

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580019164.8

[51] Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

[43] 公开日 2008年2月6日

[11] 公开号 CN 101120098A

[22] 申请日 2005.6.9

[21] 申请号 200580019164.8

[30] 优先权

[32] 2004.6.10 [33] US [31] 60/578,789

[86] 国际申请 PCT/US2005/020378 2005.6.9

[87] 国际公布 WO2005/123957 英 2005.12.29

[85] 进入国家阶段日期 2006.12.11

[71] 申请人 通用电气医疗集团生物科学公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 C·W·福勒 J·R·纳尔逊

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
代理人 程 淼 梁 谋

权利要求书 8 页 说明书 14 页 附图 7 页

[54] 发明名称

核酸分析方法

[57] 摘要

本发明提供了核酸分析方法。核酸模板、核苷酸和聚合酶的闭合复合物在聚合酶反应期间形成，不含二价阳离子。其用于在闭合复合物中捕获与下一模板核苷酸互补的标记核苷酸。对标记的检测允许确定下一正确核苷酸的身份。鉴定可作为复合物的一部分被在适当位置鉴定，或者当反应循环由二价金属离子的加入而完成时随着染料从复合物洗脱而被鉴定。DNA的按顺序存在的核苷酸可通过这种方式被鉴定，从而有效确定DNA序列。该方法可用于核酸单分子或用于同一或几乎同一序列的集合如PCR产物或克隆。多个模板可被平行测序，尤其是如果它们被固定在固体支持物上时。

1. 一种鉴定核酸模板的目标区域的方法，包括：

a) 通过形成反应混合物，在支持物上启动核酸聚合反应，所述反应混合物包含核酸模板、引物、核酸聚合酶、和至少一种各自含有不同标记的末端磷酸标记的核苷酸，其中所述反应混合物的组分或两种或多种所述组分的第一复合物被固定在所述支持物上，并且一种或多种所述组分选自所述核酸模板、所述引物和所述核酸聚合酶，且其中所述至少一种末端磷酸标记的核苷酸各自均含有与四种天然存在的碱基中的每一种互补的碱基；

b) 进行核酸聚合反应，通过在没有二价阳离子的情况下温育所述反应混合物以形成包含所述核酸模板、所述引物、所述核酸聚合酶、和末端磷酸标记的核苷酸的第二复合物进行，其中所述末端磷酸标记的核苷酸含有与聚合位点处模板碱基互补的碱基；

c) 除去未结合的末端磷酸标记的核苷酸和所述反应混合物的其它组分；和

d) 检测来自所述第二复合物的所述末端磷酸标记的核苷酸的标记。

2. 权利要求1的鉴定核酸模板的目标区域的方法，还包括：

e) 加入二价阳离子以完成所述聚合反应；

f) 除去所述二价阳离子和来自所述聚合反应的其它终产物；和

g) 重复步骤(a) - (f) 以确定序列中额外的核苷酸。

3. 权利要求1的方法，其中所述步骤在流通或停止-流动系统中以顺序方式执行。

4. 权利要求1的方法，其中所述支持物是珠粒形式。

5. 一种对多个核酸模板的目标区域进行平行鉴定的方法，包括：

a) 在支持物结构上固定多种引物或核酸模板，其中各引物或模板均含有独特的序列，且其中各引物或模板的多个拷贝位于所述支持物结构上的可识别的离散位置；

b) 通过形成反应混合物，在所述支持物结构上启动多个核酸聚合反应，所述反应混合物包含所述多种引物、所述多种核酸模板、核酸聚合酶、和至少一种各自含有不同标记的末端磷酸标记的核苷酸，其中每一种所述至少一种末端磷酸标记的核苷酸均含有与四种天然存在的碱基中的每一种互补的碱基；

c) 进行所述核酸聚合反应，通过温育所述反应混合物以形成多种复合物，其各自均含有所述多种引物之一、所述多种核酸模板之一、所述核酸聚合酶、和末端磷酸标记的核苷酸，其中所述末端磷酸标记的核苷酸含有与聚合位点处模板碱基互补的碱基；

