

【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 19 年 11 月 15 日 (2007.11.15)

【公表番号】 特表 2007-506430 (P2007-506430A)
 【公表日】 平成 19 年 3 月 22 日 (2007.3.22)
 【年通号数】 公開・登録公報 2007-011
 【出願番号】 特願 2006-528170 (P2006-528170)
 【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)
C 1 2 N 1/15 (2006.01)
C 1 2 N 1/19 (2006.01)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A
 C 1 2 N 1/15
 C 1 2 N 1/19
 C 1 2 N 1/21
 C 1 2 N 5/00 B

【手続補正書】
 【提出日】 平成 19 年 9 月 25 日 (2007.9.25)
 【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】

標的ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドの合成方法であって、

- a) 耐熱性ポリメラーゼを含む非好熱性細胞を、前記細胞を破壊するのに有効な温度に曝すことによって反応混合物中に耐熱性ポリメラーゼを提供する工程であって、前記反応混合物は、破壊された細胞、耐熱性ポリメラーゼ、標的ポリヌクレオチド、該標的ポリヌクレオチドの配列または標的ポリヌクレオチドの隣に位置する配列にハイブリダイズする 1 または 2 以上のプライマー、および、1 または 2 以上のヌクレオチドを含む、前記工程；および
- b) 標的ポリヌクレオチドの少なくとも一部に相補的なポリヌクレオチドが耐熱性ポリメラーゼの作用により合成される条件下で、前記反応混合物をインキュベートする工程を含む、前記方法。

【請求項 2】

耐熱性ポリメラーゼをコードする配列が、細胞内で機能するプロモーターに機能可能に連結され、細胞のゲノム内に組み込まれる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

細胞が、耐熱性ポリメラーゼをコードする配列を含むクローニングベクターを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

細胞が、標的ポリヌクレオチドを含む、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

反応混合物が、工程 b) において合成された相補的ポリヌクレオチドにハイブリダイズ

する 1 または 2 以上のプライマーをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

反応混合物が、標的ポリヌクレオチドを含むクローニングベクターを含み、前記クローニングベクターは、リニアライズされている、エピソーマルである、ウィルスベクターにパッケージングされている、またはそれらの組み合わせである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

反応混合物が、標的ポリヌクレオチドを含む第二の非好熱性細胞を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

耐熱性ポリメラーゼが、逆転写酵素、RNAポリメラーゼまたはDNAポリメラーゼである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

耐熱性ポリメラーゼが、サーモコッカス・リトラリス、バシラス・ステアロサーモフィラス、パイロコッカス・フリオサス、パイロコッカス・ウォーセイ、サーマス・アクアティカス、サーマス・フィリフォルミス、サーマス・フラバス、サーマス・サーモフィラスまたはサーモトガ・マリチマにおいて天然的に発現されるポリメラーゼまたはその組換え変異体から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

工程 b) の条件がサーマルサイクリングを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

反応混合物がDNAヘリカーゼをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

細胞が原核細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

原核細胞が大腸菌である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

細胞が哺乳動物細胞または酵母細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

耐熱性ポリメラーゼが80℃で20秒間安定である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

耐熱性ポリメラーゼが95℃で3分間安定である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

複数の標的ポリヌクレオチドを含む非好熱性細胞の集団を含むゲノミックライブラリー、cDNAライブラリーまたは発現ライブラリーであって、前記集団内の各細胞が、細胞の染色体内に安定に組み込まれた耐熱性ポリメラーゼをコードするポリヌクレオチドを含み、前記耐熱性ポリメラーゼが80℃で20秒間安定である、前記ゲノミックライブラリー、cDNAライブラリーまたは発現ライブラリー。

【請求項 18】

細胞が大腸菌細胞を含む、請求項 17 に記載のライブラリー。

【請求項 19】

耐熱性ポリメラーゼが、サーモコッカス・リトラリス、バシラス・ステアロサーモフィラス、パイロコッカス・フリオサス、パイロコッカス・ウォーセイ、サーマス・アクアティカス、サーマス・フィリフォルミス、サーマス・フラバス、サーマス・サーモフィラスおよびサーモトガ・マリチマのポリメラーゼである、請求項 17 に記載のライブラリー。

【請求項 20】

耐熱性ポリメラーゼが95℃で3分間安定である、請求項 17 に記載のライブラリー。

【請求項 21】

組換え酵素を使用する対立遺伝子交換によって非好熱性細胞の染色体内に安定に組み込まれた耐熱性ポリメラーゼをコードするポリヌクレオチドを含む改変非好熱性細胞であって、前記ポリメラーゼが80℃で20秒間安定である、前記改変非好熱性細胞。

【請求項 2 2】

ポリヌクレオチドが、耐熱性ポリメラーゼをコードする配列に機能可能に連結された誘導型プロモーターを含む、請求項 2 1 に記載の細胞。

【請求項 2 3】

大腸菌細胞である、請求項 2 1 に記載の細胞。

【請求項 2 4】

耐熱性ポリメラーゼが、サーモコッカス・リトラリス、バシラス・ステアロサーモフィラス、パイロコッカス・フリオサス、パイロコッカス・ウォーセイ、サーマス・アクアテリカス、サーマス・フィリフォルミス、サーマス・フラバス、サーマス・サーモフィラスおよびサーモトガ・マリチマのポリメラーゼである、請求項 2 1 に記載の細胞。

【請求項 2 5】

耐熱性ポリメラーゼが95℃で3分間安定である、請求項 2 1 に記載の細胞。

【請求項 2 6】

コンピテントセルである、請求項 2 1 に記載の細胞。

【請求項 2 7】

請求項 2 1 に記載の細胞を含む非好熱性細胞の集団および使用のための説明書を含む、請求項 1 に記載の方法に従ってポリヌクレオチドを合成するためのキット。

【請求項 2 8】

クローニングベクターを含むポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 2 7 に記載のキット。

【請求項 2 9】

クローニングベクターがマルチクローニング配列を含む、請求項 2 8 に記載のキット。

【請求項 3 0】

細胞がコンピテントセルである、請求項 2 7 に記載のキット。

【請求項 3 1】

(i) クローニングベクターにハイブリダイズするプライマー、(ii) 反応バッファー、(iii) デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチドまたはジデオキシヌクレオチド、(iv) 制限エンドヌクレアーゼ、(v) リガーゼ、(vi) DNAヘリカーゼ、およびそれらの組み合わせより選択される構成物をさらに含む、請求項 2 7 に記載のキット。

【請求項 3 2】

デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチドまたはジデオキシヌクレオチドの1または2以上を含み、前記デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチドまたはジデオキシヌクレオチドの少なくとも1つが検出可能なラベルを含む、請求項 3 1 に記載のキット。