

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

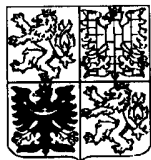
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2874-98

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **09. 09. 98**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **11.09.97**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **97/058525**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17. 03. 99**
(Věstník č. 3/99)

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁶:

C 12 N 9/12
C 12 N 15/54

(71) Přihlášovatel:

F. HOFFMANN - LA ROCHE AG, Basle, CH;

(72) Původce:

Gelfand David H., Oakland, CA, US;
Kalman Lisa Vivian, San Francisco, CA, US;
Myers Thomas W., Alameda, CA, US;
Reichert Fred Lawrence, Oakland, CA, US;
Sigua Christopher Lim, Antioch, CA, US;

(74) Zástupce:

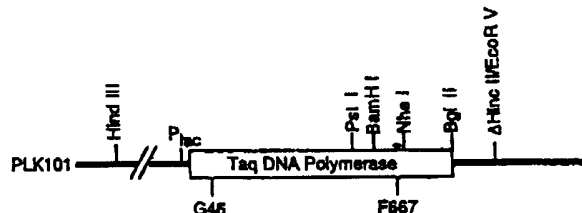
Hořejš Milan Dr. Ing., Národní 32, Praha 1,
11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Rekombinantní, tepelně stálá DNA
polymeráza, způsob její přípravy a kit,
který ji obsahuje**

(57) Anotace:

Rekombinantní, tepelně stálá DNA polymeráza se zvýšenou účinností pro začleňování nekonvenčních, například fluorosceinovými barvami značených nukleotidů se může připravovat rekombinantní DNA technologií a má výrazné cenové a účinnostní přednosti pro DNA sekvencování. Modifikovaná DNA polymeráza je výhodná pro in vitro DNA syntézy, například pro DNA sekvencování, pro syntézu značené DNA a pro produkci značených primárních extenzních produktů. Polymerázový enzym je zvláště vhodný pro ukončování řetězce nukleové kyseliny sekvenčními způsoby. Nukleové kyseliny kódující rekombinantní, tepelně stálá DNA polymerázy a vektory a hostující buňky, které je obsahují. Kity obsahující rekombinantní, tepelně stálá DNA polymerázy.



CZ 2874-98 A3

O1-1930-98-Ho

Rekombinantní, tepelně stálá DNA polymeráza, způsob její přípravy a kit, který ji obsahuje

Oblast techniky

Vynález se týká rekombinantní, tepelně stálé DNA polymerázy, která podporuje účinnost začleňování nukleosidtrifosfátů značených barvivem fluoresceinové skupiny a způsobu její přípravy a izolace. Enzymy podle vynálezu jsou vhodné pro četné obory molekulární biologie a zvláště jsou výhodné pro sekvenování nukleové kyseliny. Vynález se také týká kitu, který rekombinantní, tepelně stálou polymerázu obsahuje.

Dosavadní stav techniky

Začleňování nukleosidtrifosfátů (dNTP) značených barvivem fluoresceinové skupiny je důležité v četných in vitro DNA syntetických aplikacích. Například barevné terminátorové DNA sekvenční reakce vyžadují začlenění fluorescentních dideoxynukleotidových analogů pro ukončení a značení. Kromě toho in vitro příprava značených produktů může zahrnovat začlenění fluorescentních nukleotidů nebo nukleotidových analogů. Například se fluorescenčně značená DNA používá při hybridizačních zkouškách za použití mikroseskupení imobilizovaných sond (Cronin a kol., Human Mutation 7, str. 244, 1996).

K zajištění věrnosti DNA replikace mají DNA polymerázy velmi silný sklon pro začlenění svých normálních substrátů, označovaných zde jako konvenční deoxynukleosidové trifosfáty (dNTP) a proti začlenění nekonvenčních dNTP včetně dNTP a dNTP analogů značených fluorescentním barvivem. V buňkách tato vlastnost zeslabuje začlenění abnormálních bází, například dUTP pro rostoucí DNA řetězce. In vitro je tato charakteristika obzvláště zřejmá v přítomnosti jak konvenčních tak nekon-

venčních fluorescenčně značených nukleosidových trifosfátů, například v DNA sekvenčních reakcích za použití verse způsobu dideoxy řetězového zakončení za použití barevných terminátorů (Lee a kol., Nuc. Acids. Res. 20, str. 2471, 1992).

Obchodně dostupné DNA cyklické sekvenční kity pro způsob barevného terminátoru používají řetězového terminátoru ddNTP značených fluorescentním barvivem rhodaminového typu. Avšak rhodaminová barviva jsou iontově obojetná a nukleosidtrifosfáty, značené těmito barvivy, migrují anomálně v elektroforetickém gelu, použitém pro oddělení produktů sekvence pro identifikaci. Tato vlastnost rhodaminových barviv nutí modifikovat standardní sekvenční protokol, který zahrnuje použití dITP a přídatný stupeň před elektroforézou.

Na rozdíl od toho fluorescentní barviva se záporným nábojem, jako fluoresceinová barviva umožňují 1) lepší oddělování značených nukleosidtrifosfátů a značených primerních extenzních produktů a 2) lepší elektroforetickou migraci značených sekvenčních produktů než fluorescentní barviva s neutrálním nebo s kladným nábojem. Proto při použití fluoresceinových barviv odpadá přídatné zpracovatelské stupně, potřebné při použití rhodaminových barviv. Avšak dostupná fluoresceinová barviva nejsou ideální pro použití v současných, obchodně dostupných DNA cyklických sekvencujících formátech, jelikož se ddNTP značené těmito barvivy, nezačleňují účinně do sekvenčních produktů za použití těchto formátů. Proto je potřeba vyvinout obchodně dostupné tepelně stálé DNA polymerázy, které by se účinně začleňovaly do konvenčních a fluorescenčně značených nukleotidů. Vynález řeší tuto potřebu. Kromě toho neočekávatelnou vlastností mutantních enzymů podle vynálezu je zvýšená míra primerní extenze ve srovnání s odpovídajícím enzymem standardního typu. Jinou neočekávatelnou vlastností je zvýšená rovnoměrnost začlenění různých terminátorových nukleotidů v automatizované DNA sekvenční analýze.

Podstata vynálezu

Na matrici závislá rekombinantní, tepelně stálá DNA polymeráza spočívá podle vynálezu v tom, že

a) ve své nativní formě obsahuje aminokyselinovou sekvenci

LeuSerXaaXaaLeuXaaXaaProXaaXaaGlu, SEQ ID NO:1, přičemž Xaa v poloze 3, 4, 6, 9 a 10 sekvence znamená jakýkoliv aminokyseinový zbytek a Xaa v poloze 7 znamená Val nebo Ile,

b) Xaa v poloze 4 je mutovaný ve srovnání s nativní sekvencí s výjimkou, že Xaa v poloze 4 není mutován na Glu a

c) tepelně stálá DNA polymeráza má rozlišovací schopnost proti začlenění nukleotidů značených fluoresceinovým barvivem, která je snížena ve srovnání s nativní formou této polymerázy.

V jednopísmenovém kodu se SEQ ID NO:1, označovaná ve třípísmenovém kodu jako LeuSerXaaXaaLeuXaaXaaProXaaXaaGlu, označuje jako LSXXLX(V/I)PXXE.

Vynález se tedy týká na matrici závislých rekombinantních, tepelně stálých DNA polymerázových enzymů se sníženým rozlišováním proti začlenění nukleotidů značených fluoresceinovými barvivy ve srovnání s dříve charakterizovanými enzymy. Tyto enzymy začleňují nukleotidy, včetně deoxynukleotidů (dNTP) a bázevých analogů, jako jsou dideoxynukleotidy (ddNTP), které jsou značeny fluoresceinovými barvivy účinněji než běžné tepelně stálé enzymy. Vynález se rovněž týká genů, kodujících tyto enzymy, jakožto rekombinantních expresních vektorů pro získání velkého množství čištěných enzymů.

Podle vynálezu je identifikována kritická oblast tepelně stálé DNA polymerázy, která ovlivňuje schopnost polymerázy začleňovat nukleotidy, značené fluoresceinovými barvivy, za zachování schopnosti začleňovat svědomitě přírodní nukleotidy. Tato kritická oblast, kritický motiv, se může zavádět do genů

pro tepelně stálé DNA polymerázy rekombinantními DNA způsoby, například místně specifickou mutagenezí k realizaci vynálezu.

Vynález se tedy týká rekombinantních tepelně stálých DNA polymerázových enzymů, které jsou mutovány k produkování kritického motivu a snižují rozlišování proti začlenění nukleotidů značených fluoresceinovými barvivy ve srovnání s odpovídajícími enzymy standardního typu.

Podle jiného provedení rekombinantní, tepelně stálá DNA polymeráza spočívá podle vynálezu v tom, že

- a) ve své nativní formě obsahuje aminokyselinovou sekvenci LS(Q/G)XL(S/A)IPYEE, SEQ ID NO:2, přičemž X znamená jakýkoliv aminokyseliny zbytek,
- b) X v poloze 4 je mutovaný ve srovnání s nativní sekvencí s výjimkou, že X není mutován na E a
- c) tepelně stálá DNA polymeráza má rozlišovací schopnost proti začlenění nukleotidů značených fluoresceinovým barvivem, která je snížena ve srovnání s nativní formou této polymerázy.

Ve třípísmenovém kódu je tato aminokyselinová sekvence přepsána jako LeuSerXaaXaaLeuXaaIleProTyrGluGlu (SEQ ID NO:2), přičemž Xaa v poloze 3 znamená Gln nebo Gly, Xaa v poloze 4 jakoukoliv aminokyselinu a Xaa v poloze 6 Ser nebo Ala. Podle výhodného provedení aminokyselinová sekvence je LSQXLAIPYEE (SEQ ID NO:3), kde znamená X jakoukoliv aminokyselinu. V třípísmenovém kódu je tato aminokyselinová sekvence přepsána jako LeuSerGlnXaaLeuAlaIleProTyrGluGlu (SEQ ID NO:3), přičemž znamená Xaa v poloze 4 jakoukoliv aminokyselinu. Podle nejvýhodnějšího provedení znamená Xaa v poloze 4 Lys.

Podle dalšího provedení rekombinantní, tepelně stálá DNA polymeráza spočívá podle vynálezu v tom, že

- a) ve své nativní formě obsahuje aminokyselinovou sekvenci

LSVXLG(V/I)PVKE, SEQ ID NO:4,

- b) X v poloze 4 je mutovaný ve srovnání s nativní sekvencí s výjimkou, že X není mutován na E a
- c) tepelně stálá DNA polymeráza má rozlišovací schopnost proti začlenění nukleotidů značených fluoresceinovým barvivem, která je snížena ve srovnání s nativní formou této polymerázy.

Ve třípísmenovém kódu je tato aminokyselinová sekvence přepsána jako LeuSerValXaaLeuGlyXaaProValLysGlu (SEQ ID NO:4), přičemž Xaa v poloze 4 znamená jakoukoliv aminokyselinu a Xaa v poloze 7 Val nebo Ile. Podle výhodného provedení aminokyselinová sekvence je LSVXLGVPVKE, (SEQ ID NO:5), kde znamená X v poloze 4 jakoukoliv aminokyselinu. V třípísmenovém kódu je tato aminokyselinová sekvence přepsána jako LeuSerValXaaLeuGlyValProValLysGlu (SEQ ID NO:5), přičemž znamená Xaa v poloze 4 jakoukoliv aminokyselinu. Podle nejvýhodnějšího provedení znamená Xaa v poloze 4 Arg. Podle dalšího výhodného provedení aminokyselinová sekvence je LSVXLGIPVKE (SEQ ID NO:6), kde znamená X v poloze 4 jakoukoliv aminokyselinu. V třípísmenovém kódu je tato aminokyselinová sekvence přepsána jako LeuSerValXaaLeuGlyIleProValLysGlu (SEQ ID NO:6), přičemž znamená Xaa v poloze 4 jakoukoliv aminokyselinu. Podle nejvýhodnějšího provedení znamená Xaa v poloze 4 Arg.

Zvláštní kritická oblast podle vynálezu se může kombinovat s motivy jiných oblastí polymerázového genu, o němž je známo, že poskytuje tepelně stálé DNA polymerázy se sníženým rozlišováním proti začlenění nekonvenčních nukleotidů jako například rNTP a ddNTP. Příkladně byl konstruován rekombinantní *Thermus aquaticus* (Taq) DNA polymerázový enzym obsahující dvě mutace. První mutací je E až K mutace ve zbytku X v poloze 4 kritického motivu podle vynálezu. Druhou mutací je mutace umožňující účinné začlenění ddNTP, známá jako F667Y mutace. Touto mutací je mutace fenylalaninu na tyrosin v poloze 667

Taq DNA polymerázy (popsané v americkém patentovém spise číslo 5 614365 a v americkém patentovém spise číslo přihlášky 8/448223). Při použití v sekvenční reakci s fluoresceinovým barvivem značeného ddNTP se zjistilo, že E681K F667Y dvojitý mutantní enzym produkuje čitelný sekvenční žebřík. Podle takového provedení se motiv přinášející snížené rozlišení se zřetelem na dideoxynukleotidy kombinuje s kritickým motivem podle vynálezu za vytvoření enzymu majícího zvýšenou účinnost začlenění jak značeného tak neznačeného ddNTP.

Kromě toho se zjistilo, že E681K F667Y mutantní enzym vyvíjí výrazně zvýšenou míru extenze se zřetelem na enzym se samotnou F667Y mutací. Proto podle dalšího provedení vynálezu zavedení kritického motivu do tepelně stálého DNA polymerázového enzymu, samotného nebo v kombinaci s jinými motivy, produkuje enzymy se zvýšenou mírou extenze. Také se neočekávatelně zjistilo, že dvojitý mutantní enzym produkuje rovnoměrnější píkové výšky v barevně terminátorovém dideoxysekvencování za použití rhodaminovým barvivem značených terminátorů. Proto ještě podle dalšího provedení vynálezu zavádění kritického motivu do tepelně stálého DNA polymerázového enzymu produkuje enzymy s rovnoměrnějšími výškami píků při DNA sekvenčních způsobech za použití rhodaminovým barvivem značených terminátorů.

Vynález umožňuje také mutace účinnější účinnější začlenění rNTP, jako glutaminová kyselina, do glycinové mutace v poloze 615 Taq DNA polymerázy, nebo E615G mutace (evropská zveřejněná přihláška vynálezu číslo EP-A-823479) se kombinuje s kritickým motivem podle vynálezu za získání enzymu majícího zvýšenou účinnost při začlenění ribonukleosidů značených fluoresceinovým barvivem.

Podle vynálezu se také produkují geny kodující polymerázy podle vynálezu. Zvláště se produkují geny kodující rekombinantní tepelně stálé polymerázy obsahující kritický motiv

podle vynálezu. Zahrnuty jsou také geny kodující kombinace alespoň dvou mutací, které zahrnují mutace produkující kritický motiv podle vynálezu.

Vynález se také týká zlepšeného způsobu DNA sekvencování, který umožňuje použití nižších koncentrací fluoresceinovým barvivem značených ddNTP, čímž se snižují náklady pro provádění takových reakcí. Zlepšený způsob podle vynálezu také umožňuje použití nižších množství fluoresceinovým barvivem značených ddNTP a dNTP. Použití takových způsobů má četné přednosti, včetně účinnější polymerace, nižších koncentrací maticových žádaných nukleových kyselin a snižuje pravděpodobnost zavedení inhibitorů do reakční směsi. Tyto výhody také usnadňují sekvencování dlouhých matic. Vynález se také týká zlepšených způsobů sekvencování, přičemž se sekvencovaná reakční směs může přímo vnášet do sekvencovacích gelů pro následnou elektroforézu bez čištění meziproductů.

Podle jednoho provedení je vynálezem zlepšený způsob stanovení sekvence štítové nukleové kyseliny za použití rekombinantního enzymu, který má a) mutaci v poloze 4, která produkuje kritický motiv podle vynálezu a b) snížené rozlišování proti začlenění nukleotidů značených fluoresceinovými barvivými ve srovnání s odpovídajícím standardním enzymem. Vynález tedy zahrnuje zlepšený způsob sekvencování za použití tepelně stálých DNA polymerázových enzymů odvozených od termofilního druhu, přičemž enzymy obsahují přírodně se vyskytující sekvenční variace, které produkují kritický motiv podle vynálezu. Nativní enzymy mohou také poskytovat snížené rozlišování proti začlenění nekonvenčních nukleotidů. Podle tohoto provedení poskytuje vynález zlepšený způsob sekvencování za použití nativní tepelně stálé DNA polymerázy, která má a) kritický motiv podle vynálezu, přičemž aminokyselinou v poloze 4 je Glu a b) snížené rozlišování proti začlenění nukleotidů značených fluoresceinovými barvivými.

