

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2020年10月8日(08.10.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/203496 A1

(51) 国際特許分類:
C40B 40/06 (2006.01) C12N 15/10 (2006.01)
C12P 19/34 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2020/013133

(22) 国際出願日: 2020年3月24日(24.03.2020)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2019-069798 2019年4月1日(01.04.2019) JP

(71) 出願人: 国立大学法人神戸大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KOBE UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1 Hyogo (JP).

(72) 発明者: 柘植 謙爾(TSUGE Kenji); 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP). 石井 純(ISHII

Jun); 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP). 近藤 昭彦(KONDO Akihiko); 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人 津国 (TSUKUNI & ASSOCIATES); 〒1020083 東京都千代田区麹町5-3-1 麹町ビジネスセンター Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,

(54) Title: METHOD FOR CONSTRUCTING CHIMERIC PLASMID LIBRARY

(54) 発明の名称: キメラプラスミドライブラリーの構築方法

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a novel method which is for preparing a DNA fragment for microbial cell transformation, and by which the combinatorial library of a long-chain DNA can be efficiently constructed and confirmation of the genotype of the obtained clone is facilitated. The present invention is a method for preparing a DNA fragment, which is for microbial cell transformation and has at least one insert DNA unit that includes a DNA containing an effective replication origin in a host microorganism and an insert DNA in which unit DNAs are linked, the method being characterized by including: (A) a step for preparing, through an OGAB method, a plurality of types of plasmids having an insert DNA unit in which a plurality of types of unit DNAs capable of being linked in a specific linking order are linked; (B) a step for decomposing a plasmid into unit DNAs by treating the plurality of types of plasmids prepared in the step (A) with a restriction enzyme suitable for each plasmid and preparing a mixed liquid of a plurality of types of unit DNAs; and (C) a step for preparing a long-chain DNA fragment by re-assembling the unit DNAs through the OGAB method by using the mixed liquid of a plurality of types of unit DNAs obtained in the step (B).

(57) 要約: 本発明は、長鎖DNAのコンビナトリアルライブラリーを効率的に構築することができ、得られたクローンの遺伝子型の確認が容易である、新規の微生物細胞形質転換用DNA断片の調製方法を提供することを課題とする。本発明は、宿主微生物中で有効な複製開始点を含むDNAと、単位DNAが連結した挿入DNAとを含む挿入DNAユニットを、少なくとも1つ有する、微生物細胞形質転換用DNA断片の調製方法であって、(A) 特定の連結順序で連結し得る、複数種類の単位DNAを連結させた、挿入DNAユニットを含むプラスミドを、OGAB法により複数種類調製する工程、(B) 工程(A)で調製した複数種類のプラスミドを、それぞれに適した制限酵素で処理して、単位DNAに分解し、複数種類の単位DNA混合液を調製する工程、及び(C) 工程(B)で得られた複数種類の単位DNA混合液を用いて、OGAB法により単位DNAを再集積させ、長鎖DNA断片を調製する工程を含むことを特徴とする、微生物細胞形質転換用DNA断片の調製方法である。

WO 2020/203496 A1

[続葉有]

QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))