

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges
Eigentum

Internationales Büro

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum
10. August 2017 (10.08.2017)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2017/133738 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation:
C12Q 1/68 (2006.01) *C12N 15/10* (2006.01)
C12N 15/66 (2006.01)
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2017/200014
- (22) Internationales Anmeldedatum:
1. Februar 2017 (01.02.2017)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
10 2016 101 948.8
4. Februar 2016 (04.02.2016) DE
- (71) Anmelder: **LEIBNIZ-INSTITUT FÜR
PFLANZENBIOCHEMIE (IPB)** [DE/DE]; Weinberg 3,
06120 Halle (Saale) (DE).
- (72) Erfinder: **MARILLONNET, Sylvestre**; Nietlebener
Straße 20, 06126 Halle (DE).
- (74) Anwälte: **STÜVEN, Ralf** et al.; Pohl & Partner
Patentanwälte, Kirchenhang 32b, 21073 Hamburg (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW,
BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK,
DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH,
KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,
MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA,
NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO,
RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV,
SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST,
SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG,
KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH,
CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD, SUBSTRATE AND KIT FOR ONE-POT ONE-STEP ASSEMBLY OF DNA MOLECULES

(54) Bezeichnung : VERFAHREN, TRÄGER UND KIT ZUR EIN-TOPF-EIN-SCHRITT-ASSEMBLIERUNG VON DNA-MOLEKÜLEN

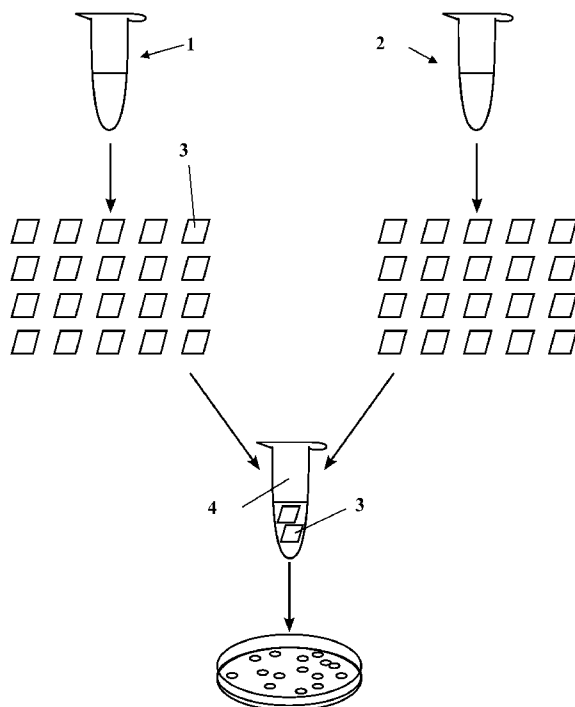


Fig. 1

(57) Abstract: The invention relates to a method for one-pot one-step assembly of two or more DNA molecules to form at least one recombinant DNA molecule, and a substrate and a kit for this purpose. The object of the invention is to provide a simple and cost-effective assembly method for DNA molecules. In order to achieve this object, a method for one-pot one-step assembly of two or more DNA molecules to form at least one recombinant DNA molecule is provided according to the invention, wherein the two or more DNA molecules to be assembled are brought together in dry form with a suitable reaction medium on at least one substrate present in a reaction vessel.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Ein-Topf-Ein-Schritt-Assemblierung von zwei oder mehr DNA-Molekülen zu mindestens einem rekombinanten DNA-Molekül sowie einen Träger und ein Kit hierfür. Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein einfaches und kostengünstiges Assemblierungsverfahren für DNA-Moleküle bereit zu stellen. Zur Lösung der Aufgabe wird erfindungsgemäß ein Verfahren zur Ein-Topf-Ein-Schritt-Assemblierung von zwei oder mehr DNA-Molekülen zu mindestens einem rekombinanten DNA-Molekül bereit gestellt, wobei die zwei oder mehr zu assemblierenden DNA-Moleküle in trockener Form auf mindestens einem Träger vorliegend in einem Reaktionsgefäß mit einem geeigneten Reaktionsmedium zusammen gebracht werden.

WO 2017/133738 A1



IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,
RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).

Veröffentlicht:

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

- *hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii)*

- *mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)*
- *vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eingehen (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe h)*
- *mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung (Regel 5 Absatz 2 Buchstabe a)*

VERFAHREN, TRÄGER UND KIT ZUR EIN-TOPF-EIN-SCHRITT-ASSEMBLIERUNG VON DNA-MOLEKÜLEN

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Ein-Topf-Ein-Schritt-Assemblierung von zwei oder
5 mehr DNA-Molekülen zu mindestens einem rekombinanten DNA-Molekül sowie einen Träger
und ein Kit hierfür.

Das Ziel der synthetischen Biologie ist ein Engineering von lebenden Organismen mit
neuartigen Phänotypen, die in der Natur nicht existieren. Effiziente Methoden für das
10 Zusammenfügen von DNA-Fragmenten, die für die Erstellung von Multigenkonstrukten
erforderlich sind, stellen fundamentale Werkzeuge für die synthetische Biologie dar. Mehrere
geeignete Methoden der Neukombination sind in den letzten Jahren entwickelt worden
einschließlich der „Gibson Assembly“-Methode (Gibson et al. 2009, Nature Methods 6, 343-
345) und des „Golden Gate Cloning“ (Engler et al. 2008, Plos ONE 3 (11): e3647,
15 doi:10.1371/journal.pone.0003647). Beide Methoden erlauben das Zusammenfügen von
multiplen DNA-Fragmenten in einer Ein-Topf-Ein-Schritt-Reaktion mit einer extrem hohen
Effizienz. Mit beiden Methoden enthalten die meisten Kolonien nach einer Transformation der
Neukombinationsreaktion in kompetente E.-coli-Zellen das erwartete Konstrukt.

20 Obwohl die Verfügbarkeit effizienter DNA-Neukombinations-Methoden das Zusammenfügen
von DNA-Konstrukten erleichtern kann, ist die Gestaltung einer Klonierungsstrategie immer
noch ein limitierender Faktor. Große Multigenkonstrukte erfordern die Planung
aufeinanderfolgender Klonierungsschritte um Schritt für Schritt größere Konstrukte mit mehr
Genen zu generieren. Irgendwann enthalten große Konstrukte mit hoher Wahrscheinlichkeit
25 multiple Schnittstellen für eine Vielzahl von Restriktionsenzymen, was deren Verwendung für
das Einfügen weiterer Gene in das Konstrukt ausschließen kann und die Planung einer
Klonierungsstrategie zunehmend schwierig macht. Die Anwendung von
Standardisierungsprinzipien in solchen Systemen kann eine Lösung dieses Problems
ermöglichen. Standardisierung von Teilen besteht in der Definition von Standardstrukturen für
30 Konstrukte, die die Sequenzen für grundlegende genetische Elemente wie Promotoren,
codierende Sequenzen und Terminatoren enthalten. Solche biologischen Standardteile
(Grundbausteine) werden von Restriktionsschnittstellen flankiert. Restriktionsenzyme für diese

Stellen werden dann für das Zusammenfügen von diesen DNA-Fragmenten verwendet, um z.B. Transkriptionseinheiten zu generieren. Einige Restriktionsschnittstellen können von internen Sequenzen der Basismodule auch bewusst eliminiert werden, um die Verwendung der betreffenden Enzyme für weitere Assemblierungsschritte zu ermöglichen. Mehrere

5 Standardprozeduren sind vorgeschlagen worden, die sich in der Wahl der die Basismodule flankierenden Restriktionsschnittstellen unterscheiden (Cassini et al. 2015, Nat Rev Mol Cell Biol 16(9) 568-576). Das „Modular Cloning (MoClo)“-System ist ein Beispiel für eine solche standardisierte Klonierungsprozedur (Weber et al. 2011, Plos ONE, 6(2): e16765, doi: 10.1371/journal.pone.0016765; Patron et al. 2015, New Phytol., 208, 13-19).