Vynález zahrnuje také zlepšené způsoby produkce DNA značených fluoresceinovými barvivy. Enzymy podle vynálezu účinně začleňují fluoresceinovými barvivy značené dNTP do polymerázových řetězových reakčních způsobů za produkce zesílených produktů, které jsou značeny na různých místech fluoresceinovými barvivy. Podle takového provedení zlepšený způsob značení DNA zahrnuje a) poskytnutí reakční směsi obsahující dNTP značený fluoresceinovými barvivy a enzym podle vynálezu a b) provedení reakce zesílení nukleové kyseliny.

Enzymy podle vynálezu a geny, kodující tyto enzymy, jsou dalším oborem vynálezu, kterým jsou kity pro DNA sekvencování, které zahrnují rekombinantní enzym podle vynálezu a mohou případně zahrnovat fluorescetní terminátorovou sloučeninu s negativním nábojem. Jiné kity pro DNA sekvencování zahrnují a) fluorescetní terminátorovou sloučeninu s negativním nábojem a b) nativní enzym podle vynálezu.

Vynález se také týká kitů pro způsob přípravy značené DNA, který obsahuje rekombinantní enzym podle vynálezu. Jiné kity pro způsob přípravy značené DNA zahrnují a) fluorescetní nukleosidtrifosfátovou sloučeninu s negativním nábojem a b) nativní enzym podle vynálezu.

Vynález blíže objasňuje následující podrobný popis a připojený obrázek.

Přehled obrázků

Na obr. 1 je schéma Taq DNA polymerázového genu. Jsou uvedena restriční místa, která mají vztah k příkladu 1 a popis způsobů přípravy přídatných mutantů a expresních vektorů.

Pro usnadnění pochopení vynálezu se uvádí význam jednotlivých používaných výrazů:

Výrazem "gen" se vždy míní DNA sekvence, která obsahuje řídicí a kodující sekvence, nutné pro reprodukovatelnou produkci bioaktivního polypeptidu nebo prekursoru. Polypeptid se může kodovat plnou délkou genové sekvence nebo jakýmkoliv podílem kodující sekvence, pokud se udrží enzymatická aktivita.

Výrazem "nativní" se vždy míní gen nebo genový produkt, který se izoluje z přírodně se vyskytujícího zdroje. Tento výraz se také týká rekombinantní formy nativního proteinu, produkovaného technikami molekulární biologie, které mají identickou aminokyselinovou sekvenci jako nativní forma.

Výrazem "mutant" se vždy míní gen, který byl změněn v sekvenci jeho nukleových kyselin, nebo znamená genový produkt, který byl změněn v jeho sekvenci aminokyselin, čímž se získá genový produkt, který může mít změněné funkční vlastnosti ve srovnání s nativním nebo standardním genem nebo genovým produktem. Takové změny zahrnují místo mutace, vypuštění a začlenění .

Výrazem "hostitelská buňka nebo buňky" se vždy míní jednobuněčný prokaryotový a eukaryotový organismus, jako jsou bakterie, kvasinky a aktinomycety a jednotlivé buňky vyšších řádů rostlin nebo živočichů rostoucí v buněčné kultuře.

Výrazem "expresní systém" se vždy míní DNA sekvence obsahující žádanou kodující sekvenci a řídicí sekvence ve funkční vazbě, takže hostitelské buňky, transformované těmito sekvencemi, jsou schopny produkovat zakodované proteiny. Pro transformaci může být expresní systém na vektoru; avšak příslušná DNA může být také začleněna do hostitelského chromosomu.

Výrazem "oligonukleotid" se vždy míní molekula obsahující alespoň dva, s výhodou více než tři a zpravidla více než deset deoxyribonukleotidů nebo ribonukleotidů. Přesný rozměr oligo-

nukleotidu závisí na četných faktorech, včetně konečné funkce nebo na účelu použití oligonukleotidu.

Oligonukleotidy se mohou připravovat jakýmkoliv vhodným způsobem včetně například klonování a restrikce vhodných sekvencí a přímého chemického způsobu například fosfotriesterovým způsobem (Narang a kol., Meth. Enzymol 68, str. 90 až 99, 1979), fosfodiesterovým způsobem (Brown a kol., Meth. Enzymol 68, str. 109 až 151, 1979), diethylfosforamiditovým způsobem (Beaucage a kol., Tetrahedron Lett. 22, str. 1859 až 1862, 1981), triesterovým způsobem (Matteucci a kol., J. Am. Chem. Soc. 103, str. 3185 až 3191, 1981), automatizovaných způsobů přípravy a způsobů přípravy na pevném nosiči (americký patentový spis číslo 4 458066).

Výrazem "primer" se vždy míní oligonukleotid, ať přírodního nebo syntetického původu, který je schopen působit jako bod iniciace syntézy při použití za podmínek, ve kterých se iniciuje extenze primeru. Primerem je s výhodou jednořetězcový oligodeoxyribonukleotid. Vhodná délka primeru závisí na záměru použití primeru, zpravidla však je 15 až 35 nukleotidů. Krátké primerové molekuly zpravidla vyžadují chladnější teploty k vytvoření dostatečně stálých hybridních komplexů s matricí. Primer nemusí reflektovat přesně sekvenci matrice, musí však být dostatečně komplementární pro hybridizaci s matricí, aby došlo k prodlužování primeru.

Primer může být popřípadě značen začleněním značení zjištělného spektroskopickým, fotochemickým, biochemickým, imunochemickým nebo chemickým způsobem. Jakožto užitečné značení se příkladně uvádí ^{32}P , fluorescentní barviva, elektronově husté reagenty, enzymy (jako běžně používané při testech ELISA), biotin nebo hapteny a proteiny, pro které jsou dostupné antisera nebo monoklonální protilátky.

Výrazem "tepelně stálá polymeráza" se vždy míní enzym, který je stálý proti působení tepla, je tepelně odolný a podržuje si dostatečnou účinnost ke způsobení následných primerových extenzních reakcí a nedochází u něho k nevratné denaturaci (desaktivaci) při působení zvýšených teplot po dobu potřebnou k denaturaci dvouřetězcových nukleových kyselin. Podmínky zahřívání, nutné pro denaturaci nukleových kyselin, jsou v oboru dobře známy a jsou v literatuře příkladně doloženy (americký patentový spis číslo 4 683202 a 4 683195)). Tepelně stálá polymeráza podle vynálezu je vhodná pro použití při tepelných cyklizačních reakcích, jako je polymerázová řetězová reakce (PCR). Nevratnou denaturací se míní trvalá a dokonalá ztráta enzymatické účinnosti. V případě tepelně stálé polymerázy se enzymatická účinnost týká katalýzy kombinace nukleotidů vhodným způsobem pro extenzi primerových produktů, které jsou komplementární k matricovému řetězci nukleové kyseliny.

Výrazem "konvenční nebo přírodní" se vždy míní se zřetelem na báze nukleových kyselin, na nukleosidtrifosfáty nebo nukleotidy produkty, které se přírodně vyskytují v popisovaných polynukleotidech (například pro DNA to jsou dATP, dGTP, dCTP a dTTP). Přídavně se dITP a 7-deaza-dGTP často používají místo dGTP a 7-deaza-dATP se používá místo dATP v syntezních reakcích DNA in vitro, jako je například sekvencování. Společně se mohou označovat jako dNTP.

Výrazem "nekonvenční nebo modifikovaný" se vždy míní se zřetelem na báze nukleových kyselin, na nukleosidy nebo nukleotidy modifikace, derivace nebo analogy konvenčních bází, nukleosidů nebo nukleotidů přírodně se vyskytujících, zvláště polynukleotidu. Deoxyribonukleotidová forma uracilu je nekonvenční nebo modifikovaná báze v DNA (dUMP), přičemž ribonukleotidová forma uracilu je konvenční báze RNA (UMP). Nekonvenční nukleotidy zahrnují, bez záměru na jakémkoliv omezení, sloučeniny používané jako terminátory pro sekvencování nukleových

kyselin. Terminátorové sloučeniny zahrnují, bez záměru na jakémkoliv omezení, sloučeniny, které mají 2',3' dideoxystrukturu a jsou označovány jako dideoxynukleosidtrifosfáty. Dideoxynukleosidtrifosfáty ddATP, ddTTP, ddCTP a ddGTP se společně mohou označovat jako ddNTP. Jakožto jiné nekonvenční nukleotidy se příkladně uvádějí fosforothioát dNTP ($[\alpha\text{-S}]\text{dNTP}$), 5'- α -boran-dNTP, α -methylfosfonát-dNTP a rubonukleosidtrifosfáty (rNTP). Nekonvenční báze mohou být značeny radioaktivními izotopy například ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , fluorescentními činidly, chemiluminescenčními činidly, bioluminescenčními činidly, haptogeny, jako je biotin nebo enzymovými činidly, jako jsou streptavidin nebo avidin. Jakožto fluorescentní činidla se příkladně uvádějí barviva, která mají negativní náboj, jako jsou fluoresceinová barviva, nebo barviva, která mají neutrální náboj, jako jsou rhodaminová barviva nebo barviva, která mají pozitivní náboj, jako jsou cianinová barviva. Jakožto barviva fluoresceinová se příkladně uvádějí FAM, HEX, TET, JOE, NAN a ZOE. Jakožto barviva rhodaminová se příkladně uvádějí texaská červeň, ROX, R110, R6G a TAMRA. FAM, HEX, TET, JOE, NAN a ZOE, ROX, R110, R6G, a TAMRA jsou obchodní produkty společnosti Perkin-Elmer (Foster City, CA) a texaská červeň je obchodním produktem společnosti Molecular Probes. Jakožto barviva cyaninová se příkladně uvádějí Cy2, Cy3, Cy5 a Cy7, přičemž jde o obchodní produkty společnosti Amersham (Amersham Place, Little Chalfont, Buckinghamshire, Anglie).

Výrazem "DNA syntetzní reakce" se vždy míní způsoby produkce kopií DNA včetně, nikoliv však se záměrem na jakémkoliv omezení na PCR, zesílení přenosu řetězců, transkripcí zprostředkované zesílení, extenze primeru a reverzní transkripce.

K dalšímu usnadnění porozumnění vynálezu se v popise a v příkladech uvádějí specifické tepelně stálé DNA polymerázové enzymy a fluorescentní barviva, přičemž však vynález na ně omezen není.

Vynález poskytuje nové a zlepšené sloučeniny, kterými jsou tepelně stálé DNA polymerázy. Enzymy podle vynálezu zahrnují rekombinantní polymerázy, které jsou mnohem účinnější při začlenění fluoresceinovými barvivy značených nukleosidtrifosfátů ve srovnání s odpovídajícími standardními typy enzymů. Tepelně stálé DNA polymerázy podle vynálezu jsou mnohem vhodnější a žádanější pro procesy, jako je sekvencování DNA a in vitro příprava značených produktů než polymerázy, známé ze stavu techniky. Zlepšené DNA sekvenční způsoby podle vynálezu zahrnují použití těchto rekombinantních polymeráz, jakož také použití nativních enzymů, které mnohem účinněji začleňují fluorescenčními barvivy značené nukleosidtrifosfáty než enzymy charakterizované ve stavu techniky. DNA sekvence, kodující tyto enzymy, a vektory pro expresování proteinů vynález rovněž zahrnuje.

Tepelně stálé DNA polymerázy podle vynálezu mají oblast kritičnosti v aminokyselinové sekvenci domény polymerázové aktivity enzymu. Kritická oblast v aminokyselinové sekvenci tepelně stálé DNA polymerázy podle vynálezu je dále doložena za použití běžného jednopísmenového aminokyselinového kódu (Lehninger, Biochemistry, New York, New York, Worth Publishers Inc., str. 67, 1970).

SEQ ID NO:7 LSXXLX(V/I)PXXE, kde X v poloze 4 znamená jakoukoliv aminokyselinu s výjimkou E. Ve třípísmenovém kódu je tato aminokyselinová sekvence přepsána jako LeuSerXaaXaaLeuXaaXaaProXaaXaaGlu (SEQ ID NO:7), přičemž Xaa v poloze 3, 6, 9 a 10 znamená jakoukoliv aminokyselinu, Xaa v poloze 4 znamená jakoukoliv aminokyselinu s výjimkou zbytku glutamové kyseliny (Glu) a Xaa v poloze 7 znamená Val nebo Ile. Tato kritická oblast poskytuje tepelně stálé DNA polymerázové enzymy schopné účinně začleňovat nukleotidy značené fluoresceinovými barvivy.

Příkladně derivovaný *Thermus aquaticus* (Taq) DNA polymerázový gen, který již obsahuje mutaci glycinu a aspragové kyseliny v poloze 46 (G46D) a F667Y mutaci, mutaci G na A v první poloze kodonu pro glutamovou kyselinu na zbytku 681 sekvence plné délky Taq DNA polymerázové sekvence (odpovídající poloze 4 kritického motivu) vede k enzymu majícímu kritický motiv. Tento enzym vykazuje 1) přibližně dva až deseti násobný vzrůst účinnosti začleňování nukleotidů značených fluoresceinovými barvivy bez poškození enzymatické schopnosti zprostředkovávat PCR v přítomnosti konvenčních nukleotidů a 2) tří až 4,3násobný vzrůst míry extenze. V Taq DNA polymeráze vede tato zvláštní mutace v aminokyselině k změně E (glutamová kyselina) na K (lysin).

Jakkoliv tato zvláštní aminokyselinová změna produkuje kritický motiv a výrazně mění schopnost enzymu začleňovat nekonvenční nukleotidy, očekává se, že specifická změna E na K není tak kritická pro vynález, jako je nyní identifikovaná poloha uvnitř oblasti kritičnosti. Podle výhodného provedení poskytuje vynález rekombinantní tepelně stálé DNA polymerázové enzymy, které a) v nativní formě polymerázy obsahují aminokyselinovou sekvenci LSXXLX(V/I)PXXE (SEQ ID NO:1), kde znamená X jakoukoliv aminokyselinu, b) X v poloze 4 sekvence je mutován ve srovnání s nativní sekvencí s výjimkou, že X v poloze 4 není mutován na E a c) tepelně stálá DNA polymeráza má snížení rozlišování proti začlenění fluoresceinovými barvivy značených nukleotidů ve srovnání s nativní formou tohoto enzymu. Podle ještě výhodnějšího provedení vynálezu je X v poloze 4 nahrazen aminokyselinou mající pozitivní náboj, jako je K, R nebo H nebo polární aminokyselinou, jako je Q nebo N. Podle nejvýhodnějšího provedení vynálezu je X v poloze 4 nahrazen K.

Podle jiného výhodného provedení vynálezu má enzym a) snížené rozlišování se zřetelem na fluoresceinovými barvivy značené nukleotidy a b) obsahuje aminokyselinovou sekvenci

LS(Q/G)XL(S/A)IPYEE, kde znamená X jakoukoliv aminokyselinu (SEQ ID NO:2). Ve třípísmenovém kódu je tato aminokyselinová sekvence přepsána jako LeuSerXaaXaaLeuXaaIleProTyrGluGlu, kde Xaa v poloze 3 znamená Gln nebo Gly, Xaa v poloze 4 jakoukoliv aminokyselinu a Xaa v poloze 6 Ser nebo Ala.

Podle ještě výhodnějšího provedení obsahuje enzym mající snížené rozlišování se zřetelem na fluoresceinovými barvivy značené nukleotidy aminokyselinovou sekvencí LSQXLAIPYEE, kde znamená X jakoukoliv aminokyselinu (SEQ ID NO:3). Ve třípísmenovém kódu je tato aminokyselinová sekvence přepsána jako LeuSerGlnXaaLeuAlaIleProTyrGluGlu, kde znamená Xaa v poloze 4 jakoukoliv aminokyselinu. Podle nejvýhodnějšího provedení X znamená K.

