

(12) Ausschließungspatent

(11) DD 284 052 A5



Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 12 Q 1/68
C 07 M 21/04
C 12 Q 1/25

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD C 12 Q / 330 683 8	(22)	11.07.89	(44)	31.10.90
(31)	218,103	(32)	12.07.88	(33)	US

(71) siehe (73)
(72) Tabor, Standley; Richardson, Charles, US
(73) President and Fellows of Harvard College, Cambridge, Massachusetts 02138, US
(74) Internationales Patentbüro Berlin, Wallstraße 23/24, Berlin, 1020, DD

(54) Methode zur Sequenzierung eines Stranges einer DNA

(55) DNA-Sequenzierung; DNA-Strang; Starter, hybridisiert; Inkubation mit Dextoxyribonukleosidtriphosphat; DNA-Polymerase; Kettenabbruchglied; Polymerase Verlängerung; Starter; DNA-Produktbildung

(57) Die Erfindung betrifft eine Methode zur Sequenzierung eines Stranges einer DNA, einschließlich der Schritte: Bereitstellung eines Stranges der DNA; Hybridisieren des Stranges mit einem Starter, der diesen Strang hybridisieren kann, um ein hybridisiertes Gemisch zu ergeben; Inkubation des Gemischs mit einem Deoxyribonukleosidtriphosphat, einer DNA-Polymerase und einem Kettenabbruchglied unter Bedingungen, unter denen die Polymerase die Verlängerung des Starters zur Bildung einer Reihe von DNA-Produkten bewirkt, die sich von der Länge des verlängerten Starters unterscheiden, wobei jedes DNA-Produkt am verlängerten Ende ein Kettenabbruchglied hat und die Anzahl jedes DNA-Produktes im wesentlichen für alle DNA-Produkte, die sich in der Länge von 1 bis 20 Basen unterscheiden, annähernd die gleiche ist.

Patentansprüche:

1. Methode zur Sequenzierung eines Strangs einer DNA, bestehend aus den Schritten der Bereitstellung dieses DNA-Stranges, Hybridisierung dieses Stranges mit einem Starter, welcher diesen Strang hybridisieren kann, um ein hybridisiertes Gemisch zu ergeben, und Inkubation dieses hybridisierten Gemisches mit einem Dideoxynukleosidtriphosphat, einer DNA-Polymerase und einem ersten Kettenabbruchglied, **dadurch gekennzeichnet**, daß diese Inkubation unter Bedingungen ausgeführt wird, in denen diese Polymerase die Verlängerung des Starters zur Bildung einer ersten Reihe von ersten DNA-Produkten bewirkt, welche sich von der Länge des erweiterten Starters unterscheidet, wobei sich am verlängerten Ende jedes ersten DNA-Produktes ein Kettenabbruchglied befindet und die Menge jedes der ersten DNA-Produkte für im wesentlichen alle DNA-Produkte, die sich in der Länge von 1 bis 20 Basen unterscheiden, annähernd gleich ist.
2. Methode nach Anspruch 1, **gekennzeichnet durch** die Schritte der Trennung dieser ersten DNA-Produkte durch Gel-Permeation nach dem Molekulargewicht zur Bildung einer ersten Reihe von Bändern, wobei jede der ersten Bandreihen ein erstes DNA-Produkt mit einem bestimmten Molekulargewicht darstellt, worin die Intensität jedes nahegelegenen Bandes der ersten Reihe für im wesentlichen alle Bänder der ersten Reihe annähernd gleich ist, und Bestimmung der Position jedes Bandes der ersten Reihe.
3. Methode nach Anspruch 1, **gekennzeichnet durch** Bereitstellung von einem bis drei zusätzlichen, verschiedenen Kettenabbruchgliedern in dem hybridisierten Gemisch, jedes mit einer Konzentration, die sich von der jedes anderen Kettenabbruchgliedes unterscheidet, worin die DNA-Polymerase die Produktion von einer bis drei zusätzlichen Reihen von zusätzlichen DNA-Produkten bewirkt, wobei jedes DNA-Produkt jeder zusätzlichen Reihe am verlängerten Ende eines der zusätzlichen Kettenabbruchglieder hat, die Menge jedes dieser zusätzlichen DNA-Produkte mit demselben Kettenabbruchglied annähernd dieselbe für alle Längen innerhalb eines Bereichs von 20 Basen ist und distinktiv verschieden ist von der Menge aller DNA-Produkte mit einem anderen Kettenabbruchglied, welches in einer anderen Reihe liegt, aber annähernd dasselbe Molekulargewicht hat.
4. Methode nach Anspruch 3, **gekennzeichnet durch** die Schritte der Trennung aller dieser DNA-Produkte durch Gel-Permeation nach dem Molekulargewicht zur Bildung von insgesamt zwei bis vier Reihen von Bändern, wobei das Band einer Reihe ein DNA-Produkt mit demselben Kettenabbruchglied wie jedes andere Band in dieser Reihe darstellt und ein bestimmtes Molekulargewicht hat, worin die Intensität jedes nahegelegenen Bandes innerhalb derselben Reihe annähernd dieselbe und distinktiv verschieden ist von der Intensität jedes nahegelegenen Bandes einer anderen Reihe, und Bestimmung der Position und der Intensität jedes Bandes jeder Reihe.
5. Methode nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß das hybridisierte Gemisch mit einem Mangan- oder Eisenion versetzt wird, wobei dieses Ion bewirkt, daß diese Polymerase nichtunterscheidend für die Kettenabbruchglieder ist.
6. Methode nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß die DNA-Polymerase ausgewählt wird aus einer DNA-Polymerase Typ T7, dem großen Fragment von E. coli-DNA-Polymerase I und Taq-Polymerase.
7. Methode nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Kettenabbruchglied ein Dideoxynukleosidtriphosphat ist.
8. Methode nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß das hybridisierte Gemisch mit einem Chelator versetzt wird.
9. Satz zur Verwendung bei der Sequenzierung von DNA, bestehend aus einer Quelle für die DNA-Polymerase und einem Kettenabbruchglied, **dadurch gekennzeichnet**, daß er ein Mangan- oder Eisenion enthält.
10. Satz nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Polymerase eine DNA-Polymerase Typ 7, eine Klenow- oder Taq-Polymerase ist und daß das Kettenabbruchglied ein Dideoxynukleosidtriphosphat ist.
11. Satz nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß er eine Pyrophosphatase enthält.

Hierzu 11 Seiten Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft die DNA-Sequenzierung und insbesondere automatisierte Methoden zur DNA-Sequenzierung.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Die DNA-Sequenzierung wird in der Regel nach der Methode von Sanger u. a. (Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74: 5463, 1977) durchgeführt und beinhaltet die enzymatische Synthese von einzelnen Strängen der DNA aus einer einzelsträngigen DNA-Matrize und einem Starter. Unter Bezugnahme auf die Abb. 1 werden vier getrennte Synthesen ausgeführt. Es wird eine einzelsträngige Matrize zusammen mit einem Starter geschaffen, der an die Matrize hybridisiert wird. Der Starter wird unter Verwendung von DNA-Polymerase verlängert, und jede Reaktion wird an einer bestimmten Base (Guanin – G, Adenin – A, Thymin – T oder Zytosin – C) durch die Einbeziehung eines geeigneten Kettenabbruchmittels, beispielsweise ein Dideoxynukleotid, terminiert. Für diese Methode der Sequenzierung werden gegenwärtig u. a. folgende Enzyme eingesetzt: das große Fragment der *Escherichia coli* DNA-Polymerase I („Klenow“-Fragment), reverse Transkriptase, Taq-Polymerase und eine modifizierte Form der Bakteriophag T7-DNA-Polymerase.

Es wird weiter auf die Abb. 1 Bezug genommen. Die vier DNA-Synthesereaktionen führen zur Bildung von vier Reihen von DNA-Produkten, wobei jedes Produkt ein definiertes Ende und ein variables Ende hat. Das definierte Ende beginnt beim Starter-Molekül. Das variable Ende terminiert in einem für die Nukleotidbase (entweder G, A, T oder C) spezifischen Kettenabbruchglied, an welchem die Synthesereaktion terminiert ist. Die vier verschiedenen Reihen von Produkten werden jeweils auf der Grundlage ihres Molekulargewichts getrennt, in vier getrennten Bahnen in einem hochauflösenden Polyakrylamid-Gel, wobei jedes Band auf dem Gel sequentiell einem bestimmten Nukleotid in der DNA-Folge entspricht. Auf diese Weise kennzeichnen die relativen Positionen der Bänder die Positionen der einzelnen gegebenen Nukleotidbasen in der DNA-Folge. Im allgemeinen werden die DNA-Produkte markiert, so daß die erzeugten Bänder leicht festgestellt werden können. Wie in der Abb. 1 gezeigt wird, ist die Intensität der Bänder im allgemeinen nicht einheitlich, auch nicht innerhalb einer einzelnen Bahn, da die Bandintensität im direkten Zusammenhang mit der Gesamtzahl oder der Konzentration der DNA-Produkte mit demselben Molekulargewicht in einer bestimmten Bahn steht, und diese Zahl variiert von einem Produkt zum anderen, selbst wenn sie annähernd das gleiche Molekulargewicht haben und selbst wenn sie das gleiche Kettenabbruchglied enthalten.

Unter Anwendung der oben genannten Methodologie wurden automatisierte Systeme für die Analyse von DNA-Folgen entwickelt. Ein Instrument, das von EG & G entwickelt wurde, arbeitet mit einer ³²P-Markierung und einer DNA-Polymerase, und die resultierenden DNA-Produkte werden durch Gel-Elektrophorese getrennt. Toneguzzo u. a., 6 Biotechniques 460, 1988. Ein ³²P-Detektor am Boden des Gels tastet beim Durchgang durch den Boden des Gels auf Radioaktivität ab. Für jede zu sequenzierende Matrize sind vier Synthesereaktionen erforderlich, ebenso vier Bahnen in jedem Gel, wobei eine gesonderte Bahn für Produkte verwendet wird, die jeweils durch ein spezielles Kettenabbruchglied terminiert werden, wie das für das Beispiel in der Abb. 1 gezeigt wird.

Kanbara u. a., 6 Biotechnology 816, 1988, haben den ³²P-markierten Starter, der oben beschrieben wurde, durch einen fluoreszent-markierten Starter ersetzt. Die resultierenden fluoreszent-markierten Produkte werden am Boden des Gels mit einem Laser erregt, und die Fluoreszenz wird mit einem Leuchtschirmmonitor entdeckt. Auch dieses Verfahren verlangt vier Synthesereaktionen und vier Bahnen auf dem Gel für jede zu sequenzierende Matrize.

Applied Biosystems stellt ein Instrument her, in welchem vier verschiedene Starter verwendet werden, die jeweils mit einem anderen fluoreszent-Marker versehen sind. Smith u. a., 13 Nuc. Acid. Res. 2399, 1985, und 321 Nature 674, 1986.

Jeder Starter wird in einer gesonderten Reaktion eingesetzt, die eines von vier Dideoxynukleotiden enthält. Nachdem die vier Reaktionen ausgeführt worden sind, werden sie miteinander kombiniert und in einer einzelnen Bahn auf einem Gel durchgeführt. Ein Laser am Boden des Gels dient dazu, fluoreszente Produkte zu entdecken, nachdem sie durch das Gel durchdrungen oder elektrophoretisch worden sind. Dieses System verlangt vier gesonderte Hybridisierungsreaktionen und vier gesonderte Synthesereaktionen für jede Matrize, aber nur eine Bahn auf dem Gel. Die Computer-Analyse der Folge wird dadurch erleichtert, daß alle vier Bänder in einer einzigen Ebene liegen.

DuPont stellt ein Instrument zur Verfügung, bei dem an jedes von vier Dideoxynukleosidtriphosphaten eine andere fluoreszente Markierung angefügt wird. Prober u. a., 238 Science 336, 1987. Erforderlich sind nur ein Hybridisierungsschritt, eine Polymerasereaktion (die jede der vier markierten Dideoxynukleosidtriphosphate enthält) und eine Bahn im Sequenzierungs-Gel. Die vier verschiedenen Fluoreszenzmarkierungen in den DNA-Produkten werden bei der Elektrophorese durch das Gel getrennt festgestellt.

Englert u. a., US-PS 4707237 (1987) beschreibt ein Elektrophorese-Mehrkanalgerät mit einem Detektor, der im wesentlichen quer über die gesamte Breite des Gels angeordnet ist und die markierten DNA-Produkte abtasten kann, wenn sie in vier getrennten Bahnen sich am Detektor vorbei bewegen, das Gerät identifiziert dabei den Kanal oder die Bahn, in welcher sich die Probe befindet. Vorzugsweise wird mit radioisotopen Markierungen gearbeitet.

Den Verfahren, die gegenseitig für die Analyse von DNA-Folgen angewendet werden, ist die Notwendigkeit eigen, radioaktiv oder fluoreszent markierte DNA-Produkte durch ein Gel-Permeationsverfahren, beispielsweise die Polyakrylamid- oder eine andere Gel-Elektrophorese, zu trennen und dann deren Lage zueinander längs der Achse der Permeation oder Bewegung durch das Gel zu bestimmen. Die Genauigkeit dieses Verfahrens wird teilweise durch die Einheitlichkeit des Signals in Bändern bestimmt, die etwa über dieselbe Entfernung durch das Gel durchdrungen wurden. Differenzen oder Schwankungen in den Signalintensitäten zwischen dicht nebeneinanderliegenden Bändern verursachen verschiedene Probleme. Erstens verringern sie die Sensitivität der Methode, welche durch die Fähigkeit begrenzt wird, die Bänder festzustellen, die die schwächsten Signale enthalten. Zweitens verursachen sie Schwierigkeiten bei der Feststellung, ob ein Band mit einem schwachen Signal ein echtes Signal auf Grund der Einbeziehung eines Kettenabbruchgliedes oder ein Artefakt auf Grund einer Leerstelle in der DNA ist, wo die Polymerase dissoziiert ist. Drittens verringern sie die Genauigkeit bei der Bestimmung der DNA-Folge von dicht nebeneinanderliegenden Bändern, da das starke Signal des einen Bandes das schwache Signal des benachbarten maskieren kann.

Ziel der Erfindung

Durch die vorliegende Erfindung wird eine gegenüber dem Stand der Technik vereinfachte automatisierte Methode zur Sequenzierung eines Stranges einer DNA zur Verfügung gestellt.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine sensitivere und präzisere Methode zur DNA-Sequenzierung zur Verfügung zu stellen.

Erfindungsgemäß wird eine Methode zur Sequenzierung eines Stranges einer DNA bereitgestellt.

Alle vorstehend genannten Probleme werden durch die vorliegende Erfindung überwunden, bei welcher annähernd die gleichen Mengen an DNA-Produkten von ähnlichen Molekulargewichten in einer Sequenzierungsreaktion gebildet werden und damit benachbarte Bänder im Sequenzierungs-Gel, in derselben Bahn, von annähernd derselben Intensität sind.

