

請求の範囲

- [請求項1] 環状DNAの増幅方法であって、以下の工程：
- (1) 鋳型となる環状DNAと、以下：
- 環状DNAの複製を触媒する第一の酵素群；
- 岡崎フラグメント連結反応を触媒して、カテナンを形成する2つの姉妹環状DNAを合成する第二の酵素群；
- 2つの姉妹環状DNAの分離反応を触媒する第三の酵素群；
- 緩衝液；
- ATP；
- GTP、CTPおよびUTP；
- dNTP；
- マグネシウムイオン源；および
- アルカリ金属イオン源；
- を含む反応液との反応混合物を形成する工程、
- ここで当該環状DNAはDnaA活性を有する酵素と結合可能な複製開始配列 (origin of chromosome (oriC)) を含む；および
- (2) 工程(1)において形成した反応混合物を等温条件下で保温する工程；
- を含む、前記方法。
- [請求項2] 環状DNAの増幅方法であって、以下の工程：
- (1) 鋳型となる環状DNAと、以下：
- 環状DNAの複製を触媒する第一の酵素群；
- 岡崎フラグメント連結反応を触媒して、カテナンを形成する2つの姉妹環状DNAを合成する第二の酵素群；
- 2つの姉妹環状DNAの分離反応を触媒する第三の酵素群；
- 緩衝液；
- ATP；
- GTP、CTPおよびUTP；

d N T P ;

マグネシウムイオン源 ; および

アルカリ金属イオン源 ;

を含む反応液との反応混合物を形成する工程、

ここで当該環状DNAはDnaA活性を有する酵素と結合可能な複製開始配列 (origin of chromosome (oriC)) を含む ; および

(2) 工程 (1) において形成した反応混合物を、3 0 ° C 以上でのインキュベーションおよび2 7 ° C 以下でのインキュベーションを繰り返す温度サイクル下で、インキュベートする工程 ;

を含む、前記方法。

[請求項3] 反応液が、さらにタンパク質の非特異吸着抑制剤、および／または核酸の非特異吸着抑制剤を含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

[請求項4] 反応液が、さらに直鎖状DNA特異的エキソヌクレアーゼおよび／またはRecG型ヘリカーゼを含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

[請求項5] 反応液が、さらにアンモニウム塩を含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

[請求項6] 第一の酵素群が、DnaA活性を有する酵素、1 種以上の核様体タンパク質、DNAジャイレース活性を有する酵素または酵素群、一本鎖DNA結合タンパク質 (single-strand binding protein (SSB)) 、DnaB型ヘリカーゼ活性を有する酵素、DNAヘリカーゼローダー活性を有する酵素、DNAプライマーゼ活性を有する酵素、DNAクランプ活性を有する酵素、およびDNAポリメラーゼIII*活性を有する酵素または酵素群、の組み合わせを含み、

第二の酵素群が、DNAポリメラーゼI活性を有する酵素およびDNAリガーゼ活性を有する酵素の組み合わせを含み、

第三の酵素群が、トポイソメラーゼIII活性を有する酵素および／またはトポイソメラーゼIV活性を有する酵素を含む、
請求項 1 または 2 に記載の方法。

- [請求項7] 第二の酵素群がさらに、RNaseH活性を有する酵素を含む、請求項6に記載の方法。
- [請求項8] 第三の酵素群がさらに、RecQ型ヘリカーゼ活性を有する酵素を含む、請求項6に記載の方法。
- [請求項9] 第一の酵素群において、
1種以上の核様体タンパク質がIHFまたはHUであり、
DNAジャイレース活性を有する酵素または酵素群が、GyrAおよびGyrBからなる複合体であり、
DnaB型ヘリカーゼ活性を有する酵素がDnaBヘリカーゼであり、
DNAヘリカーゼローダー活性を有する酵素がDnaCヘリカーゼローダーであり、
DNAプライマーゼ活性を有する酵素がDnaGプライマーゼであり、
DNAクランプ活性を有する酵素がDnaNクランプであり、
DNAポリメラーゼIII*活性を有する酵素または酵素群が、DnaX、HolA、HolB、HolC、HolD、DnaE、DnaQ、およびHolEのいずれかを含む酵素または酵素群である、
請求項6に記載の方法。
- [請求項10] 工程(2)における等温条件が、25℃～50℃の範囲に含まれる一定の温度である、請求項1に記載の方法。
- [請求項11] 反応液が、さらにRecG型ヘリカーゼおよび／または一本鎖DNA特異的エキソヌクレアーゼを含む、請求項1または2に記載の方法。
- [請求項12] 反応液が、さらに直鎖状DNA特異的エキソヌクレアーゼおよび／または一本鎖DNA特異的エキソヌクレアーゼを含む、請求項1または2に記載の方法。
- [請求項13] 反応液が、さらにDNAの安定化因子を含む、請求項1または2に記載の方法。
- [請求項14] 工程(1)が
(1-1) 以下：