Podle jiného výhodného provedení obsahuje enzym mající snížené rozlišování se zřetelem na fluoresceinovými barvivy značené nukleotidy aminokyselinovou sekvencí LSVXLG(V/I)PVKE, kde znamená X jakoukoliv aminokyselinu (SEQ ID NO:4). Ve třípísmenovém kódu je tato aminokyselinová sekvence přepsána jako LeuSerValXaaLeuGlyXaaProValLysGlu, kde znamená Xaa v poloze 4 jakoukoliv aminokyselinu a XAA v poloze 7 znamená Val nebo Ile.

Podle ještě výhodnějšího provedení obsahuje enzym mající snížené rozlišování se zřetelem na fluoresceinovými barvivy značené nukleotidy aminokyselinovou sekvencí LSVXLGVPVKE, kde znamená X jakoukoliv aminokyselinu (SEQ ID NO:5). Ve třípísmenovém kódu je tato aminokyselinová sekvence přepsána jako LeuSerValXaaLeuGlyValProValLysGlu, kde znamená Xaa v poloze 4 jakoukoliv aminokyselinu. Podle nejvýhodnějšího provedení X znamená R.

Podle jiného výhodného provedení obsahuje enzym mající snížené rozlišování se zřetelem na fluoresceinovými barvivy značené nukleotidy aminokyselinovou sekvencí LSVXLGIPVKE, kde

znamená X jakoukoliv aminokyselinu (SEQ ID NO:6). Ve třípísmenném kódu je tato aminokyselinová sekvence přepsána jako LeuSerValXaaLeuGlyIleProValLysGlu, kde znamená Xaa v poloze 4 jakoukoliv aminokyselinu. Podle nejvýhodnějšího provedení X znamená R.

Charakterizace popsané E681K mutace identifikuje oblast v DNA polymerázovém genu, která ovlivňuje schopnost polymerázy vzájemně působit s fluorescenčními nukleotidy s negativním nábojem. Toto místo vzdálené ke šroubovici O, je na konci šroubovice O_a a na začátku šroubovice O_b polymerázy (Kim a kol., Nature 376, str. 612, 1995). Na základě molekulárních modelovacích principů, v oboru dobře známých, se také očekává, že změny struktury O_a-O_b šroubovice, jiné než E na K v poloze 681 povedou ke změně schopnosti polymerázy rozlišovat proti začlenění fluoresceinovými barvivy značených nukleotidů. Proto mutace v polohách v kritickém motivu jiných než ve zbytcích X v poloze 4 spadá také do rozsahu vynálezu. Podle takového provedení se vynález týká rekombinantního tepelně stálého DNA polymerázového enzymu, který a) má ve své nativní formě polymerázu obsahující aminokyselinovou sekvenci LSXXLX(V/I)PXXE (SEQ ID NO:1), kde znamená X jakoukoliv aminokyselinu, b) rekombinantní polymeráza obsahuje alespoň jednu mutaci v aminokyselinové sekvenci s touto výjimkou, že X v poloze 4 není mutován na E a c) enzym má snížené rozlišování proti začlenění fluoresceinovými barvivy značených nukleotidů ve srovnání s nativním enzymem.

Podobně tepelně stálé DNA polymerázy, které obsahují kritické motivy, které jsou podobné nikoliv však stejné jako kritický motiv, kterým je aminokyselinová sekvence LSXXLX(V/I)PXXE (SEQ ID NO:7), kde znamená X v poloze 4 jakoukoliv aminokyselinu s výjimkou E, spadá do rozsahu vynálezu. Podle zvlášť výhodného provedení je kritickým motivem aminokyselinová sekvence LXXXXXXXXXE (SEQ ID NO:8), kde znamená X v poloze 4 jakou-

koliv aminokyseliny s výjimkou E. Ve třípísmenovém kódu je tato aminokyselinová sekvence přepsána jako LeuXaaXaaXaaXaaXaaXaaXaaXaaXaaGlu (SEQ ID NO:8), kde znamená Xaa v poloze 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 a 10 jakoukoliv aminokyseliny a kde znamená Xaa v poloze 4 jakoukoliv aminokyseliny s výjimkou Glu.

Podle jiného provedení je kritickým motivem aminokyselinová sekvence L(S/A)XX(L/I)XXXXXE (SEQ ID NO:9), kde znamená X v poloze 4 jakoukoliv aminokyseliny s výjimkou E. Ve třípísmenovém kódu je tato aminokyselinová sekvence přepsána jako LeuXaaXaaXaaXaaXaaXaaXaaXaaXaaGlu (SEQ ID NO:9), kde znamená Xaa v poloze 3, 6, 7, 8, 9 a 10 jakoukoliv aminokyseliny a kde znamená Xaa v poloze 2 Ser nebo Ala, Xaa v poloze 4 jakoukoliv aminokyseliny s výjimkou Glu a Xaa v poloze 5 Leu nebo Ile.

Podle jiného provedení je kritickým motivem aminokyselinová sekvence LSXXLXXXXXE (SEQ ID NO:10), kde znamená X v poloze 4 jakoukoliv aminokyseliny s výjimkou E. Ve třípísmenovém kódu je tato aminokyselinová sekvence přepsána jako LeuSerXaaXaaLeuXaaXaaXaaXaaXaaGlu (SEQ ID NO:10), kde znamená Xaa v poloze 3, 6, 7, 8, 9 a 10 jakoukoliv aminokyseliny a kde znamená Xaa v poloze 4 jakoukoliv aminokyseliny s výjimkou Glu.

Schopnost enzymů podle vynálezu účinně začleňovat fluoresceinovými barvivy značené nukleotidy se měří ddNTP zkouškami. Jednou takovou zkouškou je konkurenční zkouška extenze primeru prováděná za podmínek omezující matrice. Při této zkoušce primer DG48 (5'-GGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGC (SEQ ID NO:11) vázaný na M13mp18 matrici (Innis a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, str. 9436, 1988) se prodlužuje v přítomnosti [α -³³P]dCTP a nadbytku enzymu s různými hladinami fluorescenčně značeného ddNTP, Zowie-ddCTP. Jelikož začlenění ddCTP zbytku extenzní reakci ukončí, čím ochotněji DNA polymeráza začlení ddCTP do extendovaného primeru, tím méně se může začle-

nit [α - ^{33}P]dCTP. Proto čím vzrůstá účinnost začlenění fluorescenčně značeného ddCTP, tím vzrůstá míra inhibice DNA syntézy. Reakce se provádějí tedy s různými úrovněmi neznačeného ddCTP. Koncentrace ddCTP a Zowie-ddCTP, potřebná pro 50% inhibici se vypočítá a porovnává k získání relativní míry schopnosti enzymu začleňovat fluorescenčně značený nukleotid. Podrobnosti zkoušky začlenění ddNTP objasňuje příklad 2.

Vynález se týká měření sníženého rozlišování proti začlenění fluoresceinovými barvivy značeného nukleotidu zkouškou začlenění fluorescenčního ddNTP, popsanou v příkladu 2. Podle výhodného provedení koncentrace fluoresceinovým barvivem Zowie-ddCTP značeného ddNTP, potřebná pro 50% inhibici syntézy DNA, se snižuje alespoň trojnásobně pro mutantní enzym podle vynálezu se zřetelem na standardní typ enzymu. Podle ještě výhodnějšího provedení se koncentrace snižuje alespoň pět krát a podle nejvýhodnějšího provedení se snižuje alespoň deset krát. Podle jiného provedení se charakteristika sníženého rozlišení zkouší měřením začlenění fluorescentního dNTP.

Podle jiného hlediska vynálezu se tepelně stálá DNA polymerázová genová sekvence a enzym odvozují z různých termofilních druhů. Podle jeho provedení vynálezu jsou polymerázová genová sekvence a enzym odvozeny od genus *Thermus*. Podle jiného provedení vynálezu jsou polymerázová genová sekvence a enzym odvozeny od jiného zdroje než je genus *Thermus*. Je dostupná plně nukleová kyselina a aminokyselinová sekvence pro četné termostabilní DNA polymerázy. Všechny sekvence ze souboru zahrnujícího *Taq*, *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus species* Z05, *Thermus species* sps17, *Thermotoga maritima* (Tma) a *Thermosiphon africanus* (Taf) byly zveřejněny v mezinárodní přihlášce vynálezu číslo PCT/U.S.91/07035, která byla zveřejněna jako PCT přihláška vynálezu číslo WO 92/06200 16. dubna 1992. Sekvence DNA polymerázy z *Thermus flavus*, *Bacillus caldotenax* a *Bacillus stearothermophilus* jsou rovněž z literatury známy

(Akhmetzjanov a Vakhiitov, *Nucleic Acids Research* 20 (21), str. 5839, 1992; Uemori a kol. *J. Biochem* 113, str. 401 až 410, 1993; a objednáací číslo BSU23149.ng od NG:New GenBank database). Sekvence tepelně stálé DNA polymerázy z *Thermus caldophilus* je uložena v organizaci EMBL/GenBank pod objednáacím číslem U62584. Sekvence tepelně stálé DNA polymerázy z *Thermus filiformis* je dosažitelná pod objednáacím číslem 42380 od organizace ATCC, přičemž se využívá skutečností známých z patentového spisu číslo U.S. 4 889818, přičemž je informace o sekvenci v tabulce I. Sekvence tepelně stálé DNA polymerázy z *Thermotoga neapolitana* je dosažitelná pod objednáacím číslem R98144 od GeneSeq Patent Data Base (je popsána v mezinárodním patentovém spise PCT WO 97/O94451).

Tabulka I

Organismus	Kritický motiv	Poloha kritické aminokyseliny
	⇓	
Konsensus	L S/a - - L/i - - - - E	
<i>Thermus aquaticus</i>	L S Q E L A I P Y E E	681
<i>Thermus flavus</i>	L S G E L S I P Y E E	679
<i>Thermus thermophilus</i>	L S Q E L A I P Y E E	683
<i>Thermus specie Z05</i>	L S Q E L A I P Y E E	683
<i>Thermus specie sps17</i>	L S Q E L S I P Y E E	679
<i>Thermus caldophilus</i>	L S Q E L A I P Y E E	683
<i>Thermus filiformis</i>	L S Q E L S I P Y E E	679
<i>Thermotoga maritima</i>	L S V R L G V P V K E	744
<i>Thermotoga neapolitana</i>	L S V R L G I P V K E	744
<i>Thermosipho africanus</i>	L S K R I G L S V S E	743
<i>Bacillus caldotenax</i> ¹	L A Q N L N I S R K E	725, 724
<i>Bacillus stearothermophilus</i> ²	L A Q N L N I T R K E	724, 727, 802

1. Proteinová sekvence objednáací číslo D12982, T. Uemori, Y. Ishino, K. Fujita, K. Asada, I. Kato "Cloning of

the DNA polymerase gene of *Bacillus caldotenax* and characterization of gene product" (J. Biochem. 113, str. 401, 1993). Kritický zbytek v této sekvenci je 725. Téměř stejná proteinová sekvence je dostupná jako údajná "*Bacillus stearothermophilus*" DNA polymeráza pod objednacím číslem R45155 a WPI 93-408323/51. Kritický zbytek v této sekvenci je 724.

2. Několik sekvenčních submisí pro *Bacillus stearothermophilus* DNA polymerázu je v organizaci GeneBank nebo ve SwissProt/PIR databázích. Jakkoliv jsou tyto sekvence vysoce příbuzné, navzájem se poněkud liší, přičemž každá obsahuje identický motiv L(S/A)XX(L/I)XXXXXE (SEQ ID NO:9), kde znamená X jakoukoliv aminokyselinu s výjimkou E. Ve třípísmenovém kódu je tato aminokyselinová sekvence přepsána jako LeuXaaXaaXaaXaaXaaXaaXaaXaaXaaGlu (SEQ ID NO:9), přičemž Xaa v poloze 3, 6, 7, 8, 9 a 10 znamená jakoukoliv aminokyselinu, Xaa v poloze 2 znamená Ser nebo Ala, Xaa v poloze 4 znamená jakoukoliv aminokyselinu s výjimkou Glu a XAA v poloze 5 znamená Leu nebo Ile.

Podle shora uvedené tabulky proteinová sekvence obsahující kritický zbytek v kritickém motivu v poloze 724, jak popisuje japonská zveřejněná přihláška vynálezu číslo J 05 304964A a evropský patentový spis číslo EP 699760, je dostupná pod objednacím číslem U33536. Jiná, vysoce příbuzná avšak poněkud odlišná proteinová sekvence, popsána v literatuře (Gene 163, str. 65 až 68, 1995), obsahuje kritický zbytek v kritickém motivu v poloze 727. Jiná, vysoce příbuzná avšak poněkud odlišná proteinová sekvence, dostupná pod objednacím číslem U23149 pro Bst DNA polymerázu, obsahuje kritický zbytek v kritickém motivu v poloze 802.

Jelikož DNA polymerázy každého termofilního druhu jsou jedinečné, je aminokyselinová poloha oblasti kritičnosti odlišná pro každý enzym. Programy řazení aminokyseliny a sekven-

ce nukleové kyseliny jsou snadno dostupné a při dané identifikované zvláštní oblasti pomáhá k identifikaci přesné oblasti sekvence podle vynálezu. Takové programy řazení sekvence jsou dostupné v organizaci Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wiskonsin. Za určení zvláštního, zde identifikovaného motivu tyto programy zahrnující "GAP", "BESTFIT" a "PILEUP" pomáhají lokalizovat kritický motiv. Poloha oblasti kritičnosti je v tabulce I pro tepelně stálé DNA polymerázy příkladných termofilních druhů.

Bez zřetele na oblast kritického motivu LSXXLX(V/I)PXXE (SEQ ID NO:7), kde znamená X v poloze 4 jakoukoliv aminokyselinu s výjimkou E, v polymerázové doméně tepelně stálé DNA polymerázy, slouží přítomnost motivu k poskytnutí tepelně stálé DNA polymerázy mající schopnost účinně začlenit fluoresceinovými barvivy značených nukleotidů. Proto mutace konzervované glutamové kyseliny tepelně stálé DNA polymerázy *Thermus flavus* (Glu 679), *Thermus thermophilus* (Glu 683), *Thermus species Z05* (Glu 683), *Thermus* druh *sps17* (Glu 679), *Thermus caldophilus* (Glu 683), *Thermus filiformis* (Glu 679) k produkci kritického motivu bude mít podpůrný vliv na schopnost polymerázy účinně začleňovat fluoresceinovými barvivy značené nukleotidy.

Kromě toho se zřetelem na vysoce zachovanou povahu nově identifikovaného kritického motivu se mohou identifikovat nové tepelně stálé DNA polymerázy na základě jejich homologie například k Taq DNA polymeráze nebo sekvencí jiných DNA polymeráz podle tabulky I (například americký patentový spis číslo 5 618711 a 5 624833). Takové polymerázy, pokud je jejich peptidová sekvence alespoň ze 45 % a výhodněji z více než 80 % homologická s s minokyselinovou sekvencí Taq polymerázy, podle zde popsanych identifikačních metod, spadá do rozsahu vynálezu. Proto se vynález týká třídy enzymů, která zahrnuje také například tepelně stálou DNA polymerázu a odpovídající gen a expresní vektory *Thermus oshimai* (R.A. Williams a kol., Int.

J. Syst. Bacteriol. 46 (2), str. 403 až 408, 1996); *Thermus silvanus* a *Thermus chliarophilus* (S. Tenreiro a kol., Int. J. Syst. Bacteriol. 45 (4), str. 633 až 639, 1995); *Thermus scotoductus* (S. Tenreiro a kol., Res. Microbiol. 146(4), str. 315 až 324, 1995); *Thermus ruber* ATCC 35948 (L.G. Loginova, Int. J. Syst. Bacteriol. 34, str. 498 až 499, 1986); a *Thermus brockianus* (M.J. Munster, J. Gen. Microbiol. 132, str. 1677, 1986).

Pracovníkům v oboru je zřejmé, že se shora charakterizované tepelně stálé DNA polymerázy se zvýšenou účinností k začleňování fluoresceinem značených nukleotidů jsou nejnázne konstruovány technikou rekombinace DNA, jako je na místo zaměřená mutageneze (například Sambrook a kol., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, 1989, druhé vydání, kapitola 15.51 "Oligonucleotide-mediated mutagenesis"). Tento způsob je nyní v oboru standardní a může se ho používat pro vytvoření všech možných tříd změn páru bází v každém stanoveném místě genu. Tento způsob se provádí za použití syntetického oligonukleotidového primeru komplementárního s jednořetězcovým fágem nebo mutagenizovaného plasmidu DNA kromě omezeného chybného párování, které představuje žádanou mutaci. Syntetický oligonukleotid se tedy používá jako primer k přímé syntéze řetězce komplementárního k fágu nebo k plasmidu a získaná dvouřetězcová DNA se transformuje na fág nebo plasmid nesoucí hostilelské bakterium. Získaná bakterie se může zkoušet například analýzou DNA sekvence nebo hybridizační sondou k identifikaci takových fágů nebo kolonií nesoucích žádanou mutovanou genovou sekvenci.

