
 C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/68 Z N A Z
 G 0 1 N 33/53 D
 G 0 1 N 33/50 P
 C 4 0 B 30/04
 C 1 2 Q 1/68 A
 C 1 2 N 15/00 A

【誤訳訂正書】
 【提出日】令和1年7月1日(2019.7.1)
 【誤訳訂正1】
 【訂正対象書類名】明細書
 【訂正対象項目名】0012
 【訂正方法】変更
 【訂正の内容】
 【0012】

本発明の一態様においては、ブルダウンアッセイの結果を恣意的単位の恣意的スケールから絶対的単位の標準化スケールに変換し、データ解釈の正確さを改善する方法がある。本発明の一実施形態においては、標準は、真陽性エピトープの天然様親和性、特異性及び結合活性を有する関連の翻訳後修飾を含むヒストンのような、少なくとも1つの、再構成された、遺伝子組み換えの、半合成の、及び/又は、変異を含むDNA結合蛋白質を含む。好適な実施形態においては、標準は、再構成された、遺伝子組み換えの、半合成の、及び/又は、変異を含むDNA結合蛋白質に結合するバーコード分子を含む。同じタイプの多くの標準は標準を構成してもよい。異なるタイプの多くの標準も標準を構成してもよい。「標準」は例えば複数のヒストン-同じタイプのバーコード分子であり、他の実施形態においては、例えば標準がライブラリにドープされた異なる濃度をそれぞれ示す多くの異なるバーコード分子を含むヒストン-バーコード分子を含む。

【誤訳訂正2】
 【訂正対象書類名】明細書
 【訂正対象項目名】0013
 【訂正方法】変更
 【訂正の内容】
 【0013】

本発明の他の態様においては、原位置での偽陽性及び真陽性エピトープのブルダウン効率、一組の標準を用いて定量され、データ解釈の正確さを改善している。一実施形態においては、一組の標準は、真陽性エピトープの天然様親和性、特異性及び結合力を有する

少なくとも1つの、再構成された、半合成の、又は、変異を含むDNA結合蛋白質、及び、偽陽性エピトープの天然様親和性、特異性及び結合力を有する少なくとも1つの、半合成の、又は、変異を含むDNA結合蛋白質を含む。前記の一組の標準の使用は、原位置での偽陽性及び真陽性エピトープの数を定量することができるため、プルダウンアッセイの絶対的定量化を改善する。陽性的中率が既に算出されているため、原位置での偽陽性及び真陽性エピトープの数の知識はデータ分析を改善する。ある信頼レベルでのエピトープの最小数の評価が医療的診断及び調査としてのこのような使用にとっては重要な真陽性を考慮し得るため、陽性的中率の知識はデータ分析を改善する。

【誤訳訂正3】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0014

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0014】

本発明の他の態様においては、本発明は、クロマチン免疫沈降アッセイにおける真陽性エピトープ及び一組の標準の場合においては偽陽性エピトープの絶対的定量化のために標準又は一組の標準及び1つ以上の親和性試薬を含むキットを提供する。本発明の他の態様においては、本発明は、複数の試料にわたってプルダウンアッセイ結果を比較する方法を提供する。

【誤訳訂正4】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0015

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0015】

他の態様においては、本発明は、細胞のクロマチンにおけるゲノム遺伝子座でのコアヒストンの第1エピトープの密度を測定する方法を提供する。この方法は、天然のヌクレオソームのライブラリを調製する工程を備え、前記ライブラリは、第1エピトープを有するコアヒストンを含むヌクレオソームを含み、及び、前記ゲノム遺伝子座を示すヌクレオチド配列を含む。標準はドープライブラリを作成するためにライブラリに添加され、前記標準は、(i)第1エピトープを有する標準ヒストン又は標準ヒストンフラグメント、及び、(ii)バーコード分子に結合する標準ヌクレオチド配列を含む標準分子を含む再構成ヌクレオソームを含み、前記標準ヒストン又は標準ヒストンフラグメント及び標準ヌクレオチド配列は、安定的蛋白質-DNA結合を形成する。

