

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

3480/89

52543- /89

A

52543--

ELJÁRÁS DNS SZEKVENCIA MEGHATÁROZÁSÁRA
President and Fellows of Harvard College,
Cambridge, Massachussets
Amerikai Egyesült Államok

A bejelentés napja: 1989.07.11.

Elsőbbsége: 1988.07.12(218 103) Amerikai Egyesült Államok

KIVONAT

A találmány tárgya eljárás DNS egy szálának szekvenciaelemzésére, amely az alábbi lépéseket foglalja magában: a DNS szálának szolgáltatása, a szál összeforrasztása olyan primerrel, amely képes hibridizálni a szállal, és így összeforrasztási keverék kialakítása, a keverék inkubálása valamely dezoxiribonukleozid-trifoszfáttal, valamely DNS polimerázzal és valamely első lánc-terminációs ágenssel olyan körülmények között, amelyben a polimeráz előidézi, hogy a primer meghosszabbított legyen, így első DNS termékek első sorozata képződik, amely termékek a meghosszabbított primer hosszában különböznek, ahol minden első DNS terméknek lánc-terminációs ágense van meghosszabbított végén, és ahol az első DNS termékek száma mintegy azonos lényegében az összes DNS termékénél, amely hosszában 1-20 bázissal különbözik.

Földvár

3480/89

35587

Képviselő:

DANUBIA SZABADALMI IRODA

52543--

35587/89

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

PROG C12N15/10

ELJÁRÁS DNS SZEKVENCIA MEGHATÁROZÁSÁRA

President and Fellows of Harvard College,

Cambridge, Massachussets

Amerikai Egyesült Államok

Feltalálók: TABOR Stanley, Cambridge,

RICHARDSON Charles C., Chestnut Hill,

Massachussets,

Amerikai Egyesült Államok

A bejelentés napja: 1989.07.11.

Elsőbbsége: 1988.07.12(218 103) Amerikai Egyesült Államok

67440-2444-GI

A találmány DNS szekvencia elemzésre vonatkozik, elsősorban automatizált eljárásokra DNS szekvenciaelemzésben.

A DNS szekvenciaelemzést általában Sanger és munkatársai eljárásával [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463 (1977)] hajtják végre, ez magában foglalja DNS egyedi szálainak enzimes szintézisét egy egyszálas DNS templátból és egy primerből. Az 1. ábrára utalva négy különböző szintézist hajtanak végre. Egy egyszálas templátot nyújtanak egy olyan primerrel együtt, amely hibridizál a templáthoz. A primert megnyújtják DNS polimerázt alkalmazva, és az egyes reakciókat egy speciális bázisnál (guanin, G, adenin, A, timin, T vagy citozin, C) fejezik be egy megfelelő láncbefejező szer, pl. egy didezoxinukleotid beépülése révén. Azok között az enzimek között, amelyeket jelenleg alkalmaznak ehhez az eljáráshoz, található pl. az *Escherichia coli* DNS polimeráz nagy fragmentuma ("Klenow" fragmentum), reverz transzkriptáz, Taq polimeráz, és T7/bakteriofág DNS polimeráz.

Továbbra is az 1. ábrára utalva a négy DNS szintézis reakció négy sorozat DNS termék képződését eredményezi, ahol minden terméknek vagy egy meghatározott terminálisa és egy változó terminálisa. A meghatározott terminális a primer molekulával kezdődik. A változó terminális egy, arra a nukleotidra (G, A, T, vagy C) fajlagos lánc-terminációs ágenssel végződik, amelynél a szintézis reakció befejeződik. A termékek négy különböző sorozatát egyenként különítik el molekulatömegük alapján, négy külön vonalban nagy felbontású poliakrilamid gélben, hogy csíkok négy sorozatát alakítsák ki, ahol az egyes csíkok a gélen a DNS szekvenciában levő egymás utáni speciális nukleotidnak felelnek meg. Így a csíkok relatív helyzetei azonosítják a helyzeteket az egyes

adott nukleotid bázisok DNS szekvenciájában. Általában a DNS termékeket úgy jelzik, hogy a kialakított csíkokat könnyen lehessen kimutatni. Amint az 1. ábrában bemutatjuk, a csíkok intenzitása általában nem egységes egy egyedi vonalon belül, mivel a csíkintenzitás közvetlenül viszonyul az azonos molekulatömegű DNS termékek teljes számához vagy koncentrációjához, és ez a szám termékről-termékre változik még akkor is, amikor ezek nagyjából azonos molekulatömegűek, és még akkor is, amikor ezek ugyanazt a terminációs ágenszt tartalmazzák.

A fenti módszertant alkalmazva automatizált rendszereket fejlesztettek ki a DNS szekvenciaelemzéshez. Az egyik berendezés, amelyet az EG & G gyárt, ^{32}P -jelzést és DNS polimerázt alkalmaz, és az így létrejövő DNS termékeket gélelektroforézissel különítik el [Tonequzzo és munkatársai: *Biotechniques* 6, 460 (1988)]. A gél alján egy ^{32}P -detektor számolja a radioaktivitást, amint áthalad a gél fenekén. Négy szintézisreakció szükséges az egyes szekvenciálandó templatokhoz, valamint az egyes géleken négy vonal; egy elkülönített vonalat alkalmaznak azokhoz a termékekhez, amelyek az egyes speciális lánc-terminációs ágensek által fejeződnek be, amint azt pl. az 1. ábrán bemutatjuk.

Kanbara és munkatársai [Biotechnology 6, 816 (1988)] a fentebb leírt ^{32}P -jelzett primert fluoreszcens jelzéses primerrel helyettesítik. Az így létrejött, fluoreszcens jelzéses termékeket lézerral gerjesztik a gél fenekén és a fluoreszcenciát CRT monitorral mutatják ki. Ez az eljárás szintén négy szintézis reakciót és a gélen négy vonalat igényel az egyes szekvenciálandó templatokhoz.

Az Applied Biosystems olyan eszközt gyárt, amelyben négy különböző primert alkalmaznak, ahol mindegyik különböző fluoreszcens markerral van jelezve [Smith és munkatársai:

Nuc. Acid. Res. 13, 2399 (1985); Nature 321, 674 (1986)]. Mindegyik primert külön reakcióban alkalmazzák, amelyek a négy didezoxinukleotid egyikét tartalmazzák. Miután a négy reakciót kiviteleztek, ezeket egyesítik és egy gélen egyetlen vonalban futtatják. A gél fenekén lézert alkalmaznak a fluoreszcens termékek kimutatására, miután ezek átvándoroltak vagy elektroforézis segítségével átjutottak a gélen. Ez a rendszer négy különböző összeforrasztási reakciót és négy különböző szintézis reakciót igényel az egyes témákhoz, de csak egyetlen vonalat a gélen. A szekvencia számítógépes elemzése könnyebbé válik, ha mind a négy csík egyetlen vonalban van.

A DuPont olyan berendezést nyújt, amelyben négy különböző marker kötődik a négy didezoxinukleotid trifoszfát mindegyikéhez [Prober és munkatársai: Science 238, 336 (1987)]. Egyetlen összeforrasztási lépés, egyetlen polimeráz reakció (amely a négy jelzett didezoxinukleotid trifoszfát mindegyikét tartalmazza) és a szekvenciáló gélen egyetlen csík szükséges. A négy különböző fluoreszcens markert a DNS termékhez külön-külön mutatják ki, amint ezek elektroforézisen mennek át a gélen keresztül.

Englert és munkatársai [4,707,237 lajstromszámú amerikai egyesült államok-beli szabadalmi leírás (1987)] többcsatornás elektroforézis berendezést írnak le, amely kimutató eszközökkel bír lényegében a gél teljes szélességén keresztül elhelyezve, ezek az eszközök érzékelni képesek a jelzett DNS termékeket, amikor vándorolnak a négy különböző vonalban, és azonosítják a csatornát vagy vonalat, amelyben a minta elhelyezkedik. Előnyösen radioaktív jelzéseket alkalmaznak.

A jelenleg a DNS szekvenciaelemzéshez alkalmazott eljárások

közös jellemzője az a szükségszerűség, hogy a radioaktívan vagy fluoreszcens jelzéssel jelzett DNS termékeket el kell különíteni gél-permeációs eljárással, pl. poliakrilamid- vagy más gélelektroforézissel, majd ezek elhelyezkedését ki kell mutatni egymáshoz viszonyítva a vándorlás tengelye mentén, vagy a gélen át történő vándorlás során. Ennek az eljárásnak a pontosságát részben a jelek egységessége szabja meg a csíkokban, amelyek mintegy azonos távolságban hatolnak a gélen át. A különbségek vagy a változékonyság a jelintenzitásokban a közeli csíkok között számos gondot jelenthetnek. Először, ezek csökkentik az eljárás érzékenységét, amely korlátozza azt a lehetőséget, hogy a leggyengébb jeleket tartalmazó csíkokat kimutassák. Másodsor, ezek nehézséget okoznak annak meghatározásában, vajjon egy csík egy gyenge jellel valódi jel, amely egy lánc befejező ágens beépülésének tulajdonítható, vagy olyan mesterséges termék, amely a DNS-ben levő szünetjel következménye, ahol a polimeráz felbomlott. Harmadszor, ezek csökkentik a pontosságot a DNS szekvencia meghatározásában a térben közeli csíkok között, mivel az egyik csík erős jele beárnyékolhatja a szomszédos gyenge jelet.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a találmányt.

A fentebb felvetett összes gondot megoldja a jelen találmány, ahol mintegy azonos mennyiségű, hasonló molekulatömegű DNS terméket állítunk elő egy szekvenciáló reakcióban, így a szekvenciáló gélben a közeli csíkok, azonos vonalban, mintegy azonos intenzitásúak.

Az a lehetőség, hogy mintegy azonos intenzitású közeli csíkokat állítunk elő, hasznos, mivel ez lehetővé teszi, hogy bármilyen szekvenciáló reakció eredménye könnyebben és nagyobb bizton-

sággal legyen leolvasható. Ezen kívül mivel egy speciális lánc-terminációs ágenssel végzett szekvenciálós reakcióból származó DNS termékek olyan csíkokat képeznek, amelyek mintegy azonos intenzitásúak, mint a közeli csíkok intenzitásai, a csík-intenzitás maga speciális jelzést szolgáltat az így képzett csíkok sorozatához. Egy adott lánc-terminációs ágens által termelt, mintegy azonos molekulatömegű DNS termékek száma változik a lánc-terminációs ágens koncentrációjától függően. Így a szintézishez a négy lánc-terminációs ágens különböző koncentrációit alkalmazva azt a DNS terméket, amelybe az egyik lánc-terminációs ágens van beépítve, megkülönböztethetjük azoktól a mintegy azonos molekulatömegű DNS termékektől, amelyekbe más lánc-terminációs ágensek vannak beépítve, mivel ezek különböznek számban vagy mennyiségben; következésképpen a DNS termékek csíkjaikat egyszerűen azonosíthatjuk lánc-terminációs ágenseik szerint, intenzitásaikat összehasonlítva a közeli csíkok intenzitásaival. Ennek eredményeképpen DNS termékek két vagy több sorozatát, ahol az egyes sorozatok különböző lánc-terminációs ágensekkel bírnak, egyetlen vonalban vethetjük alá gél-permeációnak és azonosíthatjuk, azaz egymástól megkülönböztethetjük, olyan módon, hogy az egyes csíkok intenzitását összehasonlítjuk a közeli csíkok intenzitásával. Ezen kívül a DNS termékek, amelyekbe különböző lánc-terminációs ágensek vannak beépítve, szintézisét nem szükséges külön-külön elvégezni, külön edényekben, hanem együtt lehet elvégezni egyetlen reakció-edényben, és azonos jelzést, pl. radioizotóp, fluoreszcens, stb. jelzést alkalmazhatunk, ha szükséges, minden lánc-terminációs ágenshez a helyett, hogy különböző jelzéseket használnánk mindegyikhez. Ilyen módon az eljárást egyszerűsíthetjük.

Meg kell jegyeznünk azonban, hogy fokozatos csökkenés van a DNS termékek összes csíkjaiban intenzitásában, amint keresztülhatolnak a gélen; azok, amelyek a legrövidebb távolságot hidalják át, kisebb intenzitást mutatnak, mint azok, amelyek a legnagyobb távolságot hidalják át. Az egyes csíkok relatív intenzitása viszont, amikor összehasonlítjuk a közeli csíkokat bármely elhelyezkedésnél az áthatolás tengelye mentén, mindig közel azonos marad. A relatív intenzitásnak ez a megőrzése mindenütt a permeáció kiterjedése mentén teszi lehetővé a jelen találmányt.

A "közeli csíkok" kifejezés azokat a csíkokat jelenti azonos vonalon belül, amelyek 20-30 mm-re vannak a szóban forgó csík előtt vagy mögött, a permeációs tengelye mentén mérve. Általában a közeli csíkok megukban foglalják azokat a DNS termékeket, amelyek a szóban forgó DNS terméktől nem több, mint 20 bázissal különböznek (vagyis a tömeg-különbség nem több, mint mintegy 6000 dalton).

Általában a találmány érint egy DNS polimerázt a DNS szekvenciálós reakciókban való felhasználásra, amely egy szekvenciálós reakcióban olyan, csak enyhén eltérő molekulatömegű DNS termékeket hoz létre, amelyek mintegy azonos számban keletkeznek. Így amikor az ilyen DNS termékeket egy gél-mátrixon elkülönítjük, ezek olyan csíkokat képeznek, ahol a közeli csíkok közel azonos intenzitásúak. A nélkül, hogy ragaszkodnánk bármilyen adott elmélethez, a feltalálók ezt az egységességet az intenzitásban a polimeráznak tulajdonítják, amely nem különbözteti meg a normális nukleozid trifoszfátokat és a lánc-terminációs ágenseket, pl. didezoxi-nukleozid trifoszfátokat.

