

【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3部門第2区分
 【発行日】平成22年9月2日(2010.9.2)

【公開番号】特開2009-155284(P2009-155284A)
 【公開日】平成21年7月16日(2009.7.16)
 【年通号数】公開・登録公報2009-028
 【出願番号】特願2007-336609(P2007-336609)
 【国際特許分類】

C 0 7 C 209/84 (2006.01)
 C 1 2 P 13/02 (2006.01)
 C 0 8 G 69/26 (2006.01)
 C 0 7 C 211/09 (2006.01)
 C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 0 7 C 209/84 Z N A
 C 1 2 P 13/02
 C 0 8 G 69/26
 C 0 7 C 211/09
 C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成22年7月20日(2010.7.20)

【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】請求項3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項3】

不純物として塩類を含む含水ペンタメチレンジアミンが、ペンタメチレンジアミン塩水溶液にアルカリを添加、混合してペンタメチレンジアミン相と水相とに分液して得られたものである請求項1に記載の製造方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項4】

ペンタメチレンジアミン塩が、ペンタメチレンジアミン塩酸塩、硫酸塩、炭酸塩、酢酸塩、硝酸塩の何れかである請求項2又は3に記載の製造方法。

【手続補正3】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項5】

アルカリが、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム又は水酸化カルシウムである請求項2~4の何れかに記載の製造方法。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0022

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0022】

前記の微生物としては、エシェリヒア・コリ (*E. coli*) 等のエシェリヒア属細菌、ブレヴィバクテリウム・ラクトファーメントム (*Brevibacterium lactofermentum*) 等のコリネ型細菌、バチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*) 等のバチルス属細菌、セラチア・マルセッセンス (*Serratia marcescens*) 等のセラチア属細菌などの細菌、サッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 等の真核細胞が挙げられる。これらの中では、細菌、特に *E. coli* が好ましい。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0060

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0060】

LDC 遺伝子のコピー数を高めることは、LDC 遺伝子を微生物の染色体 DNA 上に多コピー存在させることによっても達成できる。微生物の染色体 DNA 上に遺伝子を多コピーで導入するには、染色体 DNA 上に多コピー存在する配列を標的に利用して相同組換えにより行う。染色体 DNA 上に多コピー存在する配列としては、レペティティブ DNA、転移因子の端部に存在するインバーテッド・リピートが利用できる。または、特開平 2 - 109985 号公報に開示されているように、目的遺伝子をトランスポゾンに搭載してこれを転移させて染色体 DNA 上に多コピー導入することも可能である。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0071

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0071】

組換え DNA を微生物に導入するには、これまでに報告されている形質転換法に従って行えばよい。例えば、*E. coli* K-12 について報告されているような、受容菌細胞を塩化カルシウムで処理して DNA の透過性を増す方法 (Mandel, M. and Higa, A., *J. Mol. Biol.*, 53, 159 (1970)) があり、バチルス・サチリスについて報告されているような、増殖段階の細胞からコンピテントセルを調製して DNA を導入する方法 (Ducan, C.H., Wilson, G.A. and Young, F.E., *Gene*, 1, 153 (1997)) がある。また、バチルス・サチリス、放線菌類および酵母について知られているような、DNA 受容菌の細胞を、組換え DNA を容易に取り込むプロトプラスト又はスフェロプラストの状態にして組換え DNA を DNA 受容菌に導入する方法 (Chang, S. and Choen, S.N., *Molec. Gen. Genet.*, 168, 111 (1979); Bibb, M.J., Ward, J.M. and Hopwood, O.A., *Nature*, 274, 398 (1978); Hinnen, A., Hicks, J.B. and Fink, G.R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 1929 (1978)) も応用できる。更に、電気パルス法 (特開平 2 - 207791 号公報) によっても、微生物の形質転換を行うことが出来る。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0088

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0088】

【表 2】

	カチオン (PMDA)	アニオン (塩化物イオン、硫酸イオン)
分析装置	ダイオネクス社「DX-320」 クロマトパック:島津製作所「C-R7A」	ダイオネクス社「DX-AQ」 クロマトパック:島津製作所 「C-R7A」
分離カラム	IonPac CS12A	IonPac AS12A
ガードカラム	IonPac CG12A	IonPac AG12A
流量	1.0mL/min	1.5mL/min
注入量	3mL (ループ 1.5mL)	1m L (ループ 200 μ L)
検出器感度	RANGE:200 μ S 温度補正係数:2.0%/°C	RANGE:3 μ S 温度補正係数:1.7%/°C
サプレッサー	CSRS 電流値:120mA	ASRR 電流値:50mA
溶離液	40mmol/L メタンスルホン酸	2.7mmol/L Na ₂ CO ₃ 0.3mmol/L NaHCO ₃

【手続補正 8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0098

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0098】

PCR終了後、増幅産物をエタノール沈殿により精製した後、制限酵素Kpn Iおよび制限酵素Sph Iで切断した。このDNA標品を、0.75%アガロース(SeaKem GTG agarose: FMC BioProducts製)ゲル電気泳動により分離後、臭化エチジウム染色により可視化することによりcadAを含む約2.6kbの断片を検出し、QIAquick Gel Extraction Kit(QIAGEN製)を使用して目的DNA断片の回収を行った。

【手続補正 9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0099

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0099】

回収したDNA断片を、大腸菌プラスミドベクターpUC18(宝酒造製)を制限酵素Kpn Iおよび制限酵素Sph Iで切断して調節したDNA断片と混合し、ライゲーションキットver.2(宝酒造製)を使用して連結後、得られたプラスミドDNAを使用し、大腸菌(JM109株)を形質転換した。この様にして得られた組換え大腸菌を、50 μ g/mL:アンピシリン、0.2mM:IPTG(イソプロピル-D-チオガラクトピラノシド)及び50 μ g/mL:X-Galを含むLB寒天培地に塗抹した。

【手続補正 10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0100

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0100】

この培地上で白色のコロニーを形成したクローンを、常法により液体培養した後、プラスミドDNAを精製した。得られたプラスミドDNAを制限酵素KpnIおよび制限酵素SphIで切断することにより、約2.5kbの挿入断片が認められることを確認し、これをpCAD1、pCAD1を含む大腸菌株をJM109/pCAD1とそれぞれ命名した。