



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 692 33 041 T2** 2004.03.11

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 038 973 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **692 33 041.0**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 111 087.3**

(96) Europäischer Anmeldetag: **28.08.1992**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **27.09.2000**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **02.05.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **11.03.2004**

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: **C12Q 1/68**

**C12P 19/34, G01N 33/566, G01N 33/48,  
C07H 15/12**

(30) Unionspriorität:

**767137                      27.09.1991            US**

(73) Patentinhaber:

**United States Biochemical Corp., Cleveland, Ohio,  
US**

(74) Vertreter:

**TER MEER STEINMEISTER & Partner GbR  
Patentanwälte, 81679 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU,  
MC, NL, SE**

(72) Erfinder:

**Fuller, Carl W., Clevelands Heights, Ohio 44118,  
US**

(54) Bezeichnung: **Behandlung von amplifizierter DNS mit alkalischer Phosphatase**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

## Hintergrund der Erfindung

[0001] Diese Erfindung betrifft Verfahren zur DNA-Sequenzierung, in welchen ein markiertes Nukleotid in ein sich verlängerndes DNA-Molekül während eines Ketten-Terminations- bzw. Abbruch-Sequenzier-Verfahrens inkorporiert wird.

[0002] Die Sequenz der Nukleotidbasen in einem DNA-Molekül kann auf eine Vielzahl von Arten bestimmt werden. Das Kettenabbruchverfahren schließt im allgemeinen die Synthese von DNA, komplementär zu dem Matrizen-Strang, welcher sequenziert werden soll, ein, durch das Verlängern eines Primers, welcher in der Lage ist, an einen Anteil dieses Matrizen-Stranges zu hybridisieren, mit einer DNA-Polymerase. Während der Synthesereaktion werden Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) inkorporiert, um ein DNA-Fragment zu bilden, bis ein kettenterminierendes bzw. -abbrechendes Mittel, zum Beispiel ein Didesoxynukleotidtriphosphat (ddNTP) inkorporiert wird. Das Inkorporieren eines ddNTPs verhindert eine weitere DNA-Synthese (ein Verfahren, das als Kettentermination bzw. Kettenabbruch bezeichnet wird). Die Größe eines jeden synthetisierten DNA-Fragmentes in diesem Verfahren wird dann durch eine Gelelektrophorese bestimmt und diese Information wird verwendet, um die Sequenz von Nukleotiden in der ursprünglichen DNA-Matrize zu bestimmen. Es beschreiben zum Beispiel Tabor und Richardson USP 4 795 699 ein Sequenzierungsverfahren in zwei Schritten, in welchem ein unmarkierter Primer in einem Markierungsschritt markiert wird und dann in der Anwesenheit von dNTPs im Überschuß und einem ddNTP in einem Kettenabbruchschritt verlängert wird. In dem Markierungsschritt wird eine niedrige Konzentration von dNTPs bereitgestellt (von denen eines markiert ist), um eine kleine Menge an Primerverlängerung zu gestatten

[0003] In dem Didesoxysequenzierungsverfahren kann der Primer markiert sein, zum Beispiel mit  $^{32}\text{P}$  durch ein Verfahren unter Verwendung einer Polynukleotidkinase. Eine solche Markierung gestattet den Nachweis von verlängerten Primern nach einer Gelelektrophorese durch eine Autoradiographie des resultierenden Gels. Alternativ kann ein markiertes dNTP inkorporiert werden während des Verfahrens der DNA-Synthese, und das Vorhandensein von solchen markierten dNTPs wird durch eine Autoradiographie oder durch andere Mittel nachgewiesen. Zu diesem Zweck kann das dNTP entweder radioaktiv mit  $^{32}\text{P}$  oder  $^{35}\text{S}$  markiert sein. In einem anderen Verfahren kann der Primer mit einer oder mehreren fluoreszenten Einheiten für den Nachweis durch Fluoreszenz markiert sein. In noch einem anderen Verfahren kann das ddNTP markiert sein, zum Beispiel mit einer Fluoreszenzmarkierung.

[0004] Beispiele für diese Verfahren werden bereitgestellt in den folgenden Publikationen:

Murray, 17 Nucleic Acid Research, 8889, 1989, beschreibt die Verwendung eines  $^{32}\text{P}$ markierten Primers. Der Primer wurde markiert unter Verwendung einer Polynukleotidkinase und  $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ .

Higuchi und Ochman, 17 Nucleic Acid Research 5865, 1989, beschreiben die Verwendung eines Kinase-markierten Primers für die Sequenzierung von DNA-Fragmenten, hergestellt durch eine Polymerasekettenreaktion (PCR). Die PCR ist ein Verfahren zur Amplifikation einer gewünschten Nukleinsäure durch die Verwendung von zwei Primern, welche durch eine DNA-Polymerase verlängert werden, um ein Paar von DNA-Fragmenten, komplementär zu der gewünschten Nukleinsäure, herzustellen. Diese Fragmente hybridisieren dann, um die gewünschte DNA bereit zu stellen. Dieses Verfahren wird 15–30 Mal wiederholt. Falls eine temperaturstabile DNA-Polymerase verwendet wird, wird das Verfahren am besten zyklisch durchgeführt durch das Halten der Temperatur der Reaktion alternativ bei einer Temperatur, welche für die Primerverlängerung geeignet ist ( $70^{\circ}\text{--}75^{\circ}\text{C}$ ) und dann bei einer Temperatur, welche für eine Denaturierung geeignet ist ( $90^{\circ}\text{--}100^{\circ}\text{C}$ ), um die DNA-Fragmente zu trennen und für eine Matrize für den nächsten Zyklus zu sorgen, und dann bei einer Temperatur, welche geeignet ist für ein Annealen bzw. Anlagern ( $42\text{--}55^{\circ}\text{C}$ ), um die Primer an die Matrize zu binden. Straus und Zagursky 10, BioTechniques 376, 1991, beschreiben die Verwendung von  $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-dATP}$  in einer Sequenzierungsreaktion. Smith et al., 9 BioTechniques 52, 1990, und Adams-Blakesley 13 Focus 56, 1991, beschreiben die Sequenzierung von PCR-Produkten unter Verwendung eines markierten Primers.

Krishnan et al., 19 Nucleic Acid Research 1153, 1991, beschreiben die Verwendung eines markierten Primers für die Sequenzierung von Lambda-DNA. Das Verfahren des Kettenabbruchs wird mehrere Male wiederholt (oder zyklisch durchgeführt), um die Herstellung einer großen Anzahl von Produkten zu gestatten. Diese zyklische Durchführung ist einer PCR ähnlich, da man die Reaktion bei  $42^{\circ}\text{C}$  bis  $55^{\circ}\text{C}$  voranschreiten läßt, dann wird sie bei  $95^{\circ}\text{C}$  gestoppt und wiederum bei  $42^{\circ}\text{C}$  bis  $55^{\circ}\text{C}$  gestartet (das Verfahren wird thermischzyklische bzw. Thermalzyklus-Sequenzierung (thermal cycle sequencing)) genannt. Kein neues Reagenz muß zugegeben werden, wenn das Verfahren einmal gestartet ist. Die zyklische Durchführung stellt sicher, daß eine große Anzahl des markierten Primers in den Schritten des Kettenabbruchs verlängert wird.

Spurgeon and Burke, Abstract 125, Human Genome II, 22. Oktober 1990, beschreiben die Verwendung einer modifizierten Taq-DNA-Polymerase für eine thermisch zyklische Sequenzierung in welcher ein endmarkierter Primer oder ein unmarkierter Primer verwendet wird. Fluoreszenz-markierte ddNTPs und radioaktive Markierungsverfahren wurden ebenfalls verwendet.

Mead et al., Abstract Nr. 99, Human Genome II, 22. Oktober 1990 beschreiben die Sequenzierung von Lambda-DNA in einer auf der Polymerasekettenreaktion basierenden Reaktion, unter Verwendung von Radioisotopen und Fluoreszenzmarkierungen.

#### Zusammenfassung der Erfindung

[0005] Diese Erfindung stellt ein neuartiges DNA-Sequenzierungsverfahren vor, in welchem ein unmarkierter Primer in einer Markierungsreaktion verlängert wird, durchgeführt auf eine zyklische Weise. Solch ein Verfahren ist vorteilhaft gegenüber der früheren Verwendung von  $^{32}\text{P}$ -endmarkierten Primern (hergestellt unter Verwendung von Polynukleotidkinase und  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP) da keine zusätzlichen Reagenzien (z. B. Polynukleotidkinase und  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP) erforderlich sind, gegenüber den gewöhnlichen Sequenzierungsreagenzien, das Verfahren der Herstellung von markierten Primern nicht erforderlich ist, und da der verwendete Apparat in dem Verfahren identisch mit demjenigen ist, welcher für das thermisch zyklische Sequenzieren verwendet wird, können die beiden Verfahren in bequemer Weise gemeinsam verwendet werden. Dieses Verfahren erlaubt die Verwendung von Markierungen, welche sonst nicht verwendbar sind mit einer Polynukleotidkinase, wie  $\alpha$ - $^{35}\text{S}$ -dNTPs, fluoreszenten Nukleotiden und Nukleotiden, welche mit anderen nützlichen Einheiten wie Biotin markiert sind.