Následně k vynálezu PCR, primerem řízená mutageneze (popsaná v americkém patentovém spise číslo 4 683195) a "overlap PCR" (Higuchi, *PCR Technology*, 1989, vyd. Erlich, Stoctom Press, New York, NY, str. 61 až 70) se stala rutinní cestou zavádění jakékoliv mutace na kterékoliv poloze genu.

Mutovaná DNA se může získat z plasmidu, z phasmidu, z fágu nebo zesílovací reakcí běžnými prostředky a může se vázat na expresní vektor pro následnou kultivaci a čištění vzniklého enzymu. Četné klonovací a expresní vektory jsou vhodné pro provádění vynálezu, včetně savčích a bakteriálních systémů (například shora uvedená publikace Sambrook a kol., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, 1989, druhé vydání). Pro jednoduchost je vynález objasněn na příkladu použití lambda odvozeného P_L promotoru (Shimatake a kol., *Nature* 292, str. 128, 1981). Použití tohoto promotoru je zvláště popsáno v americkém patentovém spise číslo 4 711845 a 5 079352).

Plasmid pCS1 byl uložen s ATCC 28. srpna 1997 pod objednacím číslem 98521. Tento plasmid obsahuje gen kodující tepelně stálou DNA polymerázu, přičemž je tento gen mutován na kodonu v poloze 681 náhradou glutamové kyseliny lysinem v resultujícím peptidu a poskytuje prostředek pro získání tepelně stálých DNA polymeráz, majících podpořenou účinnost začleňování fluoresceinovými barvivy značených nukleotidů. Příklad 1 objasňuje použití lemovacích restrikčních míst vhodných pro subklonování E681K mutace pro vytvoření jiných tepelně stálých DNA polymerázových enzymů. Nebo jelikož je známa kompletní genová sekvence pro četné tepelně stálé DNA polymerázy, jsou jiné prostředky zavádění E681K mutace, jako je restrikční digestce a nahrazování fragmentu, snadno dostupné pracovníkům v oboru, kteří mají k dispozici ATCC depozity a příslušné informace o sekvencích.

Pokud je záměr produkovat mutant nebo nativní enzymy podle vynálezu nebo deriváty nebo homology takových enzymů, zahrnuje produkce enzymu zpravidla transformaci hostitelské buňky expresním vektorem a kultivaci transformované hostitelské buňky za podmínek, při kterých dochází k expresi. Prostředky pro transformaci a kultivaci transformované hostitelské buňky jsou v oboru dobře známy a jsou podrobně v literatuře

popsány (například shora uvedená publikace Sambrook a kol., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, 1989, druhé vydání).

Tepelně stálé DNA polymerázy podle vynálezu se obecně čistí k odstranění kmene DG116 *E. coli* (uloženého jako ATCC 53606 7. dubna 1987), za transformace expresním vektorem operativně vázaným na gen kodující standardní typ nebo modifikovanou tepelně stálou DNA polymerázu. Způsoby čištění tepelně stálé DNA polymerázy jsou popsány příkladně v příkladu 1 a v literatuře (například Lawyer a kol., *PCR Methods and Applications* 2, str. 275 až 287, 1993).

Tepelně stálé enzymy podle vynálezu se mohou používat k jakémukoliv účelu, kde je taková enzymatická účinnost potřebná nebo žádoucí. Příkladně se uvádí sekvencování DNA, DNA značení a značení primerových extenzních produktů. Způsobem podle vynálezu se obzvláště zlepšuje DNA sekvencování Sangerovým dideoxynukleotidovým způsobem (Sanger a kol., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, str. 5463, 1977). Pokroky základního způsobu, který vyvinul Sanger a kol. vedly k novým vektorům (Yanisch-Perron a kol., *Gene* 33, str. 103 až 119, 1985) a k báзовým analogům (Mills a kol., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, str. 2232 až 2235, 1979 a Barr a kol., *Biotechniques* 4, str. 428 až 432, 1986). Obecně vyžaduje sekvencování DNA na matici závislé prodlužování primeru v přítomnosti báзовých analogů ukončujících řetězec za rozdělení parciálních fragmentů, které se následně oddělují podle velikosti. Báзické dideoxysekvencování zahrnuje i) kopulaci oligonukleotidového primeru popřípadě značeného na matici, ii) extenzi primeru s DNA polymerázou ve čtyřech oddělených reakcích, přičemž každá reakční směs obsahuje směs neznačených dNTP a omezující množství jednořetězcevého terminačního činidla, například ddNTP, popřípadě značeného a iii) oddělení čtyř řad reakčních produktů na vysoce oddělujícím denaturačním gelu polyakrylamid/močovina. Reakční pro-

dukty se mohou zjišťovat v gelu autoradiografií nebo fluorescenční detekcí v závislosti na použitém značícím činidlo a může se zkoušet obraz k odvození nukleotidové sekvence. Tyto způsoby využívají DNA polymerázy, například Klenova fragmentu *E. coli* Pol I nebo modifikované T7 DNA polymerázy.

Dostupnost tepelně odolných polymeráz, například Taq DNA polymerázy vede ke zlepšeným způsobům sekvencování s tepelně stálou DNA polymerázou (Innis a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, str. 9436, 1988) a k jejich modifikacím, označovaným jako "cyklické sekvencování" (Murray, Nuc. Acids Res. 17, str. 8889, 1989). Jako alternativa k basickému dideoxysekvencování je cyklické sekvencování lineární asymetrické zesílení štítových sekvencí komplementárních k sekvenci matrice v přítomnosti terminátoru řetězce. Jeden cyklus produkuje rodinu extenzních produktů všech možných délek. Po denaturaci extenzního reakčního produktu z DNA matrice probíhají četné cykly kopulace primeru a extenze primeru v přítomnosti terminátorů, jako jsou například ddNTP. Cyklické sekvencování vyžaduje méně matricové DNA než konvenční řetězec ukončující sekvencování. Tepelně stálé DNA polymerázy mají při cyklickém sekvencování některé přednosti: snášejí ostré kopulační teploty, kterých je zapotřebí pro specifickou hybridaci primeru na štíty nukleové kyseliny, jakož také četné cykly vysokoteplotní denaturace, ke které dochází v každém cyklu, to je 90 až 95 °C. Z tohoto důvodu AmpliTaq[®] DNA polymeráza a její deriváty a produkty odbourání se začleňují do kitů pro Taq cyklické sekvencování, které jsou obchodním produktem společnosti Perkin-Elmer, Norwalk, CT.

Existují dvě obměny způsobu řetězového terminačního sekvencování, sekvencování s barevným primerem a sekvencování s barevným terminátorem. Při sekvencování s barevným primerem jsou ddNTP terminátory neznačené a značeného primeru se používá k detekci extenzních produktů (Smith a kol., Nature

32, str. 674 až 679, 1986). Při sekvencování s barevným terminátorem se používá DNA polymerázy k začlenění dNTP a fluorescenčně značených ddNTP na konec DNA primeru (Lee a kol., Nuc. Acids. Res. 20, str. 2471, 1992). Tento způsob má výhodu, kterou nemá způsob přípravy s barevně značenými primery. Kromě toho jsou reakce s barevným terminátorem mnohem běžnější, jelikož se všechny čtyři reakce mohou provádět ve stejné nádobě.

Jak způsoby s barevným primerem tak s barevným terminátorem se mohou automatizovat za použití automatizovaného sekvenčního zařízení společnosti Applied Biosystems, Foster City, CA (americký patentový spis číslo 5 171534). Při použití zařízení se hotová sekvenční reakční směs frakcionuje na denaturačním polyakrylamidovém gelu, namontovaném v zařízení. Laser na dně zařízení zjišťuje fluorescenční produkty po elektrofořeze podle velikosti gelem.

Dvou typů fluorescentních barviv se obvykle používá ke značení terminátorů, které se používají pro sekvencování s barevným terminátorem - barviv s negativním nábojem a fluorescentních barviv s obojetným nábojem. Fluorescentní barviva s negativním nábojem zahrnují fluoresceinová barviva a barviva BODIPY. Barviva BODIPY (4,4-difluor-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen) jsou popsána ve zveřejněné mezinárodní přihlášce vynálezu číslo WO 97/00967. Fluorescentní barviva s obojetným iontem zahrnují rhodaminová barviva. Obchodně dostupné kity pro cyklické sekvencování používají terminátorů značených deriváty rhodaminu. Avšak rhodaminem značené terminátory jsou spíše drahé a produkt musí být oddělován od nezačleněných barevných ddNTP před vnesením na gel, jelikož současně migrují se produkty sekvencování. Zdá se, že terminátory s rhodaminovými barvivy stabilizují vlásenkovou strukturu v GC-bohatých oblastech, což způsobuje anomální migraci produktů. To vyžaduje použití dNTP, které uvolňují sekundární strukturu avšak také ovlivňují účinnost začlenění terminátoru.

Na rozdíl od toho fluoresceinem značené terminátory eliminují oddělovací stupeň před vnášením na gel, protože mají větší čistý náboj a migrují rychleji než produkty sekvence. Kromě toho fluoresceinem značené produkty sekvence vykazují lepší elektroforetickou migraci než sekvenční produkty značené rhodaminem. Jakkoliv standardní typ Taq DNA polymerázy nezačleňuje účinně terminátory značené fluoresceinovými barvivy, je možno účinného začlenění nyní dosáhnout použitím modifikovaných enzymů podle vynálezu.

Vynález zahrnuje nové způsoby pro dideoxysekvencování za použití enzymů, které mají kritický motiv, jakož také kity pro provádění tohoto způsobu. Podle jednoho provedení sekvenčního způsobu podle vynálezu se

- a) připravuje rekombinantní tepelně stálý DNA polymerázový enzym, který je charakterizován tím, že
 - i) ve své nativní formě polymeráza obsahuje aminokyselinovou sekvenci LSXXLX(V/I)PXXE (SEQ ID NO:1), kde znamená X jakoukoliv aminokyselinu,
 - ii) X v poloze 4 této sekvence je mutován ve srovnání s nativní sekvencí, přičemž však neznámá E,
 - iii) tepelně stálá DNA polymeráza má snížené rozlišování proti začlenění nukleotidů značených fluoresceinovými barvivy ve srovnání s nativní formou tohoto enzymu a
- b) provádí se sekvenční reakce s berevným terminátorem.

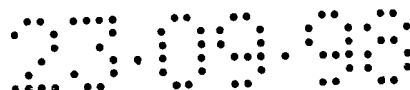
Podle výhodného provedení tohoto způsobu má nativní forma enzymu aminokyselinovou sekvenci LS(Q/G)XL(S/A)IPYEE (SEQ ID NO:2), kde znamená X jakoukoliv aminokyselinu. Ve třípísmenném kódu je tato aminokyselinová sekvence přepsána jako LeuSerXaaXaaLeuXaaIleProTyrGluGlu (SEQ ID NO:2), kde znamená Xaa v poloze 3 Gln nebo Gly, Xaa v poloze 4 jakoukoliv aminokyselinu a Xaa v poloze 6 Ser nebo Ala. Podle ještě výhodnějšího provedení je nativní forma aminokyselinové sekvence LSQXLAIPYEE (SEQ ID NO:3), kde znamená X jakoukoliv aminokyse-



linu. V třípísmenovém kódu je tato aminokyselinová sekvence přepsána jako LeuSerGlnXaaLeuAlaIleProTyrGluGlu (SEQ ID NO:3), přičemž znamená Xaa v poloze 4 jakoukoliv aminokyselinu. Podle nejvýhodnějšího provedení znamená Xaa v poloze 4 Lys.

Jak shora uvedeno, DNA sekvencování s tepelně stálými DNA polymerázami vyžaduje směs nekonvenčních bázevých analogů, které působí jako terminátory řetězce a konvenčních nukleotidů ve specifických koncentračních poměrech, které zajišťují, že se získá populace extenzních produktů všech možných délek fragmentů v oboru několika stovek bází. Některé tepelně stálé DNA polymerázy dříve používané pro sekvencování, například standardní Taq polymeráza, se charakterizují tím, že přednostně začleňují konvenční nukleotidy v přítomnosti směsi konvenčních a nekonvenčních nukleotidů. Avšak nověji bylo popsáno, že tepelně stálé DNA polymerázy umožňují snížit poměr nekonvenčních bázevých analogů ke konvenčním bázím stokrát až několik setkrát až více než tisíckrát.

Jednou takovou polymerázou je F667Y mutant Taq DNA polymerázy. Jiným takovým mutantem je Taq DNA polymeráza mající F667Y mutaci a mutaci v poloze 46, která mění glycinový zbytek na zbytek kyseliny asparagové (G46D) mutace. Tato mutantová polymeráza, známá jako AmpliTaq, FS, je výrobkem společnosti Hoffmann-La Roche a je obchodním produktem společnosti Perkin-Elmer. Jinou takovou polymerázou je DNA polymeráza F730Y-Tma30. Tato mutantní polymeráza je kombinací 1) nukleotidů 1-570 Taq DNA polymerázy, modifikované ke kodování G46D mutace a 2) nukleotidů 571-2679 Tma DNA polymerázy modifikované ke kodování asparagové kyseliny na alaninovou mutaci v poloze 323, glutamové kyseliny na alaninovou mutaci v poloze 325 a fenylalaninu na tyrosinovou mutaci v poloze 730 (americký patentový spis číslo přihlášky vynálezu 60/052065 a evropská přihláška vynálezu číslo 98112327.6). Jinou polymerázou, která začleňuje nekonvenční bázevé analogy je F730Y mutantní DNA po-

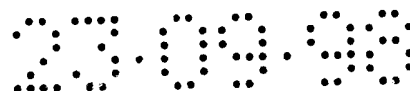


lymeráza z *Thermotoga neapolitana* (mezinárodní přihláška vynálezu číslo WO 96/10640, WO 96/41014 a WO 97/09451). Za použití těchto enzymů pro danou koncentraci dNTP se může snížit koncentrace rhodamin-ddNTP přibližně 50 krát až několik set krát ve srovnání s tepelně stálými DNA polymerázami dosud dosažitelnými.

Mutace E681K podle vynálezu se kombinuje za použití rekombinantních DNA způsobů s F667Y mutací za produkce dvojného mutantu Taq DNA polymerázového enzymu, používaného pro sekvenční reakce popsané v příkladu 4. Dvojného mutantu se používá při sekvenční reakci s barevným terminátorem za použití fluoresceinovým barvivem značených terminátorů. Výsledky, popsané v příkladu 4, dokládají, že enzym je schopen začleňovat fluoresceinovým barvivem značené terminátory do sekvenční reakce a produkovat sekvenční žebříky, které se mohou přesně číst v automatickém sekvenčním zařízení. Neočekávatelně se zjistilo, že kombinace E681K a F667Y mutací produkuje tepelně stálý DNA polymerázový enzym se 3 až 4 násobnou extenzí se zřetelem na enzym se samotnou mutací F667Y podle měření, popsaného v příkladu 3.