Az egyik szempont szerint a találmány DNS egy szálának szekvenciaelemzési eljárására irányul, ez az alábbi lépésekből áll:

a DNS szálának előállítására; a szál összeforrasztása egy olyan primerrel, amely képes hibridizálni a szálhoz, hogy egy összeforrasztott keverék keletkezzék; az összeforrasztott keverék inkubálása valamely dezoxiribonukleotid foszfáttal, valamely DNS polimerázzal és egy első lánc-terminációs ágenssel olyan körülmények között, amelyekben a polimeráz a primer meghosszabbodását idézi elő, hogy első DNS termékek első sorozatai keletkezzenek, amelyek különböznek a meghosszabbított primer hosszában, ahol az egyes első DNS termékek egy lánc-terminációs ágenssel rendelkeznek meghosszabbított végükön; az egyes első DNS termékek száma mintegy azonos lényegében az összes DNS termékénél, amely hosszában 1-20 bázisban különbözik. Az eljárás továbbá előnyösen magában foglalja az alábbi lépéseket: az első DNS termékek elkülönítése gélliparizációval molekulatömeg szerint, hogy csíkok első sorozatait kapjuk meg, ahol minden első sorozat csík egy adott molekulatömegű első DNS terméket képvisel, és ahol az egyes közeli első sorozat csíkok intenzitása csaknem azonos lényegében minden első sorozat csíknál; és az egyes első csíkok helyzetének meghatározása.

A "lényegében minden" kifejezés azt jelenti, hogy a 10-ből legalább 9 (vagy 20-ból 19) közeli kötésnek mintegy azonos intenzitása van. Azaz csak az alkalmi kötéseknek van különböző intenzitása. Ez a különböző intenzitás mesterséges termékekből ered. Ilyen mesterséges termékre példa két vagy több különböző molekulatömegű ^{DNS termék}összenyomódása egy csíkon belül. Két ilyen összenyomódást mutatunk be a 2. ábrában, ahol a mesterséges kötések csillaggal jelöljük. A "mintegy azonos" kifejezés azt jelenti, hogy a csík-intenzitás legfeljebb kétszeresére, legelőnyösebben legfeljebb

1,2-szeresére változik. A "gél-permeáció" kifejezésbe beleértjük a DNS szekvenciaelemzéshez alkalmazott meglevő poliakrilamid géleket, és bármilyen más mechanizmust DNS termékek elkülönítésére molekulatömegük alapján.

Az egyik kiviteli módban mintegy azonos intenzitású közeli csíkok előállítása érhető el olyan módon, hogy valamely DNS polimerázt inkubálunk olyan oldatban, amely mangán- vagy vas-ionokat tartalmaz.

Az egyik előnyös kiviteli módban az eljárás továbbá magában foglalja egy második lánc-terminációs ágens előállításának lépését az összeforrasztott keverékben olyan koncentrációban, amely különbözik az első lánc-terminációs ágens koncentrációjától, ahol a DNS polimeráz második DNS termékek egy második sorozatának termelését idézi elő, ahol minden második DNS termék a második lánc-terminációs ágenssel bír meghosszabbított végén, és az egyes második DNS termékek száma lényegében azonos minden DNS terméknel, amelyek hosszban 1-20 bázissal különböznek egymástól, és ahol lényegében minden első és minden második DNS termék, amely egymástól 1-20 bázis hosszúságban tér el, határozottan különböző. Legelőnyösebben a második DNS termékek második sorozata csíkok második sorozatát alakítja ki, amikor gél-permeációval különítjük el molekulatömegük szerint, ahol lényegében minden közeli második sorozat-csík intenzitása mintegy azonos, és az első sorozat lényegében összes csíkjának intenzitása határozottan és megkülönböztethetően különbözik a második sorozat egyes közeli csíkainak intenzitásától; az eljárás magában foglalja továbbá az egyes csíkok helyének és intenzitásának meghatározását, ahol az intenzitás egy adott csík-sorozat képviselője.

A "határozottan különböző" kifejezés azt jelenti, hogy egy sorozat csíkja megkülönböztethető egy közeli csíktól (vagyis olyan csíktól, amely hosszban 1-20 bázissal különbözik), amely a másik sorozatban van. Azaz egy berendezés, amely méri egy adott molekulatömegű DNS termékek számát, meg tudja különböztetni a DNS termékek két sorozatát egymástól.

Egy további előnyös kiviteli módban az eljárás magában foglalja két további lánc-terminációs ágens készítését, ahol a polimeráz második és harmadik DNS termékek második és harmadik sorozatának előállítását idézi elő, ahol az egyes második és harmadik termékek száma mintegy azonos lényegében minden olyan DNS termékénél, amelyek hosszban 1-20 bázissal különböznek egymástól, és ahol lényegében az összes első, összes második és összes harmadik DNS termék, amelyek hosszban 1-20 bázissal különböznek egymástól, száma megkülönböztethetően eltérő. Legelőnyösebben a második és harmadik DNS termékek mindegyik második és harmadik sorozata második és harmadik csíkok eltérő sorozatát képezi, amikor gél-permeációval választjuk el molekulatömeg szerint, ahol lényegében minden közeli második sorozat csík intenzitása mintegy azonos, lényegében minden közeli harmadik sorozat csík intenzitása mintegy azonos, és ahol az eltérő sorozatok lényegében összes közeli csík-jainak intenzitása megkülönböztethetően eltérő; az eljárás magában foglalja továbbá az egyes csíkok helyzetének és intenzitásának meghatározási lépéseit, ahol az intenzitás egy adott csík-sorozat képviselője.

Egy még további előnyös kiviteli módban az eljárás magában foglalja négy különböző dezoxiribonukleozid trifoszfát és négy különböző lánc-terminációs ágens előállítását az összeforrasztott

keverékben, ahol a DNS polimeráz második, harmadik és negyedik DNS termékek második, harmadik és negyedik sorozatának termelését idézi elő, ahol az egyes második, harmadik és negyedik DNS termékek száma mintegy azonos lényegében minden olyan DNS termékénél, amelyek hosszban 1-20 bázissal különböznek egymástól, és ahol lényegében az összes első, összes második, összes harmadik és összes negyedik DNS termék, amelyek hosszban 1-20 bázissal különböznek egymástól, száma megkülönböztethetően eltérő. Legelőnyösebben minden második, harmadik és negyedik sorozat második, harmadik és negyedik csíkok sorozatát alakítja ki, amikor molekulatömeg alapján gél-permeációval elkülönítjük, ahol lényegében minden közeli második sorozat csík, vagy lényegében minden közeli harmadik sorozat csík, vagy lényegében minden közeli negyedik sorozat csík intenzitása mintegy azonos, és ahol az eltérő sorozatok lényegében összes közeli csíkjainak intenzitása megkülönböztethetően eltérő; legelőnyösebben az eljárás magában foglalja továbbá az egyes csíkok helyzetének és intenzitásának meghatározási lépéseit, ahol az intenzitás egy adott csík-sorozat képviselője.

Egy további előnyös kiviteli módban az összeforrasztott keveréket mangán vagy vas-ionokkal együtt állítjuk elő, ahol ezek az ionok azt a célt szolgálják, hogy a polimeráz ne tegyen különbséget a lánc-terminációs ágensek között; a DNS termékeket molekulatömegük alapján egy gélnek kevesebb, mint négy vonalában választjuk el; az egyes csíkok intenzitását gél-leolvasó berendezéssel mérjük; a DNS polimerázt a T7-típusú polimerázok, az E. coli DNS polimeráz I nagy fragmentuma, és a Taq polimeráz közül választjuk ki; és a lánc-terminációs ágens valamely didezoxi-

nukleotid trifoszfát.

Egy rokon szempont szerint a találmány eljárást nyújt DNS egy szálának szekvencia elemzésére, ahol az eljárás az alábbi lépéseket foglalja magában: vagy (a) egy DNS polimeráz nyújtása, és a polimeráz, valamint a DNS szál inkubálása olyan oldatban, amelyben mangán- vagy vas-ion és egy lánc-terminációs ágens található; vagy (b) egy olyan DNS polimeráz nyújtása, amely lényegében nem-megkülönböztető jellegű valamely terminációs ágensre.

Egy másik rokon szempont szerint a találmány eljárást nyújt DNS polimeráz előállítására DNS szekvenciaelemzéshez, beleértve a DNS polimeráz összekeverésének lépését olyan oldatban, amely mangán- vagy vas-iont tartalmaz.

Egy további szempont szerint a találmány olyan oldatot nyújt, amelyben T7-típusú DNS polimeráz vagy valamely Taq polimeráz, valamint mangán- vagy vas-ion található. Az ion előnyösen 0,005-100 millimól/l koncentrációjú.

Egy további szempont szerint a találmány készletet nyújt DNS szekvenciaelemzéshez, amelyben DNS polimeráz, valamely lánc-terminációs ágens, és mangán- vagy vas-ion található.

Egy előnyös kiviteli módban a polimeráz T7-típusú DNS polimeráz, az E. coli DNS polimerázI nagy fragmentuma, vagy Taq polimeráz; a lánc-terminációs ágens valamely didezoxinukleotid; és a készlet tartalmaz továbbá valamely dezoxiribonukleotid trifoszfátot.

Egy további szempont szerint a találmány eljárást nyújt DNS automatizált szekvenciaelemzéséhez, ide értve egy olyan polimeráz alkalmazását, amely lényegében nem megkülönböztető jellegű valamely lánc-terminációs ágensre és olyan DNS termékek sorozá-

tának termelését idézi elő, amelyek molekulatömegükben különböznek és azonos lánc-terminációs ágenssel vannak befejezve, ahol a DNS termékek lényegében az összes közeli csíkokat azonos intenzitással állítják elő.

A "lényegében nem megkülönböztetõ" kifejezés azt jelenti, hogy a lánc-terminációs ágensek egységesen épülnek be a DNS hossza mentén, tekintet nélkül a DNS szekvenciára. A "lényegében azonos" kifejezés azt jelenti, hogy az intenzitás legfeljebb két-háromszoros szorzóval különbözik.

Egy további szempont szerint a találmány egy automatizált DNS szekvenciaelemző berendezést nyújt, amely egy reaktorból áll, amely egyedi primerből és DNS szálból képzett DNS termékek legalább két sorozatának előállítására szolgál, ahol a sorozat egyes DNS termékei molekulatömegükben különböznek egymástól és egyik végükön lánc-terminációs ágenssel bírnak; továbbá egy elkülönítő berendezésből áll a DNS termékek elkülönítésére, hogy csíkok sorozatát alkossuk meg, ahol a sorozatban lényegében az összes közeli csík intenzitása közel azonos, és lényegében az összes közeli csík intenzitása az eltérõ sorozatokban különbözõ; továbbá csík-leolvasó eszközből áll az egyes csíkok helyzetének és intenzitásának meghatározására az elkülönítés után; továbbá számítógépes berendezésből áll a DNS szál DNS szekvenciájának meghatározására közvetlenül a csíkok helyéből és intenzitásából.

Egy előnyös kiviteli módban a reaktor mangán- vagy vas-ionokat és valamely T7-típusú DNS polimerázt foglal magában.

Egy további szempont szerint a találmány oldatot vagy készletet nyújt, amely valamely pirofoszfátot, valamely DNS polimerázt, és valamely lánc-terminációs ágenszt vagy dITP-t foglal ma-

gában, továbbá eljárást nyújt DNS szekvenciaelemzésére, amely magában foglalja pirofoszfát alkalmazását a szekvenciaelemzési reakcióban. A pirofoszfát bevezetése egy szekvenciaelemzési reakcióban csökkenti a pirofoszfát szintjét és javítja a közeli csíkok csíkintenzitásának egységességét.

A fenti szempontok bármelyikében a mangán- vagy vasionokat valamely kelát, pl. citrát vagy izocitrát jelenlétében szolgáltatathatjuk. Az ilyen kelátokról úgy gondoljuk, hogy a kívánt ion szabályozottabb szintjét szolgáltatják valamely DNS szekvenciaelemzési reakcióban.

Egy utolsó szempont szerint a találmány T7 DNS polimerázt nyújt (Δ Lys118-Arg145), és nyújtja az ezt a polimerázt kódoló DNS-t. Ennek a polimeráznak nincs kimutatható exonukleáz aktivitása.

Olyan körülményeket találtunk, amelyek között a DNS polimerázokat úgy módosíthatjuk, hogy megváltoztassák képességüket egy lánc-terminációs ágens beépítésére egy primer DNS meghosszabbított terminálisánál egy DNS templát jelenlétében. Ez a képesség lehetővé teszi a kivitelezendő DNS szekvenciaelemzést lánc-terminációs ágensek kisebb koncentrációival is, így nagy mértékben csökkentve egy DNS szekvenciaelemzési reakció költségeit. Ezen kívül úgy találtuk, hogy a DNS polimerázok, amelyek ezzel a képességgel bírnak, közeli csíkokat alakítanak ki egy szekvenciáló gélben, amelyek mintegy azonos intenzitásúak. A polimeráz tehát már nem tesz különbséget jelentős mértékben a lánc-terminációs ágensek és normál dezoxinukleotid trifoszfátok között. Kimutattuk, hogy legalább három polimerázt lehet módosítani ezen az úton, ide értve egy módosított T7 DNS polimerázt, az E. coli DNS poli-

merázI nagy fragmentumát, és egy Taq polimerázot. További polimerázok, amelyek homológiával bírnak ezekhez a polimerázokhoz, szintén működhetnek a jelen találmányban.

A jelen találmány további előnye az, hogy bármilyen, egy szekvenciaelemző reakcióban alkalmazandó adott lánc-terminációs ágens koncentrációja könnyen kiszámolható, mivel a kötés-intenzitás közvetlen összefügg bármelyik lánc-terminációs ágens koncentrációjával és azonos minden ilyen ágensnél.

A jelen találmány szerinti módosított polimerázok különösen alkalmasak DNS szekvenciaelemzési reakciókhoz, mivel csak egyetlen szekvenciaelemzési reakció, amely tartalmazza mind a négy lánc-terminációs ágens négy különböző koncentrációnál, szükséges. Így kevesebb, mint négy különböző szekvenciaelemzési reakciót alkalmazhatunk bármilyen adott DNS templáthoz.

A jelen találmány más vonásai és előnyei nyilvánvalóvá válnak az előnyös kiviteli módok ez után következő leírásából és az igénypontokból.

Az alábbiakban a találmány előnyös kiviteli módjait írjuk le. Ennek keretében elsőként röviden ismertetjük az ábrákat.

Az 1. ábra a DNS szekvenciaelemzés vázlatos ismertetése Sanger és munkatársai (fentebb idézett munka) szerint.