Die Fähigkeit, nahegelegene Bänder von annähernd derselben Intensität zu erzeugen, ist nützlich, da sie es ermöglicht, die Ergebnisse jeder Sequenzierungsreaktion leichter und mit größerer Gewißheit zu lesen. Außerdem stellt die Bandintensität selbst eine spezielle Markierung für die Reihe der so gebildeten Bänder dar, weil die DNA-Produkte von einer Sequenzierungsreaktion mit einem bestimmten Kettenabbruchglied Bänder bilden, welche annähernd dieselbe Intensität wie die von nahegelegenen Bändern haben. Die Anzahl der DNA-Produkte mit annähernd dem gleichen Molekulargewicht, die durch ein gegebenes Kettenabbruchglied gebildet werden, variiert in Abhängigkeit von der Konzentration des Kettenabbruchgliedes. Verwendet man also eine unterschiedliche Konzentration für jedes der vier Kettenabbruchglieder für die Synthese, unterscheiden sich die DNA-Produkte, welche ein Kettenabbruchglied enthalten, von DNA-Produkten mit annähernd demselben Molekulargewicht, die ein anderes Kettenabbruchglied enthalten, dahingehend, daß sie sich in der Anzahl oder Menge unterscheiden; folglich können die Bänder von DNA-Produkten hinsichtlich ihres Kettenabbruchgliedes einfach anhand ihrer Intensität im Vergleich zu den Intensitäten der nahegelegenen Bänder identifiziert werden. Im Ergebnis dessen können zwei oder mehr Reihen von DNA-Produkten, bei denen jede Reihe ein anderes Kettenabbruchglied hat, der Gel-Permeation in einer einzigen Bahn unterzogen und anhand der Intensität jedes Bandes identifiziert, d. h., voneinander unterschieden, werden, verglichen mit der Intensität der nahegelegenen Bänder. Außerdem braucht die Synthese von DNA-Produkten mit unterschiedlichen Kettenabbruchgliedern nicht gesondert, in getrennten Behältnissen, ausgeführt zu werden, vielmehr können alle Reaktionen gleichzeitig in einem einzigen Reaktionsgefäß durchgeführt werden, und für alle Kettenabbruchglieder kann dieselbe Markierung, z. B. Radioisotop, fluoreszent usw., eingesetzt werden, wenn das gewünscht wird, statt einer unterschiedlichen Markierung für jedes der Glieder, was das Verfahren vereinfacht.

Es sollte jedoch beachtet werden, daß eine allmähliche Abnahme der Intensität aller Bänder des DNA-Produktes auftritt, wenn diese das Gel durchdringen, wobei die mit der kürzesten Entfernung eine geringere Intensität haben als die, welche die weiteste Strecke durchlaufen haben. Trotzdem bleibt die relative Intensität jedes Bandes im Vergleich zu den nahegelegenen Bändern an jeder Stelle längs der Permeationsachse insgesamt im wesentlichen die gleiche. Diese Beibehaltung der relativen Intensität über den Umfang der Permeation ermöglicht die vorliegende Erfindung.

Unter „nahegelegenen Bändern“ versteht man die, welche sich in derselben Ebene etwa 20 mm bis 30 mm vor oder hinter dem fraglichen Band befinden, gemessen längs der Permeationsachse. Im allgemeinen schließen die nahegelegenen Bänder DNA-Produkte ein, die sich von dem fraglichen in nicht mehr als 20 Basen (d. h. mit einer Masse, die sich um nicht mehr als etwa 6000 Dalton unterscheidet) unterscheiden.

Im allgemeinen sieht die Erfindung eine DNA-Polymerase für den Einsatz in DNA-Sequenzierungsreaktionen vor, welche in einer Sequenzierungsreaktion die Produktion von DNA-Produkten mit einer geringfügig unterschiedlichen Molekulargewichtszahl in annähernd gleichen Zahlen bewirkt. Wenn also solche DNA-Produkte in einer Gel-Matrix getrennt werden, bilden sie Bänder, wobei nahegelegene Bänder annähernd dieselbe Intensität haben. Ohne sich auf eine bestimmte Theorie festzulegen, betrachten die Autoren diese Einheitlichkeit in der Intensität als Folge davon, daß die Polymerase nicht zwischen normalen Nukleosidtriphosphaten und Kettenabbruchgliedern unterscheidet, beispielsweise Dideoxynukleosidtriphosphaten.

Nach einem ersten Aspekt sieht die Erfindung eine Methode zur Sequenzierung eines Stranges einer DNA vor, einschließlich der Schritte: Bereitstellen des DNA-Stranges; Hybridisieren des Stranges mit einem Starter, der an den Strang hybridisieren kann, um ein hybridisiertes Gemisch zu ergeben; Inkubieren des hybridisierten Gemisches mit einem Deoxyribonukleosidtriphosphat, einer DNA-Polymerase und einem ersten Kettenabbruchglied unter Bedingungen, unter denen die Polymerase eine Verlängerung des Starters bewirkt, um eine erste Reihe von ersten DNA-Produkten zu bilden, die sich in der Länge des verlängerten Starters unterscheiden, wobei jedes erste DNA-Produkt am verlängerten Ende ein Kettenabbruchglied hat; dabei ist die Anzahl jedes ersten DNA-Produktes bei im wesentlichen allen DNA-Produkten, die sich in der Länge um 1 bis 20 Basen unterscheiden, annähernd gleich. Vorzugsweise schließt die Methode außerdem die folgenden Schritte ein: Trennen der ersten DNA-Produkte durch Gel-Permeation nach dem Molekulargewicht, um eine erste Reihe von Bändern zu bilden, wobei jedes Band der ersten Reihe ein erstes DNA-Produkt mit einem gegebenen Molekulargewicht darstellt, worin die Intensität jedes nahegelegenen Bandes der ersten Reihe für im wesentlichen alle Bänder der ersten Reihe annähernd gleich ist; und Bestimmung der Position jedes ersten Bandes.

Unter „im wesentlichen alle“ versteht man, daß wenigstens 9 von 10 (oder 19 von 20) nahegelegenen Bändern annähernd dieselbe Intensität haben. Das heißt, nur gelegentliche Bänder haben eine andere Intensität. Diese andere Intensität resultiert aus Artefakten. Ein Beispiel für einen solchen Artefakt ist die Kompression von zwei oder mehr DNA-Produkten von unterschiedlichem Molekulargewicht innerhalb eines Bandes. Das Ergebnis zwei solcher Kompressionen wird in der Abb. 2 gezeigt, in welcher die Artefakt-Bänder mit einem Sternchen gekennzeichnet sind. Unter „etwa dasselbe“ versteht man, daß die Bandintensität höchstens um das Zweifache, vorzugsweise um das 1,2fache variiert. Unter „Gel-Permeation“ versteht man die Einbeziehung vorhandener Polyakrylamid-Gele, wie sie für die DNA-Sequenzierung verwendet werden, und aller anderen Mechanismen zur Trennung von DNA-Produkten nach ihrem Molekulargewicht.

Bei einem Ausführungsbeispiel wird die Produktion von nahegelegenen Bändern von annähernd derselben Intensität durch Inkubation einer DNA-Polymerase in einer Lösung, welche Mangan- oder Eisenionen enthält, erreicht.

Bei einem bevorzugten Ausführungsbeispiel schließt die Methode außerdem die Schritte ein, in dem hybridisierten Gemisch ein zweites Kettenabbruchglied bereitzustellen mit einer Konzentration, die sich von der des ersten Kettenabbruchgliedes unterscheidet, worin die DNA-Polymerase die Produktion einer zweiten Reihe von zweiten DNA-Produkten bewirkt, wobei jedes zweite DNA-Produkt am verlängerten Ende das zweite Kettenabbruchglied, wobei die Anzahl jedes zweiten DNA-Produktes für im wesentlichen alle DNA-Produkte, die sich in der Länge von 1 bis 20 Basen unterscheiden, annähernd gleich ist, worin die Anzahl im wesentlichen aller ersten und aller zweiten DNA-Produkte, die sich in der Länge um 1 bis 20 Basen unterscheiden, distinktiv verschieden ist. Am günstigsten ist es, wenn die zweite Reihe von zweiten DNA-Produkten eine zweite Reihe von Bändern bildet, wenn durch Gel-Permeation die Trennung nach dem Molekulargewicht erfolgt, worin die Intensität von im wesentlichen allen nahegelegenen Bändern der zweiten Reihe annähernd gleich ist, während die Intensität von im wesentlichen allen Bändern der ersten Reihe distinktiv und unterscheidbar verschieden ist von der Intensität jedes nahegelegenen Bandes der zweiten Reihe, und die Methode schließt außerdem den Schritt der Bestimmung der Position und der Intensität jedes Bandes ein, wobei die Intensität für eine bestimmte Bandreihe repräsentativ ist.

Unter „distinktiv verschieden“ versteht man, daß ein Band einer Reihe von einem nahegelegenen Band (d.h., einem Band mit einer Länge, die um 1 bis 20 Basen verschieden ist) in einer anderen Reihe unterschieden werden kann. Das heißt, eine Maschine, welche die Anzahl der DNA-Produkte mit einem speziellen Molekulargewicht mißt, kann die beiden Reihen von DNA-Produkten voneinander unterscheiden.

Bei einem anderen bevorzugten Ausführungsbeispiel beinhaltet die Methode die Bereitstellung zweier anderer Kettenabbruchglieder, wobei die Polymerase die Produktion einer zweiten und dritten Reihe von zweiten und dritten DNA-Produkten bewirkt, wobei die Anzahl der jeweils zweiten und dritten DNA-Produkte für im wesentlichen alle DNA-Produkte, die sich in der Länge um 1 bis 20 Basen unterscheiden, annähernd die gleiche ist, worin die Anzahl im wesentlichen aller ersten, aller zweiten und aller dritten DNA-Produkte, die sich in der Länge um 1 bis 20 Basen unterscheiden, distinktiv verschieden ist. Am vorteilhaftesten ist es, wenn jede zweite und jede dritte Reihe von zweiten und dritten DNA-Produkten eine unterschiedliche Reihe von zweiten und dritten Bändern bildet, wenn durch Gel-Permeation die Trennung nach dem Molekulargewicht erfolgt, worin die Intensität im wesentlichen aller nahegelegenen Bänder der zweiten Reihe annähernd gleich ist, die Intensität im wesentlichen aller nahegelegenen Bänder der dritten Reihe annähernd gleich ist und worin die Intensität im wesentlichen aller nahegelegenen Bänder von unterschiedlichen Reihen distinktiv verschieden ist; und die Methode beinhaltet außerdem die Schritte der Bestimmung der Position und der Intensität jedes Bandes, wobei die Intensität für eine bestimmte Bandreihe repräsentativ ist.

Nach einem weiteren bevorzugten Ausführungsbeispiel beinhaltet die Methode die Bereitstellung von vier verschiedenen Deoxyribonukleosidtriphosphaten und vier verschiedenen Kettenabbruchgliedern in dem hybridisierten Gemisch, worin die DNA-Polymerase die Produktion von zweiten, dritten und vierten Reihen von zweiten, dritten und vierten DNA-Produkten bewirkt, wobei die Anzahl der jeweils zweiten, dritten und vierten DNA-Produkte für im wesentlichen alle DNA-Produkte, die sich in der Länge zwischen 1 und 20 Basen unterscheiden, annähernd gleich ist, worin die Anzahl im wesentlichen aller ersten, aller zweiten, aller dritten und aller vierten DNA-Produkte, die sich in der Länge zwischen 1 und 20 Basen unterscheiden, distinktiv verschieden ist. Am vorteilhaftesten ist es, wenn jede zweite, dritte und vierte Reihe von zweiten, dritten und vierten Bändern bei der Trennung durch Gel-Permeation nach dem Molekulargewicht bilden, worin die Intensität im wesentlichen aller nahegelegenen Bänder der zweiten Reihe oder im wesentlichen aller nahegelegenen Bänder der dritten Reihe oder im wesentlichen aller nahegelegenen Bänder der vierten Reihe annähernd gleich ist und worin die Intensität im wesentlichen aller nahegelegenen Bänder in einer anderen Reihe distinktiv verschieden ist; vorteilhaft schließt die Methode außerdem die Schritte der Bestimmung der Position und der Intensität jedes Bandes ein, wobei die Intensität repräsentativ für eine bestimmte Bandreihe ist.

Bei anderen bevorzugten Ausführungsbeispielen wird das hybridisierte Gemisch mit einem Mangan- oder Eisenion versehen, wobei das Ion bewirkt, daß die Polymerase nichtunterscheidend für ein Kettenabbruchglied ist; sind die DNA-Produkte nach dem Molekulargewicht in weniger als vier Bahnen eines Gels getrennt; wird die Intensität jedes Bandes durch ein Gel-Lesegerät gemessen; wird die DNA-Polymerase aus einer DNA-Polymerase des Typs T7, dem großen Fragment der E. coli-DNA-Polymerase I und der Taq-Polymerase ausgewählt und ist das Kettenabbruchglied ein Dideoxynukleosidtriphosphat.

Nach verwandten Gesichtspunkten sieht die Erfindung eine Methode zur Sequenzierung eines DNA-Stranges vor, welche die Schritte einschließt von entweder (a) der Bereitstellung einer DNA-Polymerase und der Inkubation der Polymerase und des DNA-Strangs in einer Lösung mit einem Mangan- oder Eisenion und einem Kettenabbruchglied oder (b) der Bereitstellung einer DNA-Polymerase, die im wesentlichen nichtunterscheidend für ein Kettenabbruchglied ist.

Nach einem anderen verwandten Gesichtspunkt sieht die Erfindung eine Methode zur Produktion einer DNA-Polymerase zur DNA-Sequenzierung vor, welche den Schritt des Mischens der DNA-Polymerase in einer Lösung einschließt, in der sich ein Mangan- oder Eisenion befindet.

Nach einem weiteren Aspekt sieht die Erfindung eine Lösung mit einer DNA-Polymerase des Typs T7 oder einer Taq-Polymerase und einem Mangan- oder Eisenion vor. Vorzugsweise hat das Ion eine Konzentration von 0,005 bis 100 Millimol.

Nach einem anderen Gesichtspunkt sieht die Erfindung einen Satz zur DNA-Sequenzierung mit einer DNA-Polymerase, einem Kettenabbruch und einem Mangan- oder Eisenion vor.

Bei bevorzugten Ausführungsbeispielen ist eine DNA-Polymerase des Typ T7, das große Fragment von E. coli-DNA-Polymerase I oder Taq-Polymerase; das Kettenabbruchglied ist ein Dideoxynukleotid, und zum Satz gehört außerdem ein Deoxyribonukleosidtriphosphat.

