

【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28年6月23日(2016.6.23)

【公表番号】特表2015-525567(P2015-525567A)

【公表日】平成27年9月7日(2015.9.7)

【年通号数】公開・登録公報2015-056

【出願番号】特願2015-524385(P2015-524385)

【国際特許分類】

C 12 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 12 N 15/00 Z N A A

【手続補正書】

【提出日】平成28年4月28日(2016.4.28)

【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】

(a) Kozak配列を含む第1のDNA分子を用意するステップと；
 (b) 一方の末端にKozak配列及び他方の末端に6フレーム終止配列を含む第2のDNA分子を用意するステップと；
 (c) 6フレーム終止配列を含む第3のDNA分子を用意するステップと；
 (d) 直鎖状ベクター配列を含む第4のDNA分子を用意するステップと；
 (e) 少なくとも1つのリコンビナーゼの存在下で、ステップ(a)、(b)、(c)及び(d)のDNAフラグメントを用いて生成物ベクターをアセンブルするステップとを含む、DNAフラグメントアセンブリのための方法。

【請求項2】

DNAフラグメントが、PCR增幅又は直接的DNA合成を用いて得られる、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

(a) 少なくとも1つのII型制限酵素で第1のDNA分子を消化するステップであって、第1のDNA分子の消化産物がKozak配列を含む、ステップと；
 (b) 少なくとも1つのII型制限酵素で第2のDNA分子を消化するステップであって、第2のDNA分子の消化産物が一方の末端にKozak配列及び他方の末端に6フレーム終止配列を含む、ステップと；
 (c) 少なくとも1つのII型制限酵素で第3のDNA分子を消化するステップであって、第3のDNA分子の消化産物が6フレーム終止配列を含む、ステップと；
 (d) 少なくとも1つのII型制限酵素で第4のDNA分子を消化するステップであって、第4のDNA分子の消化産物がベクター配列を含む、ステップと；
 (e) 少なくとも1つのリコンビナーゼの存在下で、ステップ(a)、(b)、(c)及び(d)の消化産物を用いて生成物ベクターをアセンブルするステップとを含む、DNAフラグメントアセンブリのための方法。

【請求項4】

3' 5'エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素でステップ(a)、(b)、(c)及び(d)の消化産物を処理するステップをさらに含む、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

D N A 増幅技術が使用されない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

ポリメラーゼ連鎖反応が使用されない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

I I 型制限酵素が、A c u I 、B c i V I 、B m r I 、B s e R I 、B s r D I 、B t s I 、M l y I 及びそれらの組合せから成る群から選ばれる、請求項3 に記載の方法。

【請求項 8】

第 4 の D N A 分子が致死遺伝子を含み、好ましくは、致死遺伝子が c c d B である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

K o z a k 配列が、その 5' 末端に 3 フレーム終止配列を含み、
好ましくは、3 フレーム終止配列が、配列番号 4 4 ~ 6 2 及びそれらの相補体から成る群
から選ばれる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

K o z a k 配列が、配列番号 1 ~ 4 3 , 6 4 ~ 7 4 及びそれらの相補体から成る群から
選ばれる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

6 フレーム終止配列が、配列番号 7 5 ~ 8 0 及びそれらの相補体から成る群から選ばれ
る、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

第 4 の D N A 分子の消化産物が、選択マーカーを含み、選択マーカーが、カナマイシン
及びアンピシリン抵抗性遺伝子から成る群から選ばれる、請求項3 に記載の方法。

【請求項 13】

D N A フラグメントアセンブリのためのシステムであって、
(a) 少なくとも 1 つの I I 型制限酵素を用いて第 1 の D N A 分子から消化された D N A フラグメント 1 であって、K o z a k 配列を含む、D N A フラグメント 1 と；

(b) 少なくとも 1 つの I I 型制限酵素を用いて第 2 の D N A 分子から消化された D N A フラグメント 2 であって、一方の末端に K o z a k 配列及び他方の末端に 6 フレーム終止配列を含む、D N A フラグメント 2 と；

(c) 少なくとも 1 つの I I 型制限酵素を用いて第 3 の D N A 分子から消化された D N A フラグメント 3 であって、6 フレーム終止配列を含む、D N A フラグメント 3 と；

(d) 少なくとも 1 つの I I 型制限酵素を用いて第 4 の D N A 分子から消化された D N A フラグメント 4 であって、ベクター配列を含む、D N A フラグメント 4 と；

(e) D N A フラグメント 1 、2 、3 及び 4 を用いて生成物ベクターをアセンブルする
ための少なくとも 1 つのリコンビナーゼと
を含み、

好ましくは、前記システムが以下の少なくとも 1 つ
i) 前記システムが 3' ～ 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素をさらに含む、
i i) I I 型制限酵素が、A c u I 、B c i V I 、B m r I 、B s e R I 、B s r D I 、
B t s I 、M l y I 及びそれらの組合せから成る群から選ばれる、
i i i) D N A フラグメント 4 が、選択マーカーを含み、選択マーカーが、カナマイシン
及びアンピシリン抵抗性遺伝子から成る群から選ばれる
を充足する、システム。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 5 5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 5 5】

プロモーター (Z m U b i 1 v 8) も、3' 結合部における 3 フレーム終止配列及びプラスミド結合部に一致する最小の 13 ヌクレオチド配列 (5' ベクターホモロジー) を含有する同様の Kozak 配列を含む。同様に、6 フレーム終止コドン配列を 3' UTR (S t P i n I I 3' UTR) の 5' 末端に挿入する。3' UTR の 3' 末端は、プラスミドの別の末端と一致する 15 ヌクレオチド配列 (3' ベクターホモロジー) を含有する。フラグメントは、制限部位がフラグメント配列内に存在しないように、II 型制限部位と隣接する。II 型酵素は、例えば、A c u I、B c i V I、B m r I、B s e R I、B s r D I、B t s I、M l y I 及びそれらの組合せから選ばれることができる。これらのアセンブルしたベクターは、様々な制限酵素消化により確認可能であり、消化後のフラグメントパターンも当技術分野において周知のゲル電気泳動を用いて確認しうる。アセンブルしたベクターの配列も、当技術分野において公知の DNA 配列決定によって確認しうる。

