

【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 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 9/10 (2006.01)

C 1 2 N 9/16 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/09 1 0 0

C 1 2 N 9/10 Z N A

C 1 2 N 9/16 Z

C 1 2 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】**

フラップエンドヌクレアーゼ 1 の濃度は約 0.32 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 10 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 0.01 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 の相溶性配列、第 2 の二本鎖核酸に対する第 2 の相溶性配列、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溶性配列を含む、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 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 10 U の範囲であり、エンドヌクレアーゼの濃度は約 0.32 U ~ 約 4.8 U の範囲であり、ポリメラーゼの濃度は約 0.01 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、相溶性配列、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、相溶性配列、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、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 16 に記載の方法。

【請求項 19】

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 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 . 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 17 に記載の方法。