Kritický motiv, identifikovaný podle vynálezu, se může kombinovat s motivy přispívajícími ke snížení rozlišování proti ddNTP k produkci polymeráz, majících zvýšenou účinnost začleňování jak značených tak neznačených ddNTP. Tyto polymerázy jsou užitečné při DNA sekvenčních způsobech. Podle jednoho provedení vynálezu tepelně stálá polymeráza, mající kritický motiv definovaný podle vynálezu, obsahuje také kritický motiv, který zahrnuje F667Y mutaci, popsanou v americkém patentovém spise číslo přihlášky 08/448223. Podle tohoto provedení tepelně stálá DNA polymeráza je charakterizována tím, že

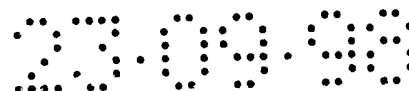
- i) ve své nativní formě polymeráza obsahuje první aminokyselinovou sekvenci LSXXLX(V/I)PXXE (SEQ ID NO:1), kde znamená X jakoukoliv aminokyselinu,



- ii) X v poloze 4 této sekvence je mutován ve srovnání s nativní sekvencí, přičemž však X není mutován na E,
- iii) tepelně stálá DNA polymeráza má snížené rozlišování proti začlenění nukleotidů značených fluoresceinovými barvivy ve srovnání s nativní formou tohoto enzymu,
- iv) polymeráza obsahuje druhou aminokyselinovou sekvenci MRRXXKXXNYXXXYG (SEQ ID NO:12), kde znamená X jakoukoliv aminokyselinu,
- v) tepelně stálá DNA polymeráza má také snížené rozlišování proti začleňování nekonvenčních nukleotidů ve srovnání s nativní formou enzymu. Ve třípísmenovém kódu je tato aminokyselinová sekvence přepsána jako MetArgArgXaaXaaLysXaaXaaAsnTyrXaaXaaXaaTyrGly (SEQ ID NO: 12), kde znamená Xaa v poloze 4, 5, 7, 8, 11, 12 a 13 jakoukoliv aminokyselinu. Podle výhodného provedení Xaa v poloze 4 v první aminokyselinové sekvenci je mutován na Lys. Podle ještě výhodnějšího provedení je enzym Taq DNA polymeráza a obsahuje E681K a F667Y mutace.

Vynález se také týká způsobu sekvencování za použití této polymerázy.

Vynález také zahrnuje zlepšený způsob sekvencování prováděný za použití tepelně stálého DNA polymerázového enzymu, majícího kritický motiv, který není odvozen mutací nýbrž existuje jako přírodní varianta. Z tohoto hlediska DNA polymeráza termofilních bakterií má kritický motiv, ve kterém zbytek v poloze 4 není Glu. Například v tepelně stálé DNA polymeráze od *Thermotoga neapolitana* je X v poloze 4 v motivu LSXXLX(V/I)PXXE (SEQ ID NO:7), kde znamená X v poloze 4 jakoukoliv aminokyselinu s výjimkou E, argininový zbytek. Proto se vynález také týká zlepšeného způsobu sekvencování DNA za použití nativní tepelně stálé DNA polymerázy, která obsahuje aminokyselinovou sekvenci LSXXLX(V/I)PXXE (SEQ ID NO:7), kde znamená X jakoukoliv aminokyselinu s výjimkou E. Ve třípísmenovém kódu je tato aminokyselinová sekvence přepsána jako

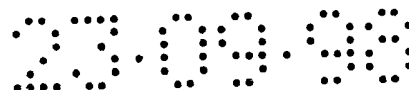


LeuSerXaaXaaLeuXaaXaaProXaaXaaGlu (SEQ ID NO:7), kde znamená Xaa v poloze 3, 6, 9 a 10 jakoukoliv aminokyselinu a Xaa v poloze 4 jakoukoliv aminokyselinu s výjimkou Glu a Xaa v poloze 7 Val nebo Ile. Vynález se také týká způsobu sekvencování, při kterém se

- a) vytváří tepelně stálá DNA polymeráza charakterizovaná tím, že
 - i) ve své nativní formě polymeráza obsahuje aminokyselinovou sekvenci LSXXLX(V/I)PXXE (SEQ ID NO:7), kde X v poloze 4 znamená jakoukoliv aminokyselinu kromě E,
 - ii) tepelně stálá DNA polymeráza má snížené rozlišování proti začlenění nukleotidů značených fluoresceinovými barvivými ve srovnání s nativní formou tohoto enzymu,
- b) vytváří se barevný terminátor značený fluoresceinovým barvivem a
- c) provádí se sekvenční reakce s barevným terminátorem.

Podle výhodnějšího provedení vynálezu se provádí sekvencování, při kterém se

- a) vytváří tepelně stálá DNA polymeráza charakterizovaná tím, že
 - i) polymeráza obsahuje první aminokyselinovou sekvenci LSXXLX(V/I)PXXE (SEQ ID NO:7), kde X v poloze 4 znamená jakoukoliv aminokyselinu kromě E,
 - ii) tepelně stálá DNA polymeráza má snížené rozlišování proti začlenění nukleotidů značených fluoresceinovými barvivými ve srovnání s nativní formou tohoto enzymu a
 - iii) tato DNA polymeráza obsahuje druhou aminokyselinovou sekvenci MRRXXKXXNYXXXYG (SEQ ID NO:12), kde znamená X jakoukoliv aminokyselinu.
 - iv) tato tepelně stálá DNA polymeráza má snížené rozlišování proti začlenění nukleotidů značených fluoresceinovými barvivými ve srovnání s nativní formou tohoto enzymu a
- b) vytváří se barevný terminátor značený fluoresceinovým bar-

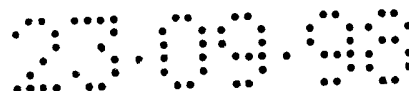


vivem a

c) provádí se sekvenční reakce s barevným terminátorem.

Podle jiného výhodného provedení obsahuje enzym aminokyselinovou sekvenci LS(Q/G)XL(S/A)IPYEE (SEQ ID NO:13), kde znamená X v poloze 4 jakoukoliv aminokyselinu s výjimkou E. Ve třípísmenovém kódu je tato aminokyselinová sekvence přepsána jako LeuSerXaaXaaLeuXaaIleProTyrGluGlu (SEQ ID NO:13), kde znamená Xaa v poloze 3 Gln nebo Gly, Xaa v poloze 4 jakoukoliv aminokyselinu s výjimkou Glu a Xaa v poloze 6 Ser nebo Ala. Podle výhodnějšího provedení je aminokyselinovou sekvencí LSQXLAIPYEE (SEQ ID NO:14), kde znamená X v poloze 4 jakoukoliv aminokyselinu s výjimkou E. Ve třípísmenovém kódu je tato aminokyselinová sekvence přepsána jako LeuSerGlnXaaLeuAlaIleProTyrGluGlu (SEQ ID NO:14), kde znamená Xaa v poloze 4 jakoukoliv aminokyselinu s výjimkou Glu.

Podle ještě jiného dále výhodného provedení obsahuje enzym aminokyselinovou sekvenci LSVXLG(V/I)PVKE (SEQ ID NO:15), kde znamená X jakoukoliv aminokyselinu s výjimkou E. Ve třípísmenovém kódu je tato aminokyselinová sekvence přepsána jako LeuSerValXaaLeuGlyXaaProValLysGlu (SEQ ID NO:15), kde znamená Xaa v poloze 4 jakoukoliv aminokyselinu s výjimkou Glu a Xaa v poloze 7 Val nebo Ile. Podle výhodnějšího provedení je aminokyselinovou sekvencí LSVXLGVPVKE (SEQ ID NO:16), kde znamená X jakoukoliv aminokyselinu s výjimkou E. Ve třípísmenovém kódu je tato aminokyselinová sekvence přepsána jako LeuSerValXaaLeuGlyValProValLysGlu (SEQ ID NO:16), kde znamená XAA v poloze 4 jakoukoliv aminokyselinu s výjimkou Glu. Podle nejvýhodnějšího provedení je Xaa v poloze 4 arg. Podle ještě dalšího výhodného provedení je aminokyselinovou sekvencí LSVXLGIPVKE (SEQ ID NO:17), kde znamená X jakoukoliv aminokyselinu s výjimkou E. Ve třípísmenovém kódu je tato aminokyselinová sekvence přepsána jako LeuSerValXaaLeuGlyIleProValLysGlu (SEQ ID NO:17), kde znamená Xaa v poloze 4 jakoukoliv aminokyselinu s výjimkou Glu. Především znamená Xaa v poloze 4 Arg.

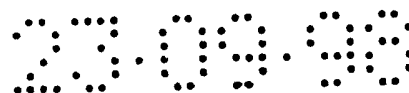


Podle jiného provedení se sekvencování provádí za použití nativního enzymu, který má snížené rozlišování proti začleňování nukleotidů značených fluoresceinovou barvivou, jehož hladina se měří za použití zkoušek začlenění ddNTP, jak je popsáno v příkladu 2. Koncentrace ddCTP, potřebná pro 50% inhibici DNA syntézy se zjistí jako koncentrace Zowie-ddCTP potřebná pro 50% inhibici. Poměr koncentrace pro Zowie-ddCTP ke koncentraci pro ddCTP se vypočte. Podle výhodného provedení je poměr menší než 10. Podle ještě výhodnějšího provedení je poměr 4 nebo menší. Podle nejvýhodnějšího provedení je poměr 1,2 nebo menší.

Jakkoliv se podle příkladů používá dideoxynukleotidů značených fluoresceinovou barvivou, spadá použití jiných nekonvenčních nukleotidů a fluorescentních barviv do rozsahu vynálezu. Jakožto jiné nekonvenční nukleotidy se příkladně uvádějí fluorescenčně značené dNTP, kterých se může použít pro značení produktů DNA syntézy, a fluorescenčně značené rNTP, kterých se může použít pro značení primerových extenzních produktů. Jakožto jiná barviva se příkladně uvádějí jiná fluorescenční barviva s negativním nábojem, například barviva BODIPY, která jsou strukturně a chemicky podobná fluoresceinu. Taková jiná barviva zahrnují rovněž cyaninová barviva. Cyaninem značená dNTP se přidávají do standardní PCR reakční směsi, která obsahuje Taq DNA polymerázu s E681K mutací (aG46D mutací). Neočekávatelně se zjistilo, že cyaninem značené dNTP se začleňují do zesílených produktů ve vyšší míře než standardní typ enzymu. Z tohoto hlediska způsob značení DNA podle vynálezu využívá nativní nebo mutované polymerázy podle vynálezu v kombinaci s nukleotidem značeným buď fluorescentním barvivem s negativním nábojem nebo cyaninovým barvivem. Podle jednoho provedení vynález zahrnuje způsob značení DNA, při kterém se

a) vytváří tepelně stálá DNA polymeráza charakterizovaná tím, že

i) polymeráza obsahuje aminokyselinovou sekvenci



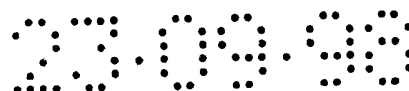
LSXXLX(V/I)PXXE (SEQ ID NO:7), kde X v poloze 4 znamená jakoukoliv aminokyselinu kromě E,

- ii) tepelně stálá DNA polymeráza má snížené rozlišování proti začlenění nekonvenčních nukleotidů a
- b) vytváří se nukleotid značený fluoresceinovým barvivem s negativním nábojem a
- c) provádí se DNA syntézní reakce.

Podle jiného provedení vynález zahrnuje způsob značení DNA, při kterém se

- a) vytváří tepelně stálá DNA polymeráza charakterizovaná tím, že
 - i) polymeráza obsahuje aminokyselinovou sekvenci LSXXLX(V/I)PXXE (SEQ ID NO:7), kde X v poloze 4 znamená jakoukoliv aminokyselinu kromě E,
 - ii) tepelně stálá DNA polymeráza má snížené rozlišování proti začlenění nekonvenčních nukleotidů a
- b) vytváří se nukleotid značený cyaninovým barvivem a
- c) provádí se DNA syntézní reakce.

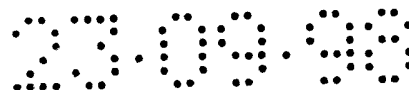
Podle jiného provedení vynálezu se vytváří tepelně stálá DNA polymeráza, která kombinuje mutaci umožňující účelnější začleňování rNTP, například glutamové kyseliny, do glycinové mutace v poloze 615 Taq DNA polymerázy a kritický motiv podle vynálezu. Očekává se, že výsledný enzym bude mít zvýšenou účinnost začleňování ribonukleotidů značených fluoresceinovými barvivy. Vynález se proto týká rekombinantní tepelně stálé DNA polymerázovy, která 1) ve své nativní formě obsahuje aminokyselinovou sekvenci LSXXLX(V/I)PXXE (SEQ ID NO:1), kde znamená X jakoukoliv aminokyselinu a 2) X v poloze 4 je mutován tak, že X v poloze 4 neznámá E a 3) obsahuje také oblast kritičnosti, kterou je aminokyselinová sekvence SQIXLR(V/I) (SEQ ID NO:18), kde znamená X jakoukoliv aminokyselinu s výjimkou E, a 4) je schopná začleňovat ribonukleotidy značené fluoresceinovými barvivy. Ve třípísmenovém kódu je tato aminokyselinová sekvence přepsána jako SerGlnIleXaaLeuArgXaa (SEQ ID NO:18),



kde znamená Xaa v poloze 4 jakoukoliv aminokyselinu s výjimkou Glu a Xaa v poloze 7 Val nebo Ile.

Oblasti mutantní polymerázy například pro Taq obsahující E614G a E681K jsou užitečné ve zlepšených způsobech produkce primerních extenzních produktů značených fluoresceinovými barvivy. Například ve primerní extenzní reakci jako PCR, rNTP značený fluoresceinovými barvivy nahrazuje alespoň částečně jeden ze čtyř standardních dNTP a je zahrnuta dvojná mutantní polymeráza jako E681K E615G Taq DNA polymeráza. Mutantní polymeráza syntetizuje primerní extenzní produkty, které mají fluoresceinen značené ribonukleotidové zbytky v různých polohách svých délek. Po zahřátí nebo po alkalickém zpracování se primerní extenzní produkty fragmentují na každém ribonukleotidovém zbytku za produkce populace koncově značených fragmentů. Tato populace rovnoměrně značených fragmentů představuje rozdělené fluorescentní značení po celé délce primerního extenzního produktu. Značené fragmenty s touto charakteristikou jsou užitečné v detekci formátů nukleové kyseliny na základě silikonových čipů (Cronin a kol., Human Mutation 7, str. 244, 1996). Vynález se tedy také týká způsobu značení primerních extenzních produktů, při kterém se

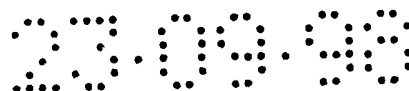
- 1) připravuje tepelně stálá DNA polymeráza, která je charakterizována tím, že
 - a) ve své nativní formě obsahuje aminokyselinovou sekvenci LSXXLX(V/I)PXXE (SEQ ID NO:1), kde znamená X jakoukoliv aminokyselinu,
 - b) X v poloze 4 této sekvence je mutován, přičemž však neznámá E,
 - c) obsahuje také oblast kritičnosti s aminokyselinovou sekvencí SQIXLR(V/I) (SEQ ID NO:18), kde znamená X jakoukoliv aminokyselinu s výjimkou E,
 - d) je schopná účinně začleňovat ribonukleotidy značené fluoresceinovými nebo cyaninovými barvivy a
- 2) provádí se primerní extenzní reakce.



Enzymy, mající kritický motiv podle vynálezu, mají zvýšenou míru extenze se zřetelem na standardní typ enzymu, jak je doloženo v příkladu 4 pro mutant E681K F667Y. Podle jednoho provedení je enzym charakterizován tím, že 1) ve své nativní formě obsahuje aminokyselinovou sekvenci LSXXLX(V/I)PXXE (SEQ ID NO:1), kde znamená X jakoukoliv aminokyselinu, 2) aminokyselinová sekvence je mutována v poloze 4 tak, že X v poloze 4 není mutován na E a 3) má zvýšenou míru extenze ve srovnání s enzymem standardního typu. Podle výhodného provedení je enzym charakterizován tím, že 1) ve své nativní formě obsahuje aminokyselinovou sekvenci LSXXLX(V/I)PXXE (SEQ ID NO:1), kde znamená X jakoukoliv aminokyselinu, 2) aminokyselinová sekvence je mutována v poloze 4 tak, že X v poloze 4 není mutován na E, 3) obsahuje také aminokyselinovou sekvenci MRRXXKXXNYXXXYG (SEQ ID NO:12), kde znamená X jakoukoliv aminokyselinu, a 4) má zvýšenou míru extenze ve srovnání s enzymem standardního typu. Podle výhodnějšího provedení je enzym charakterizován tím, že 1) ve své nativní formě obsahuje aminokyselinovou sekvenci LSXXLX(V/I)PXXE (SEQ ID NO:1), kde znamená X jakoukoliv aminokyselinu, 2) aminokyselinová sekvence je mutována v poloze 4 tak, že X v poloze 4 je mutován na K. Podle nejvýhodnějšího provedení je enzym charakterizován tím, že enzymem je Taq DNA polymeráza a obsahuje E681K mutaci a F667Y mutaci. Vynález zároveň zahrnuje způsoby sekvencování a značení DNA za použití polymeráz se zvýšenou mírou extenze a kity pro provádění takových způsobů.