【誤訳訂正5】

【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】

第1親和性試薬は、天然のヌクレオソーム及び第1エピトープを含む標準の量、並びに、第1エピトープを含む捕捉された天然のヌクレオソームに関する所定のヌクレオチド配列の量と、ドープライブラリ由来のインプットの天然のヌクレオソームに関する所定のヌクレオチド配列の量とを比較することにより決定された第1エピトープに対する相対的ゲノム数を捕捉するためにドープライブラリに添加される。第1エピトープに対する標準捕捉効率は、捕捉された標準に関するバーコード配列の量と、ドープライブラリ由来のインプットの標準に関する所定のヌクレオチド配列の量とを比較することにより決定される。ゲノム遺伝子座でのコアヒストンの第1エピトープの密度は、標準捕捉効率に対する相対的ゲノム数を比較することにより決定される。

【誤訳訂正6】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0017

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0017】

一実施形態においては、標準捕捉効率の測定は、再構成ヌクレオソームのインプット量に対するバーコード分子の捕捉量の比率を含む。他の実施形態においては、相対的ゲノム数の測定は、天然のヌクレオソームのヌクレオチド配列のインプット量に対する天然のヌクレオソームのヌクレオチド配列の捕捉量の比率の比較を含む。さらなる他の実施形態においては、第1親和性試薬第1エピトープに対する抗体である。

【誤訳訂正7】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0018

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0018】

ある実施形態においては、複数の標準がライブラリに追加され、各標準は、(i)第1エピトープを有する標準ヒストンと、(ii)バーコード分子に結合する標準ヌクレオチド配列を含む標準分子とを含む再構成ヌクレオソームを含み、バーコード分子は、ライブラリに追加された標準を示す濃度パラメータをコード化し、少なくとも2つの異なる濃度を有する標準がライブラリに追加される。複数の標準は、(i)1つ以上のオフターゲットのエピトープと、(ii)オフターゲットのエピトープの同一性及びオフターゲットのエピトープを示す濃度パラメータをコード化する標準分子バーコードとを含む再構成ヌクレオソームを含む標準をさらに追加してもよい。

【誤訳訂正8】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0020

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0020】

PCR、qPCR、ddPCR、次世代シーケンシング、ハイブリダイゼーション、オートラジオグラフィ、蛍光ラベリング、光学密度及び、及び、インターカレーター性蛍光プローブの使用からなる一群から選択された方法により、ヌクレオソームのヌクレオチド配列及び標準のヌクレオチド配列の少なくとも1つの数を測定してもよい。コアヒストンの第1エピトープは、セリン及びアラニンのN-アセチル化；セリン、スレオニン及びチロシンのリン酸化；リジンのN-クロトニル化、N-アセチル化；リジンのN6-メチル化、N6, N6-ジメチル化、N6, N6, N6-トリメチル化；アルギニンのオメガ-N-メチル化、対称性ジメチル化、非対称性ジメチル化；アルギニンのシトルリン化；リジンのユビキチン化；リジンのSUMO化；セリン及びスレオニンのO-メチル化；並びに、アルギニン、アスパラギン酸及びグルタミン酸のADP-リボース化からなる一群から選択された少なくとも1つの翻訳後アミノ酸修飾を含んでもよい。

【誤訳訂正9】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0023

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0023】

他の実施形態は、細胞のクロマチン内のゲノム遺伝子座でコアヒストンの第1エピトープの密度を測定する方法を提供する。この方法は、クロマチンから天然のヌクレオソームのライブラリを準備する工程を備え、前記ライブラリは、コアヒストン及び基点のゲノム