Nach einem weiteren Gesichtspunkt sieht die Erfindung eine Methode zur automatisierten Sequenzierung von DNA vor, einschließlich der Bereitstellung einer Polymerase, die im wesentlichen nichtunterscheidend für ein Kettenabbruchglied ist und die Produktion einer Reihe von DNA-Produkten bewirkt, die sich im Molekulargewicht unterscheiden und mit dem gleichen Kettenabbruchglied enden, worin die DNA-Produkte im wesentlichen alle nahegelegenen Bänder von annähernd derselben Intensität produzieren.

Unter im wesentlichen nichtunterscheidend versteht man, daß die Kettenabbruchglieder auf der Länge der DNA gleichmäßig einbezogen werden, ungeachtet der DNA-Folge. Unter annähernd dieselbe versteht man, daß sich die Intensität höchstens um das Zwei- bis Dreifache unterscheidet.

Nach einem anderen Gesichtspunkt sieht die Erfindung ein Gerät für die automatisierte DNA-Sequenzierung vor, das einen Reaktor für die Bereitstellung von wenigstens zwei Reihen von DNA-Produkten hat, die aus einem einzigen Starter und einem DNA-Strang gebildet werden, wobei sich die einzelnen DNA-Produkte einer Reihe im Molekulargewicht unterscheiden und an einem Ende ein Kettenabbruchglied haben; eine Trennvorrichtung zur Trennung der DNA-Produkte, um eine Reihe von Bändern zu bilden, wobei die Intensität im wesentlichen aller nahegelegenen Bänder in einer Reihe annähernd dieselbe ist und die Intensität von im wesentlichen allen nahegelegenen Bändern in einer anderen Reihe verschieden ist; ein Bandleselement zur Bestimmung der Position und Intensität jedes Bandes nach der Trennung und ein Rechenelement zur Bestimmung der DNA-Folge des DNA-Strangs direkt aus der Position und Intensität der Bänder

Bei bevorzugtem Ausführungsbeispiel enthält der Reaktor ein Mangan- oder Eisenion und eine DNA-Polymerase Typ T7.

Nach einem weiteren Gesichtspunkt sieht die Erfindung eine Lösung oder einen Satz mit einer Pyrophosphatase, einer DNA-Polymerase und einem Kettenabbruchglied oder dITP und eine Methode zur DNA-Sequenzierung, einschließlich der Bereitstellung der Pyrophosphatase in der Sequenzierungsreaktion, vor. Durch die Einbeziehung der Pyrophosphatase in eine Sequenzierungsreaktion werden der Pyrophosphatasepegel verringert und die Einheitlichkeit der Bandintensität von nahegelegenen Bändern verbessert.

Bei jedem der oben genannten Gesichtspunkte kann das Mangan- oder Eisenion bei Vorhandensein eines Chelats, wie Zitrat oder Isozitat, bereitgestellt werden. Es wird angenommen, daß diese Chelate einen besser regulierten Pegel des gewünschten Ions in einer DNA-Sequenzierungsreaktion ergeben.

Nach einem abschließenden Gesichtspunkt sieht die Erfindung eine T7-DNA-Polymerase Δ Lys 118-Arg 145 und eine diese Polymerase codierende DNA vor. Diese Polymerase hat keine nachweisbare Exonukleaseaktivität.

Es wurden Bedingungen ermittelt, unter denen DNA-Polymerasen modifiziert werden können, um ihre Fähigkeit, ein Kettenabbruchglied am Erweiterungsende einer Starter-DNA bei Vorhandensein einer DNA-Matrize einzubeziehen, zu ändern. Diese Fähigkeit ermöglicht es, DNA-Sequenzierung bei niedrigeren Konzentrationen von Kettenabbruchgliedern durchzuführen, wodurch die Kosten der DNA-Sequenzierungsreaktion erheblich gesenkt werden. Außerdem wurde festgestellt, daß DNA-Polymerasen mit dieser Fähigkeit in einem Sequenzierungsgel nahegelegene Bänder erzeugen, die von annähernd einheitlicher Intensität sind. Das heißt, die Polymerase unterscheidet nicht mehr im größeren Ausmaß zwischen der Einbeziehung von Kettenabbruchgliedern und normalen Deoxynukleosidtriphosphaten. Es wurde nachgewiesen, daß auf diese Weise wenigstens drei Polymerasen modifiziert werden können, so eine modifizierte T7-DNA-Polymerase, das große Fragment von E. coli-DNA-Polymerase I und Taq-Polymerase. Andere Polymerasen mit Homologie zu diesen Polymerasen sind in der Erfindung auch einsatzfähig.

Ein weiterer Vorteil der Erfindung besteht darin, daß die Konzentration jedes gegebenen Kettenabbruchgliedes, die in einer Sequenzierungsreaktion eingesetzt werden muß, leicht berechnet werden kann, da die Bandintensität im direkten Zusammenhang mit der Konzentration jedes Kettenabbruchgliedes steht und für jedes dieser Glieder gleich ist.

Die modifizierten Polymerasen dieser Erfindung sind besonders geeignet für DNA-Sequenzierungsreaktionen, da nur eine einzige Sequenzierungsreaktion, welche alle vier Kettenabbruchglieder in vier verschiedenen Konzentrationen enthält, notwendig ist. Folglich kann mit weniger als vier verschiedenen Sequenzierungsreaktionen für jede spezielle DNA-Matrize gearbeitet werden.

Weitere Merkmale und Vorteile der Erfindung werden aus der folgenden Beschreibung von bevorzugten Ausführungsbeispielen ersichtlich.

Ausführungsbeispiele

Die Erfindung wird anschließend durch die Zeichnungen, in denen

Abb. 1 eine schematische Darstellung der DNA-Sequenzierung nach der Methode von Sanger u. a., siehe oben, ist; Abb. 2 bis Abb. 7 grafische Darstellungen der relativen Bandintensitäten von sechs verschiedenen Sequenzierungs-Gels sind, die durch ein DNA-Sequenzierungssystem von Applied Biosystems, Modell 370A, abgetastet wurden, jede von einer einzelnen Gel-Bahn, die ein Sequenzierungsreaktionsgemisch enthält, das aus der Anwendung einer genetisch modifizierten T7-DNA-Polymerase bei Vorhandensein von verschiedenen Gemischen von Magnesium oder Mangan und verschiedenen Dideoxynukleosiden resultiert.

In jeder dieser Abbildungen war die sequenzierte DNA mGP1-2 (die RNA-Polymerase T7 codiert, Tabor u. a., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 84:4767, 1987), und der Starter war der fam-Starter von Applied Biosystems. In jedem Fall wird der unbarbeitete (Roh-) Ausgang für den fam-Starter gezeigt. Anfang und Ende des Ausgangs werden jeweils angegeben. Außerdem werden die Positionen der Folgen im Verhältnis zur entsprechenden Position bei der T7-DNA des Wildtyps gezeigt. (Dunn u. a., J. Mol. Biol. 8:452, 1983.) Die in den einzelnen Graphen mit einem Sternchen gekennzeichneten Punkte stellen Kompressionsbereiche dar, an denen wenigstens zwei DNA-Produkte mit unterschiedlichem Molekulargewicht in derselben Position im Gel vorhanden sind. Kompressionen werden allgemein von Tabor u. a., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 84:4767, 1987, beschrieben.

Abb. 8 ist ein Graph, der die optimale Konzentration von Magnesium und Mangan für die DNA-Polymeraseaktivität bei einer genetisch modifizierten T7-DNA-Polymerase bei Vorhandensein und Fehlen von 0,4 mM Isozitat zeigt.

Abb. 9 ist ein Graph, der die Wirkung von unterschiedlichen Konzentrationen von Isozitat bei Vorhandensein von 10 mM Magnesium oder Mangan auf die DNA-Polymeraseaktivität bei einer genetisch modifizierten T7-DNA-Polymerase zeigt.

Abb. 10 ist eine schematische Karte von pGP5-8, einem Plasmid, welches für eine genetisch modifizierte T7-DNA-Polymerase codiert, der die Aminosäuren Lys 118 bis einschließlich Arg 145 fehlen, der die Exonukleaseaktivität fehlt.

Abb. 11 ist eine schematische Darstellung eines automatischen Sequenzierungsgeräts nach der Erfindung.

DNA-Polymerase

Zu den DNA-Polymerasen, die für die vorliegende Erfindung geeignet sind, gehören die, welche zu einer Klasse von homologen Polymerasen, einschließlich DNA-Polymerasen des Typs T7 (wie T7, T3, Φ 1, Φ II, H, W31, gh-1, Y, A 1122 oder SP6), des großen Fragments von E. coli-DNA-Polymerase I und Taq-Polymerase, gehören. Unter homologen Polymerasen versteht man ein

Enzym, das anhand von Dideoxynukleosidtriphosphaten im Vergleich zu Deoxynukleosidtriphosphaten bei Vorhandensein von Magnesium unterscheidet; wird jedoch Magnesium durch Mangan ersetzt, wird die Unterscheidung anhand von Dideoxynukleosidtriphosphaten vermindert. Diese Polymerasen werden in einer DNA-Sequenzierungsreaktion unter Bedingungen eingesetzt, in denen sie nahegelegene Bänder von annähernd einheitlicher Intensität (mit einer etwa 1,5- bis 2,0fachen Schwankung in der Intensität) produzieren, wenn die DNA-Produkte der Sequenzierungsreaktion in einem Gel laufen. Unter nahegelegenen Bändern versteht man die Einbeziehung von Bändern, die DNA-Produkte mit einem Molekulargewicht darstellen, das sich bis zu 6000, d. h., 20 Basen, unterscheidet. Der tatsächliche Wert dieser Intensität verringert sich über die Länge des Gels, wie unten beschrieben und in den Abbildungen gezeigt wird. Die Bandintensität widerspiegelt die Anzahl der DNA-Produkte in einem bestimmten Band. Markierungen, wie Fluorophore oder Radioisotope, werden verwendet, um ein leicht feststellbares Band von Intensität, das die Anzahl dieser DNA-Produkte widerspiegelt, zu erzeugen. So haben bei dieser Erfindung nahegelegene Bänder, die von einer Sequenzierungsreaktion mit einem Kettenabbruchglied abgeleitet wurden, annähernd dieselbe Zahl von DNA-Produkten und damit ein einheitliches Intensitätsband. Die Sequenzierungsbedingungen beinhalten die Inkubation der Polymerase bei Vorhandensein von speziellen zwei- oder dreiwertigen Kationen wie Mangan- (II und III), Eisen(II)- und Eisen(III)-Ionen; zu den einwertigen und zweiwertigen Kationen, die keine feststellbare Wirkung haben oder schädlich für die DNA-Synthese sind, gehören K, Na, Ba, Be, Ca, Ce, Cr, Co, Cu, Ni, Si und Zn. Das Anion ist unwichtig, beispielsweise sind Chlorid, Azetat und Sulfat geeignet. Unter diesen Bedingungen wird der Bedarf an Kettenabbruchgliedern, wie Dideoxynukleosiden, für Enzyme wie das große Fragment von *E. coli*-DNA-Polymerase I und Taq-Polymerase um fast das 1000fache und für eine modifizierte T7-DNA-Polymerase um etwa das 10fache verringert. In dieser Lösung kann auch ein Chelator vorhanden sein, um die Regulierung der Konzentration der verfügbaren zweiwertigen Metallionen zu unterstützen. Beispielsweise können Zitrat oder Isotritat eingesetzt werden. Es wird angenommen, daß diese Chelate den Pegel von beispielsweise freien Manganionen bei einer Konzentration zwischen 10 und 100 µM über einem breiten Bereich von Mangankonzentrationen halten. Das heißt, der Chelator wirkt als Puffer.

Die DNA-Polymerasen nach der Erfindung unterscheiden nicht signifikant zwischen Dideoxynukleosidanalogen und Deoxynukleosiden auf der Länge der DNA-Matrize. Das heißt, bei Vorhandensein von Mangan oder Eisen sind diese Polymerasen nicht in der Lage, zwischen einem Nukleotid, das eine 3'-Hydroxylgruppe hat, und einem ohne eine solche Gruppe (d. h., mit zwei Wasserstoffatomen an der 3'-Position der Ribose) zu unterscheiden. Diese Polymerasen unterscheiden jedoch Modifikationen an anderen Positionen an den Nukleosiden, auch wenn Mangan oder Eisen vorhanden sind. Beispielsweise unterscheiden die Polymerasen einige Dideoxynukleosidanaloge, an die fluoreszente Gruppen gebunden sind, von Deoxynukleosiden. Die Polymerase unterscheidet jedoch nicht im erheblichen Ausmaß bei benachbarten oder nahegelegenen Nukleotiden auf der Grundlage des Vorhandenseins oder Fehlens der Modifikation zum Dideoxynukleosid. Während sie also stark gegenüber diesen Analogon unterscheiden, die höhere Konzentrationen bei einer DNA-Sequenzierungsreaktion im Vergleich zu den unmodifizierten Dideoxynukleosiden brauchen, bleibt die Intensität der nahegelegenen Bänder einheitlich. Beispielsweise besteht eine 10fache Unterscheidung von Dideoxy-ITP (ddITP) gegenüber Dideoxy-GTP (ddGTP) bei Vorhandensein von Mn. Alle in der Sequenzierungsreaktion gebildeten Bänder sind jedoch bei ddITP von gleicher Intensität, da über die Länge der DNA-Matrize keine Differentialunterscheidung erfolgt.

Folglich gewährleisten die Polymerasen nach der Erfindung einen einheitlichen Wirkungsgrad bei der Einbeziehung von Kettenabbruchgliedern, selbst wenn sie im Verhältnis zur Gesamteinbeziehung unterscheiden.

Zu den Kettenabbruchgliedern, die bei der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden können, gehören Dideoxynukleoside mit einer 2',3'-Dideoxystruktur. Andere für die Erfindung geeignete Glieder sind die, welche speziell eine DNA-Sequenzierungsreaktion an einer bestimmten Base beenden und durch die Polymerase nach den oben genannten Bedingungen nicht unterschieden werden.