[0006] Die kritische Eigenschaft der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von mindestens einem markierten Nukleotid in einem zyklisch durchgeführten Markierungsschritt. Diesem folgt im allgemeinen ein zyklischer Terminations- bzw. Abbruchsritt. Das wiederholte zyklische Durchführen einer gepimten DNA-Synthese resultiert in der Herstellung von viel mehr neu synthetisierten Molekülen an DNA als Molekülen der Matrizen-DNA, welche für die Sequenzierung verwendet wird. Daher ist, während eine Sequenzierung unter Verwendung herkömmlicher Mengen an Matrize (0,5 bis 1,0 pMol) dann möglich ist, wenn nur eine einzige Runde replikativer Synthese durchgeführt wird, eine Sequenzierung unter Verwendung von weniger Matrizen-DNA (z. B. 0,05 pMol) ohne einen zyklischen Schritt schwierig. Wiederholtes zyklisches Durchführen des Markierungsschrittes unter Verwendung beschränkter Mengen an Matrize erhöht die Menge an Produkt auf ein Niveau, welches hinreichend für normale Nachweisverfahren ist, wie eine Autoradiographie mit einer Exposition über Nacht.

[0007] In dem Verfahren sind höchstens drei von den vier erforderlichen dNTPs für eine Sequenzierungsreaktion in dem Markierungsschritt vorhanden, wobei eines oder mehrere von ihnen markiert ist, bzw. sind. Dies markiert in einer wirksamen Weise den Primer und beschränkt die Verlängerung auf eine bekannte Länge (d. h. auf eine Länge, wo das fehlende dNTP für eine weitere Synthese erforderlich ist). In dem Verfahren wird die Reaktion zyklisch durchgeführt zwischen einer Temperatur, welche für eine Kettenverlängerung geeignet ist und einer, welche für eine Denaturierung des verlängerten Primers und der Matrizenmoleküle geeignet ist, im allgemeinen 10–100 mal während einer Periode von einer Stunde und eineinhalb Stunden bis zu sechs Stunden. Nach diesem Markierungsschritt wird die Reaktion im allgemeinen in vier Teile geteilt, und eine geeignete Mischung für den Kettenabbruch einschließlich des fehlenden dNTP wird zu der Reaktionsmischung hinzugefügt und zwischen 10 und 200 Mal bei geeigneten Temperaturen für die Primerverlängerung und die Denaturierung zyklisch durchgeführt. Keine zusätzliche DNA-Polymerase ist in diesem Schritt erforderlich, und die Reaktion kann in 1,5 bis 16 Stunden vollständig durchgeführt werden.

[0008] Das Verfahren dieser Erfindung gestattet eine Sequenzierung von so wenig wie 0,01 Mikrogramm (0,005 pMol) von M13-DNA mit einer Exposition von 18 bis zu 36 Stunden für radioaktiv markiertes ( $^{35}\text{S}$ ) Material. Für doppelsträngige Plasmide kann die Sequenzinformation aus so wenig wie 0,03  $\mu\text{g}$  (0,015 pMol) ohne eine vorausgehende Denaturierung der Plasmid-DNA mit Alkali erhalten werden. Zusätzlich können verlässliche Sequenzdaten in direkter Weise aus einem einzelnen Plaque von M 13 erhalten werden, ohne weiteres Wachstum des Phagen durch einfaches Picken des Plaques in ein Reaktionsgefäß und das Zugeben der geeigneten Reagenzien. Zusätzlich können Sequenzen aus einzelnen Kolonien von Bakterien, welche Plasmide mit dem fl-Replikationsursprung (Origin) enthalten, erhalten werden (z. B. pTZ18R oder pUC118) mit einem Helferphagen (M13 KO7) oder selbst aus Plasmiden ohne einen Helferphagen.

[0009] Weil die Erfindung die Sequenzierung von kleinen Mengen an Matrize gestattet, ist die Notwendigkeit, Klone wachsen zu lassen und DNA aus ihnen aufzureinigen, nicht notwendig, und die Möglichkeit, Verunreinigungen in die Sequenzierungsreaktion gemeinsam mit der Matrizen-DNA hinein zu bringen, ist daher verringert. Zusätzlich gibt es, weil die DNA in einer effektiven Weise durch dieses Verfahren endmarkiert wird, wenig systematische Variation in der Intensität der Banden und keine Tendenz, daß die Sequenzen am Boden bzw. am unteren Ende eines Autoradiogramms eines Sequenzierungsgels blasser werden.

[0010] Darüber hinaus gestattet die Erfindung die Sequenzierung von Plasmid- und anderen doppelsträngigen DNA-Matrizen ohne eine vorausgehende Denaturierung unter Verwendung von Alkali. Diese Denaturierungsverfahren sind mühsam, erfordern eine Stunde oder mehr einer fachgerechten Manipulation zur Denaturierung und eine nachfolgende Präzipitation. Daher gestattet die Erfindung die Sequenzierung von DNA unter Verwendung eines bestehenden Apparates mit geringen Modifikationen zu dem Verfahren, welches notwendig ist, um die beanspruchte DNA-Sequenzierungsreaktion durchzuführen.

[0011] Daher stellt in einem ersten Aspekt die Erfindung ein Verfahren zur Sequenzierung von DNA vor, welches die folgenden Schritte einschließt: Das Bereitstellen eines Polynukleotidprimers, komplementär zu einem Bereich der DNA, das Bereitstellen der DNA, die sequenziert werden soll, und das In-Kontakt-Bringen des Primers und der DNA mit einander in Gegenwart einer DNA-Polymerase und zwischen 1 und 3 dNTPs, wobei mindestens eines dieser dNTPs markiert ist. Der Primer und die DNA werden unter Bedingungen mit einander in Kontakt gebracht, welche die Verlängerung des Primers durch Anfügen von einem oder mehreren der dNTPs an das 3'-Ende des Primers gestatten, um einen verlängerten Primer zu bilden. Der Primer und die DNA werden dann dissoziiert oder getrennt, im allgemeinen durch Erwärmen, und die Kontaktierungs- und Trennschritte werden mehrere Male wiederholt (gewöhnlich 10 bis 200 Mal). Schließlich wird der verlängerte Primer mit der DNA in Gegenwart einer DNA-Polymerase in Kontakt gebracht (welche im allgemeinen dieselbe Polymerase ist wie die in dem anfänglichen Markierungsschritt verwendete), allen vier dNTPs und einem Kettenterminationsmittel bzw. einem Kettenabbruchmittel.

[0012] In bevorzugten Ausführungsformen ist die DNA-Polymerase Taq-DNA-Polymerase (z. B. eine Form der Taq-Polymerase, welcher eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität fehlt), eine niedrige Exonukleaseform von T7-DNA-Polymerase (siehe Tabor und Richardson USP Nr. 4 795 699) Klenow, AMV-reverse Transkriptase, Bst-, Tth- oder Vent-DNA-Polymerase oder exofreie Formen solcher Polymerasen; das dNTP ist mit <sup>35</sup>S oder einer fluoreszenten, chemilumineszenten oder anderen Markierung (z. B. welche nachweisbar ist als ein Ligand für einen indirekten Enzym-verknüpften Assay, z. B. Biotin) markiert; und auf den letzten Kontaktierungsschritt in Gegenwart eines Kettenterminationsmittels folgt ein Trennschritt, durch welchen der verlängerte Primer von der DNA getrennt wird und diese zwei Schritte werden mehrfach wiederholt (z. B. zwischen 30 und 200 Mal) bis etwa 0,1 bis 1,0 pMol (bevorzugtermaßen 0,5 pMol) von markiertem, verlängertem Primer, welcher durch ein Didesoxynukleotid an seinem 3'-Ende terminiert ist, hergestellt wurde.