遺伝子座を示すヌクレオソームヌクレオチド配列をそれぞれ含むヌクレオソームを有する。標準はドープライブラリを作成するためにライブラリに追加され、前記標準は、(i)第1エピトープを有する標準ヒストン又は標準ヒストンフラグメント及び(ii)バーコードを有する標準分子を含む再構成ヌクレオソームを含み、前記標準ヒストン又は標準ヒストンフラグメント及び標準分子は、安定的な蛋白質-DNA結合を形成する。

【誤訳訂正10】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0024

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0024】

コアヒストンの量はドープライブラリ中のゲノム遺伝子座で計測され、ドープライブラリにおける標準の量は測定される。親和性試薬はドープライブラリに添加され、エピトープを含む捕捉標準の量及びドープライブラリ内のゲノム遺伝子座でのコアヒストンの量に基づき、天然のヌクレオソーム及びエピトープを含む再構成ヌクレオソームの量及びゲノム遺伝子座で測定された第1エピトープに対する相対的ゲノム数を捕捉する。捕捉された再構成ヌクレオソームの量及びドープライブラリ内の標準の量に基づき、エピトープに対する標準の捕捉効率が測定され、コアヒストンに対する第1エピトープ数及び標準捕捉効率に基づき、ゲノム遺伝子座でのコアヒストンの第1エピトープの相対的ゲノム数が測定される。

【誤訳訂正11】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0025

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0025】

一実施形態においては、ドープライブラリ内のゲノム遺伝子座でのコアヒストンの量の測定は、ドープライブラリに第2親和性試薬を添加し、第2エピトープを含むヌクレオソームの量を取り出す工程と、第2エピトープを含む取り出されたヌクレオソームの量におけるヌクレオソームのヌクレオチド配列の量を測定する工程とを含み、第2エピトープはコアヒストン上に存在する不変のエピトープである。他の実施形態においては、ドープライブラリ中の標準の量の測定は、再構成されたヌクレオソームの量を取り出す工程と、第2エピトープを含む取り出された再構成ヌクレオソームの量における標準分子の量を測定する工程とを備え、再構成されたヌクレオソームは第2エピトープを含む。さらなる他の実施形態においては、第1親和性試薬は第1エピトープに対する抗体であり、第2親和性試薬は第2エピトープに対する抗体である。

【誤訳訂正12】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0026

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0026】

他の態様は、配列ID No. 1-115を含む配列からなる一群から選択されたヌクレオチド配列を有するヌクレオソームを含む組成を提供する。さらなる他の態様は、ここに記載された方法を実施するキットを提供する。一実施形態においては、キットは、複数のエピトープとバーコードを含む標準分子を含む1つ以上の標準を含む。他の実施形態においては、キットは、複数のエピトープのうち少なくとも1つを認識する少なくとも1つの親和性試薬を含む。

【誤訳訂正13】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0034

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0034】

【図8】複数の内部標準を有するIceChIP。図9に示された小スケールのIceChIP実験に対するクロマチンインプット滴定。この方法は、400細胞に相当するクロマチンまで低減する。

【誤訳訂正14】

【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】

【図9】複数の内部標準を有するIceChIPは原位置のIPの特異性を示す。(A)それぞれメチル標識された抗体を用いた5種類のマルチ標準IceChIP-seq実験における内部標準捕捉の比較(未修飾、H3H4me3、H3K9me3、H3K27me3、H3K36me3、H3K79me3 2バーコード化され、同モル濃度に同時にドープされたヌクレオソームラダー)。相対的IP効率で表され、オンターゲットラダーに標準化されたデータは、未修飾ヌクレオソームと同様に、潜在的なオフターゲットのメチル化ヌクレオソームとの安易な比較を可能とする。(B)H3K4me3の最高のオフターゲットのバックグラウンドラダーと同様に、オンターゲット標識のインプットに対するIPにおける大雑把なラダーの計数として示されたmESCsを用いたマルチ標準IceChIP実験におけるIP濃縮の算出。(C)H3K4me3(M309M3-A(例えば、非特許文献13参照。))。(D)H3K27me3(Millipore 07-449)

