

【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9月22日(2011.9.22)

【公表番号】特表2010-535034(P2010-535034A)

【公表日】平成22年11月18日(2010.11.18)

【年通号数】公開・登録公報2010-046

【出願番号】特願2010-520191(P2010-520191)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成23年8月1日(2011.8.1)

【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】

改変された複数のポリヌクレオチドを製造する方法であって、

(a) 少なくとも 3 個のプライマーを、単一の反応混合物の中の二重鎖の鋳型のポリヌクレオチドに添加すること；ここで、前記少なくとも 3 個のプライマーは重複しておらず；前記少なくとも 3 個のプライマーのそれぞれは、他のプライマーとは異なる少なくとも 1 個の突然変異を含み；少なくとも 1 個のプライマーは、前記鋳型のマイナス鎖に対合可能なフォワードプライマーであり；少なくとも 1 個のプライマーは、前記鋳型のプラス鎖に対合可能なリバースプライマーであり；及び

(b) 前記反応混合物をポリメラーゼ伸長反応に供して、前記少なくとも 3 個のプライマーから、伸長され、改変された複数のポリヌクレオチドを得ることを含む方法。

【請求項 2】

更に、リガーゼにより処理されていない、伸長された複数の生成物を細胞に形質転換することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

更に、伸長され、改変された前記複数のポリヌクレオチドを前記細胞から回収することを含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

更に、伸長され、改変された前記複数のポリヌクレオチドを分析することを含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

分析が、伸長され、改変された前記複数のポリヌクレオチドの少なくとも 1 個を発現させ、そこから発現されたポリペプチドを分析することを含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

更に、目的とする突然変異を含んだ、伸長され、改変された前記複数のポリヌクレオチドを選択することを含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

更に、鋳型のポリヌクレオチドの配列情報を取得すること、及び目的とする 3 以上の突然変異を鋳型ヌクレオチドに沿って同定することを、工程 (a) の前に含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 8】**

更に、ポリメラーゼ伸長により製造された、伸長され、改変された前記複数のポリヌクレオチドを分析することを含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 9】**

更に、伸長され、改変された前記複数のポリヌクレオチドを酵素で処理して前記鋳型のポリヌクレオチドを破壊すること、処理され、伸長され、改変された前記ポリヌクレオチドを細胞に形質転換すること、伸長され、改変された前記複数のポリヌクレオチドを細胞から回収すること、目的とする突然変異を含んだ、伸長され、改変された前記複数のポリヌクレオチドを選択することを含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記細胞が *E. coli* 細胞である、請求項 9 に記載の方法。

**【請求項 11】**

少なくとも 4 個のプライマーが添加される、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 12】**

少なくとも 12 個のプライマーが添加される、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 13】**

それぞれのプライマーがシングルスボット突然変異を含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 14】**

少なくとも 2 個のフォワードプライマーが、鋳型のポリヌクレオチド上の同一の位置に異なる変更を含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 15】**

少なくとも 2 個のリバースプライマーが、鋳型のポリヌクレオチド上の同一の位置に異なる変更を含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 16】**

少なくとも 1 個のプライマーが、鋳型のポリヌクレオチド上の異なる位置に少なくとも 2 個の変更を含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 17】**

少なくとも 1 個のプライマーが鋳型のポリヌクレオチド上の異なる位置に少なくとも 2 個の変更を含み、且つ少なくとも 2 個のフォワードプライマー又は少なくとも 2 個のリバースプライマーが鋳型のポリヌクレオチド上の同一の位置に異なる変更を含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 18】**

前記鋳型のポリヌクレオチドが環状二本鎖 DNA である、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 19】**

少なくとも 1 個のプライマーが、それぞれ 1 個の縮重部位を含む縮重プライマーのセットであり、目的とする突然変異が前記縮重部位における異なる多様なヌクレオチドである、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 20】**

少なくとも 1 個のプライマーが、前記鋳型のポリヌクレオチドの少なくとも 1 個のコドンに対応する少なくとも 1 個の縮重コドン、及び前記鋳型のポリヌクレオチドの前記コドンに隣接する配列に相同性を有する少なくとも 1 個の隣接する配列を含む縮重プライマーのセットである、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 21】**

前記縮重コドンが、20 未満の天然アミノ酸をコードできる、請求項 20 に記載の方法。

**【請求項 22】**

前記フォワードプライマーがフォワード群に分類され、前記リバースプライマーがリバース群に分類され、前記フォワード群のプライマー及び前記リバース群のプライマーが、互いに独立して、前記鋳型のポリヌクレオチド上の位置に関係なく、対応する群の中で等濃度となるように標準化され、標準化後に等量のフォワードプライマーとリバースプライ

マーとが反応に添加される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記鋳型のポリヌクレオチド上のプライマーの位置に応じてプライマーを複数の群に組織化し；ここで、前記鋳型上の同一の選択された領域に亘るプライマーを 1 個の群に含め

；

グループ化されたプライマーをそれぞれの群の中で等濃度となるように標準化し、

1 つの群のフォワードプライマーをフォワード群に集めて、フォワードプライマーのそれぞれの群の間で濃度が等しくなるように標準化し、

1 つの群のリバースプライマーをリバース群に集めて、リバースプライマーのそれぞれの群の間で濃度が等しくなるように標準化し、

集められた等量のフォワードプライマー及びリバースプライマーを反応に添加することを、工程 (b) の前に含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 4】

更に、工程 (a) から (b) を 2 回行い、第 1 の回で製造されたポリヌクレオチドを第 2 の回で鋳型ヌクレオチドとして使用する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 5】

目的とする突然変異を含んだ、改変された複数のポリヌクレオチドを製造する方法であって、

(a) 少なくとも 2 個のプライマーを単一の反応混合物の中の二重鎖の鋳型のポリヌクレオチドに添加すること；ここで、前記少なくとも 2 個のプライマーは重複しておらず；前記少なくとも 2 個のプライマーのそれぞれは、他のプライマーとは異なる少なくとも 1 個の突然変異を含み；少なくとも 1 個のプライマーは、前記鋳型のマイナス鎖に対合可能なフォワードプライマーであり；少なくとも 1 個のプライマーは、前記鋳型のプラス鎖に対合可能なリバースプライマーであり；

(b) 前記反応混合物をポリメラーゼ伸長反応にかけ、前記少なくとも 2 個のプライマーから、伸長され、改変された複数のポリヌクレオチドを得ること、

(c) 伸長され、改変された前記複数のポリヌクレオチドを酵素で処理して前記鋳型ヌクレオチドを破壊すること、

(d) リガーゼによって処理されていない、伸長され、改変された前記ポリヌクレオチドを、細胞に形質転換すること、

(e) 伸長され、改変された複数のポリヌクレオチドを細胞から回収すること、及び

(f) 目的とする突然変異を含んだ、伸長され、改変された複数のポリヌクレオチドを選択すること、を含む方法。