Při výhodném provedení sekvencování podle vynálezu se tepelně stálá pyrofosfatáza začleňuje do reakční směsi. Zjistilo se, že pyrofosfatáza podporuje sekvencování za použití jak mesofilní tak mutantní tepelně stálé DNA polymerázy (evropská zveřejněná přihláška vynálezu číslo EP-A-763599 a americký patentový spis číslo 5 665551).

Podle příkladného provedení tepelně stálá DNA polymeráza

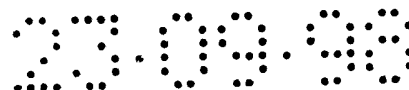


podle vynálezu obsahuje také mutaci v 5'-nukleázové oblasti, která značně přispívá ztenčení nukleázové aktivity. Modifikovaná Taq polymeráza je popsána v literatuře (PCT přihláška vynálezu číslo WO 92/06200, zveřejněná 16. dubna 1992 a americký patentový spis číslo 5 466591). Podle jednoho provedení vynálezu kodon pro glycinový zbytek v aminokyselinové poloze 46 se nahrazuje kodonem pro kyselinu asparagovou (G46D mutace). Získaný enzym má zvýšenou užitečnost v cyklických sekvenčních reakcích v důsledku snížené 5'-nukleázové aktivity. Jak polymerázová oblast aminokyselinové sekvence tak polymerázová aktivita jsou nezměněny v případě G46D mutantu ve srovnání se standardním enzymem.

Obchodním provedením vynálezu jsou zlepšené kity pro provádění způsobu podle vynálezu a které vynález zahrnuje. Kit pro DNA sekvencování obsahuje

- a) tepelně stálou DNA polymerázu charakterizovanou tím, že
 - i) polymeráza obsahuje aminokyselinovou sekvenci LSXXLX(V/I)PXXE (SEQ ID NO:7), kde X v poloze 4 znamená jakoukoliv aminokyselinu kromě E,
 - ii) tepelně stálá DNA polymeráza má snížené rozlišování proti začlenění nukleotidů značených fluoresceinovými barvivy a
- b) barevný terminátor značený fluorescentním barvivem s negativním nábojem a obsahuje popřípadě přídatně jiné reagenty pro DNA sekvencování, například dNTP, tepelně stálou pyrofosfatázu a vhodné pufrы.

Podle jiného provedení má enzym v kitu aminokyselinovou sekvenci LSVXLG(V/I)PVKE (SEQ ID NO:15), kde znamená X jakoukoliv aminokyselinu s výjimkou E. Ve třípísmenovém kódu je tato aminokyselinová sekvence přepsána jako LeuSerValXaaLeuGlyXaaProValLysGlu (SEQ ID NO:15), kde znamená Xaa v poloze 4 jakoukoliv aminokyselinu s výjimkou Glu a Xaa v poloze 7 Val nebo Ile. Podle výhodného provedení je aminoky-

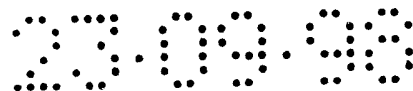


selinová sekvence LSVXLGVPVKE (SEQ ID NO:16), kde znamená X jakoukoiv aminokyselinu s výjimkou E. Ve třípísmenovém kódu je tato aminokyselinová sekvence přepsána jako LeuSerValXaaLeuGlyValProValLysGlu (SEQ ID NO:16), kde znamená Xaa v poloze 4 jakoukoliv aminokyselinu s výjimkou E. Podle ještě výhodnějšího provedení znamená Xaa v poloze 4 Arg. Podle jiného výhodného provedení je aminokyselinová sekvence LSVXLGIPVKE (SEQ ID NO:17), kde znamená X jakoukoiv aminokyselinu s výjimkou E. Ve třípísmenovém kódu je tato aminokyselinová sekvence přepsána jako LeuSerValXaaLeuGlyIleProValLysGlu (SEQ ID NO:17), kde znamená Xaa v poloze 4 jakoukoliv aminokyselinu s výjimkou Glu. Podle ještě výhodnějšího provedení znamená Xaa v poloze 4 Arg.

Jiné kity pro DNA sekvencování obsahují mutantní tepelně stálou DNA polymerázu charakterizovanou tím, že

- a) ve své nativní formě tato polymeráza obsahuje aminokyselinovou sekvenci LSXXLX(V/I)PXXE (SEQ ID NO:1), kde X znamená jakoukoliv aminokyselinu,
- b) tato aminokyselinová sekvence je mutována v poloze 4, přičemž však X v poloze 4 neznámá E,
- c) tepelně stálá DNA polymeráza má snížené rozlišování proti začlenění nukleotidů značených fluoresceinovými barvivy ve srovnání s nativní formou enzymu a obsahuje popřípadě činidla pro sekvencování DNA, jako jsou sloučeniny ukončující řetězec, dNTP, tepelně stálá pyrofosfatáza a vhodné pufrы.

V případě, kdy jsou terminátory značeny, jsou vhodným značením fluorescentní barviva, ještě výhodnějším značením jsou fluorescentní barviva s negativním nábojem nebo cyaninová barviva a nejvýhodnějším značením jsou fluoresceinová barviva. Podle výhodného provedení má enzym v kitu aminokyselinovou sekvenci LS(Q/G)XL(S/A)IPYEE (SEQ ID NO:2), kde znamená X jakoukoliv aminokyselinu. Ve třípísmenovém kódu je tato aminokyse-



linová sekvence přepsána jako LeuSerXaaXaaLeuXaaIleProTyrGluGlu (SEQ ID NO:2), kde znamená Xaa v poloze 3 Gln nebo Gly, Xaa v poloze 4 jakoukoliv aminokyselinu a Xaa v poloze 6 Ser nebo Ala. Podle výhodnějšího provedení má enzym v kitu minokyselinovou sekvenci LSQXLAIPYEE (SEQ ID NO:3), kde znamená X jakoukoliv aminokyselinu. Ve třípísmenovém kódu je tato aminokyselinová sekvence přepsána jako LeuSerGlnXaaLeuAlaIleProTyrGluGlu (SEQ ID NO:3), kde znamená Xaa v poloze 4 jakoukoliv aminokyselinu. Nejvýhodněji znamená Xaa v poloze 4 Lys.

Kity pro značení DNA obsahují tepelně stálou DNA polymerázu charakterizovanou tím, že

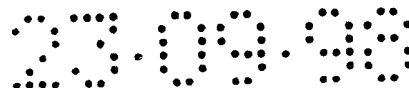
- a) ve své nativní formě polymeráza obsahuje aminokyselinovou sekvenci LSXXLX(V/I)PXXE (SEQ ID NO:1), kde X znamená jakoukoliv aminokyselinu,
- b) X v poloze 4 je mutován ve srovnání s nativní formou, není však mutován na E,
- c) enzym má snížené rozlišování proti začlenění nukleotidů značených fluoresceinovými barvivy ve srovnání s odpovídajícím standardním enzymem a popřípadě obsahuje přidavně dNTP a vhodné pufrы.

Podle výhodného provedení je X v poloze 4 mutován na K.

Jiné kity pro produkci značené DNA obsahují

- a) nukleotid nebo nukleotidový analog značený fluorescentní sloučeninou s negativním nábojem,
- b) nativní tepelně stálé DNA polymerázy mající kritický motiv LSXXLX(V/I)PXXE (SEQ ID NO:7), kde X v poloze 4 znamená jakoukoliv aminokyselinu kromě E,
- c) polymeráza má snížené rozlišování proti začlenění nukleotidů značených fluoresceinovými barvivy a popřípadě obsahuje přidavně dNTP a vhodné pufrы.

Podle výhodného provedení je X v poloze 4 mutován na K.



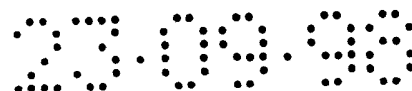
Podle jiného výhodného provedení je X v poloze 4 mutován na R.

Kit pro značení primerních extenzních produktů obsahuje obsahuje tepelně stálou DNA polymerázu charakterizovanou tím, že

- a) ve své nativní formě polymeráza obsahuje aminokyselinovou sekvenci LSXXLX(V/I)PXXE (SEQ ID NO:1), kde X znamená jakoukoliv aminokyselinu,
- b) X v poloze 4 je mutován ve srovnání s nativní formou, není však mutován na E,
- c) tepelně stálá DNA polymeráza obsahuje druhou aminokyselinovou sekvenci SQIXLR(V/I) (SEQ ID NO:18), kde znamená X jakoukoliv aminokyselinu s výjimkou E,
- d) enzym má snížené rozlišování proti začlenění ribonukleotidů značených fluoresceinovými barvivy ve srovnání s odpovídajícím standardním enzymem a obsahuje popřípadě přídatně ribonukleotid nebo ribonukleotidový analog značený fluoresceinovou sloučeninou s negativním nábojem nebo cyaninovou sloučeninou, dNTP a vhodné pufrы.

Podle výhodného provedení obsahuje polymeráza E681K mutaci a E615G mutaci. Jiné kity pro výrobu značených primerních extenzních produktů obsahují a) ribonukleotid nebo ribonukleotidový analog značený fluorescentní sloučeninou s negativním nábojem nebo cyaninovou sloučeninou a b) netivní tepelně stálou DNA polymerázu charakterizovanou tím, že

- i) polymeráza obsahuje kritický motiv, kterým je aminokyselinová sekvence LSXXLX(V/I)PXXE (SEQ ID NO:7), kde X v poloze 4 znamená jakoukoliv aminokyselinu kromě E,
- ii) obsahuje druhou aminokyselinovou sekvenci SQIXLR(V/I) (SEQ ID NO:18), kde X znamená jakoukoliv aminokyselinu kromě E,
- iii) tepelně stálá DNA polymeráza má snížené rozlišování proti začlenění ribonukleotidů značených fluoresceinovými barvivy a popřípadě obsahuje přídatně dNTP a vhodné pufrы.



Podle výhodného provedení v první aminokyselinové sekvenci je X v poloze 4 mutován na K a ve druhé aminokyselinové sekvenci je X v poloze 4 mutován na G. Podle jiného výhodného provedení v první aminokyselinové sekvenci je X v poloze 4 mutován na R a ve druhé aminokyselinové sekvenci je X v poloze 4 mutován na G.

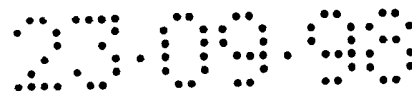
Vynález objasňují, nijak však neomezují následující příklady praktického provedení. Procenta a díly jsou míněny vždy hmotnostně, pokud není uvedeno jinak.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Expresse modifikovaného Taq polymerázového genu majícího snížené rozlišování proti začlenění nukleotidů značených fluoresceinovými barvivy

C-Koncový aminokyselinový podíl Taq DNA polymerázy kóduje polymerázovou aktivní oblast (Lawyer a kol., PCR Methods and Applications 2, str. 275 až 287, 1993; Freemont a kol., Proteins: Structure, Function and Genetics 1, str. 66 až 73, 1986). Fragment DNA, obsahující tuto oblast, se izoluje z plné délky Taq genu a mutuje se PCR zesílením v přítomnosti manganu (Leung a kol., Technique 1(1), str. 11 až 15, 1989). Například všechny restriční enzymy jsou obchodními produkty společnosti New England Biolabs, Beverly MA. Mutagenizované fragmenty se digerují s *Pst*I a *Bgl*III a klonují se do Taq expresního plasmidu, pLK102, který se má digerovat s *Pst*I a *Bgl*III. Plasmid pLK102 je derivátem pLK101, ve kterém je 900 bp *Pst*I-*Bgl*III fragment nahrazen krátkým *Pst*I-*Bgl*III linkerem. Plasmid pLK101 je modifikovaná forma pSYC1578 (Lawyer a kol., PCR Methods and Applications 2, str. 275 až 287, 1993 a americký patentový spis číslo 5 079352), ze kterého je malý fragment *Hinc*II/*Eco*RV

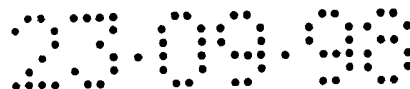


fragment v poloze 3' k polymerázové kódující oblasti vypuštěn.

Výsledné expresní plasmidy se transformují do *E. coli* kmenu N1624 (dostupný v organizaci *E. coli* Genetic Stock Center na univerzitě Yale University, kmen No. CGSC#5066) a získané transformanty se skrínují se zřetelem na schopnost účinněji začleňovat [$\alpha^{32}\text{P}$]Tet-dCTP ve srovnání se standardním enzymem. Za použití tohoto způsobu se identifikuje Mutant CS1, mající schopnost účinněji začleňovat [$\alpha^{32}\text{P}$]Tet-dCTP. Mutagenizovaný Taq expresní plasmid mutantu CS1 se digeruje s *Hind*III/*Nhe*I a získaný restriční fragment se subklonuje do standardního typu genu pLK101 za náhrady mutagenizovaného *Hind*III/*Nhe*I fragmentu ke stanovení, který podíl mutagenizované Taq polymerázy je zodpovědný za změněný fenotyp. Subkolny, obsahující *Hind*III/*Nhe*I restriční fragment, poskytují změněný fenotyp na standardní enzym, což naznačuje, že je mutace v tomto fragmentu. Následná analýza subklonu stanovuje, že mutace je lokalizována ve fragmentu 265 bp *Bam*HI-*Nhe*I.

DNA sekvenční analýza 265 *Nhe*I-*Bam*HI fragmentu se provádí na pCS1 za použití TaqFS DyeDeoxyTM terminátorového cyklického sekvencovacího kitu společnosti Applied Biosystems, Foster City, CA a DNA sekvenčního systému Applied Biosystems Model Prism 377. Sekvenční analýza identifikuje nesmyslnou mutaci v Taq polymerázovém genu na aminokyselině v poloze 681, která způsobuje náhradu zbytku glutamové kyseliny (E) zbytkem lysinu (K). Číslování se začíná na kodonu kodujícím první methioninový zbytek zralého proteinu (americký patentový spis číslo 5 079352). Tato mutace, E681K, je speciálně způsobená náhradou GAG za AAG v kodonové sekvenci. Plasmid pCS1 je uložen s ATCC 28. srpna 1997 pod objednacím číslem 98521.

Plasmid pCS1 může obsahovat přídatné mutace v kodovací sekvenci pro Taq polymerázu; avšak dalšími subklonovacími pokusy se zjistilo, že E681K mutace je jediná zodpovědná za

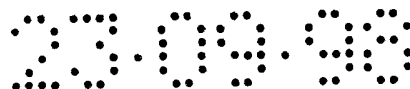


zvýšenou účinností začleňování nukleosidtrifosfátů, značených fluoresceinovými barvivy. Tato bodová mutace je umístěna v 265 pářů bází *Bam*HI-*Nhe*I DNA fragmentu, jak je ukázáno na obr. 1. V 265 bp DNA fragmentu E681K mutace je pouze změněna se zřetelem na standardní typ Taq polymerázové genové sekvence.

Pro další analýzu a kvantifikaci účinnosti začleňování nukleotidových analogů se 265 bp *Bam*HI-*Nhe*I fragment plasmidu pCS1 klonuje do Taq extrenního vektoru, který obsahuje standardní sekvenci v polymerázové doméně, pRDA3-2. Plasmid pRDA3-2, označovaný zde jako klon 3-2, je plně popsán v mezinárodním patentovém spise číslo WO 92/06200. Druhý klon, kodující jak E681K mutaci tak F667Y mutaci, se vytvořil na primer řízenou mutagenezí a následným klonováním PCR produktu obsahujícího obě mutace do *Bam*HI-*Nhe*I míst plasmidu pRDA3-2.