。

【誤訳訂正15】

【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】

用語「免疫沈降(IP)濃縮」は、インプット試料由来の内部標準から分かれた免疫沈降された試料由来の内部標準を意味する。

【誤訳訂正16】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0074

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0074】

記載されているように、エピトープ密度を測定する方法の一実施形態においては、標準認識分子を備えた一組の前記半合成ヌクレオソームは天然ヌクレオソームのコレクション内にドープされる。この一組は、関連の少なくとも1つのエピトープを含み、2つ以上のエピトープを内部に含む標準認識分子を有する半合成ヌクレオソームを構成する。例えば、一組の半合成ヌクレオソームは、翻訳後修飾、すなわちH3K9me3及びヒストンのポリペプチド配列のような保存され又は変異されたエピトープを含んでもよい。或いは、一組の半合成ヌクレオソームは、H3K9me3のような2つ以上の翻訳後修飾を含み、又は第2エピトープを挿入してもよい。他の態様においては、一組の標準は、関連のエピトープとは異なる偽陽性エピトープの天然様親和性、特異性及び結合活性を有するDNA-蛋白質複合体を備えた少なくとも1つの半合成、再構成された又は変異体を含む。好適な実施形態においては、一組の半合成又は変異体は、真陽性エピトープの天然様親和性、

特異性及び結合活性を有する少なくとも1つのヌクレオソーム、並びに、偽陽性エピトープの天然様親和性、特異性及び結合活性を有する少なくとも1つのヌクレオソームを含むヌクレオソームを備える。

【誤訳訂正17】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0076

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0076】

I C e - C h I P データ分析

一実施形態においては、I C e - C h I P を実施するために、C h I P 読み取りが比較される一組の前記内部標準は、天然DNA - 蛋白質複合体のコレクション内にドーブされる。以下に、これらの標準がどのように標準IP効率の算出に用いられるか、同様に、研究されたエピトープが変異蛋白質フラグメント、蛋白質インフォーマー又は蛋白質翻訳後修飾かどうか依存して、蛋白質又はエピトープ密度(PD)、蛋白質変異体密度(PVD)又は蛋白質修飾密度(PMD)が何と呼ばれるか算出するために用いられることを我々は記載する。天然様親和性、特異性及び結合活性を有するヌクレオソームを含む半合成又は変異体に基づく標準は、ヒストン修飾密度(HMD)又はヒストン変異体密度(HVD)の絶対的定量を行うことにより、クロマチン免疫沈降法を改良する。

【誤訳訂正18】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0081

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0081】

「IP効率」は、1つ以上のブルダウン間のエピトープの相対的取り出しを意味する。標準に対するIP効率の知見は、1つ以上のブルダウン間の取り出しの差を修正することにより絶対的定量の実施を可能とする。一実施形態においては、前記IP効率は、天然エピトープと同じ親和性、特異性及び結合活性を有し、数を複合混合物中で容易に測定される一組の前記標準を用いることにより測定される。これらの半合成標準は、少ない天然DNA - 蛋白質複合体、親和性捕捉の対象となる試料中にドーブされる。このステップの後、エピトープ数及び一般的な蛋白質密度の前記測定は、前記数測定の方法の1つを有する半合成標準及び少ない天然DNA - 蛋白質複合体群に対して実施される。一実施形態においては、一組の標準は、異なる濃度で添加される標準を含む。ここで、添加される濃度は、バーコードにより独特に同定される。

【誤訳訂正19】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0091

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0091】

直接内部標準校正は、本来の試料における精査されるエピトープの絶対的モル数を外挿法により推定するために、インプットにおける各内部標準ラダーメンバーの正確なモル濃度を測定するChIP工程を通して添加されたバーコード化ヌクレオソーム標準のタグ計数を測定する。この種類の校正は、小球菌ヌクレアーゼ消化を施された細胞核計数の正確性、及び、この良好な定量数から徹底的にフラグメント化されたクロマチン単離の途中で生じるバイアスのかけられた損失により限定される。高く最適化された消化及び単離条件下で消化された細胞核由来の総核酸の80%そこそこを取り出すため、バイアスのかけられたゲノム取り出しに起因する合成誤差がある(例えば、非特許文献1参照)。