d) 除去未结合的末端磷酸标记的核苷酸和所述反应混合物的其它组分；

e) 在所述各可识别的离散位置检测来自所述复合物的所述末端磷酸标记的核苷酸的不同标记；

f) 将从步骤 e) 获得的数据记录到数据储存介质；和

g) 通过将所述数据转化为所述四种核苷酸序列之一，鉴定出所述多个核苷酸模板的每一个的所述目标区域序列。

6. 权利要求 5 的对多个核酸模板的目标区域进行平行鉴定的方法，还包括：

h) 加入二价阳离子以完成所述聚合反应；

i) 除去所述二价阳离子和来自所述聚合反应的其它终产物；和

j) 重复步骤 (a) - (i) 以鉴定出所述多个核酸模板的每一另外的核苷酸。

7. 权利要求 5 的方法，其中所述支持物结构是珠粒，且其中携带一种引物的所述珠粒与携带不同引物的所述珠粒以可识别的方式分开。

8. 权利要求 1 或 5 的方法，其中所述支持物结构是显微载玻片的第一表面。

9. 权利要求 1 或 5 的方法，其中所述末端磷酸标记核苷酸中所述标记是荧光染料或生色染料。

10. 权利要求 9 的方法，其中所述荧光染料选自夹氧杂蒽染料、花青染料、merrocynine 染料、偶氮染料、卟啉染料、香豆素染料、bodipy 染料和其衍生物构成的组。

11. 权利要求 9 的方法，其中所述生色染料选自偶氮染料、merrocynine 染料、花青染料、夹氧杂蒽染料、卟啉染料、香豆素染料、bodipy 染料和其衍生物构成的组。

12. 权利要求 1 或 5 的方法，其中所述核酸聚合酶是 FY7 DNA 聚合酶。

13. 权利要求 1 或 5 的方法，其中所述核酸聚合酶选自 DNA 聚合酶、

RNA 聚合酶、逆转录酶、末端脱氧核苷酸转移酶、引发酶或端粒末端转移酶。

14. 权利要求 1 或 5 的方法，其中所述核酸聚合酶选自 DNA 聚合酶 I，T4 DNA 聚合酶，Amplitaq FS，T7 DNA 聚合酶，Phi 29 DNA 聚合酶，Klenow exo-，Sequenase，Taq DNA 聚合酶，Thermo Sequenase I，ThermoSequenase II，FY7 DNA 聚合酶，ThemoSequenase E681 M，*T. hypogea* (Thy B)，*T. neapolilana* (Tne)，*T. subterranea* (Tsu)，*T. barossii* (Tba)，*T. litoralis* (NEB Vent)，*T. kodakaraensis* (Novagen)，*P. furiosis* (Strategene)，P. GB-D (NEB Deep Vent)，Human Pol beta，Tsp JSI，AMV-逆转录酶，MMLV-逆转录酶和 HIV-逆转录酶，或这些酶的外切核酸酶缺陷型变体。

15. 权利要求 1 或 5 的方法，其中所述启动步骤中的所述反应混合物还包括 EDTA。

16. 权利要求 2 或 6 的方法，其中所述二价阳离子是镁。

17. 权利要求 2 或 6 的方法，其中所述二价阳离子是锰。

18. 一种鉴定核酸模板目标区域的方法，包括：

a) 通过形成反应混合物，在支持物上启动核酸聚合反应，所述反应混合物包含核酸模板、引物、核酸聚合酶、和至少一种各自含有不同标记的末端磷酸标记的核苷酸，其中所述反应混合物的组分或两种或多种所述组分的第一复合物被固定在所述支持物上，并且所述一种或多种组分选自所述核酸模板、所述引物和所述核酸聚合酶，且其中所述至少一种末端磷酸标记的核苷酸各自均含有与四种天然存在的碱基互补的碱基；