10

Die Verwendung von standardisierten Einzelteilen erleichtert das Zusammenfügen großer Konstrukte, da eine universelle Klonierungsstrategie eingeschlagen werden kann, die unabhängig von der Natur der einzelnen Teile ist, die neu kombiniert werden sollen. Sie erleichtert ebenfalls die Wiederverwendung von Einzelteilen in vielen unterschiedlichen

15 Konstrukten, da alle Module vom gleichen Typ die gleichen Assemblierungseigenschaften haben und daher gegen andere Teile vom gleichen Typ ausgetauscht werden können.

Beispielsweise kann ein Promotor, der als Standardteil kloniert ist, für die Assemblierung von Transkriptionseinheiten gegen jeden anderen Standardpromotor ausgetauscht werden und es kann die gleiche Assemblierungprozedur verwendet werden.

20

Ein zusätzlicher Vorteil solcher standardisierter Module ist die Tatsache, dass diese Einzelteile auch von Wissenschaftlern anderer Laboratorien verwendet werden können, die die gleichen Standards benutzen. Man kann somit erwarten, dass die Anzahl solcher Module erheblich wächst, da Teile mit den gleichen Standards von vielen verschiedenen Laboratorien konstruiert

25 und benutzt werden können. Die Anzahl solcher biologischer Module, die für Zwecke der synthetischen Biologie generiert werden können ist theoretisch unbegrenzt. Beispielsweise könnten alle codierenden und regulatorischen Sequenzen irgendeines lebenden Organismus kloniert werden und als standardisierte biologische Module genutzt werden solange sie mit einem definierten Standard kloniert werden. Zusätzlich zu Modulen abgeleitet von lebenden

30 Organismen können auch synthetische Module, die in der Natur nicht existieren, generiert werden. Beispielsweise können Bibliotheken von synthetischen Promotoren erstellt werden, die

Segmente definierter Sequenzen sowie auch Segmente degenerierter Sequenzen enthalten (Brückner et al. 2015, Plant J. 82, 707-716).

Sobald solche biologischen Grundmodule erstellt worden sind, müssen sie für den späteren
5 Gebrauch gesichert werden. Solche DNA-Module werden gewöhnlich als gereinigte Plasmid-DNA in einer Pufferlösung gefroren bei -20 °C aufbewahrt. Alternativ können diese Module auch als Glycerinkulturen bei -80 °C aufbewahrt werden. Die Glycerinkultur enthält einen Bakterienstamm, der mit der das Standardmodul enthaltenden Plasmid-DNA transformiert worden ist. In diesem Fall muss vor der Verwendung in einer neuen Klonierung DNA aus frisch
10 kultivierten E.-coli-Zellen extrahiert werden. Da üblicherweise nicht die gesamte extrahierte und gereinigte Plasmid-DNA in einem Experiment verwendet wird, wird der Rest gewöhnlich bei -20 °C wie oben beschrieben für den weiteren Gebrauch eingefroren.

Es gibt zwei Probleme bei der Aufbewahrung von gereinigter Plasmid-DNA bei -20 °C .
15 Erstens, die Aufbewahrung von DNA bei niedriger Temperatur, d.h. -20 °C , ist sehr kostenaufwendig. Während das für eine begrenzte Anzahl von Proben noch akzeptabel ist, würde dieses für eine sehr große Probenzahl sehr teuer werden und eine große Anzahl von Gefriergeräten erfordern. Ein zweites Problem ist die Verschlechterung der DNA-Qualität mit steigender Lagerdauer selbst bei einer Lagerung bei -20 °C . Dieses kann zu reduzierter
20 Klonierungseffizienz oder sogar zum Scheitern von DNA-Assemblierungsreaktionen führen.

Eine Alternative zur Lagerung von DNA oder Bakterienstämmen bei -20 °C ist deren Aufbewahrung in trockener Form bei Raumtemperatur. Für Klonierungszwecke muss diese DNA bisher allerdings zunächst in Wasser oder Puffer solubilisiert und dann in E. coli
25 transformiert werden. Eine bakterielle Kolonie mit dem transformierten Plasmid wird dann in Flüssigmedium kultiviert, Plasmid-DNA extrahiert und schließlich die DNA-Konzentration der Plasmidpräparation gemessen. Nachfolgend kann die DNA für Klonierungszwecke verwendet werden. Diese Prozesse sind sehr zeitaufwendig und arbeitsintensiv.

30 Es besteht nach wie vor ein Bedarf, Assemblierungs- bzw. Klonierungsverfahren zu verbessern, insbesondere zu vereinfachen und kostengünstiger zu machen. Aufgabe der vorliegenden

Erfindung ist es daher, ein einfaches und kostengünstiges Assemblierungsverfahren für DNA-Moleküle bereit zu stellen.

Zur Lösung der Aufgabe wird erfindungsgemäß in einem ersten Aspekt ein Verfahren zur Ein-
5 Topf-Ein-Schritt-Assemblierung von zwei oder mehr DNA-Molekülen zu mindestens einem rekombinanten DNA-Molekül bereit gestellt, wobei die zwei oder mehr zu assemblierenden DNA-Moleküle in trockener Form auf oder in mindestens einem Träger vorliegend in einem Reaktionsgefäß mit einem geeigneten Reaktionsmedium zusammen gebracht werden.

10 Das erfindungsgemäße Verfahren schlägt die Verwendung von kostengünstig lagerfähigen trockenen DNA-Aliquots zum Einmalgebrauch für die direkte DNA-Assemblierung vor. Die Erfindung nutzt die Stabilität und die niedrigen Kosten einer DNA-Lagerung in trockenem Zustand bei Raumtemperatur aus, und erfordert keine Transformation bakterieller Zellen und die Extraktion von Plasmid-DNA vor der Klonierung.

15 Das erfindungsgemäße Verfahren sieht die Nutzung von DNA vor, die im trockenen Zustand auf oder in einem geeigneten Träger vorliegt, vorzugsweise in Aliquots in einer definierten Menge. Besonders bevorzugt ist, wenn jedes Aliquot einer trockenen DNA-Probe für eine Assemblierungs- bzw. Klonierungsreaktion ausreichend ist. Diese definierte DNA-Menge kann
20 z.B. für eine leichte Handhabung auf einem kleinen Stück Filterpapier oder einem Zellulosepartikel, beispielsweise einem Partikel aus mikrokristalliner Zellulose, aufgebracht sein. Das Klonieren würde dann beispielsweise durch Zugabe eines ersten Filterpapierstückchens oder Zellulosepartikels, beispielsweise eines Partikels aus mikrokristalliner Zellulose, mit beispielsweise einem Insert (codierendes Fragment) in ein
25 Reaktionsgefäß erfolgen, gefolgt von der Zugabe eines zweiten Filterpapiers oder Zellulosepartikels mit einem geeigneten Vektor. Für den Fall, dass das Klonieren mit dem „Golden-Gate-System“ mit Restriktionsenzym und Ligase durchgeführt wird, würde die Zugabe von Restriktionsligase-Puffer, Restriktionsenzym und Ligase folgen. Bei Verwendung der „Gibson Assembly“-Methode könnte die Zugabe von Exonuklease, DNA-Polymerase und
30 DNA-Ligase folgen. Selbstverständlich kann auch das Reaktionsmedium in einem Reaktionsgefäß vorgelegt werden und die DNA-Aliquots werden anschließend hinzugefügt. Wenn alle Komponenten gemeinsam im Reaktionsgefäß vorliegen, kehrt die trockene DNA in

eine lösliche Form zurück und kann sofort geschnitten und ligiert werden, was in der Assemblierung des gewünschten Produkts resultiert.