【誤訳訂正20】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0114

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0114】

試薬及びキット

本発明の他の態様は、ここに記載された方法の1つを実施する試薬を含む試薬及びキットを提供する。試薬は適切なパッケージ又は容器に含まれる。キットは、例えばプルダウンアッセイ又はクロマチン免疫沈降アッセイにおいて、真陽性及び偽陽性エピトープの絶対的定量のためのここに記載された標準を含む1つ以上の試薬を含む。キットは、ここに記載された少なくとも1つの親和性試薬、例えば抗体も含む。標準は、真陽性エピトープに対して天然様親和性、特異性及び結合活性を有する。キットは、偽陽性エピトープに対するエピトープの天然様親和性、特異性及び結合活性を有する少なくとも1つの標準を含む。

【誤訳訂正21】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0115

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0115】

他の好適な実施形態においては、前記標準は、天然様親和性、特異性及び結合活性を有するヒストン、ヒストンアイソフォーム又はヒストン翻訳後修飾を有して作成された半合成ヌクレオソーム並びにパーコード分子を有するDNA-蛋白質複合体を含む。様々な実施形態においては、表1~6において定義されたものを含む当業者に公知なコアヒストン配列又は翻訳後修飾のいずれかの変異体は、エピトープの天然様親和性、特異性及び結合活性が保持される仮定のもとヒストンオクタマーを含むヒストン上に取り付けられる。好適な実施形態においては、一組の標準は、真陽性エピトープに対するエピトープの天然様親和性、特異性及び結合活性を有するDNA複合体の少なくとも1つの標準、及び、天然の少ないDNA-蛋白質複合体において存在する可能なオフターゲットエピトープ(偽陽性エピトープ)の範囲をカバーするエピトープの天然様親和性、特異性及び結合活性を有するDNA複合体の複数の標準から構成される。

【誤訳訂正22】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0116

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0116】

他の実施形態においては、キットは、パッケージ又容器中に1つ以上の洗浄バッファ(例えばリン酸緩衝食塩水)及び/又は他のバッファを含む。さらなる他の実施形態においては、キットは、第2抗体又は蛋白質Aに結合された、例えば常磁性粒子を含む捕捉試薬、例えば固相捕捉試薬の分離のために必要な試薬を含む。キットは、捕捉標準又は試料の量の測定に必要な試薬も含む。

【誤訳訂正23】

【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】

細胞のクロマチン内のゲノム遺伝子座でコアヒストンの第1エピトープの密度を測定す

る方法であって、

前記クロマチンから天然のヌクレオソームのライブラリを準備する工程と、
ドープライブラリを作成するために前記ライブラリに標準を追加する工程と、

前記第1エピトープを含む天然のヌクレオソーム及び標準の量を捕捉するために前記ドープライブラリに第1親和性試薬を追加する工程と、

前記第1エピトープを含む捕捉された天然のヌクレオソームに関する所望のヌクレオチド配列の量と、前記ドープライブラリからのインプット量における天然のヌクレオソームに関する所望のヌクレオチド配列の量とを比較することによって前記第1エピトープに対する相対的ゲノム数を測定する工程と、

捕捉された標準分子に関するバーコード配列の量と、前記ドープライブラリからのインプット量における前記標準分子に関する所望のヌクレオチド配列の量とを比較することによって前記第1エピトープに対する標準捕捉効率を測定する工程と、