b) 进行所述核酸聚合反应，通过在没有二价阳离子的情况下温育所述反应混合物以形成包含所述核酸模板、所述引物、所述核酸聚合酶、和末端磷酸标记的核苷酸的第二复合物，其中所述末端磷酸标记的核苷酸含有与聚合位点处模板碱基互补的碱基；

c) 除去未结合的末端磷酸标记的核苷酸和所述反应混合物的其它组分；

d) 加入二价阳离子以完成所述聚合反应；和

e) 检测来自所述第二复合物的所述末端磷酸标记核苷酸的标记。

19. 权利要求 18 的鉴定核酸模板目标区域的方法，还包括：

- f) 除去所述二价阳离子和来自所述聚合反应的其它终产物；和
- g) 重复步骤 a) -f) 以确定每一个另外的核苷酸序列。

20. 权利要求 18 的方法，其中所述步骤在流通或停止-流动系统中以顺序方式执行。

21. 权利要求 18 的方法，其中所述支持物是珠粒形式。

22. 一种对核酸模板的目标区域进行分析的方法，包括：

a) 通过形成反应混合物，在支持物上启动核酸聚合反应，所述反应混合物包含核酸模板、引物、核酸聚合酶、和至少一种各自含有不同标记的核苷酸，其中所述反应混合物的组分或两种或多种所述组分的第一复合物被固定在所述支持物上，并且所述一种或多种组分选自所述核酸模板、所述引物和所述核酸聚合酶，且其中所述至少一种标记核苷酸之一含有与聚合位点出现的模板碱基互补的碱基；

b) 温育所述反应混合物以形成包含所述核酸模板、所述引物、所述核酸聚合酶、和所述至少一种标记的核苷酸之一的第二复合物，其中所述标记的核苷酸含有与聚合位点处模板碱基互补的碱基，且其中所述标记的核苷酸在第二复合物内处于动态平衡；

c) 检测所述标记的核苷酸的标记；和

d) 基于检测到的不同标记鉴定出序列。

23. 权利要求 22 的对核酸模板的目标区域进行分析的方法，还包括：

e) 从所述反应混合物除去所述至少一种标记的核苷酸和所述反应混合物的其它未结合组分；

f) 向所述反应混合物加入核酸聚合酶、二价阳离子、和含有与聚合位点的模板碱基互补的碱基的核苷酸；

g) 通过温育所述反应混合物一段时间来完成所述聚合反应；

h) 除去所述二价阳离子和来自所述聚合反应的其它终产物；和

i) 针对每一个另外的待测序核苷酸重复步骤 (a) - (h)。

24. 一种对多个核酸模板进行平行鉴定的方法，包括：

a) 在支持物结构上固定多种引物，其中各引物均含有独特的序列，且其中各引物的多个拷贝位于所述支持物结构上的可识别的离散位置；

b) 通过形成反应混合物，在所述支持物结构上启动多个核酸聚合反应，所述反应混合物包含所述多种固定引物、多种核酸模板、核酸聚合酶、和四种各自含有不同标记的标记核苷酸，其中所述四种标记的核苷酸

酸中的每一种均含有与四种天然存在的碱基中的每一种互补的碱基;

c) 温育所述反应混合物以形成多个第二复合物, 其各自均含有所述多种固定引物之一、所述多种核酸模板之一、所述核酸聚合酶、和标记核苷酸, 其中所述标记核苷酸含有与聚合位点处模板碱基互补的碱基, 且其中所述标记核苷酸在所述第二复合物内处于动态平衡;

d) 在所述各可识别的离散位置检测所述标记核苷酸的所述标记;

e) 将从步骤 d) 获得的数据记录到数据储存介质; 和

f) 通过将所述记录的数据转化为所述四种核苷酸之一, 鉴定出所述多个核苷酸模板中的每一个的所述目标序列。

25. 一种对多个核酸模板进行平行鉴定的方法, 包括:

a) 在支持物结构上固定多种引物, 其中各引物均含有独特的序列, 且其中各引物均位于所述支持物结构上的可识别的离散位置;

b) 通过形成反应混合物, 在支持物结构上启动多个核酸聚合反应, 所述反应混合物包含所述多种固定引物、多种核酸模板、核酸聚合酶、和一种标记核苷酸;

c) 温育反应混合物以形成多种第二复合物, 其各自均含有所述多种固定引物之一、所述多种核酸模板之一、所述核酸聚合酶、和所述标记核苷酸, 其中所述标记核苷酸含有与聚合位点处模板碱基互补的碱基, 且其中所述标记核苷酸在所述第二复合物内处于动态平衡;

d) 在所述可识别的离散位置检测所述标记核苷酸的标记;

e) 将从所述检测步骤获得的数据记录到数据储存介质; 和

f) 从所述反应混合物除去所述标记的核苷酸和所述反应混合物的其它组分;

g) 向所述反应混合物加入核酸聚合酶、二价阳离子、和所述标记核苷酸的未标记等同物;

h) 通过温育所述反应混合物一段时间来完成所述聚合反应;

i) 除去所述二价阳离子和来自所述聚合反应的其它终产物;

j) 用其它三种核苷酸之一重复步骤 (a) - (i), 直到所有四种核苷酸均被测试; 和

k) 重复步骤 a) - j) 以确定其它核苷酸序列。

26. 权利要求 25 的方法, 进一步包括步骤:

l) 通过将所述记录数据转化为所述四种核苷酸之一的序列, 鉴定所

述多个核苷酸模板的所述目标序列，且针对所述多个核苷酸模板中的每一个装配所述目标序列。

27. 一种对核酸模板目标区域进行分析的方法，包括：

a) 通过形成反应混合物，在支持物上启动核酸聚合反应，所述反应混合物包含核酸模板、引物、核酸聚合酶、和至少一种各自含有不同标记的核苷酸，其中所述反应混合物的组分或两种或多种所述组分的第一复合物被固定在所述支持物上，并且所述一种或多种组分选自所述核酸模板、所述引物和所述核酸聚合酶，且其中所述至少一种标记核苷酸之一含有与聚合位点的模板碱基互补的碱基；

b) 温育所述反应混合物以形成包含所述核酸模板、所述引物、所述核酸聚合酶、和所述至少一种标记核苷酸之一的第二复合物，其中所述标记的核苷酸含有与聚合位点处模板碱基互补的碱基，且其中所述标记的核苷酸在第二复合物内处于动态平衡；

c) 从所述反应混合物中除去所述至少一种标记核苷酸和所述反应混合物的其它组分；

d) 检测所述标记的核苷酸的标记；和

e) 基于检测到的不同标记鉴定核酸序列。

28. 权利要求 27 的对核酸模板目标区域进行分析的方法，进一步包括：

f) 向所述反应混合物加入核酸聚合酶、二价阳离子、和含有与在聚合位点的模板碱基互补的碱基的核苷酸；

g) 通过温育所述反应混合物一段时间来完成所述聚合反应；

h) 除去所述二价阳离子和来自所述聚合反应的其它终产物；和

i) 针对每一个另外的待测序核苷酸重复步骤 (a) - (h)。

29. 一种对多个核酸模板的目标区域进行平行鉴定的方法，包括：

a) 在支持物结构上固定多种引物，其中各引物均含有独特的序列，且其中各引物位于所述支持物结构上的可识别的离散位置；

b) 通过形成反应混合物，在所述支持物结构上启动多个核酸聚合反应，所述反应混合物包含所述多种固定引物、多种核酸模板、核酸聚合酶、和四种各自含有不同标记的标记核苷酸，其中所述四种标记的核苷酸中的每一种均含有与四种天然存在的碱基中的每一种互补的碱基；