Um festzustellen, ob eine bestimmte DNA-Polymerase in Kombination mit einem bestimmten Kettenabbruchglied oder einer anderen Komponente des Sequenzierungsreaktionsgemischs für diese Erfindung geeignet ist, wird eine Sequenzierungsstandardreaktion durchgeführt, wie sie unten beschrieben und in den Zeichnungen gezeigt wird, und es werden das Ausmaß der Bandbildung und die Einheitlichkeit von nahegelegenen Bändern in einem Sequenzierungs-Gel überprüft. Wenn die Polymerasereaktion den Starter nicht um wenigstens 20 Basen verlängert, ist sie unter den angewendeten Bedingungen nicht geeignet. Die Einheitlichkeit von benachbarten Bändern innerhalb des zweifachen oder eines kleineren Bereichs ist bei dieser Erfindung geeignet, vorzugsweise die Einheitlichkeit innerhalb eines 1,0- bis 1,5fachen Bereichs. Ebenso wird die Bestimmung der optimalen Kationenkonzentration oder anderer, potentiell für die Erfindung geeigneter Kationen durch die Anwendung dieser Sequenzierungsreaktion unter verschiedenen Bedingungen bestimmt. Beispielsweise werden Kationen in den Bereichen von 0,005 bis 100 µM getestet. Nachstehend wird ein Beispiel für ein solches Experiment gegeben:

Die DNA-Synthese wird gemessen unter Verwendung eines 17mer Starters der Folge 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3' (New England Biolabs, Katalog-Nr. 1211), der am 5'-Ende mit ³²P markiert wurde und an eine einsträngige mGP 1-2-DNA hybridisiert wurde. Tabor u. a., Proc. Nat. Acad. Sci. USA **84**: 4767 (1987) und Tabor u. a., J. Biol. Chem. **262**: 16212 (1987). Jede andere Matrize ist in dieser Reaktion gleichermaßen geeignet. Diese Starter-Matrize wird in einer Reaktion verwendet, die eine DNA-Polymerase bei Vorhandensein eines Bereichs von Konzentrationen eines Metallions enthält. Reaktionen werden bei Vorhandensein einer gegebenen Konzentration mit allen 4 Deoxynukleotiden (dNTPS, 20–200 µM) und über einen Bereich von Konzentrationen von einem Dideoxynukleotid (ddNTP in diesem Beispiel, ddGTP von 10–500 µM) durchgeführt. Die DNA-Produkte werden dann durch Polyakrylamid-Gel-Elektrophorese analysiert, wobei die DNA-Synthese als Erweiterung der starterproduzierenden Bänder festgestellt wird, die Erweiterung mit unterschiedlichem Molekulargewicht im Gel darstellen.

Bei einem speziellen Beispiel enthielt jedes Reaktionsgemisch (10 µl) 0,1 µg ³²P-Starter-Matrize, 40 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, 5 µM Dithiothreitol (DTT), 5 µM bis 20 µM Metallion, 10 bis 500 µM dNTP, 1 bis 500 µM ddNTP und 2 Einheiten einer DNA-Polymerase. Die Inkubation wurde 10 Minuten lang bei 37°C ausgeführt. Die Reaktion wurde durch den Zusatz von 10 µl 90%igem Formamid, 50 µM EDTA und 0,1% Bromophenol-Blau gestoppt.

Die resultierenden Proben wurden bei 75°C zwei Minuten lang unmittelbar vor der Aufbringung auf das Polyakrylamid-Gel (8% Akrylamid, 0,3% Bisakrylamid) in 7M Harnstoff, 100 µM Tris-Borat, pH-Wert 8,9, erhitzt. Die Elektrophorese wurde 2 Stunden lang bei 2000V durchgeführt. Das Gel wurde in 50% Methanol, 10% Essigsäure 30 min fixiert, getrocknet und zur Autoradiografie exponiert. Die Bandintensität in jeder Bahn des resultierenden Films wurde durch Abtasten jeder Bahn mit einem Densitometer bestimmt. Verwendet wurde ein Doppelstrahlaufzeichnungsinstrument, Modell MkIIIC (Joyce, Loeb & Co., Gateshead on Tyne,

II, England). Geeignet ist auch jedes andere für die Abtastung von Gelen geeignete Densitometerinstrument. Als Alternative dazu kann die Einheitlichkeit der resultierenden Bänder durch Abtasten der DNA-Produkte, wenn sie innerhalb des Gels elektrophoretisiert werden, bestimmt werden.

Die Fähigkeit, ein gegebenes ddNTP im Vergleich zum entsprechenden dNTP für jedes Enzym einzubeziehen, wird als Verhältnis von ddNTP zu dNTP gemessen, das notwendig ist, um die DNA-Synthese, die in einem festgelegten Bereich endet, als Bänder von nicht mehr als einem festgelegten Molekulargewicht erzeugend festzustellen. Das heißt, es geht um die Bänder, die im Reaktionsende innerhalb eines festgelegten Bereichs im Sequenzierungs-Gel produziert werden. Wenn also ein Enzym 1000fach mehr anhand eines gegebenen ddNTP als ein anderes Enzym unterscheidet, ist ein 1000fach höheres Verhältnis von ddNTP zu dNTP notwendig, um Bänder zu erhalten, die an den entsprechenden Stellen im selben Bereich des Gels enden.

Mangan (Mn)

Es folgt eine Reihe von Beispielen für die Anwendung einer modifizierten T7-DNA-Polymerase oder des großen Fragments von E. coli-DNA-Polymerase I in DNA-Sequenzierungsreaktionen, wenn Mn im Sequenzierungspuffer vorhanden ist. Diese Beispiele schränken die Erfindung nicht ein und werden nur gegeben, um den Fachleuten auf diesem Gebiet Richtlinien für die Anwendung der DNA-Polymerasen dieser Erfindung zu geben. Wie oben beschrieben wurde, können Fachleute leicht andere Bedingungen bestimmen, unter denen DNA-Polymerasen nach der Erfindung produziert werden können, welche die hier hinsichtlich der Einheitlichkeit der Einbeziehung des Kettenabbruchgliedes und des Einsatzes in einer Sequenzierungsreaktion beschriebenen Eigenschaften erreichen.

Die spezielle, in den folgenden Beispielen verwendete modifizierte T7-DNA-Polymerase war genetisch modifiziert, so daß sie keine nachweisbare Exonukleaseaktivität hatte. Diese genetisch modifizierte DNA-Polymerase wird als ΔLys 118-Arg 145 (Δ28) bezeichnet, da der Aminosäurebereich von Lys 118 bis einschließlich Arg 145 in der T7-DNA-Polymerase gelöscht wird. Das Gen, welches diese Polymerase codiert, wurde in einem Plasmid pGP5-8 als eine Variante des Plasmids pGP5-5 konstruiert, das von Tabor u. a., US-PS 4795699, beschrieben wird.

Es wird auf die Abb. 10 Bezug genommen. Das Plasmid pGP5-8 beinhaltet pACYC 177, an den Stellen BamHI und HincII herausgeschnitten, T7-DNA von den Basen 5667 bis 6177, welche Ø1.1 A und Ø1.1 B enthält, und T7-DNA-Basen 14306 bis 16869, welche Gen 5 enthalten mit den in der Abb. 5 gezeigten Modifikationen. pGP5-8 wurde durch Synthetisierung von zuerst dem 34mer konstruiert, 5'CCGGCAAGTTGCCCGGGATGCTCGAGGAGCAGGG 3'. Dieses Oligonucleotid wurde als Starter für die DNA-Synthese an der einzelsträngigen DNA von M13 mGP5-2 verwendet, die ein Insert enthält, welches T7-Gen 5 kodiert, und wird von Tabor, u. a., ebenda, beschrieben. Die DNA-Synthese und die Mutantselektion wurden so durchgeführt, wie das von Tabor u. a., ebenda, beschrieben worden ist. Nach der Konstruktion der gewünschten Mutation in mGP5-2 wurde der entsprechende Bereich von T7-Gen 5, welcher die 84 bp-Deletion enthält, in pGP5-5 eingefügt durch Isolierung eines Fragmentes EcoRI und HpaI, der T7-DNA von den Positionen 14306 bis 15610 enthält, einschließlich des Bereichs mit der 84-bp-Deletion, und in den vergleichbaren Bereich von pGP5-5 ligiert. Anhand des Vorhandenseins der Stellen SmaI und XhoI, die durch die Mutagenese geschaffen werden, und der DNA-Sequenzanalyse des Bereichs, der die 84 bp-Deletion enthält, wurde bestätigt, daß das Derivat pGP5-8 die Deletion aufweist. Plasmid pGP5-8 wurde in den Stamm K38/pTrx-3 transformiert, um den Stamm K38/pTrx-3/pGP5-8 zu schaffen. Die Induktion von K38/pTrx-3/pGP5-8 und die Reinigung der genetisch geänderten T7-DNA-Polymerase wurden unter Anwendung des Verfahrens ausgeführt, das für den analogen Stamm K38/pTrx-3/pGP5-5 bei Tabor u. a., ebenda, beschrieben wird. Da diese Polymerase keine nachweisbare Exonukleaseaktivität hat, ist eine chemische Modifikation, wie sie von Tabor u. a., ebenda, beschrieben wird, vor der Verwendung in einer DNA-Sequenzierungsreaktion nicht notwendig. Die genetisch modifizierte T7-DNA-Polymerase, die in den untenstehenden Beispielen verwendet wurde, war ein Präparat mit einer Aktivität von 1000 Einheiten/ml.

Beispiel 1:

DNA-Sequenzierungsreaktion unter Verwendung von Mangan

Für die Sequenzierung von DNA bei Vorhandensein von Mn wird die Standardmethodologie für DNA-Sequenzierungsreaktionen angewendet. Für T7-DNA-Polymerase werden die allgemeinen Sequenzierungsschritte ausführlich von Tabor u. a., ebenda, beschrieben. Kurz formuliert, werden folgende Schritte und Bedingungen ausgeführt und angewendet:

A. Hybridisierungsreaktion

Bei der Hybridisierungsreaktion wird folgende Lösung hergestellt:

Zu sequenzierende DNA (z. B. mGP1-2-DNA) in 10mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, 0,1mM EDTA, 2µg/7µl	7µl
5X SeqBuf (200mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, 5mM MnCl ₂ , 250mM NaCl)	2µl
Starter (New England Biolabs - 17mer, Kat.-Nr. 1210 0,5pm/µl)	1µl
	<u>10µl</u>

Diese Lösung wurde 2 min bei 65°C erhitzt und langsam auf Zimmertemperatur abgekühlt.

B. Markierungsreaktion

Bei der Markierungsreaktion wurde folgende Lösung hergestellt:

Hybridisierungsgemisch	10µl
Dithiothreitol 0,1m	1µl
[³⁵ S]dATP, New England Nuclear NEG-034H	1µl
dTTP, dCTP, dGTP, je 1,5µM	2µl
Genetisch modifizierte T7-DNA-Polymerase, 1 Einheit/µl (ΔLys 118-Arg 145, wie oben beschrieben)	2µl
	<u>16µl</u>

Diese wurde bei Zimmertemperatur 5 min inkubiert.

C. Terminationsreaktion

In Terminationsreaktionen wurden folgendermaßen vier Reaktionsgemische hergestellt:

	G	A	T	C
5X SeqBuf	0,6µl	0,6µl	0,6µl	0,6µl
4dNTP (3mM)	0,3µl	0,3µl	0,3µl	0,3µl
H ₂ O	1,9µl	1,9µl	1,9µl	1,9µl
ddGTP (0,2mM) (dd = Dideoxy)	0,2µl			
ddATP (0,2mM)		0,2µl		
ddTTP (0,2mM)			0,2µl	
ddCTP (0,2mM)				0,2µl
	3µl	3µl	3µl	3µl

Die Terminationsgemische wurden bei 37°C 2 min inkubiert, dann wurden jedem Terminationsgemisch 3µl- Aliquote des fertigen Markierungsreaktionsgemischs zugesetzt. Die resultierende Lösung wurde bei 37°C 5 min inkubiert.

Die Terminationsreaktionen wurden mit 5µl 90% Formamid, 20mM EDTA, 0,2% Bromphenol-Blau, Xylen-Zyanol- pH-Wert 8,0 gestoppt. Die resultierenden Proben wurden für die Dauer von 2 min auf 75°C erhitzt, auf ein Polyakrylamid-Gel (8% Akrylamid, 0,3% Bisakrylamid) in 7M Harnstoff, 100mM Tris-Borat, pH-Wert 8,9, gebracht und bei 2000 V 2 Stunden lang elektrophoretisiert. Das Gel wurde in 50% Methanol, 10% Essigsäure 30 min lang fixiert, getrocknet und zur Exponierung des Films durch Autoradiografie genutzt.

Das exponierte Gel wurde entwickelt, und die Intensität der radioaktiven Bänder in jeder Bahn wurde durch Abtasten jeder Bahn mit einem Densitometer (Joyce, Loeb & Co., Ltd., Modell Nr. MkIIIC) bestimmt.

Wenn dieselbe Probe bei Vorhandensein von Magnesium anstelle von Mangan durchläuft, sind die unterstrichenen Basen in den folgenden Tripletten um das Zwei- bis Fünffache intensiver als angrenzende Basen, wenn diese Tripletten erscheinen: TCT, AAG, GCA, CCT. Bei dem eben beschriebenen Beispiel aber haben Bänder, die jeder Base in allen den gezeigten Tripletten entsprechen, dieselbe Intensität, sie unterscheidet sich höchstens um 20% von der der anderen.

Beispiel 2:

Sequenzierungsreaktion unter Verwendung von Mangan, 2X ddGTP und 1X ddCTP zur Unterscheidung zwischen G und C anhand der relativen Bandintensitäten

Bei diesem Beispiel wurde nur ein Behältnis zur Ausführung einer Sequenzierungsreaktion verwendet, um die Folge von zwei Typen von Basen (C und G) in einer DA-Matrize zu bestimmen. Es wurden folgende Schritte ausgeführt:

In der Hybridisierungsreaktion wurde folgende Lösung hergestellt:

mGP 1-2-DNA (2,7mM in 10mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, 0,1mM EDTA)	8,6µl
5X SeqBuf	4 µl
Starter (ABI-fam-Starter, 0,4pm/µl)	2 µl
H ₂ O	5,4µl
	<u>20 µl</u>

Diese Lösung wurde 2 min lang bei 65°C erhitzt und langsam auf Zimmertemperatur abgekühlt. Der fam-Starter wurde mit einer fluoreszenten Markierung markiert, die beim Durchgang durch ein Sequenzierungsgel entdeckt werden kann, dazu wird das DNA-Sequenzierungssystem Modell 370A von ABI verwendet.

In der Erweiterungsreaktion wurde folgende Lösung hergestellt:

Hybridisierungsreaktionsgemisch	20 µl
Dithiothreitol 0,1 M	1 µl
4dNTP 3mM	3 µl
ddGTP 30µM	3 µl
ddCTP 30 µM	1,5µl
	<u>28,5µl</u>

Diese Lösung wurde 2 min lang bei 37°C inkubiert, es wurden 1,5µl genetisch modifizierte T7-DNA-Polymerase ($\Delta 28$), 1 Einheit/µl, zugesetzt, und die Lösung wurde 10 min lang bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch den Zusatz von 5µl von 100mM EDTA, pH-Wert 8,0, gestoppt.