Unter einem „Verfahren zur Ein-Topf-Ein-Schritt-Assemblierung von zwei oder mehr DNA-Molekülen“ oder einer „Ein-Topf-Ein-Schritt-Assemblierungsmethode“ werden hier Verfahren
5 wie das „Golden Gate“- oder „Gibson-Assembly“-Verfahren verstanden, bei denen die Synthese des resultierenden rekombinanten DNA-Moleküls, beispielsweise eines Klonierungsvektors, in einem Schritt und in einem Reaktionsgefäß durchgeführt werden kann. Solche Verfahren unterscheiden sich von anderen Standard-Klonierungsmethoden dadurch,
10 dass DNA-spaltende bzw. -abbauende und DNA-ligierende bzw. aufbauende Prozesse nebeneinander ablaufen können, ohne dass die Synthese dadurch beeinträchtigt würde. Beispielsweise erfordert das „Golden-Gate“-Verfahren keine getrennten Schritte für Restriktionsverdau und Ligation, während dies bei anderen Standard-Klonierungsmethoden
15 nötig ist, was darauf zurückgeht, dass ligierte DNA-Fragmente nach der Ligation neu verdaut werden können, da die Restriktionsenzym-Schnittstellen für die Klonierung durch den Ligationsschritt wiederhergestellt werden.

Der Begriff „Assemblierung von zwei oder mehr DNA-Molekülen“ bedeutet die In-vitro-Synthese von zwei, drei, vier oder auch mehr, vorzugsweise unterschiedlichen, DNA-Molekülen zu einem einzigen DNA-Molekül. Beispielsweise kann ein Empfängervektor mit
20 DNA-Molekülen, die codierende oder regulatorische DNA-Sequenzen bilden oder enthalten, zu einem Klonierungsvektor assembliert werden. Der Begriff „zwei oder mehr DNA-Moleküle“ ist dabei selbstverständlich nicht einschränkend so zu verstehen, dass er sich nur auf die genannte Anzahl von Molekülen bezieht, beispielsweise ein einzelnes DNA-Molekül A und ein einzelnes
25 DNA-Molekül B. Vielmehr ist die Formulierung so zu verstehen, dass mindestens ein erstes DNA-Molekül (z.B. ein Empfängervektor) mit mindestens einem zweiten, vorzugsweise vom ersten verschiedenen, DNA-Molekül (z.B. mit einer codierenden DNA-Sequenz) assembliert wird. Ein mit einem anderen DNA-Molekül zu assemblierendes DNA-Molekül kann
30 beispielsweise auch in einem größeren Nukleinsäuremolekül bzw. -konstrukt, das linear oder ringförmig geschlossen sein kann, z.B. in einem Plasmid, enthalten sein, aus dem es im Verlauf der Reaktion herausgeschnitten und mit dem anderen DNA-Molekül assembliert wird.

Unter einem „geeigneten Reaktionsmedium“ wird hier ein vorzugsweise wässriges flüssiges Medium verstanden, in dem die trockenen DNA-Moleküle sich lösen und unter geeigneten Bedingungen miteinander reagieren können. Es kann sich beispielsweise um eine Pufferlösung handeln, die ggfs. geeignete Enzyme enthält wie z.B. DNA-Ligase und ein Restriktionsenzym des Typs IIs.

Unter einem „Mikroreaktionsgefäß“ wird hier ein Reaktionsgefäß verstanden, das Probenvolumina im Bereich von Nanolitern, Mikrolitern und maximal wenigen Millilitern fasst, beispielsweise von 0,005 bis 2 ml, vorzugsweise von beispielsweise 0,01 ml bis 1,5 ml oder von 0,05 bis 0,5 ml. Es kann sich beispielsweise um Gefäße aus Kunststoff, z.B. Polypropylen (PP), mit oder ohne Deckel handeln. Der Begriff umfasst aber auch die Näpfe („wells“) von beispielsweise Mikrotiterplatten oder dergleichen.

Wenn hier von einem „DNA-Molekül in trockener Form“ gesprochen wird, so bedeutet dies, dass der Träger mit dem darauf oder darin befindlichen DNA-Molekül vorzugsweise einen möglichst geringen Wassergehalt aufweist. Im Falle beispielsweise eines einfachen Filterpapiers als Träger kann das bedeuten, dass der Wassergehalt im Wesentlichen dem entspricht, der sich bei einfacher Lagerung bei Raumtemperatur und Umgebungsfeuchtigkeit einstellt. Im Falle beispielsweise eines beschichteten Trägers kann der Wassergehalt in der Umgebung der DNA-Moleküle aber auch deutlich unterhalb der Umgebungsfeuchte liegen. Es ist auch möglich, auf, in oder an dem Träger oder in dessen Umgebung ein geeignetes Trocknungsmittel vorzusehen, um das DNA-Molekül trocken zu halten.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren kann auch die Klonierung von mehr als einem Insert in einen Vektor unter Einsatz trockener DNA-Aliquots in einem Schritt durchgeführt werden. Beispielsweise kann die Assemblierung einer Transkriptionseinheit mit einem Promotor, einer codierenden Sequenz und einem Terminator in einem ausgewählten Vektor mittels vier trockener DNA-Proben durchgeführt werden, eine für den Empfängervektor sowie drei für jede der Grundeinheiten der Transkriptionseinheit. Alle vier Fragmente, die jeweils auf getrennten Trägern, z.B. Filterpapierstückchen oder Zellulosepartikeln, oder auch zumindest teilweise gemeinsam auf jeweils einem Träger, z.B. Filterpapierstück oder Zellulosepartikel, vorliegen können, würden zusammen mit Puffer und Enzymen in ein Reaktionsgefäß gegeben werden,

analog der Subklonierung eines Fragments wie oben beschrieben. Es ist zwar insbesondere zur Herstellung eines bestimmten rekombinanten DNA-Moleküls bevorzugt, dass jedes der zu assemblierenden DNA-Moleküle auf/in einem separaten Träger, vorzugsweise in einer für die Klonierung ausreichenden Menge, in getrockneter Form vorliegt. Grundsätzlich ist es aber auch
5 möglich, dass alle oder ein Teil der DNA-Moleküle auf/in einem gemeinsamen Träger vorliegen, beispielsweise der Empfängervektor auf/in einem ersten Träger und regulatorische/codierende DNA-Moleküle auf/in einem gemeinsamen zweiten Träger. Es ist auch möglich, auf/in einem Träger nur einen Typ DNA-Molekül vorzusehen, um eine Bibliothek solcher DNA-Moleküle auf/in einem, oder gegebenenfalls auch mehreren Trägern,
10 bereit stellen zu können. Beispielsweise könnte auf/in einem oder gegebenenfalls mehreren Trägern eine Anzahl von mehreren, z.B. 10, 20, 50 oder 100, verschiedenen Promotoren angeordnet sein. Dies kann vorteilhaft sein, um beispielsweise eine entsprechende Bibliothek unterschiedlicher DNA-Konstrukte herzustellen, die sich im Promotor unterscheiden. Ebenso ist es möglich, zwei oder mehr solcher Bibliotheken unterschiedlicher Typen von DNA-
15 Molekülen bereit zu stellen, um auf einfache Weise eine Vielzahl von verschiedenen Konstrukten herstellen zu können.

Das Verfahren eignet sich in besonderer Weise zur Durchführung von Assemblierungen von standardisierten DNA-Molekülen. Dabei handelt es sich um DNA-Moleküle, die in einer
20 standardisierten Form vorliegen, in der sie beispielsweise direkt in einem „Golden-Gate“- oder „Gibson-Assembly“-Verfahren einsetzbar sind. Insbesondere sind bei solchen standardisierten DNA-Molekülen die Verbindungsstellen, d.h. die zu ligierenden Enden, so aufeinander abgestimmt, dass eine Assemblierung auch mehrerer DNA-Moleküle in einem Ein-Topf-Ein-Schritt-Verfahren, beispielsweise einem „Golden-Gate“- oder „Gibson-Assembly“-Verfahren
25 ermöglicht ist.