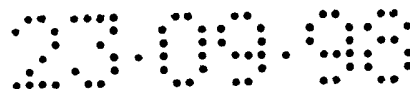
Expresní vektor pRDA3-2 obsahuje plnou délku Taq DNA polymerázového genu, funkčně napojeného na fág lambda P_L promotor. Ve vektoru pRDA3-2 5'-nukleázová doména Taq DNA polymerázového genu obsahuje bod mutace na kodonu kodujícím glycin v poloze 46, což snižuje aktivitu 5'-nukleázy (G46D mutace). Avšak genová sekvence v polymerázové doméně expresního vektoru pRDA3-2 je identická jako standardního typu Taq DNA polymerázové genové sekvence. Plasmid, pRDA3-2, pCS1 a E681K F667Y PCR produkt se digerují s *Bam*HI a s *Nhe*I a 265 bp DNA fragment z plasmidu pCS1 nebo PCR produkt se ligatuje do vektoru pRDA3-2 o sobě známými způsoby. Výsledné plasmidy, pLK112 a pLK113, se transformují do *E. coli* kmen DG116 (ATCC No. 53606). Tyto plasmidy kodují tepelně stálé DNA polymerázy, označované zde jako G46D E681K Taq a G46D E681K F667Y Taq. Expresovaný tepelně stálý DNA polymerázový protein G46D E681K F667Y Taq se čistí způsobem popsaným v literatuře (Lawyer a kol., PCR Methods and Applications 2, str. 275 až 287, 1993).

Enzym G46D E681K Taq se čistí způsobem podobným způsobu



přípravy, prováděným však v menším měřítku, jak následuje: všechny stupně se provádějí při teplotě 4 °C, pokud není uvedeno jinak. Buňky z 475 ml kultury se resuspendují ve 30 ml pufru (50 mM Tris-HCl, hodnota pH 7,5, 10 mM EDTA, hodnota pH 8,0, 0,5 mM Pefabloc^o SC, 0,5 µg/ml leupeptinu, 0,1 mM Nα-p-tosyl-L-lysinchlormethylketonu, 1 mM DTT). Na buňky se působí zvukem při 50% cyklu, usazují se 5 po dobu jedné minuty a chladí se na ledu po dobu jedné minuty. Tento stupeň se dvakrát opakuje. Přidá se 1,5 ml 4,0 M síranu amonného a směs se zahřívá na vodní lázni o teplotě 75 °C po dobu 15 minut a ochladí se na ledu. Přidá se polyethylenimin do 0,6 % a směs se inkubuje na ledu po dobu 10 minut. Směs se odstřeďuje při 16000xg po dobu 30 minut. Supernatant se vnese na sloupec 1,8 ml fenyl-sefaroze (Bio-Rad Polyprep chromatografický sloupec) vyvážený roztokem 50 mM Tris-HCl, hodnota pH 7,5, 10 mM EDTA, hodnota pH 8,0, 1 mM DTT, 0,2 M síranu amonného. Sloupec se promyje 6 ml každého z následujících tří roztoků: 1) 25 mM Tris-HCl, hodnota pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,2 M síranu amonného, 2) 25 mM Tris-HCl, hodnota pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 3) 25 mM Tris-HCl, hodnota pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 20 % ethylenglykolu. Polymeráza se eluuje 6 ml systémem 25 mM Tris-HCl, hodnota pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 20 % ethylenglykolu, 2,5M močoviny. Po adjustaci polymerázové preparace na 100 mM KCl 3M KCl se směs vnese na sloupec heparinu a sepharosu (1,8 ml, Bio-rad Polyprep sloupec) vyvážený 25 mM Tris-HCl, hodnota pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 100 mM KCl. Po promytí tímtož pufrům se vzorek eluuje za použití pufru 25 mM Tris-HCl, hodnota pH 7,5, 1 mM EDTA, 400 mM KCl.

Po čištění se aktivita modifikovaných enzymů stanovuje za použití zkoušky aktivity popsané v literatuře (Lawyer a kol., J. Biol. Chem. 264, str. 6427 až 6437, 1989). Aktivita vyčištěných enzymů se vypočte tímto způsobem: jedna jednotka enzymu odpovídá 10 nmol produktu syntetizovaného v průběhu 30 minut. DNA polymerázová aktivita je přímo úměrná koncentraci



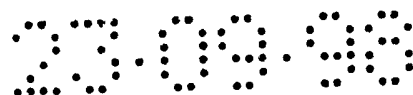
enzymu až do 80-100 pmol začleněného dCMP (zředěný enzym při 0,024 až 0,03 jednotek/ μ l). Vyčištěných enzymů se používá pro začleňovací a sekvenční reakce podle příkladu 2 až 4.

Příklad 2

Zkouška porovnávací účinnost začleňování ddNTP

Relativní schopnost G46D F667Y Taq, G46D F667Y E681K Taq a F730Y Tma 30 DNA polymeráz začleňovat fluoresceinovými barvivy značeného ddCTP se porovnává za použití omezující matrice, primerové extenzní konkurenční zkoušky. Polymeráza F730Y Tma 30 DNA je popsána v příkladu 1 amerického patentového spisu číslo přihlášky vynálezu 60/052065, podané 9. června 1997 a v evropské přihlášce vynálezu číslo 98112327.6). Při této konkurenční zkoušce v důsledku toho, že začlenění ddCTP ukončuje extenzní reakci, čím ochotněji polymeráza začleňuje ddCTP do extendovaného primeru, tím méně se může začlenit [α - 33 P]dCTP. Proto se vzrůstající účinností ddCTP začleňování vzrůstá míra inhibice DNA syntézy. Účinnost začleňování ddCTP se pak porovnává s účinností začleňování fluorescentně značené ddCTP, čímž se získá relativní míra účinnosti začlenění fluorescentně značeného ddNTP pro daný enzym.

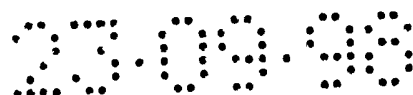
Zkouška se provádí způsobem popsaným v literatuře (Lawyer a kol., J. Biol. Chem. 264, str. 6427, 1989), včetně následujících modifikací. Zkoušená směs má takové složení, aby konečná koncentrace byla 50 mM Bicinu pH 8,3, 25 °C, 2,5 mM MgCl₂, 1 mM β -merkaptoethanolu, 20 μ M vždy dATP, dGTP a dTTP (Perkin-Elmer), 20 μ M dCTP (Perkin-Elmer) a [α - 33 P]dCTP (New England Nuclear, Boston, MA). M13mp18 (Perkin-Elmer) se kopuluje na primer DG48 (SEQ ID NO:10) a ekvivalent 0,085 pmol kopulované matrice se přidává do zkušební směsi pro každou reakci. Přidává se 35 μ l zkoušené směsi s matricí DNA do každé z 38 Eppendorfových zkumavek o obsahu 0,5 ml. Připraví se zředění



Zowie-ddCTP v 25 mM CAPSO pufru, hodnota pH 9,6, tak, aby vždy 10 μ l každého se přidalo do reakční zkumavky, aby konečná koncentrace Zowie-ddCTP byla 3, 1, 0,5, 0,25, 0,125 nebo 0,0625 μ M. Pro G46D F667Y Taq DNA polymerázu se připraví dvě zkumavky 3, 1, 0,5, 0,25, 0,125 a 0,0625 μ M Zowie-ddCTP. Osm zbylých reakčních zkumavek obsahuje 10 μ l 25 mM pufru CAPSO, hodnota pH 9,6. Tak každá z 36 zkumavek obsahuje 35 μ l zkoušené směsi a 10 μ l buď 25 mM pufru CAPSO, hodnota pH 9,6, nebo Zowie-ddCTP v příslušném zředění.

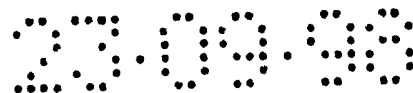
Pro každý zkoušený enzym se iniciuje polymerace ve zkumavce s každým Zowie-ddCTP v příslušném zředění a ve dvou zkumavkách obsahujících samotný pufru CAPSO za použití 5 μ l enzymu. Používá se následujících koncentrací enzymu, přičemž se vždy dbá na nadbytek enzymu pro množství zkoušeného substrátu: 2,5 jednotek F667Y G46D Taq DNA polymerázy, připravené způsobem podle příkladu 1; 1,25 jednotek G46D,F667Y,E681K Taq DNA polymerázy, připravené způsobem podle příkladu 1; nebo 2 jednotky F730Y Tma30 DNA polymerázy. Jako kontrola pro základní koncentraci se iniciuje zbylá negativní kontrola enzymem zředěným puftrem spíše než polymerázou. Všechny zkušební zkumavky se bezprostředně krátce intenzivně províří a inkubují se po dobu 10 minut při teplotě 75 °C. Reakce se ukončí přidáním 10 μ l 60 mM EDTA a uloží se při teplotě 0 °C.

V analogickém testu se ddCTP zředí ve 25 mM pufru CAPSO, hodnota pH 9,6, tak, aby 10 μ l každého zředění po přidání do reakční zkumavky vytvořilo konečnou koncentraci 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625 nebo 0,0312 μ M. Pipetuje se 10 μ l každého zředění do tří Eppendorfových zkumavek, obsahujících vždy 35 μ l shora popsané testovací směsi. Také se připraví 4 zkumavky obsahující 35 μ l testované směsi plus 10 μ l 25 mM CAPSO pufru, hodnota pH 9,6. Každá z 19 zkumavek obsahuje 35 μ l testované směsi a 10 μ l buď 25 mM pufru CAPSO, hodnota pH 9,6, nebo jednoho ze zředění ddCTP.



Polymerace se inidiuje v jedné zkumavce z každého ddCTP zředění a v jedné zkumavce s pufrem CAPSO se 2,5 jednotkami G46D F667Y E681K Taq DNA polymerázy, s 1,25 jednotkami G46D-F667Y E681K Taq DNA polymerázy nebo se 2 jednotkami F730Y Tma 30 DNA polymerázy. Zbyvajících zkumavka obsahující CAPSO se iniciuje enzymem zředěným pufrem místo pufrem obsahujícím polymerázu jakožto jako negativní kontrola. Všechny reakční směsi se bezprostředně intenzivně províří a inkubují se po dobu 10 minut při teplotě 75 °C. Reakce se ukončí přidáním 10 µl 60 mM EDTA a uloží se při teplotě 0 °C.

Pro každou reakci 50 µl podíl 60 µl reakční směsi se zředí 1 ml 2 mM EDTA, 50 µl /ml stříhaného losového sperma DNA jako nosičem. Vysráží se DNA použitím TCA o sobě známým způsobem a shromáždí se na GF/C filtračním kotoučku (Whatman). Stanoví se množství začleněné [α -³³P]dCMP pro každý vzorek a normalizuje se na CAPSO vzorky bez ddNTP (0% inhibice). Koncentrace ddCTP nebo Zowie-ddCTP, potřebná k 50% inhibici, se vypočte pro každý vzorek a je uvedena v tabulce II. Porovnání množství ddCTP, potřebného k inhibici syntézy 50%, se množstvím Zowie-ddCTP, potřebným pro inhibici syntézy 50% pro určitý enzym, odpovídá relativní schopnosti každého enzymu začleňovat fluorescenčně značený analog. Tyto hodnoty dokládají, že G46D F667Y Taq DNA polymeráza začleňuje Zowie-ddCTP nejméně účinně ze tří zkoušených enzymů (koncentrační poměry pro 50% inhibici Zowie-ddCTP versus ddCTP = 25). F730Y Tma30 DNA polymeráza začleňuje tento značený analog účinněji než G46D F667Y Taq DNA polymeráza (koncentrační poměry pro 50% inhibici Zowie-ddCTP versus ddCTP = 4), zatímco G46D F667Y E681K Taq DNA polymeráza začleňuje značený a neznačený analog ddCTP téměř stejně účinně (koncentrační poměry pro 50% inhibici Zowie-ddCTP versus ddCTP = 1,2).



Tabulka II

Koncentrace (μM) Zowie-ddCTP nebo ddCTP potřebné k 50% inhibici

DNA polymeráza	Zowie-ddCTP	ddCTP	Zowie-ddCTP/ddCTP
G46D F667Y Taq	1,4	0,056	25,0
G46D F667Y E681K Taq	0,14	0,116	1,2
F730Y Tma30	0,236	0,057	4,0

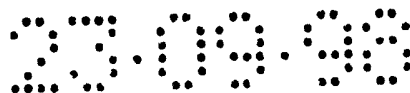
Příklad 3

Zkouška míry extenze

Míra extenze G46D F667Y Taq a G46D F667Y E681K Taq se stanoví zkouškou míry extenze. Při této zkoušce se používá enzymu k extenzi primeru kopulovaného na M13 matici v přítomnosti $[\alpha\text{-}^3\text{P}]\text{dCTP}$. Extenzní reakce se denaturuje a produkty se analyzují denaturační agarozovou gelovou elektroforézou.

Zkouška se provádí jak shora popsáno (Lawyer a kol., J. Biol. Chem. 264, str. 6427, 1989) včene následujících modifikací. Zkoušená směs je složena tak, aby konečná koncentrace byla 50 mM Bicinu, hodnota pH 8,3, 25 °C, 2,5 mM chloridu hořečnatého, 1 mM β -merkapt ethanolu, 200 μM vždy dATP, dGTP a dTTP (Perkin-Elmer), 100 μM dCTP (Perkin-Elmer) obsahujícího $[\alpha\text{-}^3\text{P}]\text{dCTP}$ (New England Nuclear, Boston, MA). M13mp18 (Perkin-Elmer) se kopuluje na primer DG48 (SEQ ID NO: 11) a přidá se ekvivalent 0,085 pmol kopulované matrice ke zkoušené směsi pro každou reakci. Přidá se 55 μl zkušební směsi s matricovou DNA do každé ze 14 Eppendorfových zkumavek o obsahu 0,5 ml. Každá zkumavka se preinkubuje při teplotě 75 °C po dobu alespoň 30 sekund před startem polymerázové reakce.

Polymerace se iniciuje v šesti ze čtrnácti testovacích zkumavek 5 μl G46D F667Y Taq DNA polymerázy (2,5 jednotek) nebo G46D F667Y E681K Taq DNA polymerázy (1,25 jednotek) Oba en-

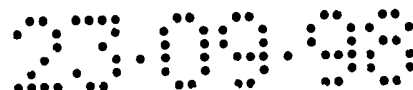


zymy se připraví způsobem podle příkladu 1, a použité koncentrace představují předem stanovený nadbytek enzymu pro množství testovaného substrátu. Jako kontrola pro základ se iniciuje zbylá negativní kontrola enzymem zředěným pufrům spíše než polymerázou. Všechny reakční zkumavky se krátce víří a inkubují se při teplotě 75 °C. Dvě z šesti zkumavek obsahující G46D F667Y Taq DNA polymerázu se inkubují tři minuty, dvě šest minut a dvě 10 minut. Podobně dvě zkumavky startující s G46D F667Y E681K Taq DNA polymerázou se inkubují 30 sekund, dvě jednu minutu a dvě dvě minuty. Kontrolní zkumavky se inkubují tři minuty. Reakce se ukončí přidáním 10 µl 60 mM EDTA a uloží se při teplotě 0 °C.

Pro každou reakci 25 µl podíl 60 µl reakční směsi se zředí 1 ml 2 mM EDTA, 50 µg/ml stříhaného losového sperma DNA jako nosiče. Vysráží se DNA použitím TCA o sobě známým způsobem a shromáždí se na GF/C filtračním kotoučku (Whatman). Stanoví se množství začleněné [α - ^{33}P]dCMP pro každý vzorek.

Zbylých 35 µl každého duplikátu se zkombinuje a 70 µl vzorku se vysráží ethanolem, vysuší se a resuspenduje se v 50 mM NaOH, 1 mM EDTA. Z těchto vzorků se odstraní podíly takže se odejme z každého stejný počet [α - ^{33}P]. Tyto podíly se vnesou na 0,9% alkalický agarosový gel, podrobí se elektroforéze, vysuší se a autoradiografují se způsobem popsaným v literatuře (Maniatis a kol., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1982). Jako standard molekulové hmotnosti se použije bakteriofág lambda DNA řez s restrikcí enzymem *HindIII* (BRL) a 5' zakončení s [^{32}P].

Délka páru bází extenzního produktu v každém vzorku se určí porovnáním migrační vzdálenosti každého vzorku se vzdáleností migrovaného lambda DNA standardu velikosti. Počet páru bází v každém produktu se dělí počtem sekund každé extenzní



reakce inkubované, čímž se získá extenzní rychlost, jak dále uvedeno.

DNA polymeráza	Doba	Pár bází/sekunda
G46D F667Y Taq	3 min	12,5
G46D F667Y Taq	6 min	12,2
G46D F667Y Taq	10 min	11,8
G46D F667Y E681K Taq	30 s	36,7
G46D F667Y E681K Taq	1 min	41,7
G46D F667Y E681K Taq	2 min	52,9

Výsledky zkoušek dokládají, že přítomnost E681K mutace zvyšuje rychlost extenze G46D F667Y enzymu 3 až 4,3 krát.