Die resultierenden Fragmente wurden folgendermaßen ausgefällt: es wurden 3,5µl 3M Natriumazetat und 100µl 100%iges Ethanol zugesetzt. Nach einer zehnmütigen Inkubation auf Eis wurde das Gemisch 30 min lang bei 4°C in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500µl 70%igem Ethanol gewaschen und erneut 5 min zentrifugiert. Die obenaufschwimmende Schicht wurde dekantiert, und das Pellet wurde durch mehrminütiges Zentrifugieren unter Vakuum getrocknet. Dann wurde die Probe wieder in 5µl 90%igem Formamid, 50mM EDTA, pH-Wert 8,0, suspensiert, zwei Minuten lang bei 75°C erhitzt und in ein ABI-DNA-Sequenzierungssystem, Modell 370A, eingeführt. Man ließ das Instrument arbeiten, und die unbearbeiteten (Roh-) Daten wurden aufgenommen, wie das in der Benutzungsanleitung für das Instrument Modell 370A (vorläufige Version, März 1987, Abschnitte 3, 4 und 5) beschrieben wird. Es wird nur für den fam-Starter der unbearbeitete (Roh-) Ausgang gezeigt.

Der Ausgang von dieser Reaktion wird in der Abb. 4 gezeigt. Jedes G wird durch eine schlanke Spitze und jedes C durch eine kurze veranschaulicht. Folglich ist die Folge der G's und C's in der DNA anhand der Spitzenhöhe bestimmbar. Es kann also aus einer Sequenzierungsreaktion mit nur einer Markierung für alle DNA-Produkte eine DNA-Folge von G's und C's bestimmt werden. Die Spitzenhöhe verringert sich über die Länge eines Gels, da Produkte mit höherem Molekulargewicht in geringeren Mengen vorhanden sind. Die Differenz zwischen nahegelegenen G und C bleibt jedoch längs des Gels etwa das Zweifache, während die

eines Paares von nahegelegenen G's oder eines Paares von nahegelegenen C's annähernd einheitlich ist (sie schwankt um das 1,1- bis 1,4fache), wodurch die Verringerung in der Intensität bei jeder zusätzlichen Position längs der Folge korrigiert wird. Beispielsweise verringert sich in der Abb. 4 das Signal für eine gegebene Reihe von Bändern über eine Spanne von etwa 60 Basen um das Zweifache. Folglich gilt für jede zusätzliche Position längs der Matrize in diesem Beispiel eine 1,16%ige Verringerung (da ChI gleich 1,0116 für $ChI^{60} = 2$ ist).

Es ist wichtig, zwischen Bändern von unterschiedlicher Intensität auf Grund eines unterschiedlichen Wirkungsgrades des Kettenabbruchgliedes innerhalb nahegelegener Bänder und auf Grund von zwei oder mehreren Bändern, die während der Elektrophorese zusammenwandern, zu unterscheiden. Das letztgenannte Ereignis, als Kompression bezeichnet, ist ein Artefakt der Gel-Elektrophorese und nicht die eigentliche DNA-Sequenzierungsreaktion, und sie wird auch durch die Verwendung von Mangan nicht ausgeschlossen. Ein Beispiel für eine solche Kompression ist in der Abb. 4 mit einem Sternchen (*) bezeichnet worden. Wenn man weiß, daß eine solche Kompression die Komigration von zwei DNA-Produkten darstellt, wie das in der Abb. 4 in einem Fall angegeben wird, dann ist dieses Band eine genaue Markierung eines Bandes von zweifacher Intensität. Die genaue Folge im Bereich zu einer Kompression kann nicht bestimmt werden. Um diese Folge zu bestimmen, ist es notwendig, entweder 1) die Folge in umgekehrter Orientierung zu bestimmen, 2) das Sequenzierungs-Gel unter stärker denaturierenden Bedingungen laufen zu lassen, d. h. bei höherer Temperatur oder durch den Zusatz von 50% Formamid, oder 3) ein Nukleotidanalogue, z. B. dITP oder deazaGTP, anstelle von dGTP zu verwenden. Kompressionen sind auf die Bildung von stabilen Haarnadeln in der DNA unter den Bedingungen der Gel-Elektrophorese zurückzuführen; die Einbeziehungen dieser Nukleotidanalogue destabilisiert die meisten dieser Haarnadeln.

Kompressionen auf Grund von Haarnadelstrukturen können faktisch jede Länge haben, sie ist abhängig vom Umfang und der Stärke der Haarnadel. So haben bei Mn alle nahegelegenen Bänder annähernd gleiche Zahlen von DNA-Produkten mit demselben Molekulargewicht, haben aber auf Grund von Kompressionen nicht notwendigerweise dieselbe Bandintensität. Es wird auf die Abb. 2 Bezug genommen. Die oben beschriebene Methode wurde mit ddGTP bei Vorhandensein von Mangan mit einer Endkonzentration von 1 mM durchgeführt. Jedes Band im resultierenden Gel wird in der Abb. 2 als eine Spitze dargestellt. Die Intensität jedes Bandes widerspiegelt sich in der Höhe der einzelnen Spitzen. Mit Mangan ist die nahegelegene Bandintensität und damit die Spitzenhöhe längs des Gels annähernd einheitlich, sie unterscheidet sich zwischen nahegelegenen Bändern um weniger als 5% oder 10%.

Dagegen stellt der in der Abb. 3 gezeigte Ausgang das gleiche Experiment dar, wenn es bei Vorhandensein von Magnesium anstelle von Mangan durchgeführt wurde. In diesem Fall variiert die Intensität und damit die Spitzenhöhe nahegelegener Bänder bis um das Zehnfache.

Es wird auf die Abb. 5 Bezug genommen. Mit allen vier Dideoxynukleotiden bei gleicher Konzentration (0,75 μ M Endkonzentration für jedes ddNTP, wie im Beispiel 2) sind in einer Sequenzierungsreaktion bei Vorhandensein von Mangan die nahegelegenen Bänder und die entsprechenden Spitzen annähernd einheitlich, sie unterscheiden sich um nicht mehr als etwa das 1,5fache und nehmen wiederum bei DNA-Produkten mit höherem Molekulargewicht in der absoluten Intensität ab. Dagegen variiert bei Vorhandensein von Magnesium und allen vier Dideoxynukleotiden mit gleicher Konzentration die Intensität nahegelegener Bänder stark, wie aus der Abb. 6 deutlich wird.

Durch Variieren der Konzentration jedes ddNTP in einer Sequenzierungsreaktion kann die vollständige Nukleotidfolge eines Stranges der DNA bestimmt werden. Ein Beispiel für ein solches Verfahren wird in der Abb. 7 gezeigt, in welcher sich die Konzentration jedes ddNTP in 30%-Intervallen unterscheidet: ddGTP (4,5 μ M, 2,2X), ddATP (3,0 μ M, 1,7X), ddTTP (2 μ M, 1,3X) und ddCTP (1,4 μ M, 1,0X). Die aus diesem Graphen bestimmte DNA-Folge wird unter der zweiten Linie in der Abbildung gezeigt. Es wurden nur 6 Fehler (gekennzeichnet durch ein „v“) im Vergleich zur tatsächlichen DNA-Folge festgestellt. Diese Fehler können ausgeschlossen werden, wenn man mit größeren Verhältnissen für jedes ddNTP (z. B. 1X ddCTP, 2X ddTTP, 4X ddATP und 8X ddGTP) arbeitet. Ebenso werden die Ergebnisse genauer, wenn man die Spitzenfläche, nicht die Spitzenhöhe mißt. Computerprogramme zur Messung dieser Spitzenflächen können leicht für vorhandene DNA-Sequenziermaschinen geschrieben werden.

Es wird auf die Abb. 8 Bezug genommen. Die optimale Konzentration für Mangan in einer Sequenzierungsreaktion beim Fehlen eines Chelators, wie Zitrat oder Isozitrat, beträgt 1 mM, verglichen mit 20 mM für Magnesium. Wenn bei der Reaktion 40 mM Isozitrat vorhanden sind, wird die Polymeraseaktivität bei Vorhandensein von Mangan um das Vierfache stimuliert, so beträgt die optimale Mangankonzentration 5 bis 20 mM.

Es wird auf die Abb. 9 Bezug genommen. Bei einer Mangankonzentration von 10 mM beträgt die optimale Isozitratkonzentration 40 mM, was eine vierfache Stimulierung der Polymeraseaktivität ergibt. Bei einer Magnesiumkonzentration von 10 mM hat jede Isozitratmenge eine hemmende Wirkung auf die Polymerase. Diese Ergebnisse wurden bei der Durchführung von Polymerasereaktionen, wie das unten beschrieben wird, bei Vorhandensein von verschiedenen Chelator- und Ionenkonzentrationen ermittelt. Insbesondere enthielten die Reaktionsgemische (200 μ l) 40 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, 5 mM Dithiothreitol, 0,5 mM denaturierte Kalbsthymus-DNA, 0,3 mM dGTP, dATP, dCTP und [3 H]dTTP (20 cprn/pm), 50 μ g/ml BSA und die angegebenen Konzentrationen von $MgCl_2$, $MnCl_2$ oder Natriumisoitrat. Die Reaktionen wurden eingeleitet durch den Zusatz von 0,1 Einheit genetisch modifizierter T7-DNA-Polymerase (Δ Lys 118-Arg 145). Die Inkubation bei 37°C dauerte 30 min. Die Reaktionen wurden durch den Zusatz von 3 ml 1 N HCl und 0,1 M Natriumpyrophosphat gestoppt, und es wurde die säureunlösliche Radioaktivität bestimmt. Eine Einheit der DNA-Polymerase katalysiert die Einbeziehung von 10 mMol des Gesamtnukleotids in eine säureunlösliche Form innerhalb von 30 min unter den Bedingungen der Untersuchung (Tabor u. a., J. Biol. Chem. 262, 16212 (1987)).

Pyrophosphatase

Wenn für die DNA-Sequenzierung chemisch modifizierte T7-DNA-Polymerase verwendet wird, verschwinden bei längerer Inkubation bestimmte Fragmente (Tabor und Richardson, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84: 4767, 1987). Die Stellen, an denen das geschieht, werden als „Löcher“ bezeichnet, da dieser Vorgang einen Leerraum oder eine Lücke im Sequenzierungs-Gel erzeugt. Diese Löcher treten häufiger auf, wenn anstelle von dGTP dITP verwendet wird.

Der Abbau von speziellen Fragmenten ist ein offensichtliches Problem beim Lesen von DNA-Sequenzierungs-Gels. Das Fehlen eines Fragmentes geht entweder vollkommen verloren, wenn die Folge gelesen wird, was zu einer Deletion in der bestimmten Folge führt, oder aber es wird ein Loch beobachtet, das nur als eine unbekannte Base in dieser Position interpretiert werden kann.

Gegenwärtig besteht die Lösung für dieses Problem darin, die Reaktionszeiten kurz zu halten. Das ist aus zwei Gründen unbefriedigend. Erstens wird dadurch der Durchlauf der Reaktionen technisch erschwert, da sehr schnell gearbeitet werden muß, um die Reaktionen schnell nach dem Beginn zu beenden. Wichtiger aber noch ist, daß einige Bänder sehr sensitiv gegenüber diesem Abbau sind und schon nach sehr kurzen Reaktionszeiten verschwinden.

Es wurde eine genetisch geänderte Form von T7-DNA-Polymerase ($\Delta 28$, die oben beschrieben wurde) entwickelt, die keinen nachweisbaren Pegel an Exonukleaseaktivität hat ($< 10^{-7}$ des Pegels des Wildtypenzym oder > 10000 mal weniger als die chemisch modifizierte T7-Polymerase). Es wurde erwartet, daß, da die Löcher bei längerer Inkubation auftreten, diese vermutlich auf die Exonukleaseaktivität zurückzuführen seien und folglich nicht auftreten würden, wenn mit dieser genetisch modifizierten Form der T7-DNA-Polymerase gearbeitet wurde. Die oben genannten radioaktiven Fragmente verschwinden jedoch immer noch mit derselben Rate, auch wenn mit einer chemisch oder genetisch modifizierten T7-DNA-Polymerase durchgearbeitet wird.

Es wurde festgestellt, daß dieser Verlust bestimmter Bänder auf die Pyrophosphorolyseaktivität der Polymerase zurückzuführen ist. Diese Aktivität ist nicht auf die Exonukleaseaktivität von DNA-Polymerase, sondern vielmehr auf die Umkehrung von Polymeraseaktivität zurückzuführen: bei Vorhandensein von Pyrophosphat (PPi) fügt die Polymerase PPi dem Terminalnukleotiden hinzu, der sich am 3'-Ende der Kette befindet, wodurch in diesem Fall ein Dideoxynukleosid-5'-triphosphat freigesetzt wird. Siehe dazu allgemein Deutscher u. a., J. Biol. Chem. **244**: 3019, 1969; und Kornberg, DNA Replication (DNA-Replikation), S. 125-126, veröffentlicht von Freeman & Co., SF. Diese Reaktion bewirkt die Entfernung des Blocks am 3'-Ende, wodurch die Synthese längs der Matrize weitergehen kann. PPi sammelt sich normalerweise in einem DNA-Synthesereaktionsgemisch an, da es ein Produkt der Polymerisationsreaktion ist. Die Pyrophosphorolysestelle ist von der DNA-Folge abhängig, und folglich werden die oben beschriebenen Löcher nur an bestimmten Stellen produziert.

Um dieses Problem zu überwinden, muß die Pyrophosphorolyse unterbunden werden. Eine Möglichkeit zur Unterbindung der Pyrophosphorolyse besteht darin, das Pyrophosphat bei der Erzeugung in der Polymerasereaktion durch den Zusatz von Enzympyrophosphatase aufzubrechen. Andere Lösungen beinhalten die Änderung des Pyrophosphates durch andere enzymatische Reaktionen oder die Verhinderung der Pyrophosphorolyse durch den Zusatz eines Analogs, welches diese Aktivität der DNA-Polymerase unterbindet. Es wurde festgestellt, daß der Zusatz selbst von Spurenmengen dieses Enzyms (ein Tausendstel des Molverhältnisses der DNA-Polymerasemoleküle) zu den Sequenzierungsreaktionsgemischen die bestimmte Klasse von Fragmenten, die oben genannt wurden, vollkommen stabilisiert und damit die Produktion von Löchern ausschließt. Bei Vorhandensein von genetisch geänderter Form von T7-DNA-Polymerase ($\Delta 28$) und Pyrophosphatase sind alle Bänder selbst bei längerer Inkubation (bis zu 2 Stunden) stabil.

Bei der automatischen Sequenzierung unter Nutzung der Differentialbandintensität ist es kritisch, daß die Intensität jedes Bandes gänzlich durch das Verhältnis von ddNTP zu dNTP bestimmt wird. Die Pyrophosphorolyse führt durch starke Verringerung der Intensität einiger Bänder zu Zweideutigkeiten. Daher ist bei diesem Sequenzierungsverfahren der Zusatz von Pyrophosphatase besonders vorteilhaft.

Pyrophosphatase sollte immer dann zugesetzt werden, wenn chemisch oder genetisch modifizierte T7-DNA-Polymerase oder andere Polymerasen für die Sequenzierung eingesetzt werden, zumindest in einer ausreichenden Menge, um die Hydrolyse der gebildeten PPi mit einer Rate zu katalysieren, welche die Ansammlung von PPi bis zu einem Pegel verhindert, der zur Pyrophosphorolyse führt. Das gilt besonders bei der Verwendung von dTTP anstelle von dGTP, da in diesem Fall das Auftreten von Löchern durch Pyrophosphorolyse im stärkeren Umfang erfolgt.