[0013] In anderen bevorzugten Ausführungsformen wird das Verfahren verwendet zur Sequenzierung von: gereinigter M13-DNA (einzelsträngig, ss), gereinigter Plasmid-DNA (doppelsträngig, ds), gereinigter Lambda-DNA (ds), M13-DNA von einem Plaque oder aus Flüssigkultur (ss), Plasmid-DNA von einer Kolonie oder aus Flüssigkultur (ds), Plasmid-mit-fl-ori, bevorzugtermaßen infiziert mit einem Helferphagen aus einer Kolonie (ss), PCR-Produkt, z. B. Gel-gereinigt (ds); PCR-Produkt behandelt mit w/ExoI und Alk. Phos. (ds), Asymmetrischem PCR-Produkt, behandelt mit Alk. Phos. (ss), gereinigter Cosmid-DNA, und DNA aus anderen Quellen z. B. Hefe oder bakterieller genomischer DNA oder anderer Phagen-DNAs.

[0014] Andere Eigenschaften und Vorteile der Erfindung werden offensichtlich aus der folgenden Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen davon und aus den Ansprüchen.

#### Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen

[0015] Die Zeichnungen werden zuerst kurzbeschrieben.

#### Zeichnungen

[0016] **Fig. 1** ist eine Darstellung eines DNA-Sequenzierungsverfahrens dieser Erfindung als Diagramm ,  
 [0017] **Fig. 2-7** sind Kopien von Autoradiogrammen, welche aus DNA-Sequenzierungsexperimenten erhalten wurden, unter Verwendung einer Vielfalt von Bedingungen, die nachstehend beschrieben werden, und  
 [0018] **Fig. 8** ist ein Graph von Daten aus einem Applied Biosystems Instrument, welcher die Ergebnisse eines Sequenzierungsexperimentes zeigt.

[0019] Es folgen Beispiele von Methoden der Erfindung. Diese Beispiele sind nicht beschränkend in der Erfindung und Fachleute werden erkennen, daß in den Reaktionen verwendete Bestandteile leicht mit äquivalenten Reagenzien, welche im Fachbereich bekannt sind, substituiert werden können.

#### Methoden

[0020] Unter Bezug auf die **Fig. 1**, besteht der erste Schritt in dem Verfahren darin, die Sequenz der Matrize zu untersuchen (gewöhnlicherweise Vektorsequenz) und eine Kombination von Primer und Markierungsnukleotiden auszuwählen. Der Primer wird nach Standardkriterien ausgewählt, welche im Fachbereich gut bekannt sind, um die DNA-Synthese nahe an der Sequenz, die von Interesse ist, zu primen. Der Primer ist typischerweise ein synthetisches Oligonukleotid von 16 bis 25 Nukleotidbasen Länge.

[0021] Eine Mischung von drei Nukleotiden (von den möglichen vier: dATP, dCTP, dGTP und dTTP) wird wie folgt ausgewählt: der erste Platz, an dem dAMP stromabwärts von dem 3'-Ende des Primers inkorporiert wird,

wird lokalisiert. In einer ähnlichen Weise werden die ersten Stellen für die Inkorporation von dGMP, dCMP und dTTP gefunden. Eine von diesen Stellen wird weiter von dem Primer entfernt sein als alle anderen. Das Nukleotid, welches an dieser Stelle erforderlich ist, wird während der Markierungsphase des Protokolls ausgelassen (dCTP in der **Fig. 1**). Eines oder mehrere der restlichen Nukleotide muß markiert sein (z. B.  $\alpha^{32}\text{P}$ ,  $\alpha^{35}\text{S}$  oder ein fluoreszentes Molekül). Eine Kombination wird so ausgewählt, daß , mindestens zwei markierte Nukleotide vor einer Termination an dem Punkt inkorporiert werden, wo das fehlende Nukleotid die Verlängerung terminiert. In der **Fig. 1** werden vier dAMP-Nukleotide inkorporiert vor der ersten Stelle, an der dCMP erforderlich wäre. Daher ist ein markiertes dATP in diesem Beispiel eine gute Wahl.

[0022] Eine geeignete Kombination von Primer und Nukleotidmischung kann gewöhnlich ohne Schwierigkeiten gefunden werden, Vektoren können jedoch in einer spezifischen Weise für eine optimale Markierung von Sequenzen konstruiert werden. Falls notwendig kann die Wahl, welches dNTP der Markierungsmischung auszulassen ist, empirisch durch das Lauferlassen von Testmarkierungen bestimmt werden.

#### Beispiel 1: Sequenzierung mit gereinigter M13-DNA oder gereinigter Plasmid-DNA

[0023] Die folgenden Bestandteile wurden zu einem Mikrozentrifugenreaktionsgefäß (0,4 ml) zugegeben, welches in einer Thermocycler-Maschine. (z. B. Perkin-Elmer DNA Thermal Cycler) eingefügt war: 0,005 pMol oder mehr M13-DNA (z. B. M13mp18, 0,01  $\mu\text{g}$ ) oder 0,03  $\mu\text{g}$  doppelsträngige Plasmid-DNA (z. B. pUC19), 2  $\mu\text{l}$   $\Delta\text{TAQ}$ -Reaktionspuffer (United States Chemical Corporation, Cleveland, Ohio, 260 mM Tris-HCl pH 9,5, 65 mM  $\text{MgCl}_2$ ), 1  $\mu\text{l}$  3,0  $\mu\text{M}$  dGTP, 1  $\mu\text{l}$  3,0  $\mu\text{M}$  dTTP, 0,5  $\mu\text{l}$  (5  $\mu\text{Ci}$ ) von [ $\alpha^{35}\text{S}$ ]-dATP (etwa 1200 Ci/mMol), 1  $\mu\text{l}$  -40-Primer (0,5  $\mu\text{M}$ , 0,5 pMol/ $\mu\text{l}$ , 5'GTTTTCCAGTCACGAC-3'), 2  $\mu\text{l}$   $\Delta\text{TAQ}$ -DNA-Polymerase, 32 U/ $\mu\text{l}$  (von United States Biochemical Corporation, Cleveland, OH, in 20 mM Tris (pH 8,5), 100 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,5% NP-40, 0,5% TWEEN-20 und 50% Glycerol, achtfach verdünnt in Verdünnungspuffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM 2-Mercaptoethanol, 0,5% TWEEN-20, 0,5% NP-40)), und Wasser zu einem Gesamtvolumen von 17,5  $\mu\text{l}$ .

[0024] Diese Bestandteile wurden gemischt und mit 10  $\mu\text{l}$  leichtem Mineralöl. überschichtet (United States Biochemical Corporation). Das Reaktionsgefäß wurde in den Thermocycler plaziert und 30 bis 100 Zyklen (mehr als 60 Zyklen sind nicht notwendig) von 45°C während 1 Minute bis 70°C während 0,5 Minuten durchgeführt (die Temperaturen können zyklisch von 55°C bis zu 70°C, falls gewünscht, durchgeführt werden, oder selbst eine konstante Temperatur von etwa 62°C kann aufrechterhalten werden (abhängig von der Schmelztemperatur des Primers und der Matriz, die sequenziert werden soll). Eine solche isotherme Markierung ist möglich, dauert aber ebenso lange, um vollständig durchgeführt zu sein (etwa 4–6 Stunden) wie bei zyklisch durchgeführten Temperaturen). Die Temperaturen können eingestellt werden, falls die Schmelztemperatur des Primers/ der Matriz in einer signifikanten Weise höher oder niedriger ist, aber diese Temperaturen funktionieren für die meisten Primer/Matrizen gut. Eine Temperatur von 95°C kann anstelle von 70°C mit äquivalenten Ergebnissen verwendet werden. Dieser Schritt kann in etwa 3 Minuten pro Zyklus durchgeführt werden.

[0025] Vier Reaktionsgefäße, wurden als A, C, G und T markiert, und mit 4 $\mu\text{l}$  der entsprechenden  $\Delta\text{TAQ}$ -Terminationsmischung gefüllt: ddA-Terminationsmischung (jeweils 15  $\mu\text{M}$  von dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 300  $\mu\text{M}$  ddATP), ddT-Terminationsmischung (jeweils 15  $\mu\text{M}$  von dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 450  $\mu\text{M}$  ddTTP), ddC-Terminationsmischung (jeweils 15  $\mu\text{M}$  von dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 225  $\mu\text{M}$  ddCTP), ddG-Terminationsmischung (jeweils 15  $\mu\text{M}$  von dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 22,5  $\mu\text{M}$  ddGTP) (United States Biochemical Corporation, Cleveland OH). Kein zusätzliches Enzym wird zu den Terminationsreaktionsgefäßen hinzu gegeben. Das eingebrachte Enzym aus dem vorhergehenden Schritt ist ausreichend.

[0026] Die zyklisch durchgeführte Markierungsreaktion wurde gleichmäßig unter den vier Terminationsreaktionsgefäßen aufgeteilt (4  $\mu\text{l}$  für jedes Terminationsreaktionsgefäß) und mit 10  $\mu\text{l}$  leichtem Mineralöl überschichtet.