c) 温育所述反应混合物以形成多种第二复合物，其各自均含有所述

多种固定引物之一、所述多种核酸模板之一、所述核酸聚合酶、和标记核苷酸，其中所述标记核苷酸含有与聚合位点处模板碱基互补的碱基，且其中所述标记核苷酸在所述第二复合物内处于动态平衡；

d) 从所述反应混合物中除去所述标记核苷酸和反应混合物的其它组分；

e) 在所述各可识别的离散位置检测所述标记核苷酸的标记；

f) 将从步骤 e) 获得的数据记录到数据储存介质；和

g) 通过将所述记录的数据转化为所述四种核苷酸之一，鉴定出所述多个核苷酸模板中的每一个的所述目标序列。

30. 一种对多个核酸模板进行平行鉴定方法，包括：

a) 在支持物结构上固定多种引物，其中各引物均含有独特的序列，且其中各引物均位于支持物结构上的可识别的离散位置；

b) 通过形成反应混合物，在所述支持物结构上启动多个核酸聚合反应，所述反应混合物包含所述多种固定引物、多种核酸模板、核酸聚合酶、和至少一种标记核苷酸；

c) 温育所述反应混合物以形成多种第二复合物，其各自均含有所述多种固定引物之一、所述多种核酸模板之一、所述核酸聚合酶、和所述标记核苷酸，其中所述标记核苷酸含有与聚合位点处模板碱基互补的碱基，且其中所述标记核苷酸在第二复合物内处于动态平衡；

d) 从所述反应混合物中除去所述标记核苷酸和所述反应混合物的其它组分；

e) 在可识别的离散位置检测所述标记核苷酸的所述标记；

f) 将从所述检测步骤获得的数据记录到数据储存介质；

g) 向所述反应混合物加入核酸聚合酶、二价阳离子、和所述标记核苷酸的未标记等同物；

h) 通过温育所述反应混合物一段时间来完成所述聚合反应；

i) 除去所述二价阳离子和来自所述聚合反应的其它终产物；

j) 用其它三种核苷酸之一重复步骤 a) -i)，直到所有四种核苷酸均被测试；和

k) 重复步骤 a) -j) 以确定另外的核苷酸序列。

31. 权利要求 30 的方法，进一步包括步骤：

l) 通过将所述记录数据转化为所述四种核苷酸之一的序列，鉴定所

述多个核苷酸模板的所述目标序列，针对所述多个核苷酸模板中的每一个装配所述目标序列。

32. 权利要求 30 的方法，其中标记核苷酸的加入次序以预设的循环方式出现。

## 核酸分析方法

### 相关申请的交叉引用

本申请要求以下美国专利申请的优先权：10/772,996，10/773,000，二者均于2004年2月5日提交；10/651,362，10/651,355，10/651582，10/651,558，均于2003年8月29日提交；10/358,818，于2003年2月5日提交；10/113,030，10/113,025，二者均于2002年4月2日提交；10/230,576，2002年8月29日提交；和美国临时专利申请60/578,789，于2004年6月10日提交；将其公开内容全文引入本文供参考。

### 发明领域

本发明一般地涉及样品中多核苷酸的测序方法，所述方法基于使用标记的核苷酸作为核酸聚合酶的底物。

### 发明背景

DNA聚合酶是适用于许多重组DNA技术的酶类，诸如通过聚合酶链式反应（“PCR”）的核酸扩增、自动维持序列复制（“3 SR”）和DNA测序。热稳定性DNA聚合酶类是特别有用的。因为加热不会破坏聚合酶活性，所以不需要在每次变性步骤后添加另外的聚合酶。