Besonders bevorzugt handelt es sich um DNA-Moleküle, die für das „Golden-Gate“-Verfahren geeignet und vorzugsweise dafür standardisiert sind. Dabei sind die auf oder in dem Träger vorliegenden zwei oder mehr DNA-Moleküle vorzugsweise jeweils flankiert von
30 Restriktionsendonuklease-Typ-II-Schnittstellen mit entgegengesetzter Orientierung. Restriktionsendonukleasen vom Typ-II sind Restriktionsendonukleasen, deren Schnittstelle zu einer Seite außerhalb von ihrer asymmetrischen nicht-palindronischen Erkennungssequenz

liegt. Typ-IIs-Restriktionsendonukleasen sind dem Fachmann bekannt. Beispiele für Restriktionsendonukleasen von Typ II umfassen BsaI, BpiI, BsmBI, SapI und FokI. Der Begriff „Orientierung“ bezieht sich hier auf die Richtung von der Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease auf der DNA hin zur außerhalb davon zu einer Seite liegenden Schnittstelle.

Wie bereits angegeben, können die DNA-Moleküle auf/in dem Träger in einem größeren DNA-Konstrukt (linear oder kreisförmig) vorliegen. Die Schnittstellen der Restriktionsendonuklease vom Typ II sind in diesen Konstrukten vorzugsweise so orientiert, dass nach dem Schneiden das DNA-Molekül ohne die flankierenden Erkennungssequenzen resultiert. Im Falle eines Empfängervektors sind die Schnittstellen beispielsweise so orientiert, dass bei der durch die Restriktionsendonuklease katalysierten Spaltungsreaktion aus dem Konstrukt ein Empfängervektor hervorgeht, der keine Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease vom Typ-IIs mehr aufweist. Die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonuklease vom Typ II liegen daher im Falle eines Empfängervektors als einem der zu assemblierenden DNA-Moleküle außerhalb des Empfängervektors, während die Schnittstellen zum Empfängervektor gerichtet sind. Bei Nicht-Vektor-DNA, beispielsweise regulatorischen oder codierenden Sequenzen, z.B. Promotoren, Terminatoren etc., verhält es sich entsprechend so, dass die Schnittstellen vorzugsweise zu dem DNA-Molekül gerichtet sind. Derartige DNA-Moleküle sind besonders gut geeignet für das „Golden-Gate“-Verfahren.

Als Träger für die DNA kommt beispielsweise Filterpapier in Frage. Es kommen jedoch auch andere Träger in Frage, beispielsweise Zellulosepartikel (Zellulosekügelchen bzw. Zellulose-Beads), z.B. Kügelchen (Beads) aus mikrokristalliner Zellulose (MCC). Es ist lediglich erforderlich, den Träger mit einer definierten DNA-Menge beladen und den beladenen Träger handhaben zu können. Zum Beispiel könnte die DNA auch zusammen mit geeigneten Zuckerverbindungen wie Trehalose und/oder anderen Hilfsmitteln, wie z.B. Polyvinylalkohol, in Form einer Tablette getrocknet werden. Es ist auch möglich, beispielsweise Zellulosekügelchen mit der DNA zu beladen und die Zellulosekügelchen zu beschichten, beispielsweise mit Trehalose und/oder anderen Hilfsmitteln, wie z.B. Polyvinylalkohol. Geeignete Formulierungen für Tabletten oder Beschichtungen sind dem Fachmann bekannt. Vorzugsweise wird die Formulierung oder Beschichtung so gewählt, dass sie sich in dem

Reaktionsmedium leicht auflöst, um das DNA-Molekül freizusetzen. Der Träger kann eine beliebige Größe aufweisen, ist vorzugsweise aber so ausgestaltet und dimensioniert ist, dass er individuell als Ganzes und unverändert in einem Mikroreaktionsgefäß angeordnet werden kann, Der Träger kann ggfs. beispielsweise auch farblich markiert sein, um eine einfache optische
5 Unterscheidung zu ermöglichen.

In einem zweiten Aspekt betrifft die Erfindung auch einen Träger für den Einsatz in einem erfindungsgemäßen Verfahren nach dem ersten Aspekt, umfassend mindestens ein in trockener Form vorliegendes DNA-Molekül, das mit einem anderen DNA-Molekül assemblierbar ist,
10 wobei der Träger mit dem DNA-Molekül so ausgestaltet und dimensioniert ist, dass er individuell als Ganzes und unverändert in einem Mikroreaktionsgefäß angeordnet werden kann, und wobei der Träger das DNA-Molekül in einer Menge umfasst, die für eine Assemblierungsreaktion ausreicht. Beispiele für einen möglichen Träger sind ein Filterpapierstück oder ein Zellulosepartikel geeigneter Form und Größe oder eine Tablette
15 geeigneter Größe und Zusammensetzung mit dem darin enthaltenen DNA-Molekül. Es ist auch möglich, eine Mischung aus dem DNA-Molekül und beispielsweise einem Zucker, z.B. Trehalose, oder einer anderen Substanz oder Zusammensetzung herzustellen, die bei Trocknung eine das DNA-Molekül umfassende Matrix bildet, die Mischung auf einen Träger, z.B. Filterpapier oder Zellulosekügelchen, aufzubringen und zu trocknen. Es ist zwar bevorzugt,
20 dass auf einem Träger lediglich ein bestimmtes DNA-Molekül (z.B. einen Promotor, einen Terminator oder dergleichen, ggfs. in einem DNA-Konstrukt, z.B. einem Plasmid enthalten) vorliegt. Es ist grundsätzlich aber auch möglich, zwei oder mehrere DNA-Moleküle auf einem Träger vorzusehen.

25 Die Formulierung, wonach der Träger „so ausgestaltet und dimensioniert ist, dass er individuell als Ganzes und unverändert in einem Mikroreaktionsgefäß angeordnet werden kann“ bedeutet insbesondere, dass der Träger mit dem darauf oder darin befindlichen DNA-Molekül ausreichend klein und stabil ist, um per Hand oder auch maschinell, z.B. per Roboter, in ein Mikroreaktionsgefäß, z.B. ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß, verbracht zu werden. Beispiele für
30 geeignete Träger sind quadratische Filterpapierstücke mit beispielsweise 0,5x0,5 mm, 1x1 mm, 1,5x1,5 mm oder 2x2 mm Kantenlänge, oder runde Filterpapierstücke oder Zellulosebeads mit beispielsweise einem Durchmesser von 0,5–3, vorzugsweise 0,5–2,5, besonders bevorzugt 0,5–

2 mm Durchmesser. Es kommen aber grundsätzlich auch sehr viel kleinere Träger, beispielsweise von unter 0,5 mm Kantenlänge oder Durchmesser in Frage.

Die Formulierung, wonach der Träger „das DNA-Molekül in einer Menge umfasst, die für eine
5 Assemblierungsreaktion ausreicht“ bedeutet insbesondere, dass auf oder (beispielsweise im Fall einer Tablette) in dem Träger in trockener Form eine solche Menge des jeweiligen DNA-Moleküls vorhanden ist, dass nach Lösung des DNA-Moleküls in der Reaktionslösung eine Assemblierungsreaktion stattfindet. Eine ausreichende Menge ist insbesondere eine solche Menge, die ausreicht, um eine Menge rekombinantes DNA-Molekül zu erzeugen, die für
10 beispielsweise eine Transformation von E-coli-Zellen ausreicht. Eine ausreichende Menge kann beispielsweise eine auf/in dem Träger vorliegende Menge von 1–100 oder mehr fmol sein, beispielsweise eine Menge von 5, 10, 20, 25, 30 oder 40 fmol.

Die Erfindung stellt in einem dritten Aspekt auch ein Kit zur Durchführung des
15 erfindungsgemäßen Verfahrens bereit, wobei das Kit mindestens einen Träger gemäß dem oben beschriebenen zweiten Aspekt der Erfindung umfasst. Vorzugsweise umfasst das Kit zwei oder mehr zu assemblierende DNA-Moleküle, wobei jedes der zwei oder mehr DNA-Moleküle vorzugsweise auf/in einem separaten Träger in einer für die Assemblierung ausreichenden Menge vorliegt.