A 2-7. ábra hat különböző szekvenciálós gél relatív csíkin-tenzitásainak grafikus ábrázolásai, ahol a gélt "Applied Biosystems Model 370A Sequencing System" rendszerben vizsgáljuk, és az egyes gél vonalak szekvenciálós reakciókeveréket tartalmaznak, amelyek genetikailag módosított T7 DNS polimeráz alkalmazásának eredményei mangán vagy magnézium és különböző didezoxinukleozidok különböző keverékeinek jelenlétében.

Ezeknek az ábráknak mindegyikében a szekvenciált DNS mGP1-2 [ez T7 RNS polimerázt kódol, lásd Tabor és munkatársai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 4767 (1987)] és a primer az Applied Biosystems fam primerje. Minden esetben a fam primerhez tartozó fel nem dolgozott (nyers) csatolást mutatjuk be. Az egyes csatolások rajtját és végét jelezzük. Ezen kívül a szekvenciák helyzeteit is bemutatjuk, tekintettel megfelelő helyükre a vad típusú T7 DNS-ben [Dunn és munkatársai: J. Mol. Biol. 8, 452 (1983)]. Az egyes grafikonokon csillaggal jelzett pontok az összenyomási területeket képviselik, ahol legalább két, különböző molekulatömegű DNS termék azonos helynél vándorol a gélen. Az összenyomásról általában írnak Tabor és munkatársai [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 4767 (1987)].

A 8. ábra a magnézium és mangán koncentrációjának optimumát bemutató grafikon a DNS polimeráz aktivitásnál, genetikailag módosított T7 DNS polimerázt alkalmazva 4,0 mmól/l izocitrát jelenlétében és távollétében.

A 9. ábra izocitrát különböző koncentrációinak hatását bemutató grafikon, 10 mmól/l magnézium vagy mangán jelenlétében, a DNS polimeráz aktivitásra, genetikailag módosított T7 DNS polimerázt alkalmazva.

A 10. ábra a pGP5-8 vázlatos térképe; ez olyan plazmid, amely egy genetikailag módosított T7 DNS polimerázt kódol, amelyből hiányoznak az aminosavak Lys118-tól Arg145-ig, és amelyből hiányzik az exonukleáz aktivitás.

A 11. ábra a jelen találmány automatizált szekvenciaelemző berendezésének diagram-szerű ábrázolása.

DNS polimeráz

A jelen találmányban alkalmas DNS polimerázok között találjuk azokat a polimerázokat, amelyek homológ polimerázok osztályába tartoznak, ide értve a T7-típusú DNS polimerázokat (pl. a T7, T3, ØI, ØII, H, W31, gh-1, Y, A1122 vagy SP6 polimerázokat), az E. coli DNS polimerázI nagy fragmentumát és a Taq polimerázot. A "homológ polimeráz" olyan enzimet jelent, amely megkülönbözteti a didezoxinukleotid trifoszfátokat a dezoxinukleotid trifoszfátoktól magnézium jelenlétében; amikor azonban a magnéziumot mangánnal helyettesítjük, a megkülönböztetés a didezoxinukleotid trifoszfátokkal szemben csökken. Ezeket a polimerázokat a DNS szekvenciaelemző reakcióban olyan körülmények között alkalmazzuk, amelyek között ezek mintegy egyforma intenzitású közeli csíkokat állítanak elő (az intenzitásban mintegy 1,5-2,0-szoros változással), amikor a szekvenciaelemző reakció DNS termékeit gélben futtatjuk. A "közeli" azt jelenti, hogy olyan csíkok vannak jelen, amelyek legfeljebb 6000 molekulatömeeggel, vagyis 20 bázissal különböző DNS termékeket képviselnek. Ennek az intenzitásnak a tényleges értéke csökkenhet a gél hosszának mentén, amint az alábbiakban leírjuk és az ábrákban bemutatjuk. A csík-intenzitás a DNS termékek számát tükrözi egy bizonyos csíkon belül. Jelzéseket, pl. fluorofórokat vagy radioizotópokat alkalmazunk, hogy olyan könnyen kimutatható intenzitású csíkokat állítsunk elő, amelyek tükrözik az ilyen DNS termékek számát. Így a jelen találmányban egy lánc-terminációs ágenssel végzett szekvenciaelemzési reakcióból származó közeli csíkok mintegy azonos számú DNS termékkel bírnak, így tehát egyforma csík-intenzitással bírnak. A szekvenciaelemzési körülmények között találjuk a polimeráz inkubálását fajlagos kétértékű vagy háromértékű kationok jelenlétében [ilye-

nek pl. a mangán (II és III), ferro- és ferri-ionok]; az egyértékű és kétértékű kationok között, amelyeknek nincs kimutatható hatása, vagy amelyek károsak a DNS szintézisre, találjuk az alábbi ionokat: K, Na, Ba, Be, Ca, Ce, Cr, Co, Cu, Ni, Si és Zn. Az anion mibenléte nem fontos, így pl. a klorid, acetát, és szulfát egyaránt alkalmas. Ezek között a körülmények között az igény láncterminációs ágensekhez, pl. didezoxinukleozidokhoz, csaknem ezredrészére csökken olyan enzimeknél, mint az E. coli DNS polimerázI nagy fragmentuma és Taq polimeráz, és mintegy tizedére csökken valamely módosított T7 polimeráznál. Egy kelát-képzőt szintén adhatunk ebbe az oldatba abból a célból, hogy segítsünk szabályozni a rendelkezésre álló kétértékű fémionok koncentrációját. Így pl. citrátot vagy izocitrátot alkalmazhatunk. Ezekről a kelátokról úgy gondoljuk, hogy fenntartják pl. a szabad mangán-ionok szintjét 10-100 $\mu\text{mol/l}$ közötti koncentrációban mangán-koncentráció széles tartományában, vagyis a kelátképző anyag pufferként működik.

A jelen találmány szerinti DNS polimerázok nem tesznek jelentős különbséget a didezoxinukleotid analógok és a dezoxinukleotidok között a DNS templát hossza mentén. Ez azt jelenti, hogy mangán vagy vas jelenlétében ezek a polimerázok nem képesek különbséget tenni egy olyan nukleotid között, amelynek 3' hidroxil csoportja van, és olyan között, amelynek nincs ilyen (vagyis a ribóz 3' helyzeténél két hidrogénje van). Ezek a polimerázok azonban meg tudják különböztetni a módosításokat más helyzeteknél a nukleozidoknál, még mangán vagy vas jelenlétében is. Így pl. a polimeráz különbséget tesz bizonyos didezoxinukleozid analógok, amelyeknek kötött fluoreszcens csoportjaik vannak, és a dezoxi-

nukleozidok között. A polimeráz azonban nem különböztet meg különböző mértékben szomszédos vagy közeli nukleotidoknál a didezoxi-nukleozidokra vonatkozó módosítás léte vagy nem léte alapján. Így miközben ezek erős különbséget tesznek ezek között az analógok között, nagyobb koncentrációt igényelve egy DNS szekvenciaelemző reakcióhoz a nem módosított didezoxinukleozidokhoz viszonyítva, a közeli csíkok intenzitása mégis egyforma lesz. Így pl. tízszeres megkülönböztetés létezik a didezoxi ITP (ddITP) és a didezoxi GTP (ddGTP) között Mn jelenlétében. Egy szekvenciaelemzési reakcióban termelt összes csík azonban azonos intenzitású ddITP-vel, mivel nincs eltérő megkülönböztetés a DNS templát hossza mentén.

Így a jelen találmány szerinti polimerázok lánc-terminációs ágensek beépülésének egyforma hatékonyságát biztosítják, még akkor is, ha ezek megkülönböztetik az általános beépülést.

A jelen találmányban alkalmazható lánc-terminációs ágensek között találjuk azokat a didezoxinukleozidokat, amelyek 2',3' didezoxi-szerkezettel rendelkeznek. A jelen találmányban alkalmas további ágensek azok, amelyek képesek fajlagosan befejezni egy DNS szekvenciáló reakciót egy adott bázisnál, és amelyek között a polimerázok nem tesznek különbséget a fenti körülmények között.

Abból a célból, hogy meghatározzuk, vajjon egy adott DNS polimeráz bármilyen adott lánc-terminációs ágenssel együtt, vagy egy szekvenciáló reakciókeverék más komponense alkalmas-e a jelen találmányban, standard szekvenciáló reakciót hajtunk végre, amint ezt alább leírjuk és ábrákban bemutatjuk, és a csík-képződés mértékét és a szekvenciáló gélben a közeli kötések egységességét feljegyezzük. Ha a polimeráz reakció nem haladja túl a primert legalább 20 bázissal, ez nem alkalmas az alkalmazott körülmények

között. A szomszédos csík-egységesség kétszeres vagy ennél kisebb eltérés mellett alkalmas a jelen találmányban, előnyösen az egységesség 1,0-1,5-szörös tartományon belül van. Hasonlóképpen az optimális kation-koncentrációt, vagy más, ebben a tartományban alkalmazható lehetséges kation meghatározását elvégezhetjük ennek a szekvenciálós reakciónak alkalmazásával különböző körülmények között. Így pl. a kationokat 0,005-100 mmól/l közti tartományban vizsgálhatjuk. Egy ilyen kísérletre példa az alábbi.

DNS szintézist mérünk egy 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3' szekvenciájú 17-mer primert (New England Biolabs, 1211 katalógusszám) alkalmazva, amely ^{32}P -vel van jelezve 5' végén és egy egyszálú mGP1-2 DNS-hez van forrasztva [Tabor és munkatársai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 4767 (1987); és Tabor és munkatársai: J. Biol. Chem. 262, 16212 (1987)].

Bármilyen más templát egyformán alkalmas ebben a reakcióban. Ezt a primer-templátot alkalmazzuk abban a reakcióban, amely egy DNS polimerázt tartalmaz valamely fémion egy koncentráció-tartományának jelenlétében. A reakciókat mind a 4 dezoxinukleotid (dNTP, 20-200 $\mu\text{mól/l}$) egy adott koncentrációjának jelenlétében és egy didezoxinukleotid (ddNTP, ebben a példában ddGTP 10-500 $\mu\text{mól/l}$ között) koncentráció-tartományában hajtjuk végre. A DNS termékeket azután poliakrilamid gélelektroforézissel elemezzük, ahol a DNS szintézist a primer termelő csíkok kiterjesztéseként mutatjuk ki a gélen, a csíkok itt a különböző molekulatömegű kiterjesztéseket képviselik.

Egy adott példában az egyes reakciókeverékek (10 μl) tartalmaznak 0,1 μg ^{32}P -primer-templátot, 40 mmól/l trisz.HCl-t (pH 7,5), 5 mmól/l ditiotreitolt (DTT), 5 $\mu\text{mól}$ -20 mmól/l fémiont,

10-500 μ mól/l 4dNTP-t, 1-500 μ mól/l ddNTP-t és 2 egység DNS poli-
merázt. Az inkubálást 37°C hőmérsékleten 15 percig végezzük. A
reakciót 10 μ l oldat hozzáadásával állítjuk le, amely 90 % forma-
midot, 50 mmól/l EDTA-t és 0,1 % brómfenol-kéket tartalmaz.

Az így létrejövő mintákat 75°C hőmérsékleten 2 percig mele-
gítjük közvetlenül az előtt, mielőtt poliakrilamid géltre (8 %
akrilamid, 0,3 % bisz-akrilamid) terhelnénk 7 mól/l karbamidot és
100 mmól/l trisz-borátot (pH 8,9) tartalmazó oldatban. A gélt
50 % metanolt és 10 % ecetsavat tartalmazó oldatban 30 percig
fixáljuk, szárítjuk és autoradiográfiához előhívjuk. Az így lét-
rejövő film egyes vonalaiban az intenzitást úgy mérjük, hogy az
egyes vonalakat denzitométerrel végigtapogatjuk. Az alkalmazott
denzitométer egy kettős sugarú regisztráló műszer [MkIIIC modell
(Joyce, Loebb and Co., Ltd., Gateshead-on-tyne, II. Anglia)]. Bár-
milyen alkalmas denzitométeres műszer működhet a gélek leolvasásá-
ra. Egy másik módszer szerint az így létrejövő csíkok egységes-
ségét olyan módon határozhatjuk meg, hogy a DNS termékeket akkor
határozzuk meg, amikor ezek elektroforézisen mennek át a gélen
belül.

Azt a képességet, hogy egy adott ddNTP beépül a megfelelő
dNTP-vel összehasonlítva, bármely enzimnél úgy mérjük, mint a
ddNTP és dNTP arányát, amely ahhoz szükséges, hogy olyan DNS szin-
tézis legyen lehetséges, amely egy rögzített tartományon belül
fejeződik be; csak azokat a létrejött csíkokat mérjük, amelyek
egy rögzített molekulatömegnél nem nagyobbak. Ez azt jelenti, hogy
a reakcióban kialakított csíkok egy megadott tartományon belül
befejeződnek a szekvenciáló gélben. Így ha egy enzim ezerszer
nagyobb szorzójú különbséget tesz egy adott ddNTP-re egy másik

enzimhez viszonyítva, a ddNTP-nek ezerszer nagyobb aránya szükséges dNTP-re vonatkoztatva, hogy olyan csíkokat kapjunk, amelyek a megfelelő helyeken fejeződnek be a gél azonos tartományában.

Mangán (Mn)

Az alábbiakban egy sor példát adunk valamely módosított T7 DNS polimeráz vagy az E. coli DNS polimeráz I nagy fragmentuma alkalmazásáról DNS szekvenciáló reakciókban a szekvenciáló pufferben jelen levő Mn-nel. Ezek a példák nem korlátozó jellegűek erre a találmányra és egyszerűen csak azért adjuk meg ezeket, hogy azok számára, akik a szakterületen jártasak, irányvonalat adjunk a jelen találmány szerinti DNS polimerázok alkalmazásáról. Amint fentebb leírtuk, azok, akik a szakterületen jártasak, könnyen tudnak más olyan körülményeket meghatározni, amelyek között a jelen találmány szerinti DNS polimerázokat elő lehet állítani, ahol ezek a DNS polimerázok az itt leírt tulajdonságokat nyújtják a lánc-terminációs ágens egységessége és egy szekvenciáló reakcióban való alkalmazhatósága tekintetében.

