

【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23年8月18日 (2011.8.18)

【公表番号】特表2011-504732(P2011-504732A)

【公表日】平成23年2月17日 (2011.2.17)

【年通号数】公開・登録公報2011-007

【出願番号】特願2010-535283(P2010-535283)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 9/12 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 9/12 Z N A

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/00 1 0 1

C 1 2 Q 1/68 A

C 1 2 M 1/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成23年6月28日 (2011.6.28)

【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】

R - X₁ - X₂ - X₃ - K - L - X₄ - X₅ - X₆ - Y - X₇ - X₈ - X₉ - X₁₀ - X₁₁、

式中、

X₁は、E、Q、G、K、及びTからなる群から選択され、

X₂は、L、I又はYであり、

X₃は、T、M、D、S、G、A、Q、及びLからなる群から選択され、

X₄は、K、R又はQであり、

X₅は、N、S又はGであり、

X₆は、Sであり、

X₇は、V、I、L、A、Tからなる群から選択され、

X₈は、D又はEであり、

X₉は、P、A、G、K、T、及びSからなる群から選択され、

X₁₀は、L又はIであり、

X₁₁は、P又はLである；

を含んでなるDNAポリメラーゼであって、

X₆がTであり他は同一のポリメラーゼと比較して、ピロリン酸分解活性化重合 (pyrophosphorolysis activated polymerization) (PAP) 活性が向上している、DNAポリメラーゼ。

【請求項2】

X₆がTであり他は同一のポリメラーゼと比較して、ブロックプライマーKAB77 (配列番号27) を伸長させる速度がより速い、請求項1に記載のDNAポリメラーゼ。

【請求項3】

CS5 DNAポリメラーゼ (配列番号20) と、少なくとも90%の配列同一性を有するキメラポリメラーゼを含んでなる、請求項1に記載のDNAポリメラーゼ。

【請求項4】

前記キメラポリメラーゼが、G46E、L329A、及びE678G、及びT606Sからなる群から選択される1又は複数のアミノ酸置換を有する、配列番号22を含んでなる、請求項3に記載のDNAポリメラーゼ。

【請求項5】

請求項1～4のいずれか1項に記載の前記DNAポリメラーゼをコードする、組換え核酸。

【請求項6】

前記ポリメラーゼが、その非改変体において、ピロリン酸分解活性化重合活性 (PAP) を有し、且つ以下のコンセンサス配列、

R - X₁ - X₂ - X₃ - K - L - X₄ - X₅ - X₆ - Y - X₇ - X₈ - X₉ - X₁₀ - X₁₁ (配列番号24)、

ここで、X₁、X₃、X₇及びX₉は、任意のアミノ酸であり、

X₂は、L、I又はYであり、

X₄は、K、R又はQであり、

X₅は、N、S又はGであり、

X₆は、Tであり、

X₈は、D又はEであり、

X₁₀は、L又はIであり、

X₁₁は、P又はLである

を有するアミノ酸配列を含むことを特徴とする変異DNAポリメラーゼである、請求項1に記載のDNAポリメラーゼ。

【請求項7】

前記ポリメラーゼの非改変体が、

(a) CS5 DNAポリメラーゼ

(b) サーマス・サーモフィルス (Thermus thermophilus)

(c) サーマス・カルドフィルス (Thermus thermophilus)

(d) サーマス種Z05

(e) サーマス・アクアティクス (Thermus aquaticus)

(f) サーマス・フラバス (Thermus flavus)

(g) サーマス・フィリフォルミス (Thermus filiformis)

(h) サーマス種sps17

(i) デイノコッカス・ラディオデュランス (Deinococcus radiodurans)

(j) バチルス・ステレオサーモフィルス (Bacillus stearothermophilus)

(k) バチルス・カルドテナクス (Bacillus caldotenax)

(l) エシェリア・コリ (Escheria coli)

(m) サーマトガ・マリチマ (Thermotoga maritima)

(n) サーマシフォ・アフリカヌス (Thermosiphon africanus)

(o) サーマトガ・ネアポリタナ (Thermotoga neapolitana)

(p) ホット・スプリング・ファミリー A

(q) (a) ~ (p) のいずれか 1 つと少なくとも 90% 配列同一性を有する DNA ポリメラーゼ、

からなる群から選択される、請求項 6 に記載の変異 DNA ポリメラーゼ。

【請求項 8】

ポリヌクレオチド鋳型、3'末端で伸長不可能なヌクレオチドを有する少なくとも 1 つのプライマー、及び請求項 1 ~ 4、6 及び 7 のいずれか 1 項に記載の DNA ポリメラーゼを含んでなり、ここで、当該伸長不可能なヌクレオチドは、2'-ターミネーターヌクレオチドである、反応混合物。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 4、6 及び 7 のいずれか 1 項に記載の DNA ポリメラーゼを、プライマー、ポリヌクレオチド鋳型、及び遊離のヌクレオチドと接触させることを含んでなり、

ここで当該プライマーの 3'末端が、伸長不可能なヌクレオチドで遮断され、及び、当該プライマーの 3'末端の伸長不可能なヌクレオチドのピロリン酸分解に適する条件下で、当該プライマーが伸長し、それにより、ピロリン酸分解活性化重合が達成される、ピロリン酸分解活性化重合を達成するための方法。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 4、6 及び 7 のいずれか 1 項に記載の DNA ポリメラーゼを、プライマー、ヌクレオチド鋳型、及び遊離ヌクレオチドと、当該プライマーの伸長に適する条件下で接触させ、それにより伸長プライマーを作製することを含んでなる、プライマー伸長を行うための方法。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 4、6 及び 7 のいずれか 1 項に記載の DNA ポリメラーゼを提供する少なくとも 1 つの容器と、以下の、

(a) ピロリン酸分解活性化重合条件下、ポリヌクレオチド鋳型にハイブリダイズ可能なプライマーを提供する容器；

(b) 3'末端に伸長不可能なヌクレオチドを有し、ピロリン酸分解活性化重合条件下、前記ポリヌクレオチド鋳型にハイブリダイズ可能なプライマーを提供する容器；

(c) 遊離ヌクレオチドを提供する容器；

(d) ピロリン酸分解活性化重合に適する緩衝剤を提供する容器、

からなる群から選択される 1 又は複数の追加の容器とを含んでなる、ピロリン酸活性化重合を行うためのキット。