20 Bei den DNA-Molekülen handelt es sich vorzugsweise um standardisierte DNA-Moleküle, besonders bevorzugt um an das „Golden-Gate“-Verfahren angepasste DNA-Moleküle, wie oben beschrieben. Das erfindungsgemäße Kit kann, muss aber nicht, alle für eine bestimmte beabsichtigte Assemblierung erforderlichen DNA-Moleküle umfassen. Beispielsweise kann das
25 Kit auch einen Satz von Promotoren enthalten, jedoch keinen Terminator und/oder einen Vektor. Das Kit kann auch bloß einen Satz eines Typs von DNA-Molekülen umfassen, beispielsweise einen Satz von Promotoren, wie oben bereits erwähnt.

Bevorzugt umfasst das erfindungsgemäße Kit auch a) eine Restriktionsendonuklease vom Typ
30 IIs und eine DNA-Ligase oder b) eine Exonuklease, eine DNA-Polymerase und eine DNA-Ligase. In diesen bevorzugten Ausführungsformen ist das Kit besonders geeignet zur Durchführung des „Golden-Gate“- oder „Gibson-Assembly“-Verfahrens für die Klonierung.

Die Erfindung wird im Folgenden anhand der beigefügten Figuren und Ausführungsbeispielen rein zu Veranschaulichungszwecken näher beschrieben.

5 Figur 1 Schematische Darstellung einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Figur 2 Schematischer Aufbau von Insert- und Vektor-Plasmiden für den Einsatz bei der in Figur 1 dargestellten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens für den Fall einer „Golden-Gate“-Klonierung.

10

Figur 1 zeigt schematisch eine Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens. Aliquots einer DNA-Präparation 1 des Empfängervektors und einer DNA-Präparation 2 eines Inserts werden in geeigneter Menge auf separate Filterpapierscheiben 3 aufgebracht. Die mit DNA beladenen Filterpapierscheiben 3 werden getrocknet und bis zur Verwendung in trockener Umgebung z.B. bei Raumtemperatur gelagert. Jeweils eine Filterpapierscheibe 3 mit Vektor- und Insertpräparation wird in ein Reaktionsgefäß 4 gegeben und mit einer Reaktionslösung in Kontakt gebracht, die beispielsweise Restriktionsenzym und Ligase enthält. Nach Inkubation der Assemblierungsreaktionsmischung wird beispielsweise E. coli mit dem in dem flüssigen Überstand enthaltenen rekombinanten Plasmid transformiert.

20

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

25 40 fmol (2,4 µL) von Plasmid pICH50251 (Aufbau siehe Fig. 2 links; dargestellte Sequenzabschnitte in den SEQ ID NO: 1, 2) wurden auf ein kleines Stückchen Filterpapier 3 (quadratisch mit 2 mm Kantenlänge) pipettiert, das aus einem größeren Filterpapier (Sartorius, Klasse 6, 80g/m² FT 3-312-070) ausgeschnitten wurde. 40 fmol (1,8 µL) Plasmid pAGM6752 (s. Figur 2, rechts; dargestellte Sequenzabschnitte in den SEQ ID NO: 3, 4) wurden auf ein
30 zweites Filterpapierstückchen 3 von ähnlicher Größe und Beschaffenheit pipettiert. Die beiden Filterpapierstückchen 3 wurden dann bei Raumtemperatur getrocknet und für 24 h trocken aufbewahrt.

Die beiden Filterpapierstückchen 3 wurden in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß 4 gegeben und mit 3
µL 10x Promega Ligasepuffer, 1,5 µL *Bsa*I (15 Units, NEB), 1,5 µL Ligase (4,5 Units,
Promega) und 24 µL Wasser für ein Gesamtvolumen von 30 µL versetzt. Das
5 Reaktionsgefäß 4 wurde 1 h bei 37°C inkubiert, gefolgt von 5 min bei 50 °C und 5 min bei
80 °C.

Die gesamte Ligationsreaktion wurde in 50 µL *E. coli* DH10b kompetente Zellen mittels
Hitzeschock transformiert. 500 µL LB Flüssigmedium wurden zu den Zellen zugefügt und für
10 45 min bei 37°C inkubiert. 50 µL dieses Transformationsansatzes wurden auf
Selektionsmedium ausplattiert. Eine ungefähr gleiche Anzahl von blauen und weißen Kolonien
wurde erhalten (jeweils etwa 130 Kolonien). Vier weiße Kolonien wurden gepickt und in
Flüssigmedium kultiviert. Daraus wurde Plasmid-DNA isoliert, mit Restriktionsverdau
analysiert, und als korrespondierend zu dem erwarteten Konstrukt befunden.

15

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Klonierung direkt aus der getrockneten, auf einen
Filterpapierträger aufgebracht DNA-Probe erfolgen kann, ohne die Notwendigkeit, den
Vektor und das Insert-DNA-Fragment in Bakterienstämme für Plasmidpräparationen
rückzutransformieren.

20

Beispiel 2

DNA von den Plasmiden pICH47732 (Insert; äquivalent zu Plasmid pICH50251 hinsichtlich
der Restriktionsstellen für die „Golden Gate“-Assemblierung; Aufbau s. Fig. 3 links;
25 dargestellte Sequenzabschnitte in den SEQ ID NO: 5, 6) und pICH42301 (Vektor; äquivalent zu
dem Plasmid pAGM6752 hinsichtlich der Restriktionsstellen für die „Golden-Gate“-
Assemblierung; s. Fig. 3 rechts; dargestellte Sequenzabschnitte in den SEQ ID NO: 7, 8)
wurden unter Verwendung des Macherey-Nagel-Miniprep-Kits „NucleoSpin® Plasmid“
aufbereitet. Die DNA-Konzentrationen, die unter Verwendung eines „NanoDrop“-UV-Vis-
30 Spektralphotometers (Thermo Fisher Scientific Inc.) gemessen wurden, betragen 275 ng und
172 ng pro Mikroliter bzw. 89 und 82 fmol pro Mikroliter.

DNA für beide Plasmide wurde getrennt zu sterilen MCC-Beads, d.h. Kügelchen aus mikrokristalliner Zellulose (Cellets® 700, HARKE Pharma GmbH), in zwei separaten Reaktionsgefäßen gegeben und jeweils vier gesonderten Behandlungen unterzogen:

- 5 Behandlung 1: Zu etwa 55 Kügelchen in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß wurden 10 µL DNA und 10 µL Wasser gegeben.

Behandlung 2: Zu etwa 55 Kügelchen in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß wurden 10 µL DNA und 10 µL einer 5% Trehalose-Lösung (steril) gegeben.

10

Behandlung 3: Zu etwa 55 Kügelchen in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß wurden 10 µL DNA und 10 µL einer 4% PVA-Lösung (4% Polyvinylalkohol in 200 mM Tris-HCl, pH 8,0; steril) gegeben.

- 15 Behandlung 4: Zu etwa 55 Kügelchen in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß wurden 10 µL DNA und 10 µL einer Trehalose-PVA-Lösung (2% Trehalose, 4% Polyvinylalkohol, in 200 mM Tris-HCl, pH 8,0; steril) gegeben.

- 20 DNA und Kügelchen der 8 Reaktionsgefäße wurden über Nacht bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Die zugegebene DNA-Menge sollte für jedes Plasmid 15 bis 16 fmol pro Kügelchen betragen.

- 25 Am folgenden Tag wurden jeweils ein mit pICH47732 beschichtetes Kügelchen und ein mit pICH42301 beschichtetes Kügelchen (beide aus der gleichen Behandlung) in ein gemeinsames PCR-Reaktionsgefäß gegeben. Dazu wurden 12 µl steriles H₂O, 1,5 µL 10x Ligationspuffer, 1 µL Ligase und 0,5 µl BsaI-Restriktionsenzym gegeben. Das Reaktionsgefäß wurde verschlossen, mit den Fingern angestoßen und dann in einen Thermocycler mit den folgenden Parametern gebracht: 4 Stunden Inkubation bei 37 °C, gefolgt von 5 min Inkubation bei 50 °C und 5 min bei 80 °C. Der Überstand wurde mittels Hitzeschock in kompetente E.-coli-Zellen transformiert. 30 µL der 565 µL Transformationsmischung wurden auf LB-Platten plattiert, die X-Gal und Carbenicillin enthielten. Die Platten 1 bis 4 wiesen die folgenden Kolonien auf:
- 30

Behandlung 1: 155 weiße Kolonien, geschätzt 23250 für die gesamte Transformation.