[0027] Die vier Reaktionsgefäße wurden in den Thermocycler plaziert und 30 – 200 Zyklen (mehr als 60 Zyklen sind nicht notwendig) wurden von 95°C während 15 Sekunden, 55°C während 30 Sekunden und 72°C während 120 Sekunden durchgeführt. Dieser Schritt wurde bequemerweise über Nacht vollständig durchgeführt. Andere Zeiten und Temperaturen sind ebenfalls wirksam.

[0028] Sechs  $\mu\text{l}$  der Reaktionsmischung wurden entfernt (unter Vermeidung von Öl), 3  $\mu\text{l}$  Stopplösung (95% Formamid, 20 mM EDTA, 0,05% Bromphenolblau, 0,05% Xylencyanol FF) wurden hinzu gegeben und kurz auf 70°C bis 80°C direkt vor dem Laden auf ein Sequenzierungsgel erwärmt. Autoradiogramme erforderten eine 18 bis 36 Stunden dauernde Exposition unter Verwendung von Kodak XAR-5 Film.

[0029] Unter Bezug auf die **Fig. 2** wurde die angegebene Menge gereinigter M13mp18-DNA (0,001 bis 0,1  $\mu\text{g}$  jeweils in den Spuren E-A) sequenziert unter Verwendung des -40-Primers und der Nukleotide, wie vorausstehend beschrieben. Der Markierungsschritt wurde zyklisch 30 Mal durchgeführt (45°C bis 95°C) und der Terminationsschritt wurde 35 Mal zyklisch durchgeführt (95°C, 55°C und 72°C). Das Ergebnis in der Spur F ist ein Beispiel, in welchem alle vier dNTPs während des zyklisch durchgeführten Markierungsschrittes vorhanden waren (jeweils 3 pMol).

[0030] Wenn das vorausstehende Markierungsverfahren ohne eine zyklische Durchführung durchgeführt wird (unter Verwendung des Standardprotokolls für den TAQuence Sequenzierungs-Kit, United States Biochemical Corporation), ergeben 0,1 µg M 13mp 18 Matrizen-DNA ein Autoradiogramm, in dem die Banden, welche die ersten 200 Basen von dem Primer repräsentieren, abwesend sind. Die Verwendung von weniger DNA ergibt eine noch blässere Sequenz.

#### Beispiel 2: Direkte Sequenzierung eines M13 Plaques

[0031] Ein M13 Plaque (M13mp18) wurde von einer 18–36 Stunden lang inkubierten Platte unter Verwendung einer Pipettenspitze mit einer großen Öffnung gepickt. Mehr Phage kann erhalten werden durch die Verwendung einer Spitze, wobei die Spitze zurückgeschnitten ist, um die Öffnung auf etwa 1,5 mm Durchmesser zu weiten. Eine kleine Menge von Softagar hängt der Spitze an. Der Softagar wurde gut gemischt (durch wiederholtes Aufsaugen und Ausstoßen der Flüssigkeit in der Pipette) mit 2 µl des Reaktionspuffers und 10 µl Wasser. Das Reaktionsgefäß wurde verschlossen und 10 Minuten lang bei 95° bis 100°C erwärmt und schnell zentrifugiert, um jedwede Kondensation zu sammeln. 12 µl wurden dann schnell (so daß sich der Agar nicht verfestigt) für die Sequenzierung entfernt. Das in dem Beispiel 1 vorgestellte Verfahren wurde dann für die Sequenzierung verwendet.

[0032] Unter Bezug auf die **Fig. 4** ist die DNA-Sequenz aus einem einzelnen Plaque von M13mp18, gepickt aus einem Rasen von JM101 gezeigt. Die DNA wurde aus dem Plaque extrahiert durch das Erwärmen in Sequenzierungspuffer bei 95°C bis 100°C während 10 Minuten. Die DNA wurde sequenziert unter Verwendung des –40 Primers und der Nukleotide wie vorausstehend beschrieben. Der Markierungsschritt wurde 99 Mal zyklisch durchgeführt (45°C bis 95°C) und der Terminationsschritt wurde 198 Mal zyklisch durchgeführt (95°C, 55°C und 72°C).

#### Beispiel 3: Direkte Sequenzierung einer ein Plasmid enthaltenden Kolonie

[0033] Eine Kolonie, welche einen Klonierungsvektor enthält (z.B. pUC19) wird aus einer 36 Stunden lang inkubierten Platte (L Brühe) unter Verwendung eines sterilen Drahtes oder einer Schlinge gepickt, in 2 µl Reaktionspuffer und 10 µl Wasser suspendiert und gemischt. Die Kolonie wurde bei 95°C bis 100°C 20 Minuten lang erwärmt, kurz zentrifugiert, um den Abfall bzw. Debris zu sedimentieren und 12 µl der Flüssigkeit wurden für die Sequenzierung entfernt. Das in dem Beispiel 1 vorgestellte Verfahren wurde dann für die Sequenzierung verwendet.

[0034] Unter Bezug auf **Fig. 3** sind die Ergebnisse der zyklisch durchgeführten Markierungssequenzierung von Plasmid(pUC19)-DNA gezeigt. Die angegebene Menge von gereinigter pUC19-DNA (0,01–3 µg) wurde sequenziert unter Verwendung des –40 Primers und von Nukleotiden, wie vorausstehend beschrieben: Der Markierungsschritt wurde 85 Mal zyklisch durchgeführt (45°C bis 95°C) und der Terminationsschritt wurde 198 Mal zyklisch durchgeführt (95°C, 55°C und 72°C).

#### Beispiel 4: Direkte Sequenzierung einer ein Plasmid enthaltenden und mit einem Helferphagen infizierten Kolonie

[0035] Die Infektion einer Zelle, welche ein Plasmid mit dem fl-Ursprung (origin) enthält, mit einem Helferphagen resultiert in der Produktion großer Mengen von phagenartigen Partikeln, welche einen Strang der Plasmid-DNA enthalten. (Der hergestellte Strang wird durch die Orientierung des fl-Ursprungs bestimmt). Diese werden aus der Zelle sezerniert.

[0036] Helferphagenpartikel werden ebenfalls in einer geringeren Menge hergestellt (aufgrund einer Veränderung in dem Ursprung des Helferphagen) aber diese werden nicht mit dem verwendeten Primer sequenziert. Daher ist, wenn eine Kolonie mit einem Helferphagen infiziert ist, mehr Plasmid-DNA (aber nur ein Strang) für die Sequenzierung verfügbar. Die Plasmid-Sequenzierung aus einer einzelnen Kolonie ist gering, möglicherweise weil es schwer ist, ausreichende Matrizen-DNA routinemäßig zu erhalten. Eine Infektion mit einem Helferphagen erzeugt mehr Matrize, was das Sequenzieren möglich macht.

[0037] Der Wirtstamm JM101 wurde mit einem Plasmid-Vektor (pTZ18U, Mead et al., 13 Nucleic Acid Research 1103, 1985) transformiert, welcher den Replikationsursprung von dem Bakteriophagen f1 enthält. Nach einer Inkubation der kompetenten Zellen mit dem Plasmid bei 0°C (45 Minuten) und 42°C (2 Minuten) wurden die Zellen in L Brühe verdünnt und bei 37°C 30 Minuten lang inkubiert. Der M13 Helferphage M13KO7 (Vierra und Messing, 153 Meth. Enz. 3, 1987; 10 µl von 10<sup>10</sup> pfu/ml (bzw. Plaque forming Units bzw. Plaque bildenden Einheiten/ml) wurden zugegeben, und die Inkubation wurde bei 37°C 20 Minuten lang fortgesetzt. Die Transformanten wurden dann auf Medium, welches Ampicillin und Kanamycin enthielt, ausplattiert. Nach einer Inkubation während 18–36 Stunden wurde eine einzelne Kolonie gepickt.

[0038] Eine Kolonie von einer 18–36 Stunden lang inkubierten Platte wurde gepickt unter Verwendung eines

sterilen Drahtes oder einer Schlinge, in 2 µl Reaktionspuffer suspendiert und 10 µl Wasser und gut gemischt. Die Mischung wurde bei 95°C bis 100°C 20 min lang erwärmt. Alternativ wurde sie bei 37°C 30 Minuten lang erwärmt, kurz zentrifugiert und der Überstand bei 95°C bis 100°C 10 Minuten lang inkubiert. Der Überstand wurde dann kurz zentrifugiert, um den Abfall zu sedimentieren und 12 µl wurden für die Sequenzierung wie vorausstehend entfernt.