Az alábbi példákban alkalmazott speciális, módosított T7 DNS polimeráz genetikailag úgy van módosítva, hogy ne rendelkezék kimutatható exonukleáz aktivitással. Ezt a genetikailag módosított DNS polimerázt Δ Lys118-Arg145(Δ 28)-nak nevezzük, mivel a Lys118 és Arg145 közti aminosav-terület a T7 DNS polimerázban ki van iktatva. Az ezt a polimerázt kódoló gént pGP5-8 plazmidben alkotjuk meg; ez a pGP5-5 plazmid (amelyet Tabor és munkatársai írtak le az alábbi helyen: 4,795,699 lajstromszámú amerikai egyesült államok-beli szabadalmi leírás) egyik változata.

A 10. ábrára utalva a pGP5-8 magában foglalja a pACYC177-et a BamHI és HincII helyeknél bevágva, a T7 DNS-t az 5667 és 6166 bázisok között, amely tartalmazza a \emptyset 1.1A-t és \emptyset 1.1B-t, és a T7

DNS-t a 14,306 és 16,869 bázisok között, amely tartalmazza az 5. gént a 10. ábrában bemutatott módosításokkal. A pGP5-8-at úgy alkotjuk meg, hogy először szintetizáljuk az 5'-CCGGCAAGTTGCCCG GATGCTCGAGGAGCAGGG-3' képletű 34-mert. Ezt az oligonukleotidot alkalmazzuk primerként a DNS szintézishez M13 mPG5-2 egyszálú DNS-én, amely olyan beiktatást tartalmaz, amely T7 5.gént kódol, amint ezt Tabor és munkatársai leírták (fentebb idézett munkák). A DNS szintézist és a mutáns-szelekciót úgy végezzük, amint ezt Tabor és munkatársai leírták (fentebb idézett munkák). Az mGP5-2-ben kívánt mutáció létrehozása után a T7 5.gén megfelelő területét, amely a 84 bp-s kiiktatást tartalmazza, beiktatjuk a pGP5-5-be olyan módon, hogy egy EcoRI-HpaI fragmentumot, amely tartalmazza a T7 DNS-t a 14,306-15,610 helyek között, ide értve a 84 bp-s kiiktatást is, izolálunk és ezt a pGP5-5 hasonló területébe ligáljuk. A pGP5-8 származékról igazoljuk, hogy tartalmazza a kiiktatást, az igazolást az SmaI és XhoI helyek, amelyek mutagenézis révén alakulnak ki, jelenlétével és a 84 bp-s kiiktatást tartalmazó terület DNS szekvenciaelemzésével végezve. A pGP5-8-at a K38/pTrx-3 törzsbe transzformáljuk, így alkotjuk meg a K38/pTrx-3/pGP5-8 törzset. A K38/pTrx-3/pGP5-8 indukálását és a genetikailag megváltozott T7 DNS polimeráz tisztítását azonos munkamenetet alkalmazva hajtjuk végre, mint amelyet Tabor és munkatársai (fentebb idézett munka) az analóg K38/pTrx-3/pGP5-5 törzsnél leírtak. Mivel ez a polimeráz nem rendelkezik kimutatható exonukleáz aktivitással, arra a kémiai módosításra, amelyet Tabor és munkatársai (fentebb idézett munka) leírtak, nincs szükség a DNS szekvenciálós reakcióban való alkalmazás előtt. Az alábbi példákban alkalmazott, genetikailag módosított T7 DNS polimeráz 1000 egység/ml ak-

tivitással bíró készítmény.

1. példa

Standard DNS szekvenciáló reakció munkamenetet alkalmazunk a DNS szekvenciáláshoz Mn jelenlétében. A T7 DNS polimerázhoz az általános szekvenciáló lépéseket részletesen leírják Tabor és munkatársai (fentebb idézett munka). Röviden a lépések és feltételek az alábbiak.

A. Összeforrasztási reakció

Az összeforrasztási reakcióban az alábbi oldatot készítjük el:

Szekvenciálendő DNS (pl. mGP1-2 DNS) 10 mmól/l	
trisz.HCl-t (pH 7,5) és 0,1 mmól/l EDTA-t tartalmazó oldatban, 2 μ g/7 μ l	7 μ l
5xSeqBuf [200 mmól/l Trisz.HCl (pH 7,5), 5 mmól/l MnCl ₂ , 250 mmól/l NaCl]	2 μ l
Primer (New England Biolabs-17 mer, 1210. katalógusszám, 0,5 pmól/ μ l)	1 μ l
	<hr/>
	10 μ l

Ezt az oldatot 65°C hőmérsékleten 2 percig melegítjük, majd lassan lehűtjük szobahőmérsékletre.

B. Jelzési reakció

A jelzési reakcióban a következő oldatot készítjük el:

Összeforrasztási reakciókeverék	10 μ l
Ditiotreitol, 0,1 mól/l	1 μ l
[³⁵ S]dATP, New England Nuclear NEG-034H	1 μ l
dTTP, dCTP, dGTP, 1,5-1,5 mól/l	2 μ l
Genetikailag módosított T7 DNS polimeráz, 1 egység/ 1 (Δ Lys118-Arg145, amint	

fentebb leírtuk)

$$\frac{2 \mu\text{l}}{16 \mu\text{l}}$$

Ezt szobahőmérsékleten inkubáljuk 5 percig.

C. Befejezési (terminációs) reakció

A befejezési reakciókban négy reakciókeveréket készítünk az alábbiak szerint.

	G	A	T	C
5xSeqBuf	0,6	0,6	0,6	0,6 μl
4dNTP (3 mmól/l)	0,3	0,3	0,3	0,3 μl
H ₂ O	1,9	1,9	1,9	1,9 μl
ddGTP 0,2 mmól/l				
(dd = didezoxi)	0,2 μl			
ddATP 0,2 mmól/l		0,2 μl		
ddTTP 0,2 mmól/l			0,2 μl	
ddCTP 0,2 mmól/l				0,2 μl
	-----	-----	-----	-----
	3	3	3	3 μl

A befejezési keveréket 37°C hőmérsékleten 2 percen át inkubáljuk, majd a kiegészített jelző reakciókeverék 3 μl -es alikvotjait adjuk az egyes befejezési keverékekhez. Az így létrejövő oldatot 37°C hőmérsékleten 5 percig inkubáljuk.

A befejezési reakciót 5 μl alábbi oldattal állítjuk le: 90 % formamid, 20 mmól/l EDTA, 0,2 % brómfenolkék, xilén-cianol, (pH 8,0). Az így létrejövő mintákat 75°C hőmérsékleten két percig melegítjük, poliakrilamid géltre terheljük (8 % akrilamid, 0,3 % bisz-akrilamid) 7 mmól/l karbamidot és 100 mmól/l trisz-borátot (pH 8,9) tartalmazó oldatban, és elektroforézisnek vetjük alá 2000 voltnál 2 órán át. A gélt 50 % metanolt és 10 % ecetsavat tartal-

mazó oldatban rögzítjük 30 percig, majd szárítjuk és felhasználjuk, hogy filmre tegyük autoradiográfiával.

A filmre tett gélt előhívjuk és a radioaktív csíkok intenzitását az egyes vonalakban meghatározzuk olyan módon, hogy az egyes vonalakat denzitométerrel (Joyce, Loeb and Co., Ltd, MkIIIIC modellszám) letapogatjuk.

Amikor ugyanaz a minta fut magnézium jelenlétében mangán helyett, az aláhúzott bázisok az alábbi triplettekben 2-5-ször intenzívebbek, mint a szomszédos bázisok, bárhol is tűnjenek fel ezek a triplettek: TCT, AAG, GCA, CCT. Az éppen leírt példában azonban az egyes bázisoknak megfelelő csíkok az összes éppen bemutatott triplettben azonos intenzitással bírnak, legfeljebb 20 %-ban térve el egymástól.

2. példa. Szekvenciálós reakciók mangánt, 2xdddGTP-t és 1xdddCTP-t alkalmazva, hogy különbséget tegyünk G és C között relatív csík-intenzitásokkal

Ebben a példában csak egyetlen edényt használunk, hogy véghezvigyünk egy szekvenciálós reakciót bázisok (nevezetesen C és G) két típusa szekvenciájának meghatározására egy DNS templátban. A lépések az alábbiak:

Az összeforrasztási reakcióban az alábbi oldatot készítjük el: mGP1-2 DNS [2,7 mmól/l az alábbi oldatban:

10 mmól/l trisz.HCl(pH 7,5), 0,1 mmól/l EDTA]	8,6 μ l
5xSeqBuf	4 μ l
Primer (ABI fam primer, 0,4 pm/ μ l)	2 μ l
H ₂ O	5,4 μ l
	<hr/>
	20 μ l

Ezt az oldatot 65°C hőmérsékleten 2 percig melegítjük, majd lassan lehűtjük szobahőmérsékletre. A fam primert fluoreszcens jelzéssel látjuk el, amelyet meghatározhatunk, amikor ez keresztülhatol egy szekvenciáló gélen, az "ABI Model 370 A DNA Sequencing System" rendszert alkalmazva.

A kiterjesztési reakcióban az alábbi oldatot állítjuk elő.

Összeforrasztási reakciókeverék	20 μ l
Ditiotreitol, 0,1 mól/l	1 μ l
4 dNTP, 3 mmól/l	3 μ l
ddGTP, 30 μ mól/l	3 μ l
ddCTP, 30 μ mól/l	1,5 μ l
	<hr/>
	28,5 μ l

Az oldatot 37°C hőmérsékleten inkubáljuk 2 percig, 1,5 μ l genetikailag módosított T7 DNS polimerázt [(A28)(1 egység/ μ l)] adunk hozzá, és az oldatot 37°C hőmérsékleten inkubáljuk 10 percig. A reakciót 5 μ l, 100 mmól/l-es EDTA (pH 8,0) hozzáadásával állítjuk le.

Az így létrejövő fragmentumokat az alábbiak szerint csapjuk ki. Az oldathoz 3,5 μ l 3 mól/l-es nátrium-acetátot és 100 μ l 100 %-os etanolt adunk. Jégen végzett 10 perces inkubálás után a keveréket 30 percig centrifugáljuk 4°C hőmérsékleten mikrocentrifugában. Az üledéket 500 μ l 70 %-os etanollal mossuk, és ismét centrifugáljuk 5 percig. A felülúszót dekantáljuk és az üledéket centrifugálással szárítjuk vákuum alatt néhány percig. A mintát azután újra szuszpendáljuk 5 μ l, 90 %-os formamidot és 50 mmól/l EDTA-t (pH 8,0) tartalmazó oldatban, 75°C hőmérsékleten 2 percig melegítjük és ráterheljük "ABI Model 370A DNA Sequencing System" készülékre. A készüléket futtatjuk és a fel nem dolgozott (nyers)

adatokat összegyűjtjük, amint ezt a fenti 370A modell berendezés-szolgáltató felhasználói kézikönyv (Előzetes változat, 1987. március, 3., 4. és 5. fejezet) leírja. A fel nem dolgozott (nyers) kimenő jeleket csak a fam primernél mutatjuk be.

A kimenő jeleket ebből a reakcióból a 4. ábrában mutatjuk be. Minden G-t egy hosszú csúcs és minden C-t egy rövid csúcs képvisel. Így a G-k és C-k szekvenciája a DNS-ben meghatározható a csúcsmagasságokból. Így egy szekvenciálós reakcióból, az összes DNS termékhez csak egyetlen alkalmazott jelzéssel a G-k és C-k DNS szekvenciája meghatározható. A csúcsmagasságok a gél hossza mentén csökkennek, mivel a nagyobb molekulatömegű termékek kisebb mennyiségben vannak jelen. A különbség azonban egy közeli G és C között 2-szeres körül marad a gél mentén, míg egy pár közeli G vagy egy pár közeli C különbsége mintegy azonos (1,1-1,4-szeres között változva), korrigálva a csökkenést az intenzitásban az egyes további helyzeteknél a szekvencia mentén. Így pl. a 4. ábrában a jel felére csökken csíkok egy sorozatánál mintegy 60 bázis periódusán keresztül. Így 1,16 %-os csökkenés van, amely az egyes további helyeknek tulajdonítható a templát mentén ebben a példában (mivel a $\chi_{1,0116} \chi_{60} = 2$ -nél).

Fontos különbséget tenni a különböző intenzitású csíkok között, vagyis azok között, amelyek a lánctermináció különböző hatékonyságának tulajdoníthatók a közeli kötéseken belül, és azok között, amelyek két vagy több kötésből alakulnak ki, amelyek együtt vándorolnak az elektroforézis során. Az utóbbi esemény, amelyet összenyomásnak nevezünk, a gélelektroforézis mesterséges terméke és nem magának a DNS szekvenciálós reakciónak a terméke, és nem tűnik el magánt alkalmazva. Egy ilyen összenyomásra példát je-

lölünk meg csillaggal (*) a 4. ábrában. Ha valaki tudja, hogy egy ilyen összenyomás két DNS termék együtt-vándorlását képviseli, mint ahogyan ezt a 4. ábrában jelöljük is, akkor ez a csík pontos jelzője a kétszeres intenzitású csíknak.

A pontos szekvenciát az összenyomás területében nem lehet meghatározni. Abból a célból, hogy meghatározzuk ezt a szekvenciát, szükséges vagy 1.) meghatározni a szekvenciát a fordított orientációban, 2.) a szekvenciáló gélt erősebb denaturáló körülmények között futtatni, vagyis magasabb hőmérsékleten vagy 50 % formamid hozzáadásával, vagy 3.) egy nukleotid analógot, pl. dITP vagy deazaGTP, alkalmazni dGTP helyett. Az összenyomódás stabil "hajtúk" képződésének következménye a DNS-ben a gélelektroforézis körülményei között; ezen nukleotid analógok beépülése destabilizálja ezeknek a hajtúknak legtöbbszörét.

A hajtú szerkezeteknek tulajdonítható összenyomódás tulajdonképpen bármilyen hosszúságú lehet, a hajtú terjedelmétől és erősségétől függően. Így Mn-nel az összes közeli csík az azonos molekulatömegű DNS termékek mintegy azonos számával bír, de nem szükségszerűen rendelkezik azonos kötés-intenzitással az összenyomás következtében.

A 2. ábrára utalva a fenti eljárást történetesen ddGTP-vel alkalmazzuk mangán jelenlétében (1 mmól/l végső koncentráció). Az így létrejövő gélen minden csík csúcsként jelenik meg a 2. ábrában. Egy csík intenzitását az egyes csúcsok magassága tükrözi. Mangánnal a közeli csík intenzitások és így a csúcsmagasságok mintegy azonosak a gél mentén, a közeli csíkoknál kevesebb, mint 5-10 %-kal különbözve.