Behandlung 2: 282 weiße Kolonien, geschätzt 42300 für die gesamte Transformation.

Behandlung 3: 196 weiße Kolonien, geschätzt 29400 für die gesamte Transformation.

Behandlung 4: 143 weiße Kolonien, geschätzt 21450 für die gesamte Transformation.

5

Für alle Behandlungen war die Mehrzahl der Kolonien weiß und eine Minderheit blau. Aus zwei weißen Kolonien pro Behandlung wurde DNA extrahiert. Bei allen wurde gefunden, dass sie das korrekte Konstrukt enthielten.

- 10 Das Klonieren unter Verwendung von MCC-Beads, die mit trockener DNA beschichtet sind, erwies sich somit als sehr effizient.

Weitere Experimente wurden durchgeführt, um eine längere Trocknungszeit vor dem Klonieren zu testen und die Zusammensetzung der DNA-Lösung zu variieren.

15

DNA für beide Plasmide wurde getrennt zu sterilen MCC-Beads (Cellets® 700, HARKE Pharma GmbH) in zwei getrennten Reaktionsgefäßen gegeben und den folgenden drei Behandlungen unterzogen:

- 20 Behandlung 5: Zu etwa 55 Kügelchen in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 10 µL DNA und 10 µL einer sterilen 4% PVA-Lösung (4 % Polyvinylalkohol in 200 mM Tris-HCl, pH 8,0) gegeben (gleiche Zusammensetzung wie Behandlung 3).

- 25 Behandlung 6: Zu etwa 55 Kügelchen in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 10 µL DNA, 4 µL einer sterilen 4% PVA-Lösung (4% Polyvinylalkohol in 200 mM Tris-HCl, pH 8,0) und 6 µL Wasser gegeben.

- 30 Behandlung 7: Zu etwa 55 Kügelchen in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 10 µL DNA, 2 µL einer sterilen 4% PVA-Lösung (4 % Polyvinylalkohol in 200 mM Tris-HCl, pH 8,0) und 8 µL Wasser zugegeben.

DNA und Kügelchen der 6 Reaktionsgefäße wurden bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

Zwei Wochen später wurden Klonierungsreaktionen mit einem Kügelchen des Inserts und einem Kügelchen des Vektors, wie zuvor für die Behandlungen 1 bis 4 beschrieben, durchgeführt. Die Transformation wurde wie für das vorhergehende Experiment beschrieben
5 durchgeführt, was die folgende Anzahl von Kolonien ergab:

Behandlung 5: 250 weiße Kolonien, geschätzt 37500 für die gesamte Transformation.

Behandlung 6: 181 weiße Kolonien, geschätzt 27150 für die gesamte Transformation.

Behandlung 7: 172 weiße Kolonien, geschätzt 25800 für die gesamte Transformation.

10

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Kügelchen für mindestens 2 Wochen bei Raumtemperatur stabil sein können und nach wie vor für eine effiziente Klonierung geeignet sind.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Ein-Topf-Ein-Schritt-Assemblierung von zwei oder mehr DNA-Molekülen zu mindestens einem rekombinanten DNA-Molekül, wobei die zwei oder mehr zu assemblierenden DNA-Moleküle in trockener Form auf oder in mindestens einem Träger vorliegend in einem Reaktionsgefäß mit einem geeigneten Reaktionsmedium zusammen gebracht werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die auf oder in dem Träger vorliegenden zwei oder mehr DNA-Moleküle jeweils flankiert sind von Restriktionsendonuklease-Typ-II-Schnittstellen mit entgegengesetzter Orientierung.
3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die zwei oder mehr DNA-Moleküle auf einem Filterpapierstück, Zellulosepartikel oder in einer Tablette formuliert vorliegend in dem Reaktionsgefäß mit dem Reaktionsmedium zusammen gebracht werden.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die zwei oder mehr DNA-Moleküle jeweils auf oder in einem separaten Träger in getrockneter Form vorliegend in dem Reaktionsgefäß mit dem Reaktionsmedium zusammen gebracht werden.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die zwei oder mehr DNA-Moleküle in einem Reaktionsmedium zusammen gebracht werden, das a) eine Restriktionsendonuklease vom Typ II und eine DNA-Ligase oder b) eine Exonuklease, eine DNA-Polymerase und eine DNA-Ligase enthält.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die zwei oder mehr DNA-Moleküle jeweils in einer für die Assemblierung ausreichenden Menge auf oder in dem Träger vorliegend in einem Reaktionsgefäß mit einem geeigneten Reaktionsmedium zusammen gebracht werden.
7. Träger für den Einsatz in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, umfassend mindestens ein darauf oder darin in trockener Form vorliegendes DNA-Molekül, das mit einem

anderen DNA-Molekül assemblierbar ist, wobei der Träger mit dem DNA-Molekül so ausgestaltet und dimensioniert ist, dass er individuell als Ganzes und unverändert in einem Mikroreaktionsgefäß angeordnet werden kann, und wobei der Träger das DNA-Molekül in einer Menge umfasst, die für eine Assemblierungsreaktion insbesondere nach dem „Golden-Gate“-Verfahren ausreicht, und wobei das DNA-Molekül jeweils flankiert ist von Restriktionsendonuklease-Typ-II-Schnittstellen mit entgegengesetzter Orientierung.

8. Träger nach Anspruch 7, wobei der Träger ein Filterpapierstück, ein Zellulosepartikel oder eine Tablette mit dem darin enthaltenen DNA-Molekül ist oder umfasst.

9. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 6, umfassend mindestens einen Träger nach Anspruch 7 oder 8.

10. Kit nach Anspruch 9, umfassend zwei oder mehr zu assemblierende DNA-Moleküle, wobei jedes der zwei oder mehr DNA-Moleküle auf oder in einem separaten Träger in einer für die Assemblierung ausreichenden Menge vorliegt.

11. Kit nach einem der Ansprüche 9 oder 10, weiterhin umfassend a) eine Restriktionsendonuklease vom Typ II und eine DNA-Ligase oder b) eine Exonuklease, eine DNA-Polymerase und eine DNA-Ligase.