Beispiel 3:

Protokoll unter Verwendung von Pyrophosphatase in Sequenzierungsreaktionen

Bei diesem Beispiel wurde ein normales Sequenzierungsprotokoll durchgeführt. Die einzige Modifikation bestand darin, daß hefeanorganische Pyrophosphatase verwendet wurde. Die Quelle für die Pyrophosphatase ist nicht wichtig, im vorliegenden Beispiel aber wurde hefeanorganische Pyrophosphatase, Sigma-Katalog Nr. I-4503, ohne weitere Reinigung oder weiter gereinigt auf einer FPLC-Mono-C-Kolonnen, und Worthington-Pyrophosphatase, hefeanorganisch, ohne weitere Reinigung verwendet. Die Pyrophosphatase wurde der modifizierten T7-DNA-Polymerase vor dem Zusatz der Polymerase zur Markierungsreaktion zugesetzt. Im typischen Fall wurden 2 Einheiten (0,25 µg) Polymerase je Sequenzierungsreaktionssatz und 0,001 Einheiten hefeanorganischer Pyrophosphatase (4 ng) eingesetzt. Ein breiter Bereich von Pyrophosphataseaktivität ist erfolgreich: 0,1 ng bis 1 µg Hefepyrophosphatase je Sequenzierungsreaktion wurden mit Erfolg getestet. Beispielsweise wurde in der Hybridisierungsreaktion folgende Lösung hergestellt:

mGP1-2-DNA (in 10mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, 0,1 mM EDTA)	7 µl
5X SeqBuf	2 µl
Starter (New England Biolabs - 17mer, 0,5 pm/µl, Kat.-Nr. 1211)	1 µl
	<hr/> 10 µl

Diese Lösung wurde 2 min lang bei 65°C erhitzt und langsam auf Zimmertemperatur abgekühlt. In der Markierungsreaktion wurde folgende Lösung hergestellt:

Hybridisierungsreaktionsgemisch	10 µl
Dithiothreitol 0,1 M	1 µl
³⁵ S dATP, New England Nuclear NEG-034H	1 µl
dNTP, 3, (jeweils 1,5 µM dTTP, dCTP, 3 µM dITP)	2 µl
Enzymgemisch (siehe unten)	2 µl
	<hr/> 16 µl

Enzymgemisch:

Genetisch modifizierte T7-DNA-Polymerase, Δ Lys118-Arp145
 anorganische Hofepyrphosphatase in 20mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5,
 10mM β -Merkaptoethanol, 50 μ g/ml Rinderserumalbumin

1 Einheit/ μ l0,01 Einheiten/ μ l

Diese Lösung wurde bei Zimmertemperatur 5min inkubiert.

Bei Terminierungsreaktionen wurden die folgenden vier Reaktionsgemische hergestellt:

	G	A	T	C
5S SeqBuf (siehe oben)	0,6 μ l	0,6 μ l	0,6 μ l	0,6 μ l
4 dNTPs (jeweils 3 mM dATP, dTTP, dCTP und 6 mM dITP)	0,3 μ l	0,3 μ l	0,3 μ l	0,3 μ l
H ₂ O	1,9 μ l	1,9 μ l	1,9 μ l	1,9 μ l
ddGTP 0,03 mM	0,2 μ l			
ddATP 0,2 mM		0,2 μ l		
ddATP 0,2 mM			0,2 μ l	
ddCTP 0,2 mM				0,2 μ l
	3 μ l	3 μ l	3 μ l	3 μ l

Diese Terminationsgemische wurden bei 37°C 2min lang inkubiert, und jedem Terminationsgemisch wurden 3 μ l-Aliquote der Markierungsreaktionslösung zugesetzt. Die resultierenden Lösungen wurden bei 37°C 60min lang inkubiert.

Jede Terminationsreaktion wurde mit 5 μ l 90%iges Formamid, 20mM EDTA, 0,2% Bromophenol-Blau, Xylen-Zyzenol, pH-Wert 8,0, gestoppt.

Die resultierenden Proben wurden 2min lang auf 75°C erhitzt, auf ein Polyakrylamid-Gel (8% Polyakrylamid, 0,3% Bis-akrylamid) in 7M Harnstoff, 100mM Tris-Borat, pH-Wert 8,9, gebracht und bei 2000V 2 Stunden lang elektrophoretisiert. Das Gel wurde in 50% Methanol und 10% Essigsäure 30min fixiert, getrocknet und zur Filmbelichtung durch Autoradiografie verwendet.

Apparat

Es wurde auf die Abb. 11 Bezug genommen. Der Apparat 100, der für die automatisierte DNA-Sequenzierung geeignet ist, besteht aus einem Reaktor 102 mit den oben beschriebenen Reagenzien 104, beispielsweise DNA-Polymerase, Mangan- oder Eisenionen, Chelatoren und Pyrophosphatase. Der Apparat ist auch mit einer Gel-Box 106 zur Trennung von DNA-Produkten nach ihrem Molekulargewicht und einem Gel-Anzeigeelement 108 zum Feststellen der DNA-Produkte während ihres Durchganges durch das Gel 107 ausgestattet. Außerdem ist ein Rechenelement 110 vorhanden, um die Intensität der Bänder von DNA-Produkten und die Position der Bänder zueinander zu berechnen. Wenn die DNA-Produkte in einer Bahn durchgeführt werden, kann das Rechenelement 110 die DNA-Folge aus den Bandintensität und -position berechnen. Für diese Funktion werden Standardrechnerprogramme verwendet.