Ezzel ellentétben a 3. ábrában bemutatott kimenetek ugyanazt

a kísérleti futamot képviselik, de magnézium jelenlétében mangán helyett. Itt a közeli csík-intenzitások és így a csúcsmagasságok akár 10-szeres szorzóval is változnak.

Az 5. ábrára utalva, ahol mind a négy didezoxinukleotidot azonos koncentrációkkal ($0,75 \mu\text{mól/l}$ végső koncentráció mindegyik ddNTP-re, mint a 2. példában) alkalmazunk egy szekvenciálós reakcióban mangán jelenlétében, a közeli csíkok és a megfelelő csúcsok mintegy egyformák, nem változva nagyobb mértékben, mint 1,5-szörösen; a nagyobb molekulatömegű DNS termékek abszolút intenzitása itt is csökken. Ezzel ellentétben a magnézium és mind a négy didezoxinukleotid jelenlétében a közeli csíkintenzitás nagy mértékben változó, amint ezt a 6. ábrában bemutatjuk.

Az egyes ddNTP-k koncentrációját változtatva egy szekvenciálós reakcióban a DNS egy szálának teljes nukleotid szekvenciáját meghatározhatjuk. Ilyen eljárásra a 7. ábrában mutatunk példát, ahol az egyes ddNTP-k koncentrációja 30 %-os intervallumokkal különbözik: ddGTP($4,5 \mu\text{mól/l}$; 2,2x), ddATP($3,0 \mu\text{mól/l}$; 1,7x), ddTTP($2 \mu\text{mól/l}$; 1,3x), és ddCTP($1,4 \mu\text{mól/l}$; 1,0x). Az ebből a grafikonból meghatározott DNS szekvenciát alul a második sorban mutatjuk be ebben az ábrában. Csak 6 hibát (amelyeket 'v'-vel ábrázolunk) követtünk el a tényleges DNS szekvenciához viszonyítva. Ezeket a hibákat ki lehet küszöbölni az egyes ddNTP-k nagyobb hányadosait alkalmazva (pl. 1xddCTP, 2xddGTP, 4xddATP és 8xddGTP). Hasonlóan a csúcsmagasságok helyett a csúcsterületeket mérve az eredmények pontosabbak. Számítógépes program az ilyen csúcsterületek mérésére könnyen írható a meglévő DNS szekvenciálós berendezésekhez.

A 8. ábrára utalva a mangán optimális koncentrációja egy

szekvenciáló reakcióban 1 mmól/l, valamely kelátképző, pl. citrát vagy izocitrát távollétében, 20 mmól/l magnéziummal összehasonlítva. Amikor a reakcióban 40 mmól/l izocitrát van jelen, a polimeráz aktivitás mangán jelenlétében négyszeresre stimulálódik és az optimális mangánkoncentráció 5-20 mmól/l. A 9. ábrára utalva 10 mmól/l mangánkoncentrációnál az optimális izocitrát koncentráció 40 mmól/l, ez a polimeráz aktivitás négyszeres stimulálását eredményezi. 10 mmól/l magnéziumkoncentrációnál bármilyen mennyiségű izocitrát gátló hatással bír a polimerázra. Ezeket az eredményeket úgy kapjuk meg, hogy a polimeráz reakciókat különböző kelátképző- és ionkoncentrációk jelenlétében hajtjuk végre, amint a későbbiekben leírjuk. Részletesen, a reakciókeverékek (200 μ l) 40 mmól/l trisz.HCl-t (pH 7,5), , 5 mmól/l ditiotreitolt, 0,5 mmól/l denaturált borjú tímusz DNS-t, 0,3-0,3 mmól/l dGTP-t, dATP-t, dCTP-t és [3 H] dTTP-t (20 cpm/pmól), 50 μ g/ml BSA-t (szarvasmarha szérum albumin) és megadott koncentrációjú $MgCl_2$ -t, $MnCl_2$ -t vagy nátrium-izocitrátot tartalmaznak. A reakciókat 0,1 egység genetikailag módosított T7 DNS polimeráz (Δ Lys118-Arg145) hozzáadásával indítjuk be. Az inkubálást 37°C hőmérsékleten 30 percig végezzük. A reakciókat 3 ml, 1 n HCl-t és 0,1 mól/l nátrium-pirofoszfátot tartalmazó oldat hozzáadásával állítjuk le, és a savoldhatatlan radioaktivitást meghatározzuk. 1 egység DNS polimeráz 10 nmól teljes nukleotid beépülését katalizálja sav-oldhatatlan formában 30 perc alatt, a vizsgálat körülményei között [Tabor és munkatársai: J. Biol. Chem. 262, 16212 (1987)].

Pirofoszfátáz

Amikor kémiaailag módosított T7 DNS polimerázt alkalmazunk a DNS szekvenciáláshoz, bizonyos fragmentumok eltűnnek a hosszan-

[tartó inkubálás során Tabor és Richardson: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 4767 (1987)]. Utalunk azokra a helyekre, ahol ez "szakadás"-ként jelentkezik, mivel ez a munkafolyamat térközt képez a szekvenciáló gélben. A szakadások gyakrabban jelentkeznek, amikor dITP-t alkalmazunk dGTP helyett.

Egy adott fragmentum elbomlása nyilvánvalóan gondot jelent a DNS szekvenciáló gélek leolvasásában. Egy fragmentum távolléte vagy teljesen elmulasztódik, kihagyást idézve elő a meghatározott szekvenciában, vagy egy szakadást figyelünk meg, amelyet csak ismeretlen bázisként lehet értelmezni annál a helynél.

A jelenlegi megoldás erre a problémára rövid reakcióidőt tartani. Ez azonban két okból nem kielégítő. Először ez a reakciók elvégzését technikailag nehezebbé teszi, mivel kényszerítve vagyunk nagyon gyorsan dolgozni abból a célból, hogy befejezzük a reakciókat alig valamivel ezután, hogy elkezdődtek. Még fontosabb azonban az, hogy bizonyos csíkok különösen érzékenyek erre az elbomlásra, és még nagyon gyors reakcióidők alatt is eltűnnek.

A T7 DNS polimeráz olyan genetikailag módosított formáját alkotjuk meg ($\Delta 28$, amint fentebb leírtuk), amely nem rendelkezik kimutatható szinten exonukleáz aktivitással ($< 10^{-7}$ a vad-típusú enzim szintjéhez viszonyítva, vagy több, mint 10000-szer kisebb aktivitású, mint a kémiaailag módosított T7 DNS polimeráz). Úgy véltük, hogy mivel a szakadások a hosszan tartó inkubálással jelennek meg, ezek valószínűleg az exonukleáz aktivitásnak tulajdoníthatók, és így bizonyára nem fordulnak elő, amikor a T7 DNS polimeráznak ezt a genetikailag módosított formáját alkalmazzuk. A fentebb említett radioaktív fragmentumok azonban mégis ugyanolyan sebességgel tűnnek el, amikor akár kémiaailag, akár geneti-

kailag módosított T7 DNS polimerázt alkalmazunk.

Meghatároztuk, hogy az adott kötéseknél ez az elvesztése a polimeráz pirofoszforolízis aktivitásának tulajdonítható. Ez az aktivitás nem a DNS polimeráz exonukleáz aktivitásának, hanem a polimeráz aktivitás megfordulásának tulajdonítható; pirofoszfát (PPi) jelenlétében a polimeráz PPi-t ad annak a terminális nukleotidnak, amely a lánc 3'-terminálisánál helyezkedik el, jelen esetben egy didezoxinukleozid 5'-trifoszfátot bocsátva ki [lásd általában: Deutscher és munkatársai: J. Biol. Chem. 244, 3019 (1969); és Kornberg: DNA Replication, 125-126 oldal (kiadó: Freeman and Co. SF)]. Ez a reakció hatással van a blokkolás eltávolítására a 3' terminálison, lehetővé téve a szintézis kiterjesztését tovább a templát mentén. A PPi normálisan a DNS szintézis reakciókeverékben gyülemlik fel, mivel ez a polimerizációs reakció terméke. A pirofoszforolízis helye DNS-szekvencia-függő, és így a fentebb leírt szakadások csak speciális helyeken alakulnak ki.

Abból a célból, hogy ezt a problémát leküzdjük, a pirofoszforolízises reakciót gátolnunk kell. A pirofoszforolízis gátlásának egyik útja a pirofoszfát elbontása, ahogyan a polimeráz reakcióban keletkezik, pirofoszfátáz enzimet adva. Egy másik megoldás magában foglalja a pirofoszfát megváltoztatását más enzimes reakciókban, vagy a pirofoszforolízis reakció megakadályozását egy olyan analóg hozzáadásával, amely gátolja a DNS polimeráz aktivitását. Úgy találtuk, hogy ebből az enzimből akár nyomnyi mennyiség (egy ezred molarány a DNS polimeráz molekulához viszonyítva) hozzáadása is a szekvenciáló reakciókhoz teljes mértékben stabilizálja a fentebb említett fragmentumok speciális

osztályát és kiküszöböli a szakadások kialakulását. Amikor a T7 DNS polimeráz genetikailag magváltozott formája ($\Delta 28$) és pirofoszfát egyaránt van jelen, az összes csík stabil még megnyújtott idejű inkubáláskor (több, mint 2 óra) is.

Az automatizált szekvenciaelemzésnél, különböző csíkintenzitásokat alkalmazva, kritikus, hogy az egyes csíkok intenzitását csak a ddNTP^{-dNTP} aránnyal határozzuk meg. A pirofoszforolízis félreértéseket okozhat, bizonyos csíkok intenzitásának csökkentésével. Így a pirofoszfát hozzáadása különösen hasznos ebben a szekvenciáló eljárásban.

A pirofoszfátot akkor kell adnunk, amikor kémiaailag vagy genetikailag módosított T7 DNS polimerázt vagy más polimerázokat alkalmazunk a szekvenciaelemzéshez; legalább olyan mennyiséget kell adnunk, amely keletkezett P_i hidrolízisének katalíziséhez elegendő olyan sebességgel, amely megakadályozza a P_i felgyülemelését olyan szinten, amely pirofoszforolízishez vezethet. Ez különösen akkor igaz, amikor dITP-t alkalmazunk dGTP helyett, amely esetben a pirofoszforolízis reakciónak tulajdonítható szakadások megjelenése nagyobb mértékben történik meg.

3. példa Munkamenet pirofoszfátot alkalmazva a szekvenciáló reakcióban

Ebben a példában normális szekvenciáló munkamenetet követünk. Az egyetlen módosítás az, hogy élesztő szerves pirofoszfátot alkalmazunk. A pirofoszfát forrása nem fontos, ebben a példában azonban Sigma élesztő szerves pirofoszfátot (I-4503 katalógusszám) alkalmazunk további tisztítás nélkül, vagy FPLC mono Q oszlopon tovább tisztítva, vagy Worthington élesztő szerves pirofoszfátot alkalmazunk további tisztítás nélkül. A pi-

rofoszfátot a módosított T7 DNS polimerázhoz adjuk, mielőtt a polimeráz a jelzési reakciókeverékhez adnánk. Tipikusan 2 egység (0,25 μg) polimeráz alkalmazunk szekvenciáló reakciókészletenként, és 0,001 egység élesztő szervesetlen pirofoszfátot (4 ng). A pirofoszfát aktivitás széles tartománya működik sikeresen: 0,01 ng - 1 μg élesztő pirofoszfát/szekvenciáló reakció tartományt vizsgáltunk át sikerrel.

Így pl. az összeforrasztási reakcióban az alábbi oldatot készítjük el:

mGP1-2 DNS [10 mmól/l trisz.HCl (pH 7,5), 0,1 mmól/l EDTA]	7 μl
5xSeqBuf	2 μl
Primer (New England Biolabs 17-mer, 0,5 pmól/l, katalógusszám: 1211)	$\frac{1 \mu\text{l}}{10 \mu\text{l}}$

Ezt az oldatot 65°C hőmérsékleten 2 percig melegítjük, és lassan lehűtjük szobahőmérsékletre.

A jelzési reakcióban az alábbi oldatot készítjük el:

Összeforrasztási reakciókeverék	10 μl
Ditiotreitol, 0,1 mól/l	1 μl
³⁵ S. dATP, New England Nuclear NEG-034H	1 μl
3 dNTP (1,5-1,5 $\mu\text{mól/l}$ dTTP, dCTP, 3 $\mu\text{mól/l}$ dITP)	2 μl
Enzimkeverék (lásd később)	2 μl
	<hr/>
	16 μl

Enzimkeverék:

Genetikailag módosított T7 DNS polimeráz

(Δ Lys118-Arg145) 1 egység/ μl

Élesztő szervesetlen pirofoszfát olyan oldatban,
amely 20 mmól/l trisz.HCl-t (pH 7,5), 10

mmól/l β -merkapto-etanolt és

50 μ g/ml szarvasmarha szérum

albumint tartalmaz

0,01 egység/ μ l

Ezt az oldatot szobahőmérsékleten 5 percig inkubáljuk.

A terminációs reakciókban az alábbi négy reakciókeveréket készítjük el.

	G	A	T	C
5xSeqBuf (lásd korábban)	0,6	0,6	0,6	0,6 μ l
4dNTP (3-3 mmól/l dATP, dTTP, dCTP, és 6 mmól/l dITP)	0,3	0,3	0,3	0,3 μ l
H ₂ O	1,9	1,9	1,9	1,9 μ l
ddGTP 0,03 mmól/l	0,2 μ l			
ddATP 0,2 mmól/l		0,2 μ l		
ddTTP 0,2 mmól/l			0,2 μ l	
ddCTP 0,2 mmól/l				0,2 μ l
	3	3	3	3 μ l

Ezeket a terminációs keverékeket 37°C hőmérsékleten 2 percig inkubáljuk, és a jelzési reakciókeverékből 3 μ l-es alikvotokat adunk az egyes terminációs keverékekhez. Az így létrejövő oldatokat 37°C hőmérsékleten 60 percig inkubáljuk.

Az egyes terminációs reakciókat 5 μ l olyan oldat hozzáadásával állítjuk le, amely 90 % formamidot, 20 mmól/l EDTA-t, 0,2 % brómfenolkéket és xilén-cianolt (pH 8,0) tartalmaz.