前記標準捕捉効率に対する前記相対的ゲノム数を比較することによって前記ゲノム遺伝子座で前記コアヒストンの前記第1エピトープの密度を測定する工程とを備え、

前記ライブラリは、前記第1エピトープを有する前記コアヒストン及び前記ゲノム遺伝子座を示すヌクレオソームヌクレオチド配列を含むヌクレオソームを有し、

前記標準は、(i)前記第1エピトープを有する標準ヒストン又は標準ヒストンフラグメント及び(ii)バーコード分子にリンクする標準ヌクレオチド配列を有する標準分子を含む再構成ヌクレオソームを含み、

前記標準ヒストン又は標準ヒストンフラグメント及び前記標準ヌクレオチド配列は、安定的な蛋白質-DNA結合を形成することを特徴とする方法。

【請求項2】

前記標準捕捉効率の測定は、前記再構成ヌクレオソームのインプット量に対する前記バーコード分子の捕捉量の比率の比較を含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記相対的ゲノム数の測定は、天然のヌクレオソームのヌクレオチド配列のインプット量に対する天然のヌクレオソームのヌクレオチド配列の捕捉量の比率の比較を含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項4】

前記第1親和性試薬は前記第1エピトープに対する抗体であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項5】

複数の標準は前記ライブラリに追加され、

前記標準のそれぞれは、(i)前記第1エピトープを有する前記標準ヒストンと、(ii)前記バーコード分子にリンクする前記標準ヌクレオチド配列を有する前記標準分子とを備える再構成ヌクレオソームを含み、

前記バーコード分子は、前記ライブラリに追加された前記標準の濃度を示す濃度パラメータをコード化し、

少なくとも2つの異なる濃度を有する標準分子が前記ライブラリに追加されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項6】

前記複数の標準は、(i)1つ以上のオフターゲットのエピトープと、(ii)オフターゲットのエピトープの同一性及び前記オフターゲットのエピトープを示す濃度パラメータをコード化する標準分子バーコードとを含む再構成ヌクレオソームを有する標準をさらに含むことを特徴とする請求項5に記載の方法。

【請求項7】

オフターゲットのエピトープに対する1つ以上の捕捉効率に基づいて、前記第1親和性試薬に対するオフターゲット捕捉の特異性を測定する工程と、

前記オフターゲット捕捉の特異性に基づいて、前記ゲノム遺伝子座の前記コアヒストンの前記第1エピトープの密度を修正する工程とをさらに備えることを特徴とする請求項5

に記載の方法。

【請求項 8】

前記第 1 エピトープは翻訳後修飾又は蛋白質のアイソフォームであることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記バーコード配列は前記細胞のゲノム内に存在しない配列であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記ヌクレオソームヌクレオチド配列及び前記標準ヌクレオチド配列の少なくとも 1 つの数は、PCR、qPCR、ddPCR、次世代シーケンシング、ハイブリダイゼーション、オートラジオグラフィ、蛍光ラベリング、光学密度及び、及び、インターカレーター性蛍光プローブの使用からなる一群から選択された方法により測定されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記コアヒストンの前記第 1 エピトープは、セリン及びアラニンの N - アセチル化；セリン、スレオニン及びチロシンのリン酸化；リジンの N - クロトニル化、N - アセチル化；リジンの N6 - メチル化、N6, N6 - ジメチル化、N6, N6, N6 - トリメチル化；アルギニンのオメガ - N - メチル化、対称性ジメチル化、非対称性ジメチル化；アルギニンのシトルリン化；リジンのユビキチン化；リジンの SUMO 化；セリン及びスレオニンの O - メチル化；並びに、アルギニン、アスパラギン酸及びグルタミン酸の ADP - リボース化からなる一群から選択された少なくとも 1 つの翻訳後アミノ酸修飾を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記標準分子は、二本鎖ポリヌクレオチドであることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記二本鎖ポリヌクレオチドは、配列 ID No. 1 - 115 からなる一群から選択されたヌクレオチド配列を有することを特徴とする請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記バーコード分子は、ヌクレオチドバーコード配列分子、ロックド核酸配列及び DNA 配列からなる一群から選択された分子を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