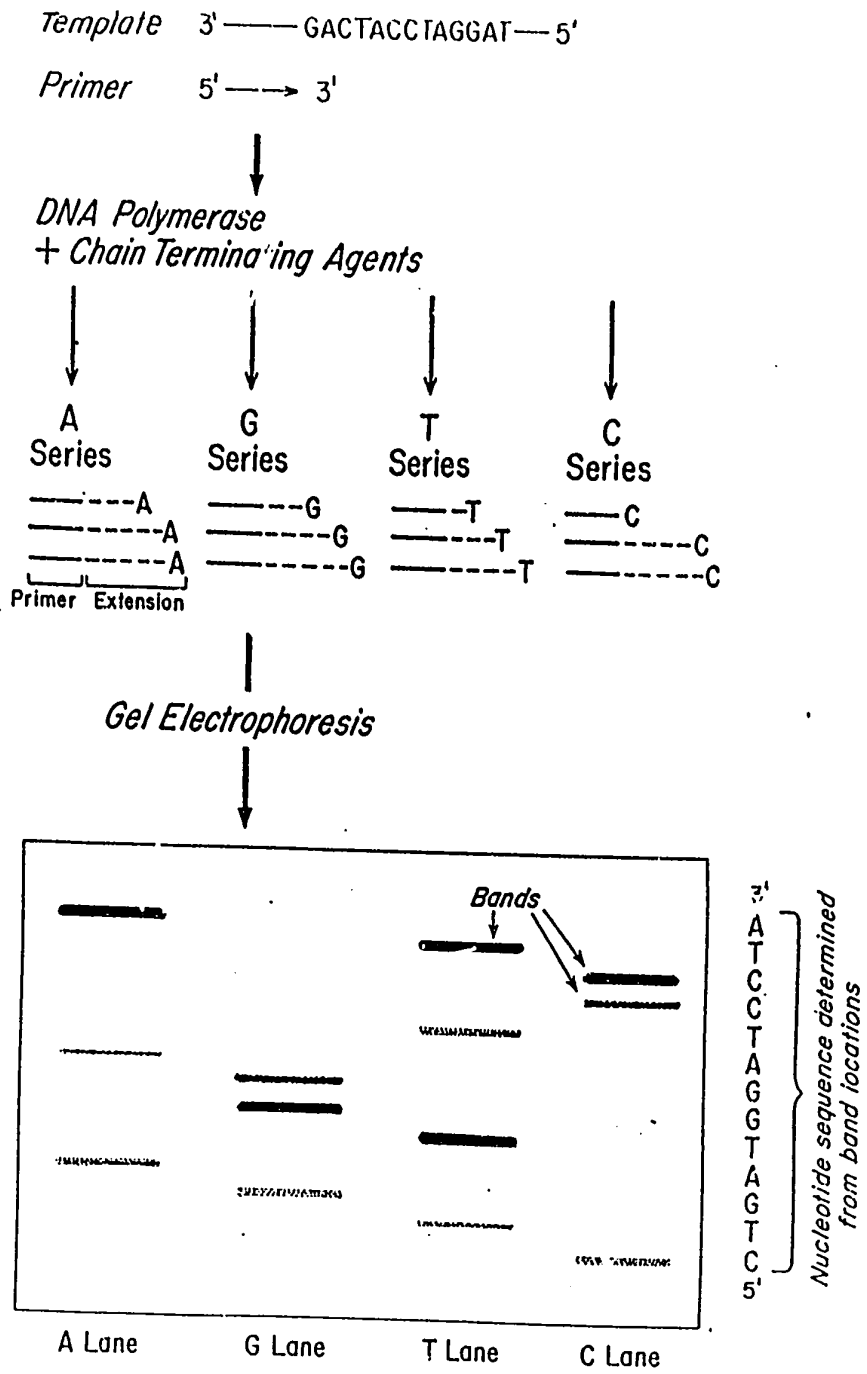


FIG. 1

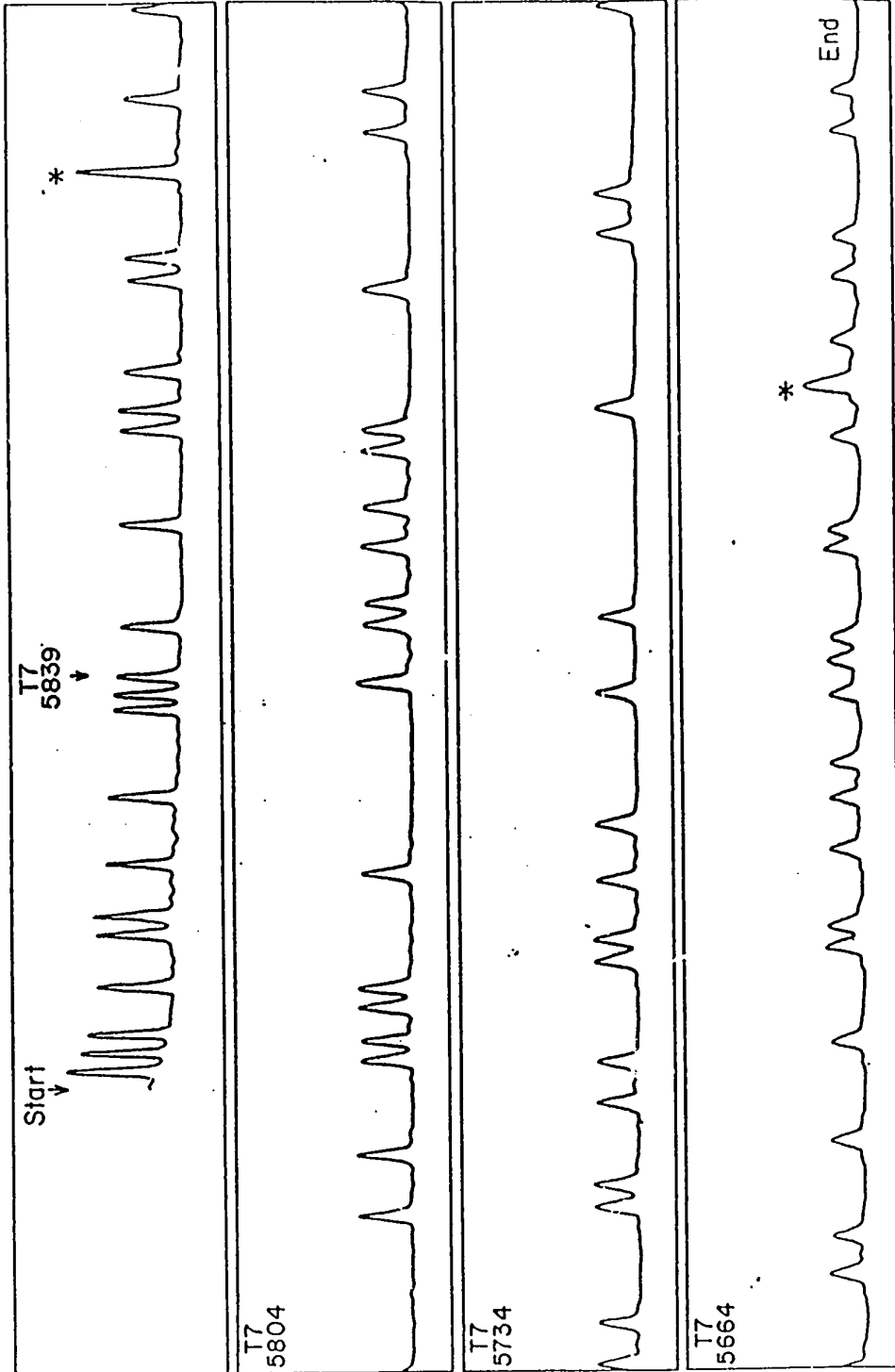


FIG.2

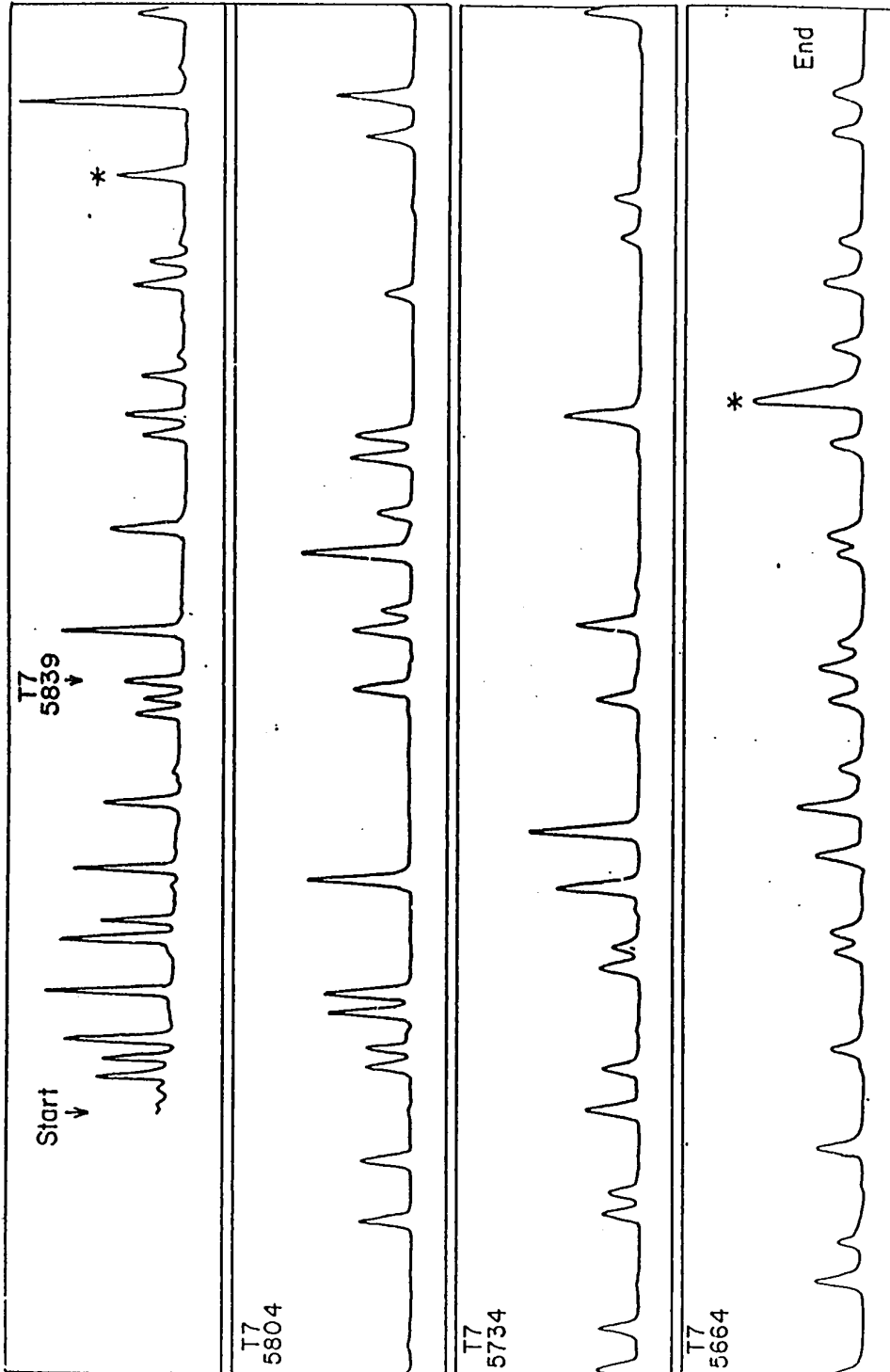


FIG 3

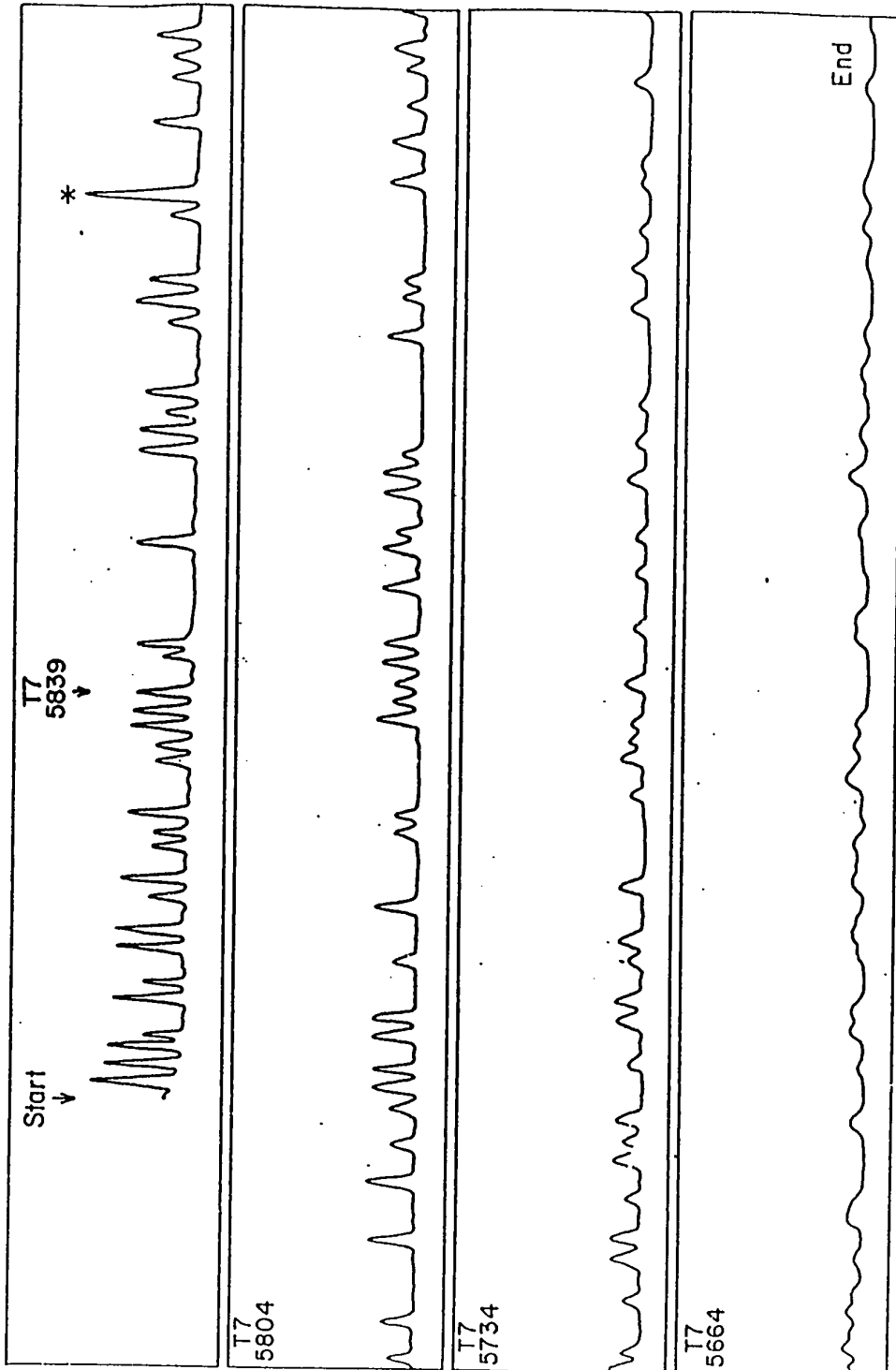


FIG.4

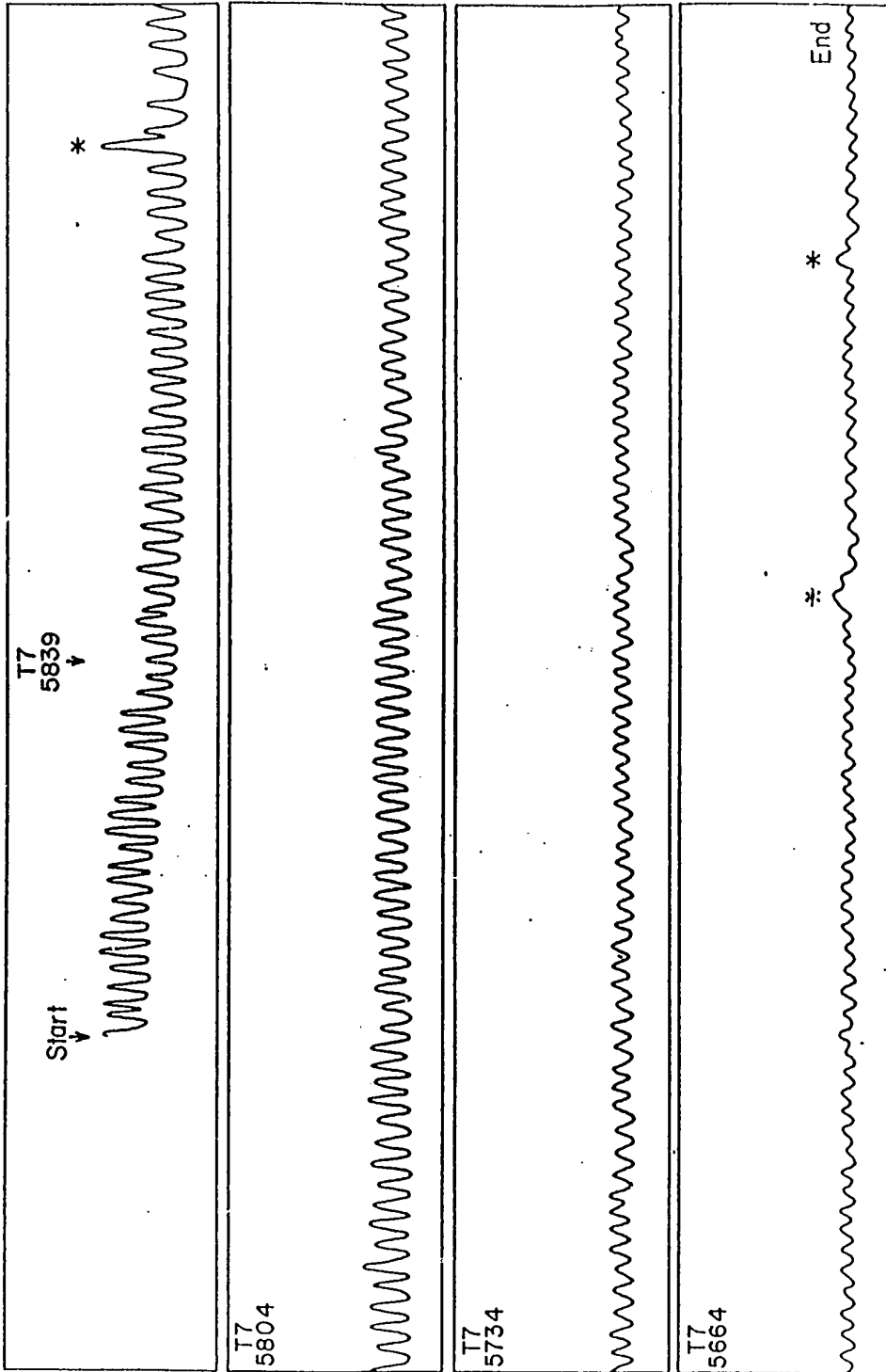


FIG.5

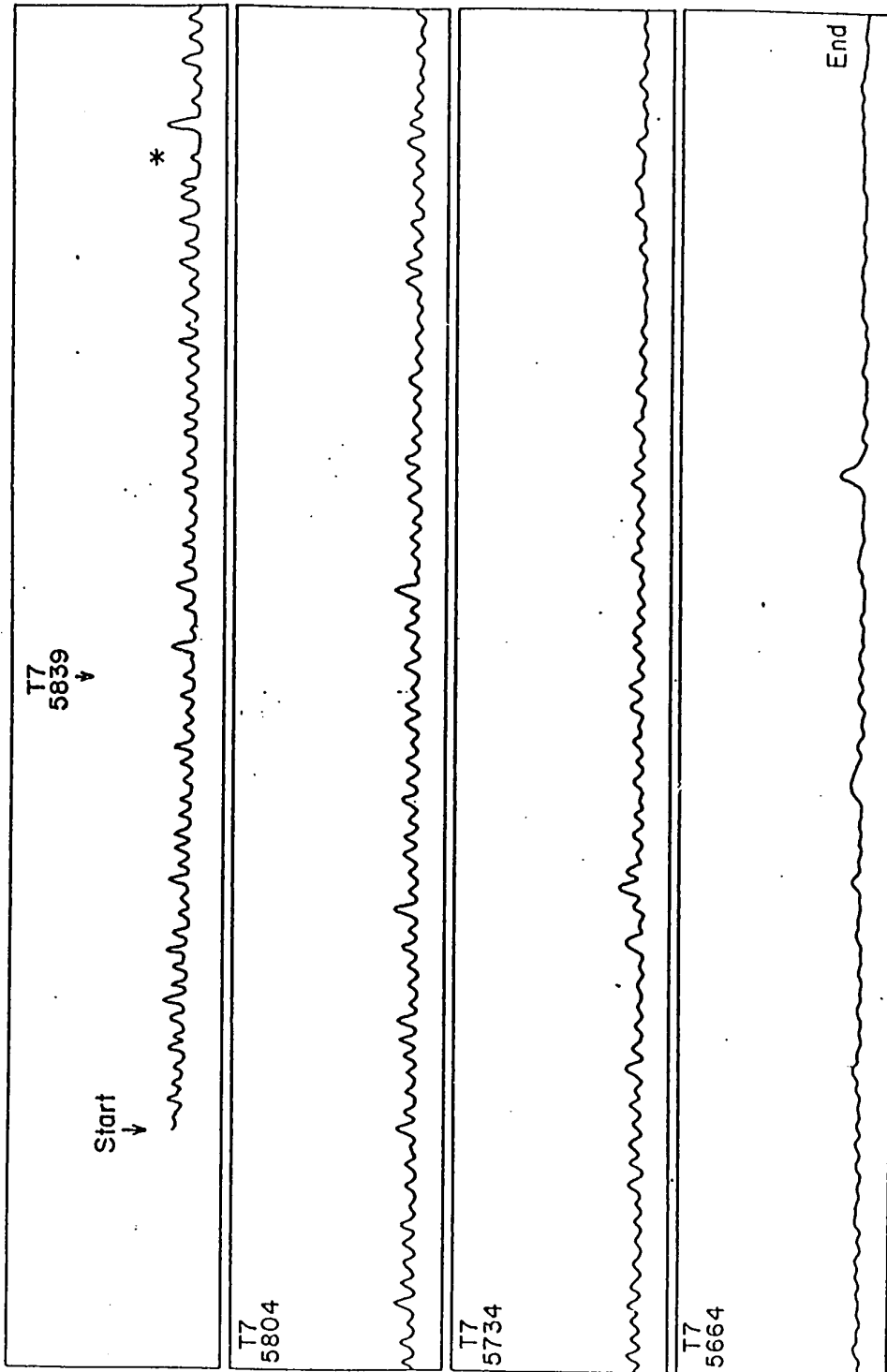