Az így létrejött mintákat 75°C hőmérsékleten 2 percig melegítjük, poliakrilamid géltre (8 % poliakrilamid, 0,3 % bisz-akrilamid) terheljük 7 mól/l karbamidot és 100 mmól/l trisz-borátot tartalmazó oldatban, és elektroforézisnek vetjük alá 2000 voltnál 2

órán át. A gélt 50 % metanolt és 10 % ecetsavat tartalmazó oldatban fixáljuk 30 percig, szárítjuk, és film exponálásához alkalmazzuk autoradiográfiával.

Berendezés

A 11. ábrára utalva, a 100 berendezés, amely alkalmas az automatizált DNS szekvenciáláshoz, magában foglal egy 102 reaktort, amelyben a fentebb leírt 104 reagensek, pl. DNS polimeráz, mangán- vagy vas-ionok, kelátképzők és pirofoszfátáz foglaltatnak. A berendezés el van látva 106 gél-dobozzal a DNS termékek elkülönítésére molekulatömegük alapján, és egy 108 gél-leolvasó berendezéssel a DNS termékek kimutatására, amint keresztülhatolnak a gélen (a 107 szaggatott nyíllal bemutatva). Található benne továbbá egy 110 számítógépes egység is a DNS terméket csíkjai intenzitásának és a csíkok egymáshoz viszonyított elhelyezkedésének kiszámítására. Ha a DNS termék egy csíkban fut, akkor a számítógépes egység képes kiszámítani a DNS szekvenciát a csíkintenzitásból és elhelyezkedésből. Standard számítógépes programokat alkalmazunk ennek a feladatnak a megoldásához.

További kiviteli módok találhatóak az alábbi szabadalmi igénypontokban.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1.) Eljárás DNS egy szálának szekvenciaelemzésére, amely az alábbi lépéseket foglalja magában:

a DNS említett szálának szolgáltatása,
 az említett szál összeforrasztása olyan primerrel, amely képes hibridizálni az említett szállal, és így összeforrasztási keverék kialakítása, és

az említett összeforrasztott keverék inkubálása valamely dezoxiribonukleozid-trifoszfáttal, valamely DNS polimerázzal, és valamely első lánc-terminációs ágenssel, azzal jellemezve, hogy az említett inkubálást olyan körülmények között hajtjuk végre, amelyben az említett polimeráz előidézi, hogy az említett primer meghosszabbított legyen, így első DNS termékek első sorozatát képezzük, amely termékek a meghosszabbított primer hosszában különböznek, ahol minden említett első DNS terméknek említett lánc-terminációs ágense van meghosszabbított végén, és ahol az egyes említett első DNS termékek mennyisége mintegy azonos lényegében az összes DNS termékénél, amely hosszában 1-20 bázissal különbözik.

2.) Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy elvégezzük az alábbi további lépéseket is:

az említett első DNS termékeket molekulatömegük szerint gélpermeációval elkülönítjük és így csíkok első sorozatát képezzük, ahol minden említett első sorozat csík egy adott molekulatömegű említett első DNS terméket képvisel, és ahol az egyes közeli első sorozat csíkok intenzitása mintegy azonos lényegében minden említett első sorozat csíknál, és

az egyes említett első sorozat csíkok helyzetét meghatározzuk

zuk.

3.) Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy 1-3 további különböző lánc-terminációs ágenszt szolgáltatunk az említett összeforrasztási keverékben, mindegyiket olyan koncentrációban, amely különbözik minden más lánc-terminációs ágens koncentrációjától, ahol az említett DNS polimeráz előidézi, hogy további DNS termékek 1-3 további sorozat alakuljon ki, ahol minden további sorozat DNS termékei az említett további lánc-terminációs ágensek valamelyikével bírnak meghosszabbított végükön, ahol az említett további DNS termékek, amelyek azonos lánc-terminációs ágenssel bírnak, mindegyikének mennyisége lényegében azonos minden hosszúságnál 20 bázison belüli tartományban, és határozottan különböző minden olyan DNS termék mennyiségétől, amely eltérő lánc-terminációs ágenssel bír és eltérő sorozatban van, de mintegy azonos molekulatömegű.

4.) A 3. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy elvégezzük az alábbi további lépéseket is:

az említett összes DNS terméket molekulatömegük szerint géll-permeációval elkülönítjük és így csíkok összesen 2-4 sorozatát képezzük, ahol egy sorozat minden említett csíkja olyan DNS terméket képvisel, amely azonos lánc-terminációs ágenssel bír, mint az összes többi csík az említett sorozatban és egy megadott molekulatömeggel bír, ahol az egyes közeli csíkok intenzitása azonos sorozaton belül mintegy azonos és határozottan különböző egy eltérő sorozat minden közeli csíkjának intenzitásától, és

az egyes sorozatok egyes csíkjainak helyét és intenzitását meghatározzuk.

5.) Az előző igénypontok bármelyike szerinti eljárás azzal jel-

lemezve, hogy az említett összeforrasztási keveréket mangán- vagy vas-ionnal nyújtjuk, ahol az említett ionok azt idézik elő, hogy az említett polimeráz nem tesz különbséget az említett lánc-terminációs ágensek között.

6.) Az előző igénypontok bármelyike szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett polimerázként T7-típusú DNS polimerázt, vagy az E. coli DNS polimerázI nagy fragmentumot, vagy Taq polimerázt alkalmazunk.

7.) Az előző igénypontok bármelyike szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett lánc-terminációs ágensként valamely didezoxinukleotid trifoszfátot alkalmazunk.


8.) Az előző igénypontok bármelyike szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett összeforrasztó keverékben kelát-képzőt is szolgáltatunk.

9.) Készlet DNS szekvenciaelemzésben való felhasználáshoz, amely valamely DNS polimerázt és valamely lánc-terminációs ágenszt szolgáltat, azzal jellemezve, hogy mangán- vagy vas-iont is tartalmaz.

10.) A 9. igénypont szerinti készlet azzal jellemezve, hogy az említett polimeráz T7-típusú DNS polimeráz, E. coli DNS polimerázI nagy fragmentum (Klenow) vagy Taq polimeráz, és az említett lánc-terminációs ágens valamely didezoxinukleozid trifoszfát.

11.) A 9. igénypont szerinti készlet azzal jellemezve, hogy valamely pirofoszfátot is tartalmaz.

A meghatalmazott:

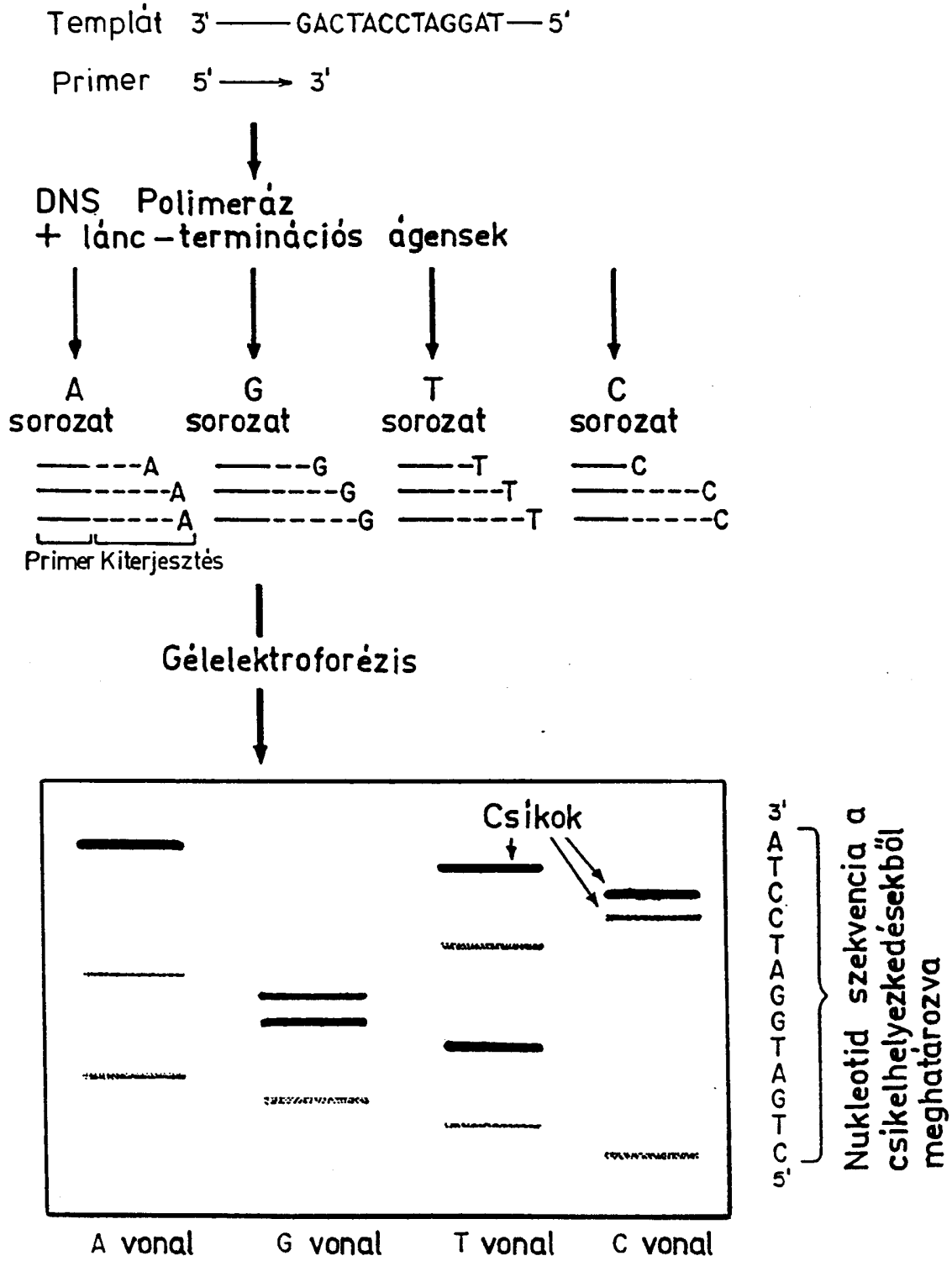
Válasz


40 oldal + 11 d'orval oldal

Földvár

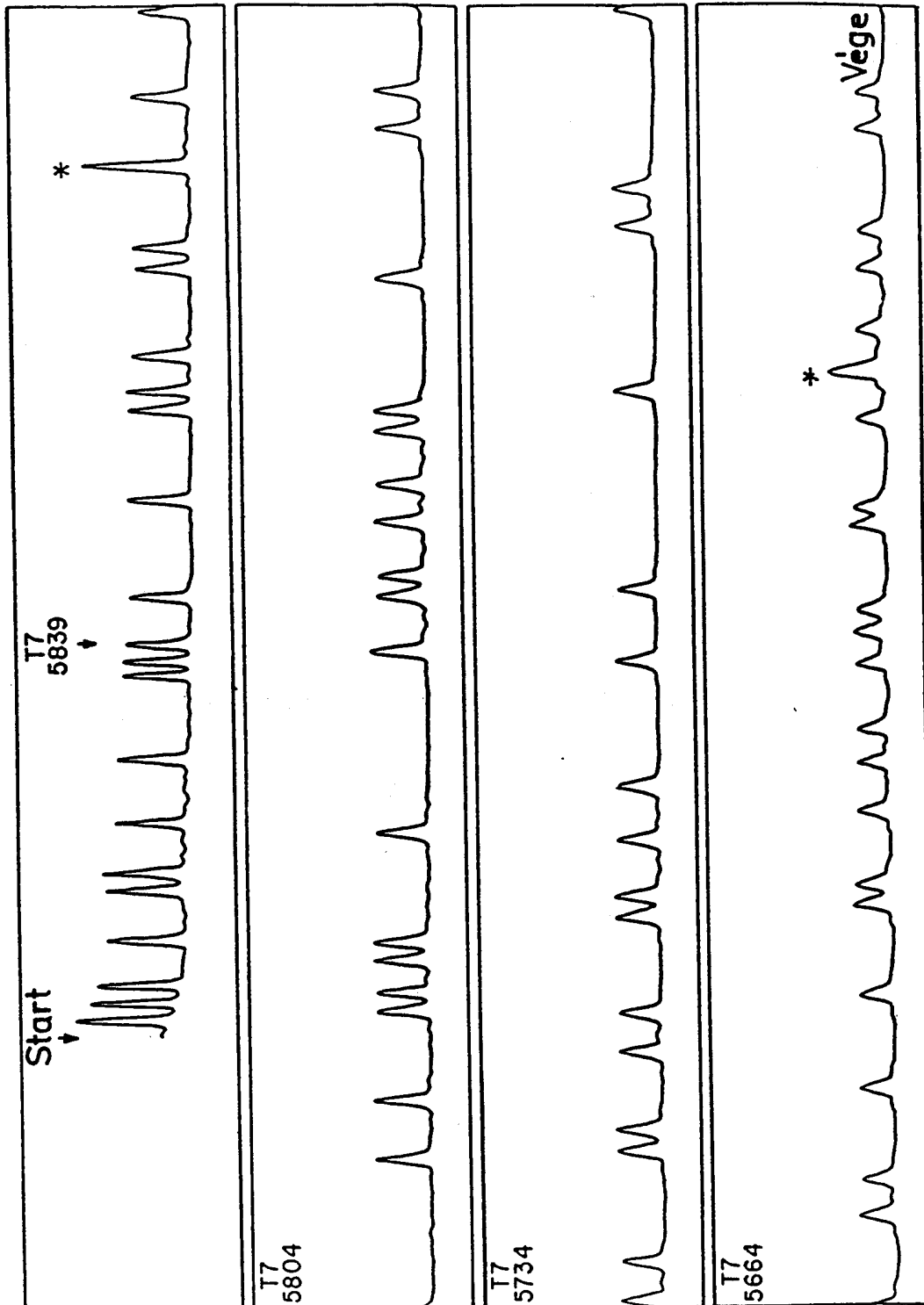
**KÖZZÉTÉTEL
PÉLDÁNY**

52543--



1. ábra

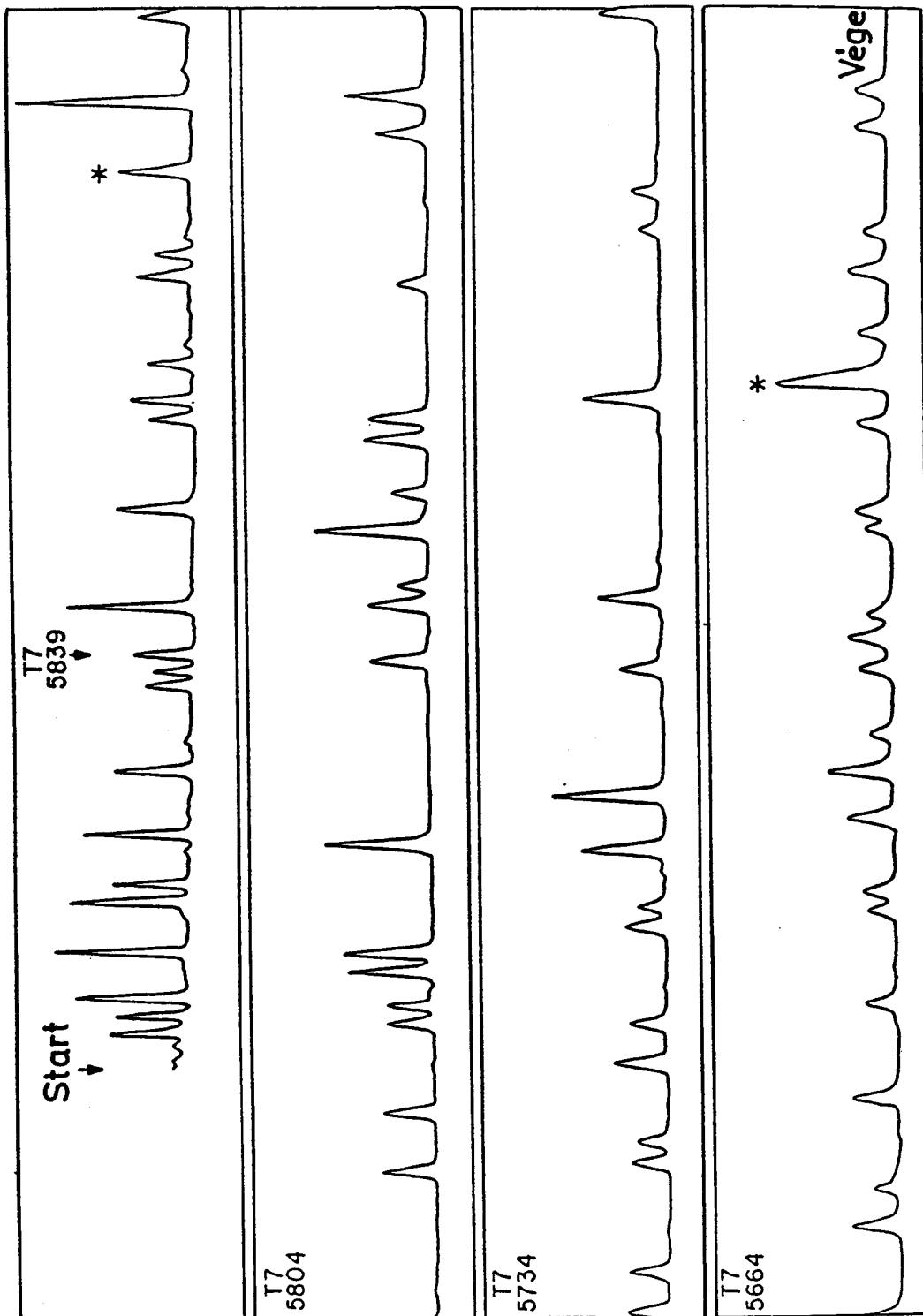
KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



2. ábra

Választott
 Példány

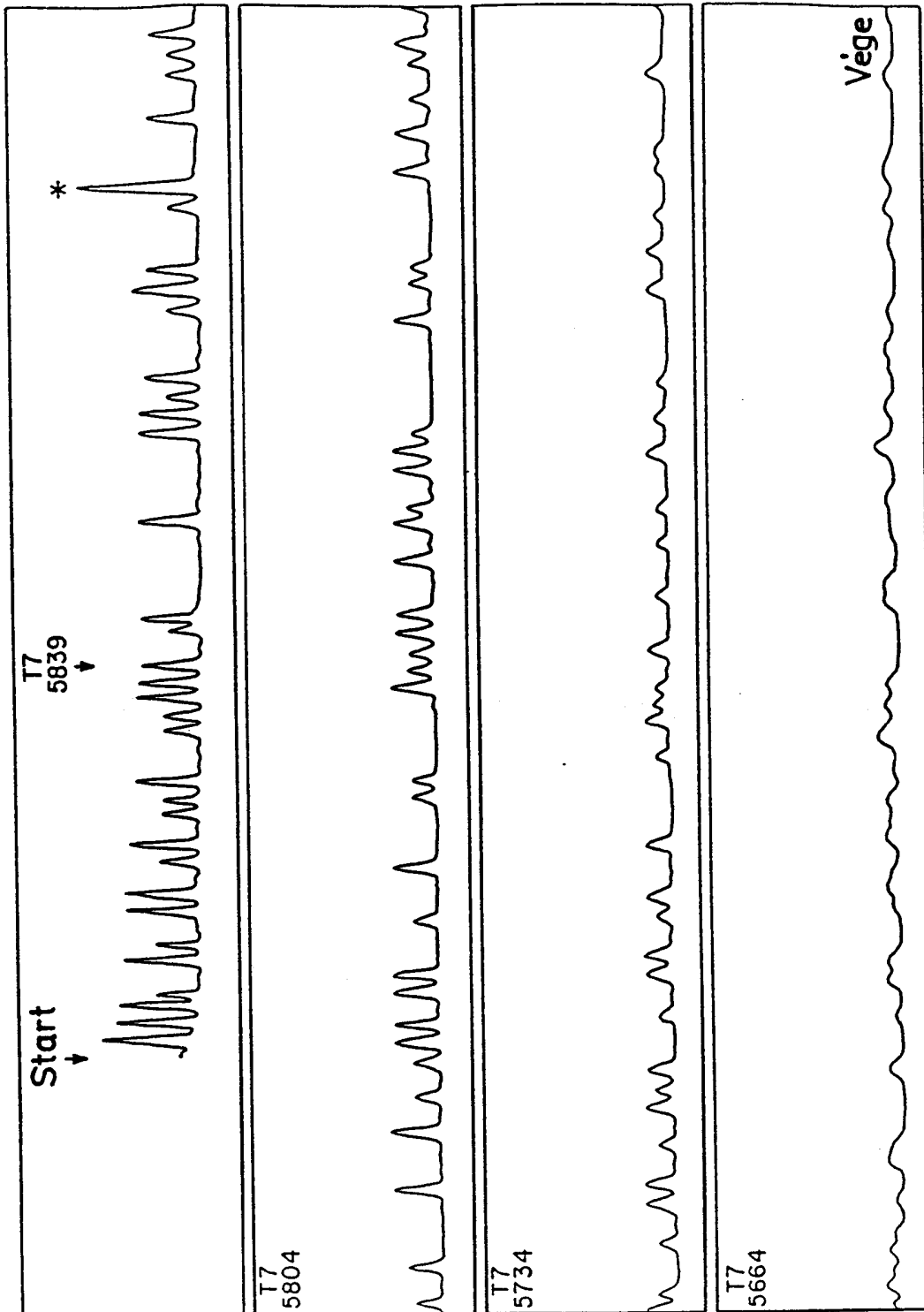
KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



