

【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3年7月26日(2021.7.26)

【公表番号】特表2020-524989(P2020-524989A)

【公表日】令和2年8月27日(2020.8.27)

【年通号数】公開・登録公報2020-034

【出願番号】特願2019-567377(P2019-567377)

【国際特許分類】

C 12 N 15/09 (2006.01)

C 12 N 9/10 (2006.01)

C 12 N 9/16 (2006.01)

【F I】

C 12 N 15/09 1 0 0

C 12 N 9/10 Z N A

C 12 N 9/16 Z

C 12 N 9/16

【手続補正書】

【提出日】令和3年6月9日(2021.6.9)

【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】

核酸アセンブリのための方法であって、

(a) 複数のポリヌクレオチドを提供する工程であって、複数のポリヌクレオチドの各々は複数のポリヌクレオチドの別のポリヌクレオチドに対して配列相同性の末端領域を含まない、工程；及び

(b) 複数のポリヌクレオチドをエキソヌクレアーゼ、フラップエンドヌクレアーゼ、ポリメラーゼ、及びリガーゼと混合する工程であって、複数のポリヌクレオチドは隣接するポリヌクレオチド間の相補的配列に基づいて漸進的な所定の順序でアニールされる、工程

を含むことを特徴とする方法。

【請求項2】

エキソヌクレアーゼはエキソヌクレアーゼI I Iである、ことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】

フラップエンドヌクレアーゼは、フラップエンドヌクレアーゼ1、エキソヌクレアーゼ1、X P G、D n a 2、又はG E N 1である、ことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項4】

ポリメラーゼは5' ~ 3' ポリメラーゼ活性を含む、ことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項5】

ポリメラーゼはD N A ポリメラーゼである、ことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項6】

リガーゼは少なくとも2つの核酸の結合を触媒する、ことを特徴とする請求項1に記載の方法。

**【請求項 7】**

フランクレアーゼ 1 の濃度は約 0 . 3 2 U ~ 約 4 . 8 U の範囲である、ことを特徴とする請求項 3 に記載の方法。

**【請求項 8】**

エキソヌクレアーゼ I I I の濃度は約 0 . 1 U ~ 約 1 0 U の範囲である、ことを特徴とする請求項 2 に記載の方法。

**【請求項 9】**

ポリメラーゼの濃度は約 0 . 0 1 U ~ 約 2 U の範囲である、ことを特徴とする請求項 4 に記載の方法。

**【請求項 10】**

リガーゼの濃度は約 4 . 0 U ~ 約 8 . 0 U の範囲である、ことを特徴とする請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 11】**

核酸アセンブリのための方法であって、

( a ) 第 1 の二本鎖核酸を提供する工程；

( b ) 第 2 の二本鎖核酸を提供する工程；

( c ) 5 ' ~ 3 ' の順序で、5 ' フランキングアダプター配列、第 1 の二本鎖核酸に対する第 1 の相同性配列、第 2 の二本鎖核酸に対する第 2 の相同性配列、及び 3 ' フランキングアダプター配列を含む第 3 の二本鎖核酸を提供する工程であって、ここで、第 1 の二本鎖核酸、第 2 の二本鎖核酸、及び第 3 の二本鎖核酸は末端領域に非相同性配列を含む、工程；及び

( d ) 第 1 の二本鎖核酸、第 2 の二本鎖核酸、及び第 3 の二本鎖核酸を、エキソヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ、ポリメラーゼ、及びリガーゼを含む反応混合物と混合する工程

を含むことを特徴とする方法。

**【請求項 12】**

エキソヌクレアーゼはエキソヌクレアーゼ I I I である、ことを特徴とする請求項 11 に記載の方法。

**【請求項 13】**

エンドヌクレアーゼは、フランクレアーゼ 1 、エキソヌクレアーゼ 1 、 X P G 、 D n a 2 、又は G E N 1 である、ことを特徴とする請求項 11 に記載の方法。

**【請求項 14】**

ポリメラーゼは D N A ポリメラーゼである、ことを特徴とする請求項 11 に記載の方法。

**【請求項 15】**

エキソヌクレアーゼの濃度は、約 0 . 1 U ~ 約 1 0 U の範囲であり、エンドヌクレアーゼの濃度は約 0 . 3 2 U ~ 約 4 . 8 U の範囲であり、ポリメラーゼの濃度は約 0 . 0 1 U ~ 約 2 U の範囲であり、リガーゼの濃度は約 4 . 0 U ~ 約 8 . 0 U の範囲である、ことを特徴とする請求項 12 に記載の方法。

**【請求項 16】**

核酸アセンブリのための方法であって、

( a ) 5 ' ~ 3 ' の順で、5 ' フランキングアダプター配列、相同性配列、挿入配列、及び 3 ' フランキングアダプター配列を含む第 1 の二本鎖核酸を提供する工程；

( b ) 5 ' ~ 3 ' の順で、5 ' フランキングアダプター配列、相同性配列、挿入配列、及び 3 ' フランキングアダプター配列を含む第 2 の二本鎖核酸を提供する工程；及び

( c ) 第 1 の二本鎖核酸及び第 2 の二本鎖核酸を、エキソヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ、ポリメラーゼ、及びリガーゼを含む反応混合物と混合する工程

を含むことを特徴とする方法。

**【請求項 17】**

エキソヌクレアーゼはエキソヌクレアーゼ I I I 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】

エンドヌクレアーゼは、ラップエンドヌクレアーゼ1、エキソヌクレアーゼ1、XPG、Dna2、又はGEN1である、ことを特徴とする請求項16に記載の方法。

【請求項 19】

ポリメラーゼはDNAポリメラーゼである、ことを特徴とする請求項16に記載の方法

。

【請求項 20】

エキソヌクレアーゼの濃度は約0.1U～約10Uの範囲であり、エンドヌクレアーゼの濃度は約0.32U～約4.8Uの範囲であり、ポリメラーゼの濃度は約0.01U～約2Uの範囲であり、リガーゼの濃度は約4.0U～約8.0Uの範囲である、ことを特徴とする請求項17に記載の方法。