前記細胞は患者由来の細胞であり、

所望の遺伝子座の前記第 1 エピトープの量は、腎細胞癌、神経膠腫、神経膠肉腫、悪性星状細胞腫、骨芽細胞腫、肺癌、小細胞性肺癌、子宮頸癌、大腸癌、直腸癌、脊索腫、咽頭癌、カポジ肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮細胞肉腫、結腸直腸癌、子宮内膜癌、卵巣癌、乳癌、膵臓癌、前立腺癌、腎細胞癌、肝細胞癌、胆管癌、絨毛癌、精上皮腫、睾丸腫瘍、ウィルムス腫瘍、ユーイング癌、膀胱癌、血管肉腫、内皮肉腫、腺癌、汗腺癌、皮脂腺肉腫、乳頭肉腫、乳頭腺肉腫、嚢胞腺肉腫、気管支原性肺癌、髄様癌、マスト細胞腫、中皮腫、滑膜腫、黒色腫、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、乏突起神経膠腫、聴神経腫瘍、血管芽細胞腫、髄膜腫、松果体腫、脳室上衣細胞腫、頭蓋咽頭腫、上皮癌、胚性癌腫細胞、扁平上皮癌、基底細胞癌、線維肉腫、粘液腫、粘液肉腫、神経膠腫、脂肪肉腫；ヘリコバクターピロリ、リステリア・モノサイトゲネス、シゲラ・フレックスネリ、アナプラズマ・ファゴサイトフィルム、クラミドフィラ、エプスタイン・バーウイルス、ヘルペス、HIV、ビルハルツ住血吸虫に起因する感染症；肥満、糖尿病、心臓病；自閉症、脆弱 X 染色体症候群、ATR - X 症候群、アンジェルマン症候群、プラダ - ウィリ症候群、ベックウィズ - ヴィーデマン症候群、レット症候群、ルビンシュタイン - テイビ症候群、コフィン - ローリー症候群、免疫不全 - セントロメア不安定性 - 顔貌異常症候群、 - サラセミア、白血病、ハンチントン病、精神分裂病、双極性障害、老化、痴呆、アルツハイマー病、パーキンソン病、コルネリア・デ・ランゲ症候群、歌舞

伎メーキャップ症候群、シェーグレン症候群、尋常性白斑、進行性全身性硬化症、乾癬、原発性胆汁性肝硬変、クローン病及び潰瘍性大腸炎、橋本甲状腺炎、グレーブス病、炎症性腸疾患、アテローム性動脈硬化症、及び、心肥大からなる一群から選択された病気又は状態を示すことを特徴とする請求項1の方法。

【請求項16】

細胞のクロマチン内のゲノム遺伝子座でコアヒストンの第1エピトープの密度を測定する方法であって、

前記クロマチンから天然のヌクレオソームのライブラリを準備する工程と、

ドーブライブラリを作成するために前記ライブラリに標準を追加する工程と、

前記ドーブライブラリ内の前記ゲノム遺伝子座で前記コアヒストンの量を測定する工程と、

前記ドーブライブラリ内の標準の量を測定する工程と、

前記エピトープを含む天然のヌクレオソーム及び再構成ヌクレオソームの量を捕捉するために前記ドーブライブラリに親和性試薬を追加する工程と、

前記エピトープを含む前記捕捉標準の量及び前記ドーブライブラリ内の前記ゲノム遺伝子座での前記コアヒストンの量に基づいて、ゲノム遺伝子座で前記第1エピトープに対する相対的ゲノム数を測定する工程と、

捕捉再構成ヌクレオソームの量及び前記ドーブライブラリ内の標準の量に基づいて、前記エピトープに対する標準捕捉効率を測定する工程と、

前記コアヒストンに対する前記第1エピトープ数及び前記標準捕捉効率に基づいて、前記ゲノム遺伝子座で前記コアヒストンの前記第1エピトープの前記相対的ゲノム数を測定する工程とを備え、