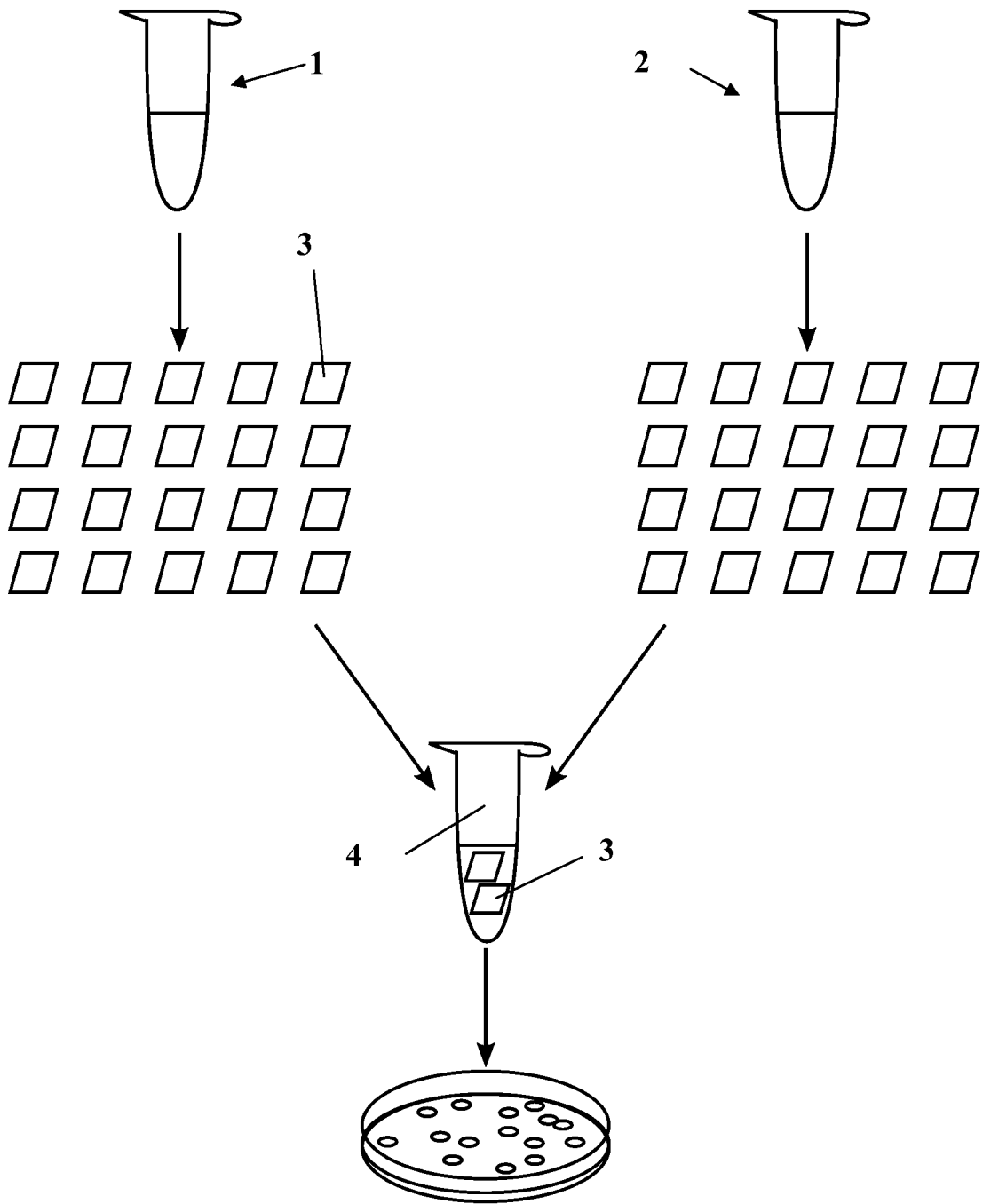


Fig. 1

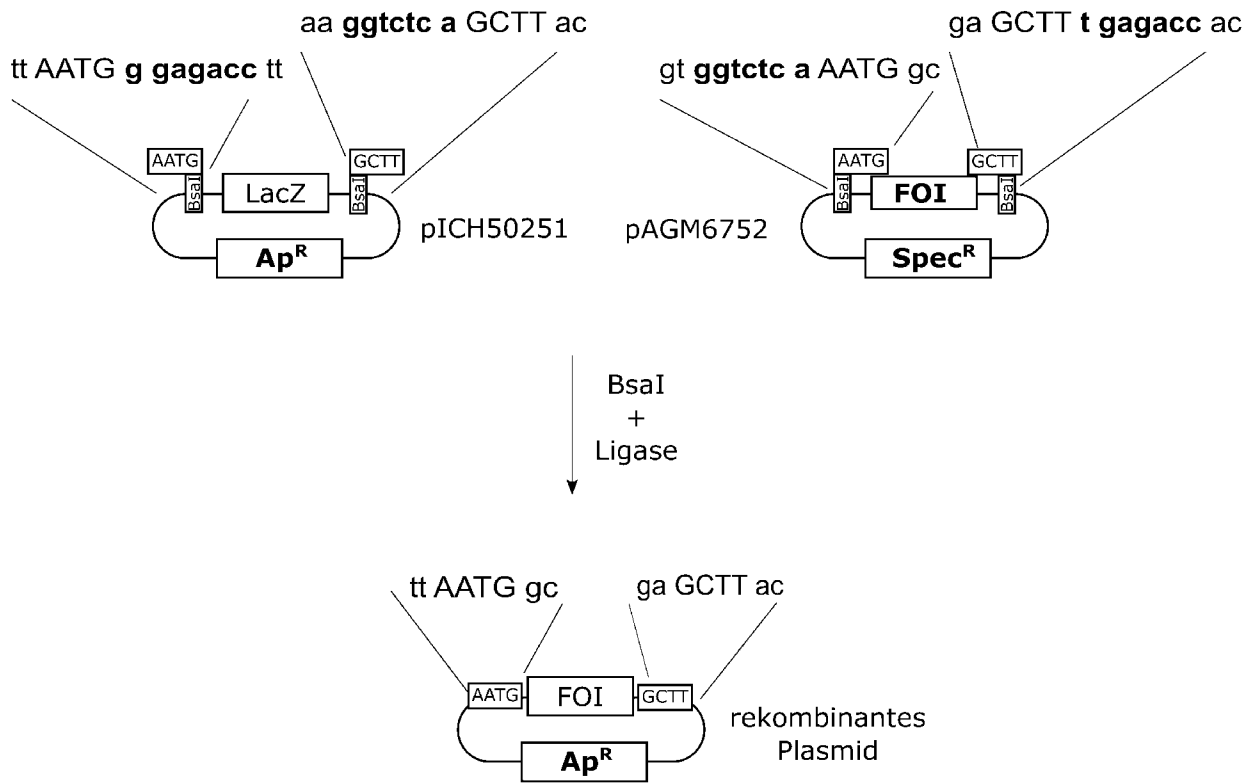


Fig. 2

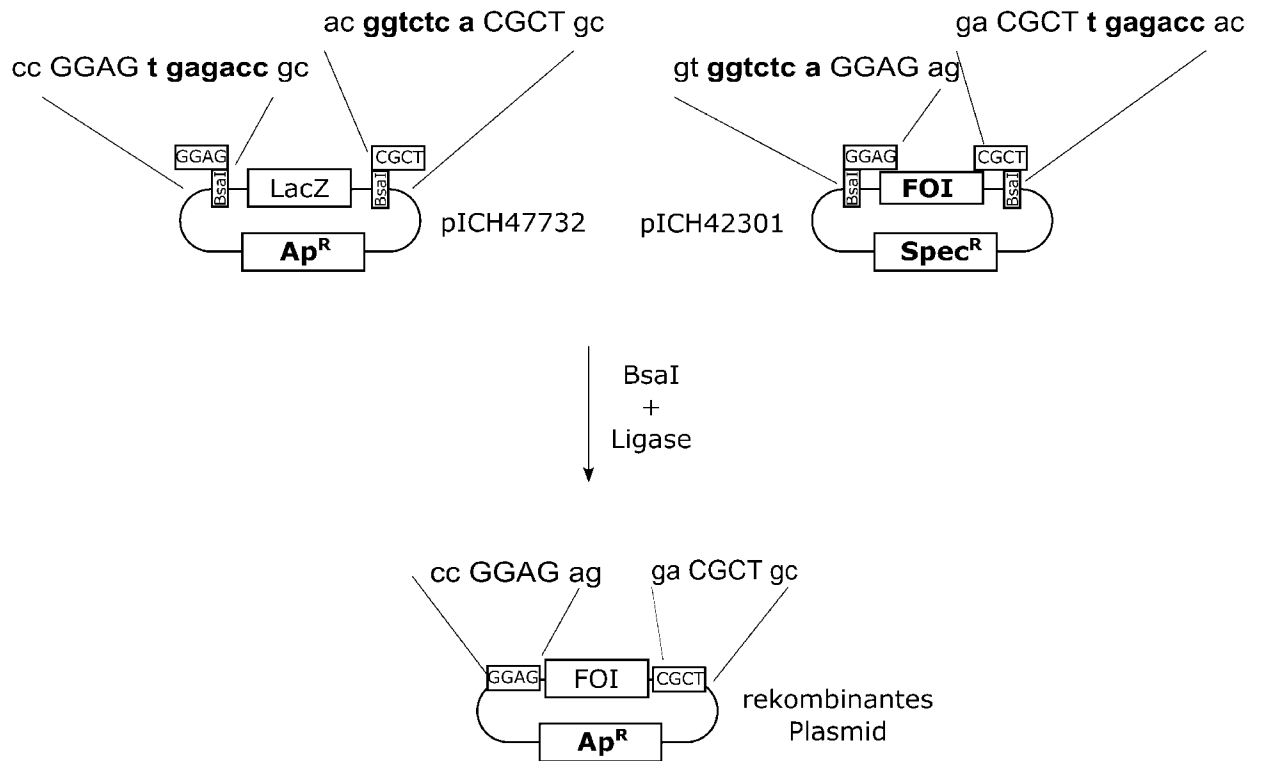


Fig. 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/DE2017/200014

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/68 C12N15/66 C12N15/10
ADD.
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q C12N
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2012/010708 A1 (AJ INNUSCREEN GMBH [DE]; HILLEBRAND TIMO [DE]; GRASER ELMARA [DE]; DAS) 26 January 2012 (2012-01-26) the whole document -----	1-11
Y	WO 2015/057330 A1 (LIFE TECHNOLOGIES CORP) 23 April 2015 (2015-04-23) page 4 - page 8; claims 1,3,7-8, -----	1-11
Y	WO 2014/004393 A1 (GEN9 INC [US]) 3 January 2014 (2014-01-03) page 2 - page 7; claims 1-4 -----	1-7
	-/--	

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search 18 May 2017	Date of mailing of the international search report 01/06/2017
--	--

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Vix, Olivier
--	--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/DE2017/200014

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ERNST WEBER ET AL: "A Modular Cloning System for Standardized Assembly of Multigene Constructs", PLOS ONE, vol. 6, no. 2, 18 February 2011 (2011-02-18), page e16765, XP055110994, ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0016765 cited in the application the whole document	1-7
Y	ENGLER C ET AL: "A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability", PLOS ONE, PUBLIC LIBRARY OF SCIENCE, US, vol. 3, no. 11, 5 November 2008 (2008-11-05), pages E3647-1, XP002613221, ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0003647 the whole document	1-7
Y	WO 2015/011203 A1 (GE HEALTHCARE UK LTD [GB]) 29 January 2015 (2015-01-29) the whole document	7-11
Y	SIYING MA ET AL: "DNA synthesis, assembly and applications in synthetic biology", CURRENT OPINION IN CHEMICAL BIOLOGY, vol. 16, no. 3-4, 1 August 2012 (2012-08-01), pages 260-267, XP055212288, ISSN: 1367-5931, DOI: 10.1016/j.cbpa.2012.05.001 the whole document	1-7
Y	Nicola J Patron ET AL: "Standards for plant synthetic biology: a common syntax for exchange of DNA parts", New Phytologist, 1 October 2015 (2015-10-01), pages 13-19, XP055372645, England DOI: 10.1111/nph.13532 Retrieved from the Internet: URL: http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/nph.13532/asset/nph13532.pdf?v=1&t=j2pww4kj&s=79c87eb366c615bda39b895b70e264395f9a2dd1 the whole document	1-7
Y	WO 90/03959 A1 (UNIV SOUTHERN AUSTRALIA [AU]) 19 April 1990 (1990-04-19) the whole document	7-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/DE2017/200014

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012010708	A1	26-01-2012	DE 102010038330 A1 EP 2596129 A1 US 2013280695 A1 WO 2012010708 A1

WO 2015057330	A1	23-04-2015	CN 105637100 A EP 3058087 A1 US 2015111214 A1 US 2016251709 A1 WO 2015057330 A1

WO 2014004393	A1	03-01-2014	AU 2013280661 A1 CA 2877823 A1 CN 104685116 A EP 2864531 A1 JP 2015523866 A US 2015191719 A1 WO 2014004393 A1

WO 2015011203	A1	29-01-2015	EP 3024919 A1 JP 2016524921 A US 2016152970 A1 WO 2015011203 A1

WO 9003959	A1	19-04-1990	CA 2000192 A1 WO 9003959 A1