[0039] Unter Bezug auf die **Fig. 5** ist die DNA-Sequenz aus einer einzelnen Kolonie von pTZ18U enthaltenden, mit M13KO7 infizierten 7M101 gezeigt. Die DNA wurde aus der Kolonie extrahiert durch das Erwärmen in Sequenzierungspuffer bei 95°C bis 100°C während 10 Minuten. Die DNA wurde sequenziert unter Verwendung des -40 Primers und der Nukleotide wie vorausstehend beschrieben. Der Markierungsschritt wurde 99 Mal zyklisch durchgeführt (45°C bis 95°C) und der Terminationsschritt wurde 198 Mal zyklisch durchgeführt (95°C, 55°C und 72°C).

#### Beispiel 5: Sequenzierung von DNA extrahiert aus dem Bakteriophagen Lambda

[0040] Gereinigte DNA aus dem Bakteriophagen Lambda (1 µg in 5 µl H<sub>2</sub>O) wurde mit 1 µl (0,5 pMol) Primer gemischt (SEQ.ID Nr. 1: 5'-GGTTATCGAAATCAGCCACAGCGCC, den Basen 7630-7606 in dem Bakteriophagen Lambda entsprechend), 2 µl ΔTAQ-Puffer, 1 µl 3 µM dGTP, 1 µl 3 µM dTTP, 0,5 µl α-<sup>35</sup>S-dCTP (1200 Ci/mMol, 10 µCi/µl) und mit verdünnter ΔTAQ-DNA-Polymerase (2µl 4 U/µl) und 5 µl H<sub>2</sub>O für ein Gesamtvolumen von 17,5 µl. Diese Mischung wurde in den DNA Thermal Cycler bei 50°C 60 Sekunden lang inkubiert, dann 90°C während 30 Sekunden während 99 Zyklen. Unter Verwendung dieser Mischung von Nukleotiden wurde der Primer 7 Basen mit der Sequenz (SEQ ID. Nr. 2: TCCCGTT, wobei die Cs markiert waren) verlängert.

[0041] Die Mischung wurde dann in vier Teile geteilt, wobei ein Teil mit 4 µl ddGTP Terminationsmischung kombiniert wurde (jeweils 15 µM von dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 33,5 µM ddGTP), ein zweiter mit 4 µl ddATP Terminationsmischung (jeweils 15 µM von dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 300 µM ddATP), der dritte mit 4 µl ddTTP Terminationsmischung (jeweils 15 µM von dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 450 µM ddTTP) und der vierte mit 4 µl ddCTP Terminationsmischung (jeweils 15 µM von dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 225 µM ddCTP). Die Mischungen wurden mit 10 µl Mineralöl überschichtet und die Reaktionsgefäße wurden verschlossen. Diese vier Reaktionsgefäße wurden dann in den Thermal Cycler plaziert und 198 Zyklen bei 95°C, 15 Sekunden lang, 55°C, 30 Sekunden lang und 72°C 120 Sekunden lang unterzogen.

[0042] Nach der Vervollständigung der Zyklen über Nacht, wurden 6 µl der wässrigen Phase aus jedem Reaktionsgefäß entfernt und 3 µl Stopplösung (95% Formamid, 20 mM EDTA, 0,05% Bromphenolblau, 0,05% Xylen-cyanol FF) zugegeben. Die Mischungen wurden auf 75°C 2 Minuten lang erwärmt und dann auf einem Sequenzierungsgel aufgetragen. Die Sequenzierung erforderte nur 1 bis 2 µg (0,03-0,05 pMol).

[0043] Unter Bezug auf die **Fig. 6**, ist die Sequenz von DNA aus Bakteriophagen Lambda-DNA unter Verwendung eines zyklisch durchgeführten Markierungsschrittprotokolls gezeigt. 0,5 bis 5 µg Lambda-DNA wurden verwendet, wie in der Figur angegeben. Das gezeigte Autoradiogramm ist das Ergebnis einer Exposition von 60 Stunden.

#### Beispiel 6: Sequenzierung von DNA hergestellt durch eine Polymerasekettenreaktion

[0044] Nach einer vollständigen Durchführung einer Polymerasekettenreaktion enthält die Reaktionsmischung immer noch Primer im Überschuß, dNTPs und unspezifisch amplifizierte einzelsträngige DNAs. Diese werden typischerweise von dem gewünschten doppelsträngigen Produkt durch eine Präzipitation, eine Gelreinigung oder andere physikalische Methoden entfernt. Diese Verfahren sind gewöhnlich zeitaufwendig und erfordern manuelle Manipulationen für die Zentrifugationen oder Gelelektrophorese. Ich habe gefunden, daß die nicht wünschenswerte einzelsträngige DNA und die Primer entfernt werden können durch eine kurze Inkubation mit Exonuklease I. In einer ähnlichen Weise können die dNTPs im Überschuß (welche mit dem Markierungsanteil des Sequenzierungsverfahrens interferieren würden) entfernt werden durch eine gleichzeitige Behandlung mit alkalischer Phosphatase. Beide Enzyme können durch ein kurzes Erwärmen inaktiviert werden. Anschließend kann das PCR-Produkt sequenziert werden unter Verwendung der in dem Beispiel 1 vorgestellten Verfahren.

[0045] In spezifischer Weise wurde eine PCR durchgeführt wie vorgestellt in dem Perkin-Elmer Cetus GENE-AMP Kit unter Verwendung von 200 µM dNTPs, 100 pMol von jedem Primer, 1 ng Matrizen-DNA und Puffer in einem Gesamtvolumen von 100 µl. Die Matrizen-DNA war pT7L-21 (ein Klon eines modifizierten Tetrahymena Ribozyms in pUC 18; Zaug et al., 27 Biochemistry 8924-8931, 1988) und die Primer waren -40 Universalsequenzierungsprimer (SEQ. ID. Nr. 3: 5'-GTTTTCCAGTCACGAC) und der reverse Sequenzierungsprimer (SEQ. ID. Nr. 4: 5'TTCACACAGGAAACAG). Diese Primer ergeben ein Produkt von 518 Nukleotiden Länge. Die Polymerasekettenreaktion wurde durchgeführt unter Verwendung von 30 Zyklen bei 94°C während 1 Minute, 37°C während 1 Minute und 72°C während 2 Minuten.

[0046] Ein Aliquot (10 µl) der PCR-Mischung wurde entfernt. Exonuklease I (USB Produkt Nr. 70013; 1 µl von 10 U/µl) und alkalische Phosphatase aus Garnelen (USB Produkt Nr. 70092; 1 µl von 1U/µl) wurden zugegeben. Diese Mischung wurde bei 37°C 15 Minuten lang inkubiert, gefolgt von einer Hitzeinaktivierung bei 70°C während 15 Minuten. Diese Mischung wurde auf 200 bis 2000 µl mit TE-Puffer verdünnt (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA) und 10 µl wurden für eine Zyklussequenzierung gemäß dem Verfahren von Beispiel 1 unter Verwendung des –40-Primers verwendet. Kontrollexperimente, in welchen die Behandlungen mit entweder Exonuklease I oder mit alkalischer Phosphatase aus Garnelen ausgelassen wurde, versagten dabei, für gute Sequenzdaten zu sorgen.

[0047] Unter Bezug auf die **Fig. 7** ist die DNA-Sequenz eines Produktes einer Polymerasekettenreaktion unter Verwendung eines zyklisch durchgeführten Markierungsschrittprotokolls gezeigt. Der Markierungsschritt wurde 65 Mal zyklisch durchgeführt (45°C bis 70°C) und der Terminationsschritt wurde 198 Mal zyklisch durchgeführt (95°C, 55°C und 72°C). Aliquots der PCR-Reaktionsmischung wurden mit der Exonuklease I behandelt (Spuren A und C) und/oder mit alkalischer Phosphatase aus Garnelen (Spuren B und C), wie vorausstehend beschrieben oder nicht behandelt (Spur D). Die Enzyme wurden dann hitzeinaktiviert und die DNA zwanzigfach verdünnt. Dies wurde als Matrize (10 µl) unter Verwendung von –40-Primer und Nukleotiden, wie vorausstehend beschrieben, verwendet. Eine Vorbehandlung sowohl mit der Exonuklease als auch mit der alkalischen Phosphatase ergibt die beste Sequenz (C)

#### Beispiel 7: Zyklussequenzierung mit Fluoreszeिन-markiertem dUTP und Fluoreszenznachweis

[0048] In diesem Beispiel wird die radioaktive Markierung durch ein nichtradioaktives Fluoreszeिन-Markiertes Nukleotid (Fluoreszeिन-dUTP), Boehringer Mannheim Biochemicals) ersetzt. Zyklussequenzen ließ man entweder unter Verwendung einzelsträngiger M13-DNA oder doppelsträngiger pUC18-Plasmid-DNA als Matrize laufen. Den zyklisch durchgeführten Markierungsschritt ließ man unter Verwendung des Universal (–40) Sequenzierungsprimers in Gegenwart von dATP, dGTP und Fluoreszeिन-dUTP laufen. Die Reaktionsprodukte wurden auf einem Sequenzierungs-Elektrophoresegel, montiert in einem ABI Modell 373A DNA-Sequenzierungsinstrument, angewendet, welches Sequenzierungsprodukte durch Fluoreszenz nachweist.