FIG. 6

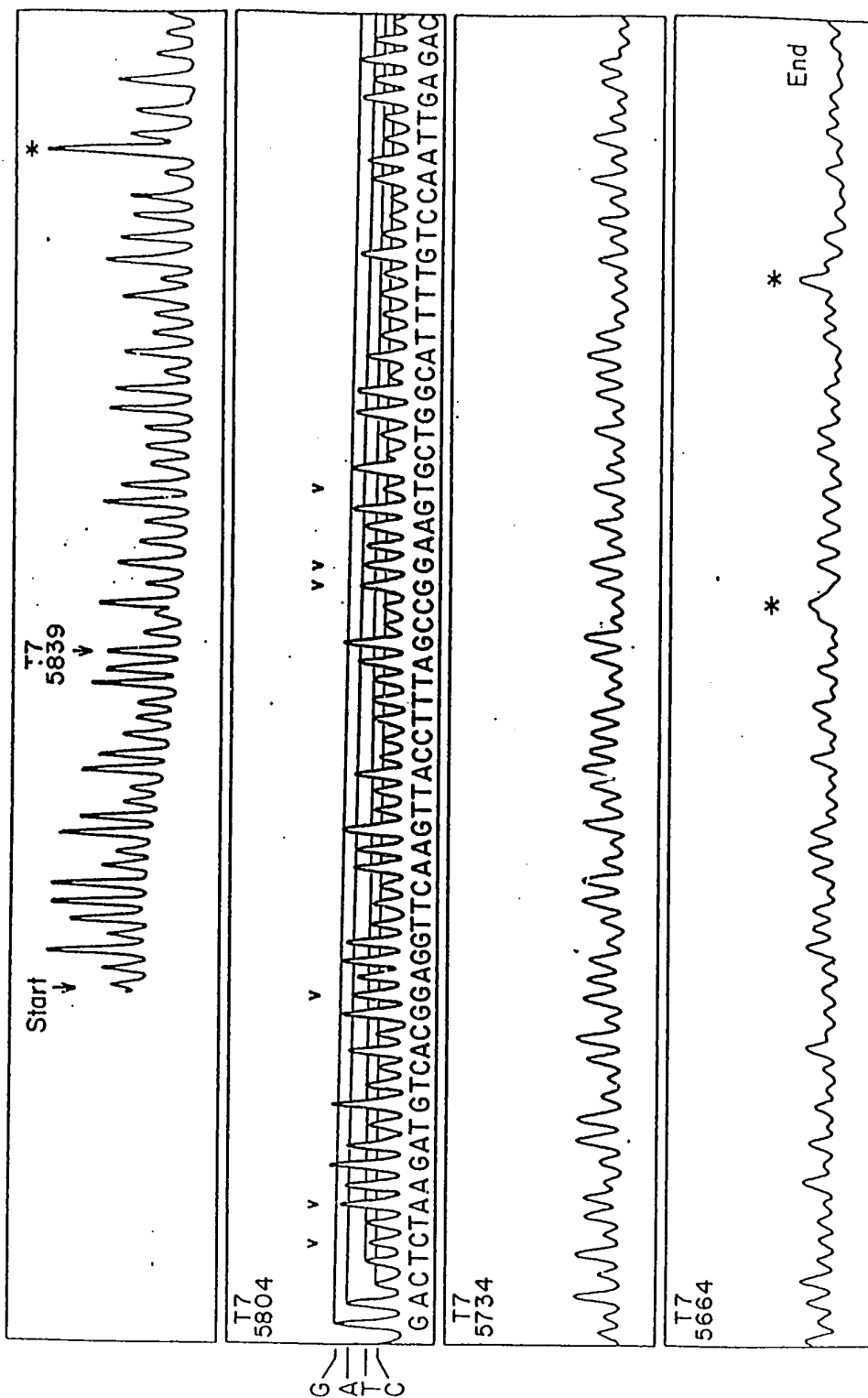


FIG.7

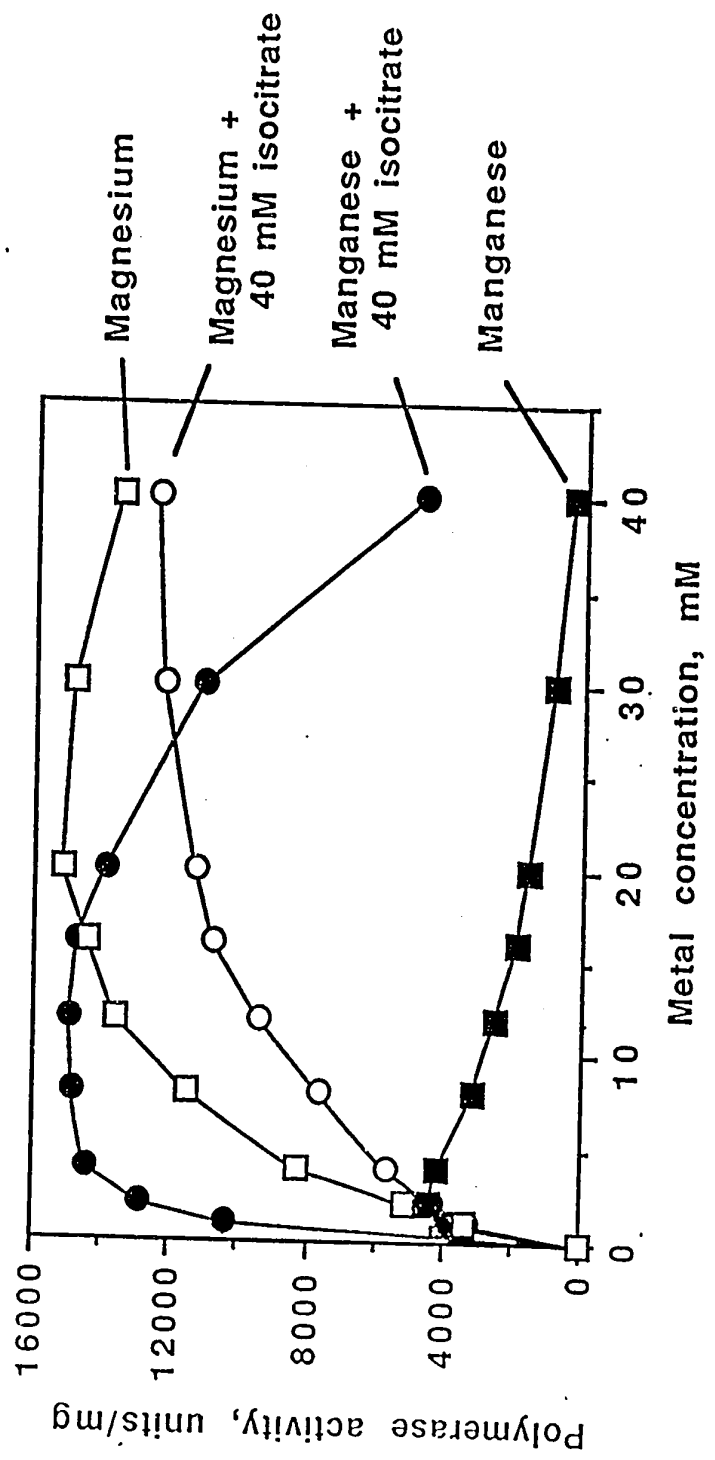


FIG.8

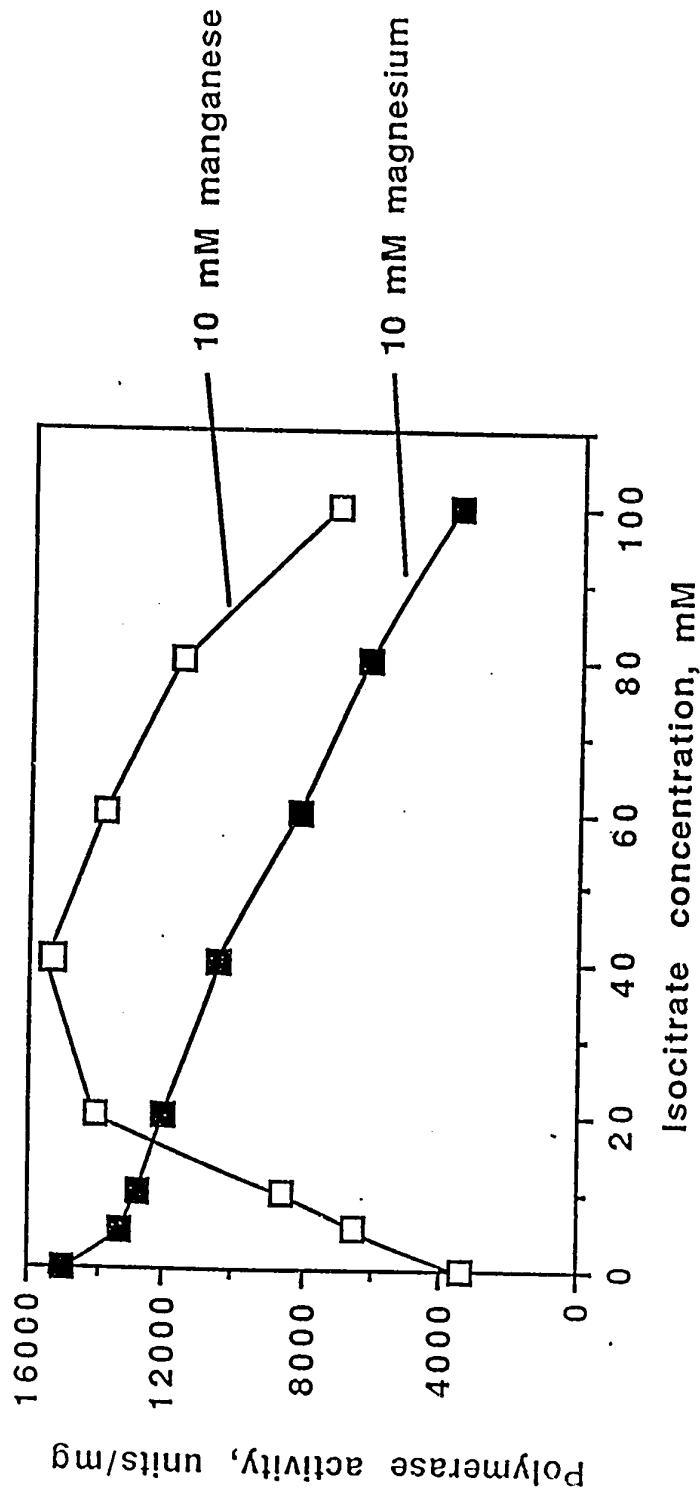


FIG.9

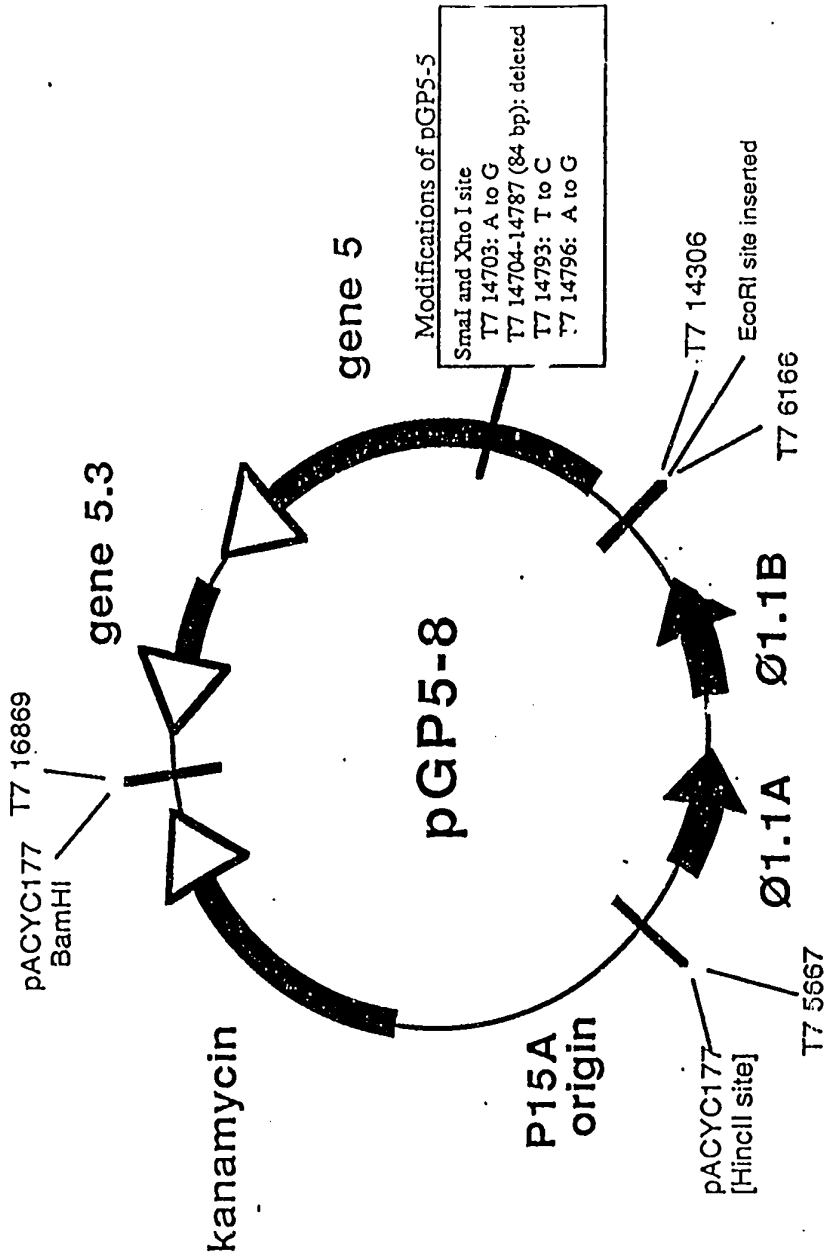


FIG. 10

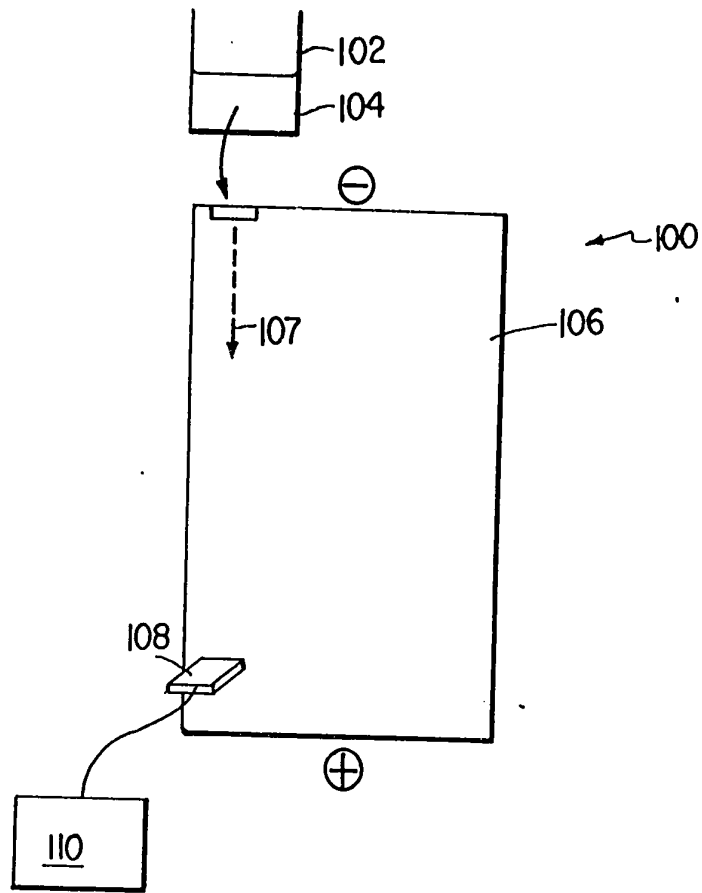


FIG. 11