本発明は、以下の態様を含む。

[1]

(a) Kozak 配列を含む第 1 の DNA 分子を用意するステップと；

(b) 一方の末端に Kozak 配列及び他方の末端に 6 フレーム終止配列を含む第 2 の DNA 分子を用意するステップと；

(c) 6 フレーム終止配列を含む第 3 の DNA 分子を用意するステップと；

(d) 直鎖状ベクター配列を含む第 4 の DNA 分子を用意するステップと；

(e) 少なくとも 1 つのリコンビナーゼの存在下で、ステップ (a)、(b)、(c) 及び (d) の DNA フラグメントを用いて生成物ベクターをアセンブルするステップとを含む、DNA フラグメントアセンブリのための方法。

[2]

DNA フラグメントが、PCR 増幅又は直接的 DNA 合成を用いて得られる、[1] に記載の方法。

[3]

(a) 少なくとも 1 つの II 型制限酵素で第 1 の DNA 分子を消化するステップであって、第 1 の DNA 分子の消化産物が Kozak 配列を含む、ステップと；

(b) 少なくとも 1 つの II 型制限酵素で第 2 の DNA 分子を消化するステップであって、第 2 の DNA 分子の消化産物が一方の末端に Kozak 配列及び他方の末端に 6 フレーム終止配列を含む、ステップと；

(c) 少なくとも 1 つの II 型制限酵素で第 3 の DNA 分子を消化するステップであって、第 3 の DNA 分子の消化産物が 6 フレーム終止配列を含む、ステップと；

(d) 少なくとも 1 つの II 型制限酵素で第 4 の DNA 分子を消化するステップであって、第 4 の DNA 分子の消化産物がベクター配列を含む、ステップと；

(e) 少なくとも 1 つのリコンビナーゼの存在下で、ステップ (a)、(b)、(c) 及び (d) の消化産物を用いて生成物ベクターをアセンブルするステップとを含む、DNA フラグメントアセンブリのための方法。

[4]

3' 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素でステップ (a)、(b)、(c) 及び (d) の消化産物を処理するステップをさらに含む、[1] に記載の方法。

[5]

DNA 増幅技術が使用されない、[1] に記載の方法。

[6]

ポリメラーゼ連鎖反応が使用されない、[1] に記載の方法。

[7]

II 型制限酵素が、A c u I、B c i V I、B m r I、B s e R I、B s r D I、B t s I、M l y I 及びそれらの組合せから成る群から選ばれる、[1] に記載の方法。

[8]

第4のDNA分子が致死遺伝子を含む、[1]に記載の方法。

[9]

致死遺伝子が、ccdBである、[8]に記載の方法。

[10]

Kozak配列が、その5'末端に3フレーム終止配列を含む、[1]に記載の方法。

[11]

Kozak配列が、配列番号1~43, 64~74及びそれらの相補体から成る群から選ばれる、[1]に記載の方法。

[12]

3フレーム終止配列が、配列番号44~62及びそれらの相補体から成る群から選ばれる、[10]に記載の方法。

[13]

6フレーム終止配列が、配列番号75~80及びそれらの相補体から成る群から選ばれる、[1]に記載の方法。

[14]

リコンビナーゼが、Int、Cre、F1p、IHf、Xis、
、Tn3レゾルバーゼ、Hin、Gin、Cin、Fis、TndX、XerC、XerD及びResから成る群から選ばれる、[1]に記載の方法。

[15]

第4のDNA分子の消化産物が、選択マーカーを含み、選択マーカーが、カナマイシン及びアンピシリン抵抗性遺伝子から成る群から選ばれる、[1]に記載の方法。

[16]

(a)少なくとも1つのII型制限酵素を用いて第1のDNA分子から消化されたDNAフラグメント1であって、Kozak配列を含む、DNAフラグメント1と；

(b)少なくとも1つのII型制限酵素を用いて第2のDNA分子から消化されたDNAフラグメント2であって、一方の末端にKozak配列及び他方の末端に6フレーム終止配列を含む、DNAフラグメント2と；

(c)少なくとも1つのII型制限酵素を用いて第3のDNA分子から消化されたDNAフラグメント3であって、6フレーム終止配列を含む、DNAフラグメント3と；

(d)少なくとも1つのII型制限酵素を用いて第4のDNA分子から消化されたDNAフラグメント4であって、ベクター配列を含む、DNAフラグメント4と；

(e)DNAフラグメント1、2、3及び4を用いて生成物ベクターをアセンブルするための少なくとも1つのリコンビナーゼと

を含む、DNAフラグメントアセンブリのためのシステム。

[17]

3' 5'エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素をさらに含む、[16]に記載のシステム。

[18]

II型制限酵素が、AccI、BciVI、BmrI、BseRI、BsrDI、BtsI、MlyI及びそれらの組合せから成る群から選ばれる、[16]に記載のシステム。

[19]

リコンビナーゼが、Int、Cre、F1p、IHf、Xis、
、Tn3レゾルバーゼ、Hin、Gin、Cin、Fis、TndX、XerC、XerD及びResから成る群から選ばれる、[16]に記載のシステム。

[20]

DNAフラグメント4が、選択マーカーを含み、選択マーカーが、カナマイシン及びアンピシリン抵抗性遺伝子から成る群から選ばれる、[16]に記載のシステム。