[0049] Für den zyklisch durchgeführten Markierungsschritt wurden 0,05 pMol (oder mehr) M13-DNA (0,125 µg) oder 36 µg doppelsträngige Plasmid-DNA (pUC18), 2 µl ΔTaq Reaktionspuffer (260 mM Tris-HCl, (pH 9,5), 65 mM MgCl<sub>2</sub>), 3 µl Fluoreszeिन-dUTP-Markierungsmischung (10 µM Fluoreszeिन-dUTP, 1 µM dGTP, 1 µM dATP) 1 µl „–40“-Primer (0,5 µM, 0,5 pMol/µl 5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3'), 2 µl ΔTaq-DNA-Polymerase (8 U/µl) (in 10 mM Tris-HCl, pH8,0, 1 mM 2-Mercaptoethanol, 0,5% TWEEN-20, 0,5% NP-40) und Wasser in einem Gesamtvolumen von 18 µl in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß für die Mikrozentrifuge kombiniert, gut gemischt und mit 15 µl leichtem Mineralöl überschichtet. Das Reaktionsgefäß wurde in den Thermocycler (Perkin-Elmer Cetus Co.) plaziert und 30 bis 50 Zyklen von 95°C während 15 Sekunden und 60°C während 30 Sekunden unterzogen.

[0050] Diese Kombination von Bestandteilen der Markierungsreaktion gestattete die Inkorporierung eines Maximums von 3 Fluoreszeिन-dUTP-Molekülen pro angelagertem Primer, da dCTP in der Polymerisierungsmischung, wie nachstehend erläutert fehlte.

[0051] Vor dem Markierungsschritt

#### Primer

. . . **GTTTTCCAGTCACGAC**

. . . **CAAAGGGTCAGTGCTGCAACATTTTGCTG** . . .

#### Matrize

[0052] Nach dem Markierungsschritt

**Primer**

. . . **GTTTTCCAGTCACGACGUUGUAAAA** (U= Fluoreszein-dUMP)

. . . **CAAAGGGTCAGTGCTGCAACATTTTGCTG**. . .

**Matrize**

[0053] Auf die Markierungszyklen folgend wurden vier Reaktionsgefäße mit A, C, T und G markiert und mit 4 µl der entsprechenden ΔTaq-Terminationsmischung gefüllt. Dann wurde die zyklisch durchgeführte Markierungsreaktion in gleicher Weise unter den vier Terminationsreaktionsgefäßen aufgeteilt (3,5 µl zu jedem Terminationsreaktionsgefäß) und mit 15 µl von leichtem Mineralöl überschichtet.

[0054] Die vier Reaktionsgefäße wurden in den Thermocycler plaziert und 30 bis 50 Zyklen wurden von 95°C während 30 Sekunden, 60°C während 60 Sekunden und 72°C während 60 Sekunden durchgeführt. Die Reaktionen wurden durch die Zugabe von 4 µl Stop-Lösung (95% Formamid, 20 mM EDTA) zu den Terminationsreaktionen bereits unter Mineralöl gestoppt. Diese Proben wurde kurz bei 75°C bis 80°C erwärmt direkt vor dem Laden auf ein Sequenzierungsgel. Die Proben (5 µl) wurden in vier neben einander liegende Spuren geladen (entsprechend einer der vier Terminationsreaktionen ddA, ddC, ddG und ddT) auf einem Sequenzierungsgel mit 6% Polyacrylamid und 7M Harnstoff. Die Elektrophorese der Sequenzierungsreaktionsprodukte wurde durchgeführt unter Verwendung des Applied Biosystems 373A DNA-Sequenzierungsinstrumentes über Nacht während 16 Stunden und 35 Watt konstanter Energie. Ein hochempfindlicher Fluoreszenzdetektor, welcher nahe am Boden bzw. unteren Ende des Gels plaziert ist, weist die fluoreszierenden Banden von DNA, während sie durch die Elektrophorese vorbeilaufen, nach. Die Fluoreszenzintensität aus jeder Spur wurde gesammelt unter Verwendung der begleitenden ABI Computer-Software unter Verwendung des Filterkanals, welcher für den Nachweis von Fluoreszein optimal war. Diese Software wurde ebenfalls verwendet, um die Daten zu normalisieren, indem man die Abweichung von der Grundlinie (baseline drift) abzog.

[0055] Die **Fig. 8** zeigt die Ergebnisse der Sequenzierung von M13mp18-DNA, indem sie die Ergebnisse zeigt, welche den Bereich von 175 bis 217 Basen von 5'-Ende des Primers abdecken. In dem Panel A sind die Rohdaten von vier nebeneinander liegenden Spuren gezeigt: eine ddG-Reaktion, eine ddC-Reaktion, eine ddA-Reaktion und eine ddT-Reaktion. Das untere Panel B zeigt dieselben Ergebnisse nach einer Softwareanalyse, welche die Hintergrundabweichung entfernt und die durchschnittlichen Spitzenhöhen normalisiert. Die bekannte Sequenz der Matrizen-DNA in diesem Bereich ist oberhalb der Spitzen gezeigt. Ein manueller Vergleich des Graphen und der Sequenz zeigt an, daß das Verfahren die Sequenz in korrekter Weise zeigte, von allen außer ein oder zwei der Basen dieses Bereichs.

Beispiel 8: Sequenzierung asymmetrischer PCR-Produkte durch eine Vorbehandlung mit alkalischer Phosphatase:

[0056] Normalerweise wird die Polymerasekettenreaktion (PCR) mit gleichen Konzentrationen von zwei Primern durchgeführt, was zur geometrischen Amplifizierung der Sequenz zwischen ihren Anlagerungsstellen (annealing sites) führt. Im Prinzip kann jeder Zyklus die Menge von Produkt-DNA in der Reaktionsmischung verdoppeln. Die Produkte solcher "symmetrischen" PCR-Reaktionen sind lineare doppelsträngige DNA-Moleküle. Manchmal werden Primer zu den Amplifizierungsreaktionen in ungleichen Konzentrationen zugegeben, mit einem Konzentrationsverhältnis von 10 : 1 bis zu 500 : 1. Solche „asymmetrischen“ PCR-Reaktionen laufen in einer normalen Weise während der ersten paar wenigen Zyklen ab, indem sie eine in geometrischer Weise ansteigende Menge an DNA-Produkt erzeugen. Schließlich ist der Vorrat des Primers mit der niedrigeren Konzentration erschöpft. Ab diesem Punkt haben Amplifizierungszyklen nur einen einzigen Primer zur Verfügung, so erzeugen sie nur einen Strang von DNA-Produkt. Die Konzentration dieses einzelsträngigen Produktes steigt in linearer Weise mit zusätzlichen Zyklen an. Daher bestehen die Reaktionsprodukte aus einer relativ kleinen Menge doppelsträngiger linearer DNA und einer größeren Konzentration einzelsträngiger linearer DNA. Diese einzelsträngige DNA kann als eine Matrize für eine DNA-Sequenzierung verwendet werden.

[0057] Gyllensten und Erlich, 85 Proc. Natl. Acad. Sci USA 7652 (1988), beschreiben ein Verfahren zur Sequenzierung der einzelsträngigen Produkte von einer asymmetrischen PCR. Das Verfahren erfordert die Verwendung eines Ultrafilters in einer Zentrifuge, gefolgt von Trocknen der konzentrierten DNA. Dieses Verfahren dauert mehrere Stunden zur voll-ständigen Durchführung und die Verwendung des Filters macht es teuer. Andere (Brow, S. 189 in „PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications“, Academic Press 1990) haben die Verwendung von einer Alkoholpräzipitation beschrieben, um die DNA vor dem Sequenzieren zu reinigen. Wiederum dauert dieses Verfahren einige Stunden zur vollständigen Durchführung. Sie schlagen eine Alterna-

tive vor, welche keine DNA-Reinigung erfordert, aber welche die Verwendung von markiertem Primer erfordert und verminderte Konzentrationen – von dNTPs in dem PCR-Verfahren. Das Markieren des Primers ist ein zusätzlicher zeitaufwendiger und teurer Schritt, insbesondere falls man nur einige wenige Sequenzen laufen läßt.