3. ábra

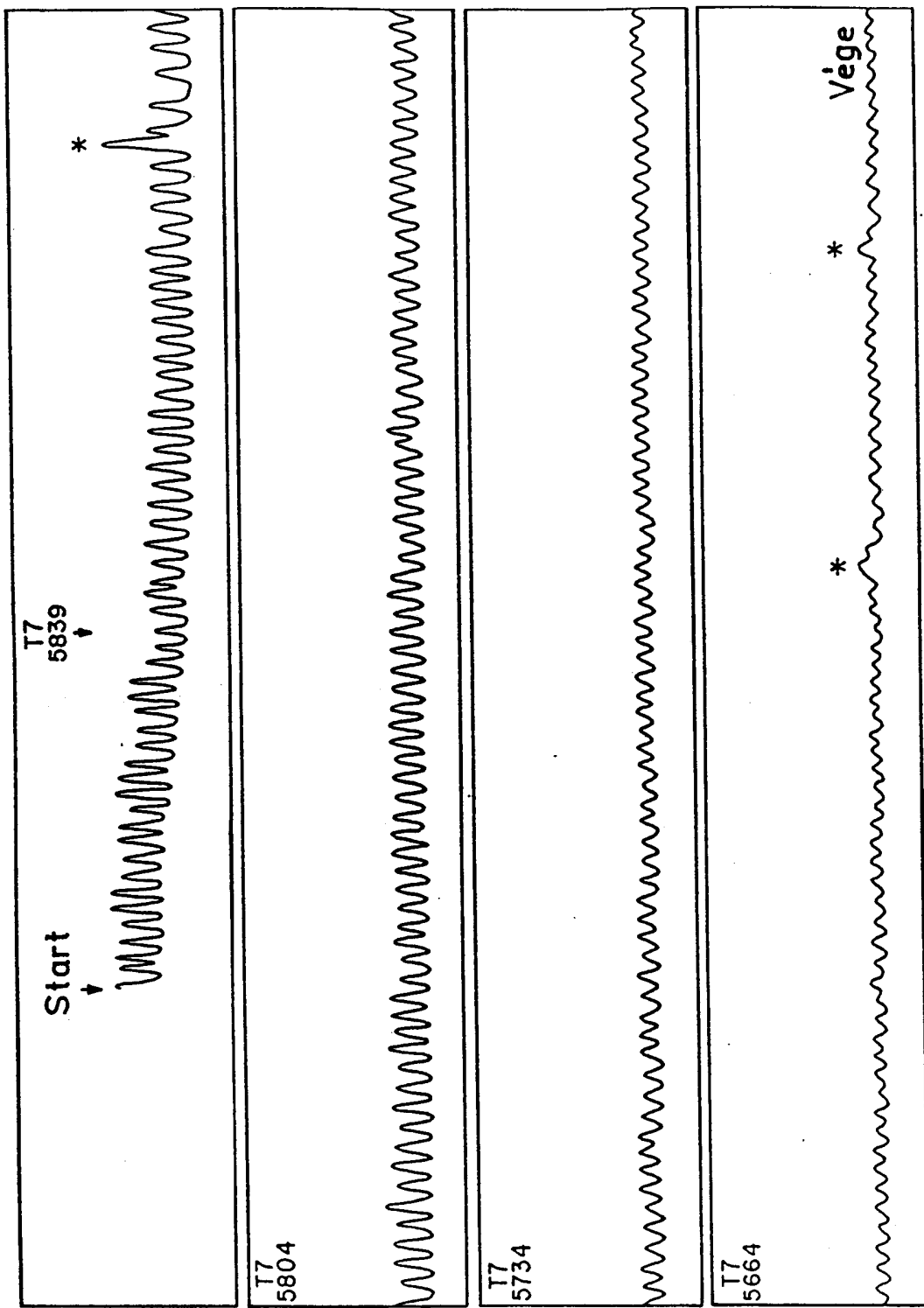
Ados Piny

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



4. ábra

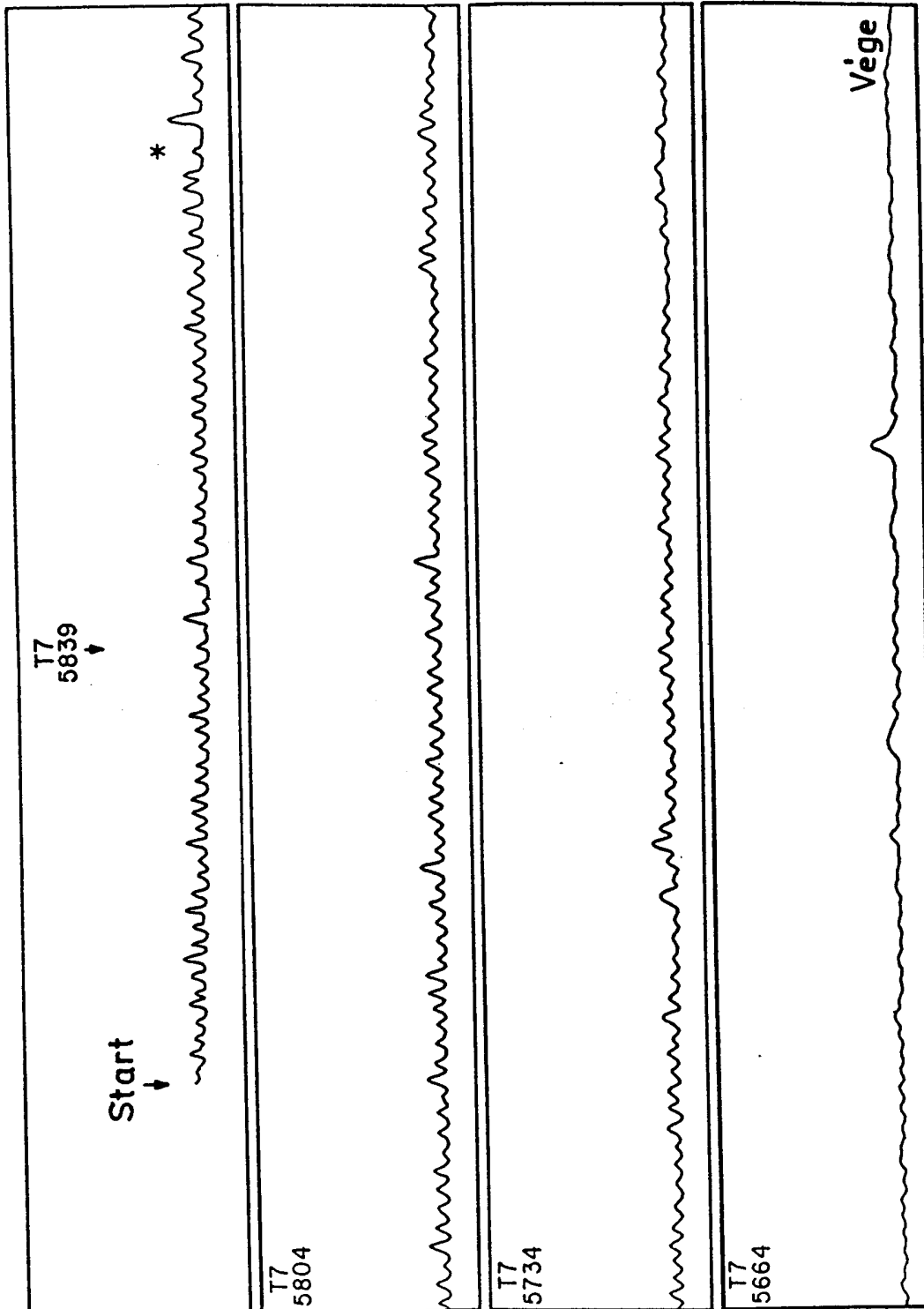
KÖZZÉTÉTEL PÉLDÁNY



5. ábra

Válasz
János

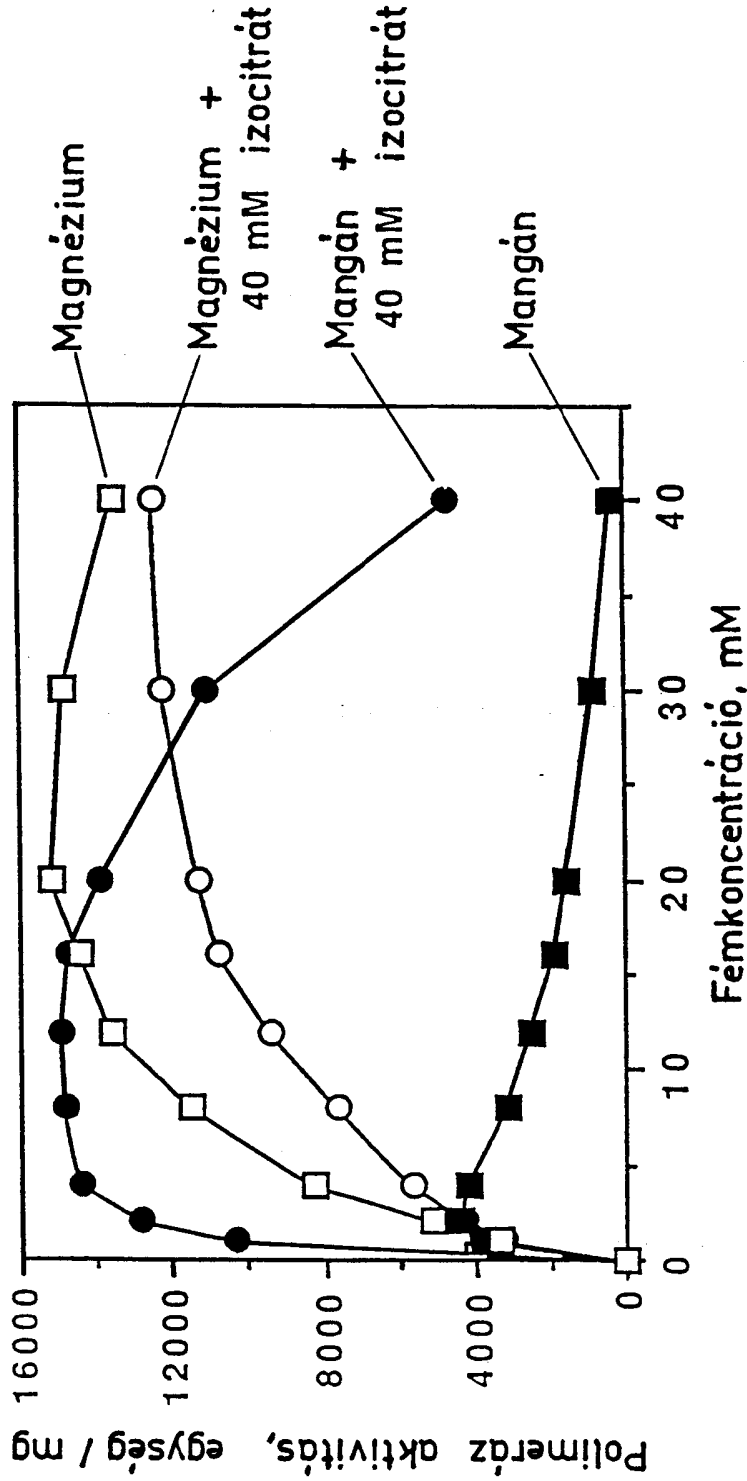
KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



6. ábra

Válasz

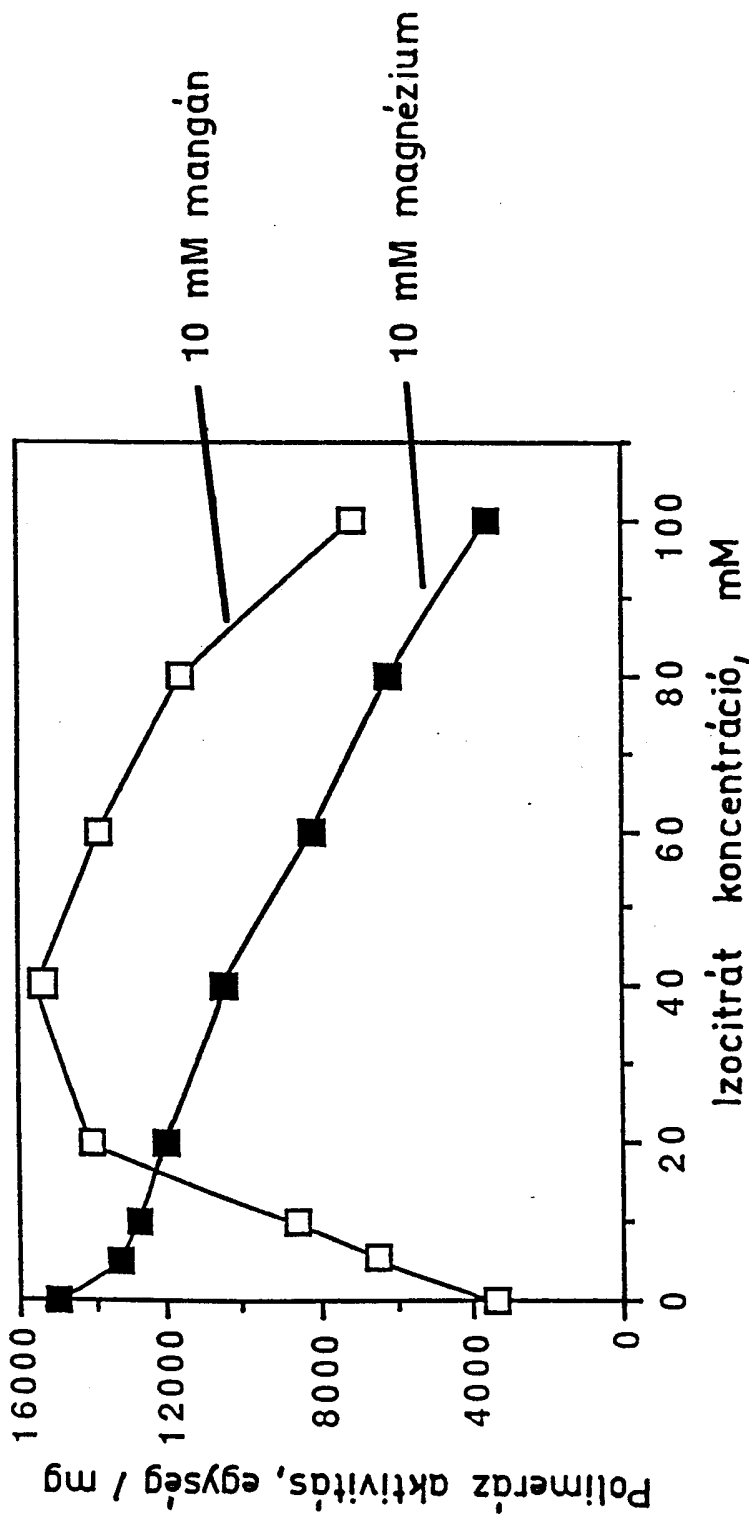
KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



8. ábra

Válasz
Függ

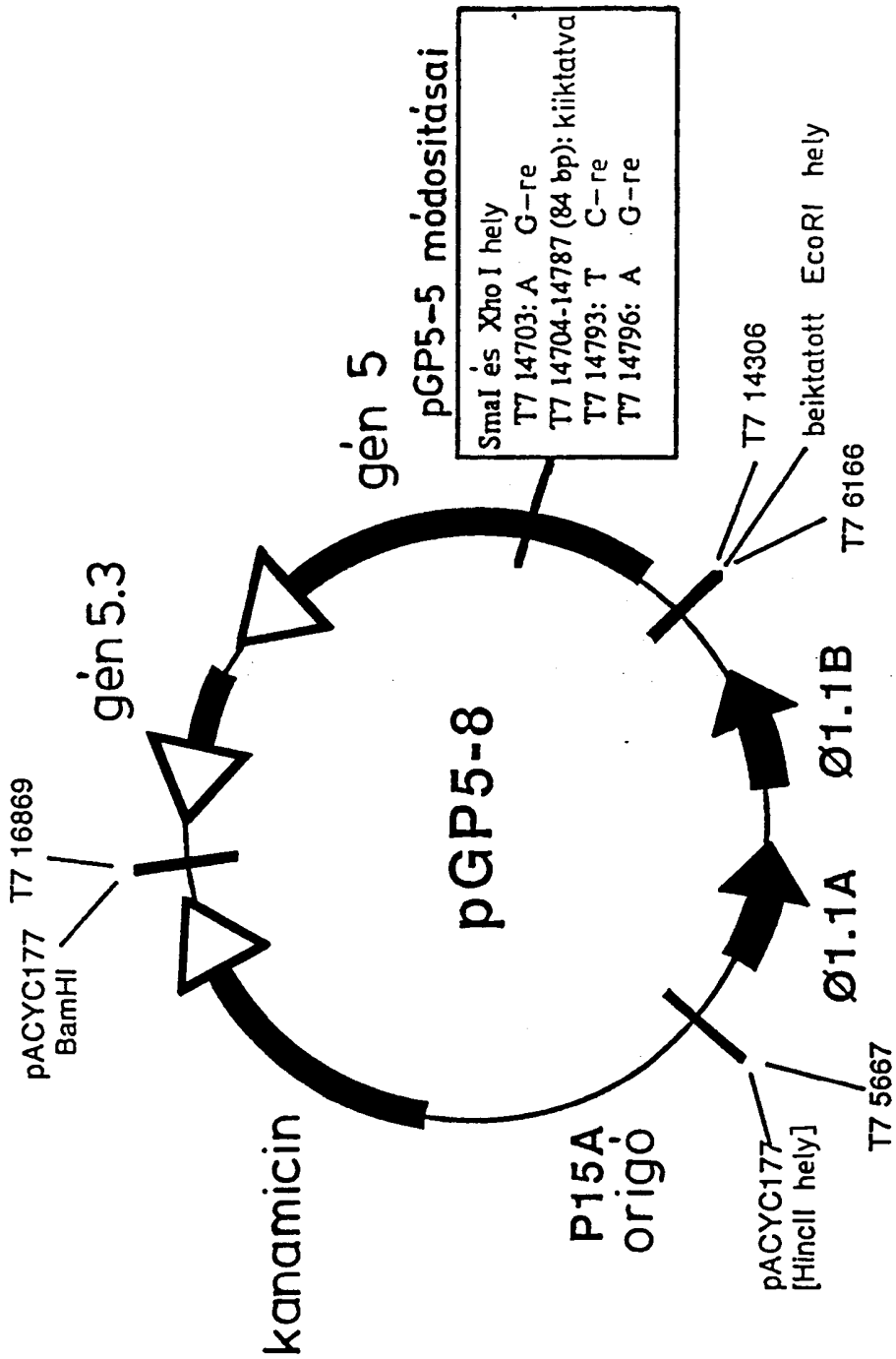
KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



9. ábra

Válasz
függ

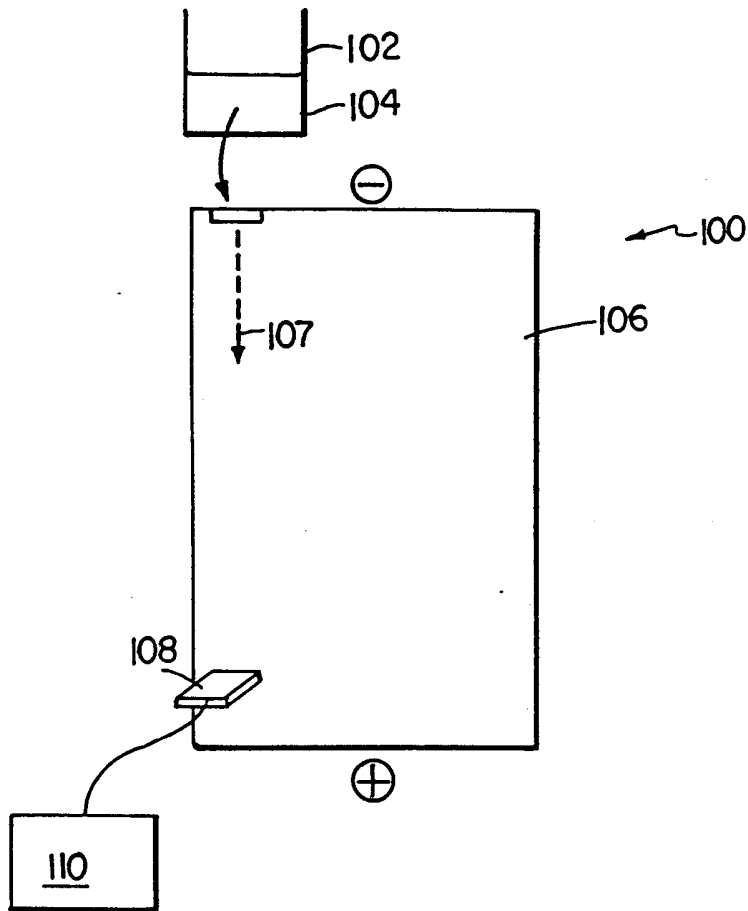
KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



10. ábra

Válasz - János

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY



11. ábra