Příklad 4

Cyklické sekvencování s G46D F667Y E681K Taq DNA polymerázou a s fluoresceinem značeným ddNTP

Tento příklad dokládá použití modifikované polymerázy podle vynálezu k cyklickému sekvencování fluoresceinovým barvivem značeného dideoxyterminátoru za použití 1 μM nebo méně ddNTP a poměru ddNTP:dNTP alespoň 1:100. Fluoresceinovým barvivem značené dideoxyterminátory jsou reagenty sekvenčního kitu společnosti Applied Biosystems PRISM Sequenase^R Terminator (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) a je optimalizován pro použití polymerázou Sequenasa DNA a s alfa-thio dNTP. Reakce cyklického sekvencování se provádějí v 20 μl objemu obsahujícím 50 mM Tris-HCl (hodnota pH 8,8), 2,0 mM MgCl₂, 100 μM vždy dATP, dCTP a dTTP (Perkin-Elmer, Norwalk, CT), 500 μM dITP (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), 0,2 μg M13mp18 jednořetězcové DNA matrice (Perkin-Elmer), 0,15 μM LacZ Forward Primer (Perkin-Elmer), 5 jednotek G46D F667Y E681K Taq DNA polymerázy, 20 jednotek rTth tepelně stálé pyrofosfatázy (evropská zveřejněná přihláška vynálezu EP-A-763599 a americký patentový spis

5 665551), 0,05 μM terminátoru Sequenase A Dye Terminator, 0,8 μM terminátoru Sequenase C Dye Terminator, 0,08 μM terminátoru Sequenase G Dye Terminator a 1,0 μM terminátoru Sequenase T Dye Terminator. Všechny čtyři terminátory Sequenase Dye Terminator jsou obchodními produkty společnosti Perkin-Elmer. Reakční směsi se vnesou do předehřátého (75 °C) tepelného cyklizátoru Perkin-Elmer GeneAmp[®] PCR System 9600 a podrobí se 25 cyklům při 96 °C po dobu 10 sekund, 50 °C po dobu 5 sekund a 60 °C po dobu 4 minut. Barvivem značené fragmenty se čistí za použití sloupců Centri-Sep[™] (Princeton Separations, Adelphia, NJ) podle výrobcova návodu a suší se ve vakuové odstředivce. Pelety se resuspendují v systému 6 μl deionizovaný formamid:50 mg/ml dextranová modř (ve 25 mM EDTA, hodnota pH 8,0) 5:1 (objem/objem), zahřátém na teplotu 90 °C po dobu tří minut a přímo se vnesou na preelektroforezovaný gel 4 % polyakrylamidu/6 M močovina, elektroforezují se a analyzují se na sekvenceru Perkin-Elmer ABI PRISM[®] 377 DNA podle návodu výrobce (ABI PRISM 377 DNA Sequencer User's Manual). Automatizovaný analytický softwar společnosti Perkin-Elmer ABI PRISM 377 DNA Sequencer poskytuje více než 98,5% přesnost pro 450 bází (6 chyb pro báze +10 až +460 z primeru).

Průmyslová využitelnost

Rekombinantní, tepelně stálá DNA polymeráza se zvýšenou účinností pro začleňování nekonvenčních, například fluoresceinových barviv značených nukleotidů s výraznými cenovými a účinnostními přednostmi pro DNA sekvencování. Je výhodná pro in vitro DNA syntézy, například pro DNA sekvencování, pro syntézu značené DNA a pro produkci značených primerních extenzních produktů.

Seznam sekvencí

(1) Obecné informace

(i) Přihlašovatel

- (A) Jméno: F. Hoffmann-La Roche Ltd
- (B) Ulice: Grenzacherstrasse 124
- (C) Město: Basel
- (D) Stát: BS
- (E) Země: Švýcarsko
- (F) Poštovní kód (ZIP): CH-4070
- (G) Telefon: (0)61 688 24 03
- (H) Telefax: (0)61 688 13 95
- (I) Telex: 962292/965512 hlr ch

(ii) Název vynálezu: Rekombinantní, tepelně stálá DNA polymeráza, způsob její přípravy a kit, který ji obsahuje

(iii) Počet sekvencí: 18

(iv) Forma pro počítač

- (A) Typ média: Floppy disk
- (B) Počítač: IBM PC kompatibilní
- (C) Operační systém: PC-DOS/MS-DOS
- (D) Software: PatentIn Release # 1,0, Version # 1,30
(EPO)

(vi) Platné přihlašovací údaje

- (A) Číslo přihlášky: US 60/052065
- (B) Datum podání: 09-červenec-1997

2. Informace o SEQ ID. Č.1:

(i) Charakteristiky sekvence

- (A) Délka: 11 aminokyselin
- (B) Typ: aminokyselina
- (C) řetězcovitost: jeden
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(ix) Charakteristiky

2. Informace o SEQ ID. Č.4:

(i) Charakteristiky sekvence

(A) Délka: 11 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) řetězcovitost: jeden

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(ix) Charakteristiky

(A) jméno/klíč: region

(B) lokace: 7

(D) Jiné informace: /značení = Xaa/

poznámka "Xaa v poloze 7 je Val nebo Ile".

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:4

Leu Ser Val Xaa Leu Gly Xaa Pro Val Lys Glu

1

5

10

2. Informace o SEQ ID. Č.5:

(i) Charakteristiky sekvence

(A) Délka: 11 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) řetězcovitost: jeden

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO:5

Leu Ser Val Xaa Leu Gly Val Pro Val Lys Glu

1

5

10

2. Informace o SEQ ID. Č.6:

(i) Charakteristiky sekvence

(A) Délka: 11 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) řetězcovitost: jeden

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Rekombinantní, tepelně stálá DNA polymeráza v y z n a -
č u j í c í s e t í m, že

a) ve své nativní formě obsahuje aminokyselinovou sekvenci

LeuSerXaaXaaLeuXaaXaaProXaaXaaGlu, SEQ ID NO:1, přičemž Xaa
v poloze 3, 4, 6, 9 a 10 sekvence znamená jakýkoliv amino-
kyseinový zbytek a Xaa v poloze 7 znamená Val nebo Ile,

b) Xaa v poloze 4 je mutovaný ve srovnání s nativní sekvencí
s výjimkou, že Xaa v poloze 4 není mutován na Glu a

c) tepelně stálá DNA polymeráza má rozlišovací schopnost proti
začlenění nukleotidů značených fluoresceinovým barvivem,
která je snížena ve srovnání s nativní formou této polyme-
rázy.

2. Rekombinantní, tepelně stálá DNA polymeráza podle nároku
1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že nukleotidem je di-
deoxynukleotid a úroveň rozlišování je alespoň třináásobně niž-
ší než nativní formy polymerázy.

3. Rekombinantní, tepelně stálá DNA polymeráza podle nároku
2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se úroveň rozlišo-
vání měří stanovením koncentrace dideoxynukleotidu značeného
fluoresceinovým barvivem, které je zapotřebí pro 50% inhibici
DNA syntézy.

4. Rekombinantní, tepelně stálá DNA polymeráza podle nároku
2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že polymeráza je z ter-
mofilních druhů ze souboru zahrnujícího *Thermosipho africanus*,
Bacillus caldotenax a *Bacillus stearothermophilus*.

5. Rekombinantní, tepelně stálá DNA polymeráza podle nároku
2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že polymeráza je
z druhu *Thermus*.

6. Rekombinantní, tepelně stálá DNA polymeráza podle nároku 5, v y z n a č u j í c í s e t í m, že

- a) ve své nativní formě obsahuje aminokyselinovou sekvenci LeuSerXaaXaaLeuXaaIleProTyrGluGlu, SEQ ID NO:2, přičemž znamená Xaa v poloze 3 Gln nebo Gly, Xaa v poloze 4 jakoukoliv aminokyselinu a Xaa v poloze 6 Ser nebo Ala,
- b) Xaa v poloze 4 je mutovaný ve srovnání s nativní sekvencí s výjimkou, že Xaa v poloze 4 není mutován na Glu a
- c) tepelně stálá DNA polymeráza má rozlišovací schopnost proti začlenění nukleotidů značených fluoresceinovým barvivem, která je snížena ve srovnání s nativní formou této polymerázy.

7. Rekombinantní, tepelně stálá DNA polymeráza podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že

- a) ve své nativní formě obsahuje aminokyselinovou sekvenci LeuSerGlnXaaLeuAlaIleProTyrGluGlu, SEQ ID NO:3, přičemž znamená Xaa v poloze 4 jakoukoliv aminokyselinu,
- b) Xaa v poloze 4 je mutovaný ve srovnání s nativní sekvencí s výjimkou, že Xaa v poloze 4 není mutován na Glu a
- c) tepelně stálá DNA polymeráza má rozlišovací schopnost proti začlenění nukleotidů značených fluoresceinovým barvivem, která je snížena ve srovnání s nativní formou této polymerázy.

8. Rekombinantní, tepelně stálá DNA polymeráza podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e t í m, že Xaa v poloze 4 je mutován na Lys.

9. Rekombinantní, tepelně stálá DNA polymeráza podle nároku 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že polymeráza je z druhu Thermogota.

10. Rekombinantní, tepelně stálá DNA polymeráza podle nároku 9, v y z n a č u j í c í s e t í m, že

- a) ve své nativní formě obsahuje aminokyselinovou sekvenci LeuSerValXaaLeuGlyXaaProValLysGlu, SEQ ID NO:4, přičemž znamená Xaa v poloze 4 jakoukoliv aminokyselinu s výhodou Arg a Xaa v poloze 7 Val nebo Ile,
- b) Xaa v poloze 4 je mutovaný ve srovnání s nativní sekvencí s výjimkou, že Xaa v poloze 4 není mutován na Glu a
- c) tepelně stálá DNA polymeráza má rozlišovací schopnost proti začlenění nukleotidů značených fluoresceinovým barvivem, která je snížena ve srovnání s nativní formou této polymerázy.

11. Nukleová kyselinová sekvence kodující rekombinantní, tepelně stálou DNA polymerázu podle nároku 1 až 10.

12. Vektor obsahující nukleovou kyselinovou sekvenci kodující rekombinantní tepelně stálou DNA polymerázu podle nároku 1 až 10.

13. Hostitelská buňka obsahující nukleovou kyselinovou sekvenci kodující rekombinantní tepelně stálou DNA polymerázu podle nároku 1 až 10.

14. Způsob přípravy rekombinantní tepelně stálé DNA polymerázy podle nároku 1 až 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že

- a) se kultivuje hostitelská buňka obsahující nukleovou kyselinovou sekvenci kodující rekombinantní tepelně stálou DNA polymerázu podle nároku 1 až 10 za podmínek promotujících expresi rekombinantní tepelně stálé DNA polymerázy a
- b) izoluje se rekombinantní tepelně stálá DNA polymeráza z hostitelské buňky nebo z prostředí.

15. Rekombinantní, tepelně stálá DNA polymeráza připravená způsobem podle nároku 14.

16. Způsob DNA sekvencování, v y z n a č u j í c í s e

t í m, že

- a) pořídí se rekombinantní, tepelně stálá DNA polymeráza podle nároku 1 až 10,
- b) pořídí se barevný terminátor značený fluoresceinovým barvivem s negativním nábojem,
- c) provádí se sekvenční reakce s barevným terminátorem.

17. Způsob podle nároku 16, v y z n a č u j í c í s e t í m, že rekombinantní, tepelně stálá DNA polymeráza má sníženou úroveň rozlišování se zřetelem na začleňování nukleotidů značených fluoresceinovými barvivy, přičemž nukleotidem je ribonukleotid a úroveň rozlišování se měří poměrem koncentrace dideoxynukleotidu značeného fluoresceinovým barvivem, které je zapotřebí pro 50% inhibici DNA syntézy versus koncentrace neznačeného dideoxynukleotidu potřebého pro 50% inhibici.

18. Způsob podle nároku 17, v y z n a č u j í c í s e t í m, že poměr je 4 nebo menší.

19. Způsob produkce značené DNA, v y z n a č u j í c í s e t í m, že

- a) pořídí se rekombinantní, tepelně stálá DNA polymeráza podle nároku 1 až 10,
- b) pořídí se nukleotid značený fluoresceinovým barvivem a
- c) provádí se DNA syntézní reakce.

20. Způsob produkce značených primerových extenzních produktů, v y z n a č u j í c í s e t í m, že

- a) pořídí se rekombinantní, tepelně stálá DNA polymeráza podle nároku 1 až 10,
 - i) polymeráza obsahuje aminokyselinovou sekvenci LeuSerValXaaLeuGlyXaaProValLysGlu, SEQ ID NO:4, přičemž znamená Xaa v poloze 4 jakoukoliv aminokyselinu s výjimkou Glu a Xaa v poloze 7 sekvence Val nebo Ile,
 - ii) polymeráza má sníženou rozlišovací schopnost se zřete-

- lem na začlenění nukleotidů značených fluoresceinovým barvivem,
- iii) polymeráza také obsahuje druhou aminokyselinovou sekvenci SQIXLR(V/I), SEQ ID NO:18, přičemž znamená X jakoukoliv aminokyselinu s výjimkou E,
 - iv) polymeráza má sníženou rozlišovací schopnost se zřetelcem na začlenění ribonukleotidů značených fluoresceinovým barvivem,
- b) pořídí se nukleotid značený fluoresceinovým barvivem a
c) provádí se primerová extenzní reakce.

21. Použití rekombinantní, tepelně stálá DNA polymerázy podle nároku 1 až 10 pro in vitro syntézní účely DNA, například pro DNA sekvencování, pro syntézu značené DNA a pro produkci značených primerních extenzních produktů.

22. Kit pro DNA sekvencování, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje rekombinantní, tepelně stálou DNA polymerázu podle nároku 1 až 10 a terminátor značený fluorescentním barvivem s negativním nábojem.

23. Kit pro DNA sekvencování podle nároku 22, v y z n a - č u j í c í s e t í m, že rekombinantní, tepelně stálá DNA polymeráza má sníženou rozlišovací schopnost se zřetelcem na začlenění ribonukleotidů značených fluoresceinovým barvivem, přičemž úroveň rozlišování se měří stanovením poměru koncentrace dideoxynukleotidu ddNTP značeného fluoresceinovým barvivem, kterého je zapotřebí pro 50% inhibici DNA syntézy ve srovnání s koncentrací neznačeného ddNTP a tento poměr je 4 nebo menší.

24. Kit pro DNA sekvencování podle nároku 23, v y z n a - č u j í c í s e t í m, že úroveň rozlišování je alespoň pětkrát nižší než nativní formy příslušné polymerázy.

25. Kit pro produkci značené DNA, v y z n a č u j í c í

s e t í m, že obsahuje rekombinantní, tepelně stálou DNA polymerázu podle nároku 1 až 10 a nukleotid značený fluorescentním barvivem s negativním nábojem.

26. Kit pro produkci značených primerních extenzních produktů, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje rekombinantní, tepelně stálou DNA polymerázu podle nároku 1 až 10 a ribonukleotid značený fluorescentním barvivem.

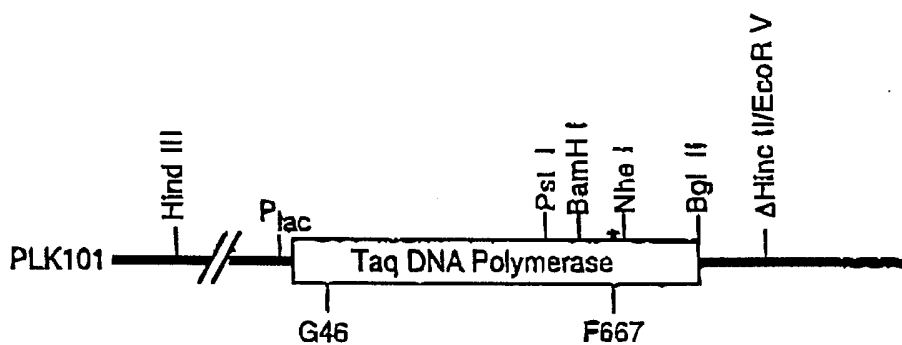
lh

23.09.98

PU 2874-98

~~57662~~

OBR. 1



PK