[0058] Die Reinigung oder andere Schritte ist bzw. sind notwendig, da die dNTPs, welche für die PCR verwendet werden, mit dem Sequenzierungsverfahren interferieren. Der Anmelder hat gefunden, daß diese dNTPs weitaus schneller entfernt werden können auf eine einfache und kostengünstige Weise durch die Zugabe einer kleinen Menge von hitzelabiler alkalischer Phosphatase. Bevorzugte alkalische Phosphatasen schließen die alkalische Phosphatase aus Garnelen ein (United States Biochemical Corporation) und alkalische Phosphatase aus Kälberdarm, welche einer Erwärmung auf 60°C bis 70°C gegenüber sensibel sind.

[0059] Die PCR wurde in einem Volumen von 100 µl durchgeführt unter Verwendung von 50 pMol eines Primers und 1 pMol des zweiten Primers (50 : 1 Primerverhältnis) in dem Puffer, welcher in dem GeneAmp Kit (Perkin-Elmer Cetus Corp.) geliefert wird, mit 2,5 Einheiten von AmpliTaq Taq-DNA-Polymerase. Die dNTPs wurden in einer Konzentration von 0,2 mM zugegeben. Die Matrize wurde durch einen einzelnen Plaque von M13, welcher eine Insertion von etwa 1 Kb Größe enthielt, geliefert. Der Phage wurde aus dem Plaque in 100 µl von 10 mM Tris-HCl pH7,5, 1mM EDTA eluiert und 5 µl wurden in der PCR verwendet. Das Reaktionsgefäß wurde in den Thermocycler plaziert und 50 Zyklen von 95°C während 1 Minute, 55°C während 1 Minute und 72°C während 2 Minuten unterzogen.

[0060] Auf die Amplifizierung folgend wurde ein Aliquot (10 µl) entfernt und 2 Einheiten von alkalischer Phosphatase wurde zugegeben. Diese Mischung wurde bei 37°C während 10 Minuten inkubiert und dann wurde die Phosphatase durch eine Inkubation bei 70°C während 10 Minuten inaktiviert.

[0061] Auf diese Behandlung folgend wurde ein Aliquot von 7 µl entfernt und sequenziert unter Verwendung der normalen Verfahren für den Sequenae Version 2.0 DNA-Sequenzierungs Kit (United States Biochemical Corporation). Die Sequenzen waren von einer ausgezeichneten Qualität bei der Vorbehandlung mit der alkalischen Phosphatase aber nicht verwendbar ohne die alkalische Phosphatase. Dieses Verfahren wird schnell vollständig durchgeführt, wobei es nur einfache Pipettierschritte erfordert, welche leicht durch automatisierte Roboter durchgeführt werden können. Die Reagenzien sind leicht verfügbar und kostengünstig. In einer ähnlichen Weise wurden Sequenzen von einer hohen Qualität unter Verwendung von amplifizierter menschlicher genomischer DNA unter Verwendung verschiedener Primer erhalten.

[0062] Andere Ausführungsformen liegen innerhalb der folgenden Ansprüche.

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von DNA für die Sequenzierung, umfassend das Amplifizieren der DNA und Kontaktieren der amplifizierten DNA mit einer alkalischen Phosphatase.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei ebenso Exonuklease I mit der amplifizierten DNA kontaktiert wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Verfahren weiterhin das Sequenzieren der DNA nach dem Kontaktierungsschritt umfaßt.
4. Kit zur Herstellung von DNA, umfassend Exonuklease I und alkalische Phosphatase.

Es folgen 8 Blatt Zeichnungen

FIG. 1.

I PRIMER (UNIVERSAL-40, IM UEBERSCHUSS ANWESEND)

GT TTT CCC AGT CAC GAC  
CCCAAAGGGTCAGTGCTGCAACATTTTGCTGCCGG

MATRIZE (M13mp18)

$\Delta$  *Taq* DNA POLYMERASE

dGTP, dTTP, [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]dATP

50-100 CYCLEN

MARKIERUNGSSCHRITT

GT TTT CC CAGT CAC GAC GTT G TAAA  
CCCAAAGGGTCAGTGCTGCAACATTTTGCTGCCGG

+

GT TTT CCC AGT CAC GAC GTT G TAAA  
(50-100 KOPIEN PRO MATRIZENMOLEKÜL)

dNTPs, ddNTP

4 REAKTIONEN

100-200 CYCLEN

TERMINATIONSSCHRITT

DNA-SEQUENZ

FIG. 2a. FIG. 2b. FIG. 2c. FIG. 2d. FIG. 2e. FIG. 2f.

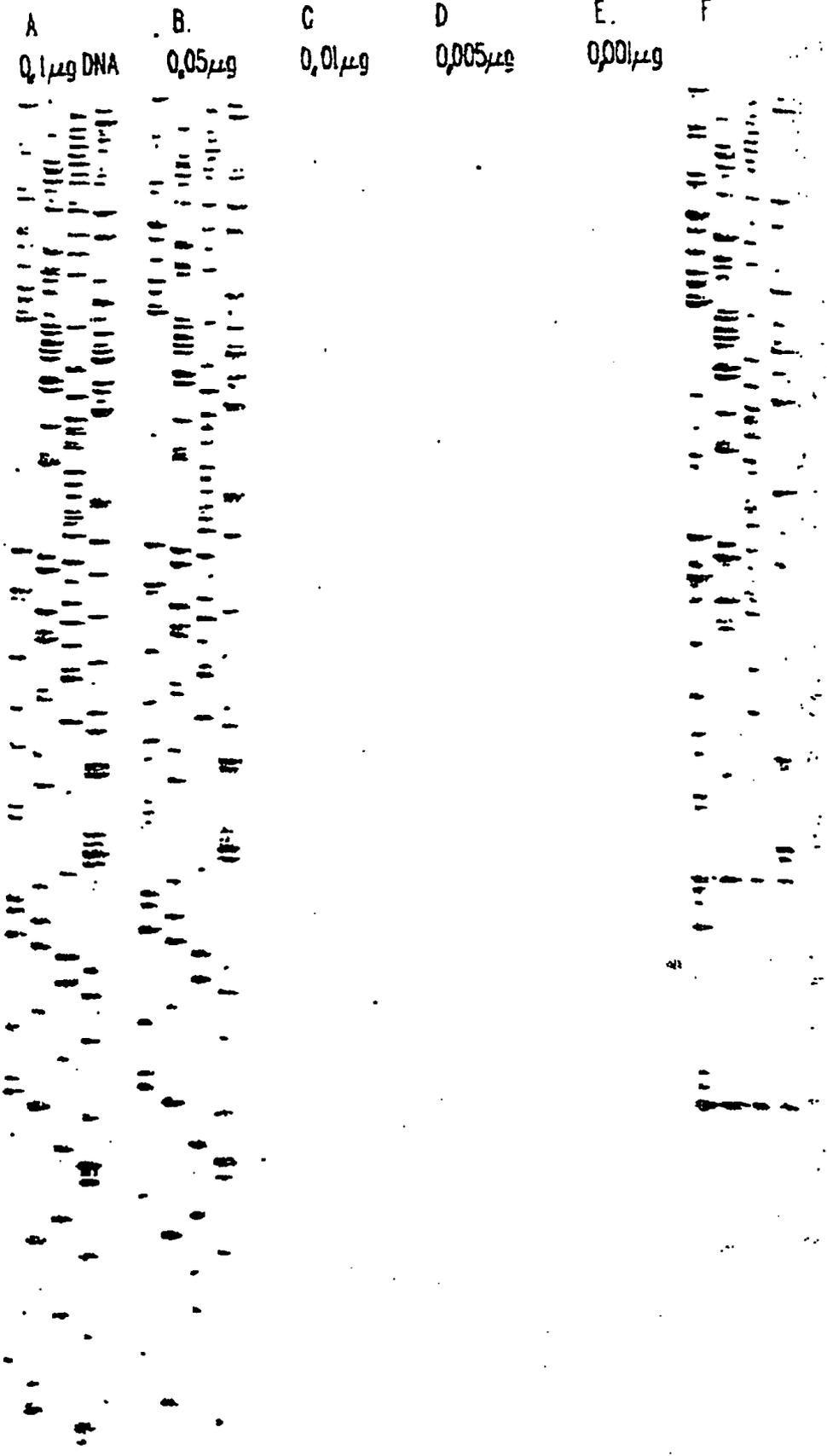


FIG. 3a. FIG. 3b. FIG. 3c. FIG. 3d. FIG. 3e. FIG. 3f.