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. C12Q1/68 C12N15/66 C12N15/10 ADD.		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) C12Q C12N		
Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 2012/010708 A1 (AJ INNUSCREEN GMBH [DE]; HILLEBRAND TIMO [DE]; GRASER ELMARA [DE]; DAS) 26. Januar 2012 (2012-01-26) das ganze Dokument -----	1-11
Y	WO 2015/057330 A1 (LIFE TECHNOLOGIES CORP) 23. April 2015 (2015-04-23) Seite 4 - Seite 8; Ansprüche 1,3,7-8, -----	1-11
Y	WO 2014/004393 A1 (GEN9 INC [US]) 3. Januar 2014 (2014-01-03) Seite 2 - Seite 7; Ansprüche 1-4 -----	1-7
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
18. Mai 2017		01/06/2017
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Vix, Olivier

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	ERNST WEBER ET AL: "A Modular Cloning System for Standardized Assembly of Multigene Constructs", PLOS ONE, Bd. 6, Nr. 2, 18. Februar 2011 (2011-02-18), Seite e16765, XP055110994, ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0016765 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-7
Y	ENGLER C ET AL: "A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability", PLOS ONE, PUBLIC LIBRARY OF SCIENCE, US, Bd. 3, Nr. 11, 5. November 2008 (2008-11-05), Seiten E3647-1, XP002613221, ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0003647 das ganze Dokument	1-7
Y	WO 2015/011203 A1 (GE HEALTHCARE UK LTD [GB]) 29. Januar 2015 (2015-01-29) das ganze Dokument	7-11
Y	SIYING MA ET AL: "DNA synthesis, assembly and applications in synthetic biology", CURRENT OPINION IN CHEMICAL BIOLOGY, Bd. 16, Nr. 3-4, 1. August 2012 (2012-08-01), Seiten 260-267, XP055212288, ISSN: 1367-5931, DOI: 10.1016/j.cbpa.2012.05.001 das ganze Dokument	1-7
Y	Nicola J Patron ET AL: "Standards for plant synthetic biology: a common syntax for exchange of DNA parts", New Phytologist, 1. Oktober 2015 (2015-10-01), Seiten 13-19, XP055372645, England DOI: 10.1111/nph.13532 Gefunden im Internet: URL: http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/nph.13532/asset/nph13532.pdf?v=1&t=j2pww4kj&s=79c87eb366c615bda39b895b70e264395f9a2dd1 das ganze Dokument	1-7
Y	WO 90/03959 A1 (UNIV SOUTHERN AUSTRALIA [AU]) 19. April 1990 (1990-04-19) das ganze Dokument	7-11

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2017/200014

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2012010708 A1	26-01-2012	DE 102010038330 A1	01-03-2012
		EP 2596129 A1	29-05-2013
		US 2013280695 A1	24-10-2013
		WO 2012010708 A1	26-01-2012

WO 2015057330 A1	23-04-2015	CN 105637100 A	01-06-2016
		EP 3058087 A1	24-08-2016
		US 2015111214 A1	23-04-2015
		US 2016251709 A1	01-09-2016
		WO 2015057330 A1	23-04-2015

WO 2014004393 A1	03-01-2014	AU 2013280661 A1	22-01-2015
		CA 2877823 A1	03-01-2014
		CN 104685116 A	03-06-2015
		EP 2864531 A1	29-04-2015
		JP 2015523866 A	20-08-2015
		US 2015191719 A1	09-07-2015
		WO 2014004393 A1	03-01-2014

WO 2015011203 A1	29-01-2015	EP 3024919 A1	01-06-2016
		JP 2016524921 A	22-08-2016
		US 2016152970 A1	02-06-2016
		WO 2015011203 A1	29-01-2015

WO 9003959 A1	19-04-1990	CA 2000192 A1	05-04-1990
		WO 9003959 A1	19-04-1990