環状DNAの複製を触媒する第一の酵素群；

岡崎フラグメント連結反応を触媒して、カテナンを形成する2つの姉妹環状DNAを合成する第二の酵素群；

2つの姉妹環状DNAの分離反応を触媒する第三の酵素群；

緩衝液；

ATP；

GTP、CTPおよびUTP；

dNTP；

マグネシウムイオン源；および

アルカリ金属イオン源；

を含む反応液をプレインキュベーションする工程；

(1-2) 当該反応液と鋳型となる環状DNAとの反応混合物を形成する工程；および

を含む、請求項1または2に記載の方法。

[請求項15] 工程(2)を、油中水滴型エマルジョン内で行う、請求項1または2に記載の方法。

[請求項16] 工程(2)に続いてさらに、
(3) 反応後処理を行う工程；を含み、ここで、当該反応後処理は、
(i) 第一から第三の酵素群を含まない反応液で五倍以上に希釈した後、再保温する処理；

(ii) 直鎖状DNA特異的エキソヌクレアーゼおよび／または一本鎖DNA特異的エキソヌクレアーゼによる処理；および／または

(iii) ギャップリペア酵素による処理；である、
請求項1または2に記載の方法。

[請求項17] 環状DNAの増幅用組成物であって、
環状DNAの複製を触媒する第一の酵素群；
岡崎フラグメント連結反応を触媒して、カテナンを形成する2つの姉妹環状DNAを合成する第二の酵素群；

2つの姉妹環状DNAの分離反応を触媒する第三の酵素群；
緩衝液；
A T P；
G T P、C T PおよびU T P；
d N T P；
マグネシウムイオン源；および
アルカリ金属イオン源；
を含む、前記組成物。

[請求項18] さらにタンパク質の非特異吸着抑制剤、および／または核酸の非特異吸着抑制剤を含む、請求項17に記載の組成物。

[請求項19] さらに直鎖状DNA特異的エキソヌクレアーゼおよび／またはRecG型ヘリカーゼを含む、請求項17に記載の組成物。

[請求項20] さらにRecG型ヘリカーゼおよび／または一本鎖DNA特異的エキソヌクレアーゼを含む、請求項17に記載の組成物。

[請求項21] さらに直鎖状DNA特異的エキソヌクレアーゼおよび／または一本鎖DNA特異的エキソヌクレアーゼを含む、請求項17に記載の組成物。

[請求項22] さらにDNAの安定化因子を含む、請求項17に記載の組成物。

[請求項23] 環状DNAの増幅用キットであって、
環状DNAの複製を触媒する第一の酵素群；
岡崎フラグメント連結反応を触媒して、カテナンを形成する2つの姉妹環状DNAを合成する第二の酵素群；

2つの姉妹環状DNAの分離反応を触媒する第三の酵素群；
緩衝液；
A T P；
G T P、C T PおよびU T P；
d N T P；
マグネシウムイオン源；および
アルカリ金属イオン源；

の組み合わせを含む、前記キット。

- [請求項24] さらにタンパク質の非特異吸着抑制剤、および／または核酸の非特異吸着抑制剤との組み合わせを含む、請求項23に記載のキット。
- [請求項25] さらに直鎖状DNA特異的エキソヌクレアーゼおよび／またはRecG型ヘリカーゼとの組み合わせを含む、請求項23に記載のキット。
- [請求項26] さらにRecG型ヘリカーゼおよび／または一本鎖DNA特異的エキソヌクレアーゼを含む、請求項23に記載のキット。
- [請求項27] さらに直鎖状DNA特異的エキソヌクレアーゼおよび／または一本鎖DNA特異的エキソヌクレアーゼを含む、請求項23に記載のキット。
- [請求項28] さらにDNAの安定化因子を含む、請求項23に記載のキット。
- [請求項29] さらにギャップリペア酵素を含む、請求項23に記載のキット。