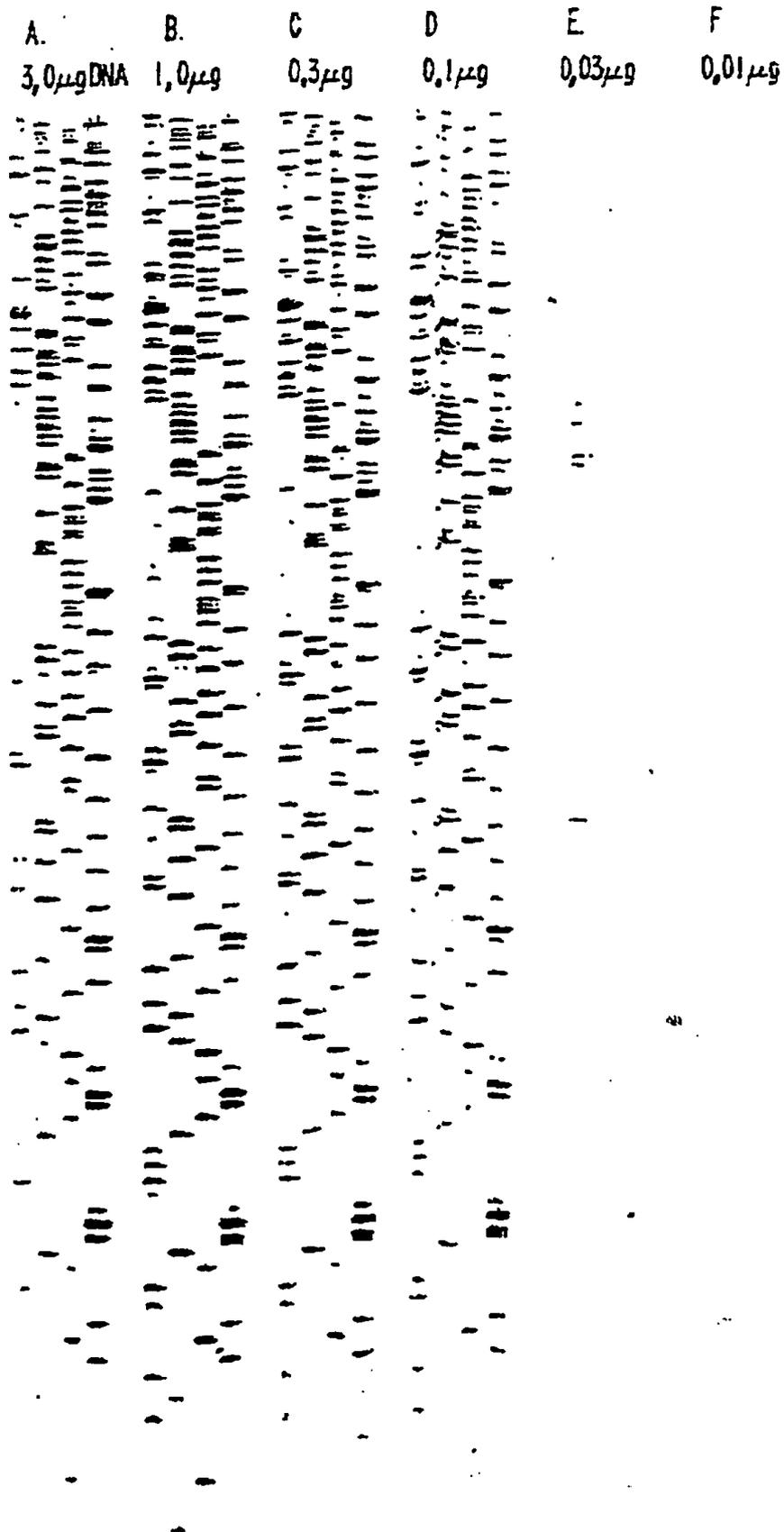


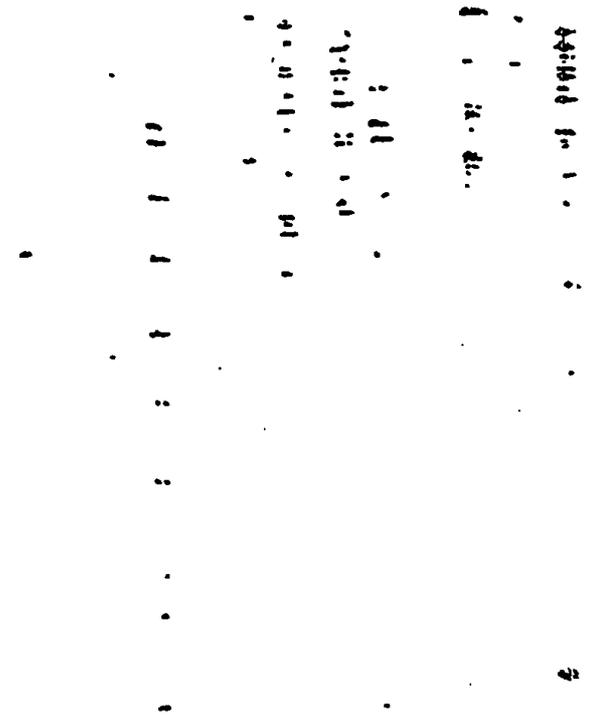
FIG. 4.

FIG. 5.



FIG. 6a. FIG. 6b. FIG. 6c. FIG. 6d'

A. 0,5µgDNA      B. 1,0µg      C. 2,0µg      D. 5,0µg



*FIG. 7a.*   *FIG. 7b.*   *FIG. 7c.*   *FIG. 7d.*  
A                    B                    C                    D  
IOU Exol            OU Exol            IOU Exol            OU Exol  
OU PHOSPHATASE    OU PHOSPHATASE    OU PHOSPHATASE    OU PHOSPHATASE

FIG. 8a.

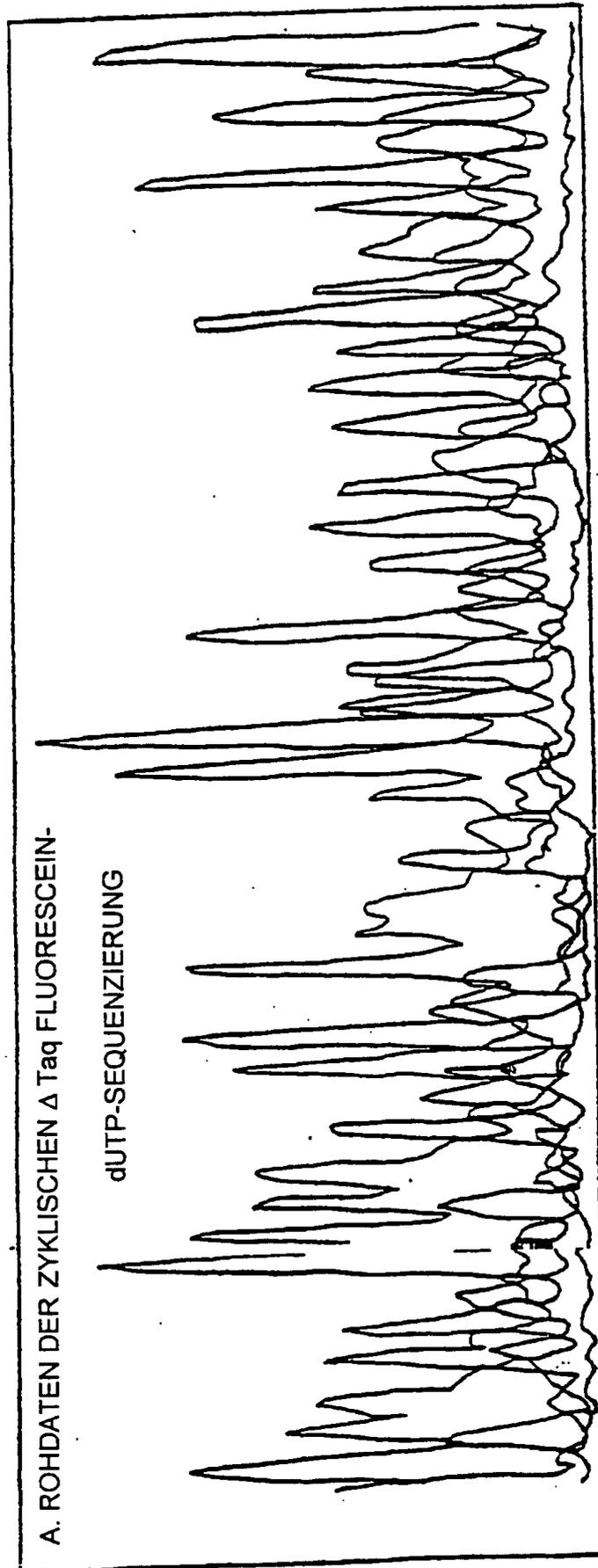


FIG. 8b.