前記ライブラリは、前記コアヒストン及び基点のゲノム遺伝子座を示すヌクレオソームヌクレオチド配列をそれぞれ含むヌクレオソームを有し、

前記標準は、(i)前記第1エピトープを有する標準ヒストン又は標準ヒストンフラグメント及び(ii)バーコードを有する標準分子を含む再構成ヌクレオソームを含み、

前記標準ヒストン又は標準ヒストンフラグメント及び前記標準分子は、安定的な蛋白質-DNA結合を形成することを特徴とする方法。

【請求項17】

前記ドーブライブラリ中のゲノム遺伝子座で前記コアヒストンの量を計測する工程は、

前記ドーブライブラリに第2親和性試薬を添加し、第2エピトープを含むヌクレオソームの量を取り出す工程と、

前記第2エピトープを含む取り出されたヌクレオソームの量におけるヌクレオソームのヌクレオチド配列の量を測定する工程とを備え、

前記第2エピトープは、前記コアヒストン上に存在する不変のエピトープであることを特徴とする請求項16に記載の方法。

【請求項18】

前記ドーブライブラリ中の標準の量の測定は、

再構成されたヌクレオソームの量を取り出す工程と、

前記第2エピトープを含む前記取り出された再構成ヌクレオソームの量における前記標準分子の量を測定する工程とを備え、

前記再構成されたヌクレオソームは前記第2エピトープを含むことを特徴とする請求項16に記載の方法。

【請求項19】

前記第1親和性試薬は前記第1エピトープに対する抗体であり、前記第2親和性試薬は前記第2エピトープに対する抗体であることを特徴とする請求項18に記載の方法。

【請求項20】

配列ID No. 1-115を含む配列からなる一群から選択されたヌクレオチド配列を有するヌクレオソームを含むことを特徴とする組成物。

【請求項21】

複数のエピトープを含む1つ以上の標準及びバーコードを含む標準分子を含むことを特徴とする請求項1に記載の方法を実施するキット。

【請求項22】

前記キットは、複数のエピトープのうち少なくとも1つを認識する少なくとも1つの親和性試薬を含むことを特徴とする請求項21に記載のキット。

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2017506073A5	公开(公告)日	2019-08-08
申请号	JP2016549801	申请日	2015-02-03
[标]申请(专利权)人(译)	芝加哥大学		
申请(专利权)人(译)	芝加哥大学		
当前申请(专利权)人(译)	芝加哥大学		
[标]发明人	ルーセンバークアレクサンダージェイ グジボフスキエイドリアン チェンチュウレイ		
发明人	ルーセンバーク,アレクサンダー,ジェイ. グジボフスキ,エイドリアン チェン,チュウレイ		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/50 C40B30/04 C12N15/09		
CPC分类号	C12Q1/6804 C12Q1/68 G01N33/6875 G01N2440/00 C12Q2522/101 C12Q2535/122 C12Q2545/101 C12Q2563/179		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.Z G01N33/53.D G01N33/50.P C40B30/04 C12Q1/68.A C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/BB12 2G045/DA13 2G045/DA36 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QQ42 4B063 /QR08 4B063/QR42 4B063/QR50 4B063/QR55 4B063/QR58 4B063/QR62 4B063/QS13 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02		
优先权	61/935129 2014-02-03 US		
其他公开文献	JP2017506073A		

摘要(译)

本发明的一个方面提供了用于定量测定给定DNA基因座上染色质中DNA结合蛋白例如组蛋白，组蛋白变体，组蛋白翻译后修饰和转录因子的密度或占有率的材料和方法。 要做。 一个实施方案测量特定基因座处因子的平均量，并控制关于抗体质量和处理组织的许多陷阱。 其他实施方案包括校准和染色质免疫沉淀测定定量以评估亲和试剂特异性，以及试剂盒中所需的试剂及其信息。 其他实施方案允许通过测量基因座处的组蛋白修饰的密度来诊断病症或疾病。 [选型图]图1