已知在其催化性循环中，一旦“正确的”dNTP或ddNTP在活性位点结合，则形成的DNA聚合酶-DNA复合物进行从“开放”到“闭合”态的限速、构象转变。在“闭合”态中， $Mg^{2+}$ （或其它金属离子）介导了一种快速化学步骤，其涉及由引物末端的3'羟基亲核置换焦磷酸。一旦焦磷酸释放则该酶回到“开放”态并且易位发起下一轮反应。尽管该三元复合物（酶-DNA-dNTP（或ddNTP））可在没有 $Mg^{2+}$ （或其它金属离子）的情况下形成，但是其仅在存在 $Mg^{2+}$ （或其它金属离子）的情况下才擅长于核苷酸的化学加成。缺乏 $Mg^{2+}$ （或其它金属离子）的条件往往导致第一“正确”的dNTP在紧密三元复合物中的非共价（物理）螯合(Doublie等(1999年2月15日)Structure Fold. Des., 7(2):R31-5)。

### 发明概要

本发明利用以上观察，采用该闭合复合物在DNA合成期间冷冻聚合酶，捕获与下一模板核苷酸互补的核苷酸，从而允许确定下一个正确核苷酸的身份。其随后可作为复合物的一部分被在适当位置（in place）

鉴定，或者当反应循环由二价金属离子的加入而完成时随着染料从复合物洗脱而被鉴定。DNA 的按顺序存在的核苷酸可通过这种方式被鉴定，从而有效确定 DNA 序列。该方法可用于模板核酸的单个分子或用于同一（或几乎同一）序列的集合如 PCR 产物或克隆。若需要的话，多个模板可被平行测序，尤其是它们被有效地固定在例如平板或珠粒的固体支持物上时。

#### 图简述

图 1 描述了在目标阵列的闭合复合物阶段通过磷酸标记的核苷酸中止进行平行测序的反应方案。复合物在冲洗和扫描的全部时间范围内是稳定的。

图 2 描述了在闭合复合物阶段通过磷酸标记的核苷酸中止进行测序的反应和检测方案。复合物在冲洗和检测的全部时间范围内是稳定的。

图 3 描述了在闭合复合物阶段通过磷酸标记的核苷酸中止进行测序的反应和检测方案。复合物在冲洗和检测的全部时间范围内仅是部分稳定的。获得的序列不能区分序列中碱基倍数（A、AA、AAA 等）。

图 4 描述了在目标阵列的闭合复合物阶段通过磷酸标记的核苷酸中止进行平行测序的反应方案。复合物在冲洗和检测的全部时间范围内仅是部分稳定的。获得的序列不能区分序列中碱基倍数（A、AA、AAA 等）。

图 5 显示了采用荧光标记的核苷酸形成稳定闭合复合物的证据。其清楚地论证了该复合物可以如本文所述被检测。

图 6 展示了 SDS 是如何破坏闭合复合物的。

图 7 展示了闭合复合物的聚合酶滴定。

#### 定义

本文定义的术语“核苷”是包括嘌呤，去氮杂嘌呤，嘧啶或在 1'位或等价位置上连接到糖或糖取代基（substitute），如碳的环或非环的部分上的经修饰碱基，包括 2'-脱氧和 2'-羟基以及 2',3'-二脱氧形式以及其它取代。

本文定义的术语“核苷酸”是指核苷的磷酸酯，其中的酯化位点通常对应于连接到戊糖的 C-5 位上的羟基。

本文定义的术语“寡核苷酸”包括核苷酸或其衍生物（包括脱氧核糖核苷、核糖核苷等）的线性低聚体。在通篇说明书中，除非另有说明，只要寡核苷酸是用字母的序列表示的，核苷酸都是从左到右的 5'-3'的顺

序，其中 A 是脱氧腺苷，C 是脱氧胞苷，G 是脱氧鸟苷，T 是胸苷。

术语“引物”是指线性寡核苷酸，它以特异性方式退火到独特的核酸序列上，允许该独特序列的扩增。

用语“目标核酸序列”等指下述核酸，其序列的身份或核苷的顺序或位置由本发明的一种或几种方法确定。

#### 优选实施方案的详细说明

本发明涉及对样品中多核苷酸加以鉴定的方法，其中使用方便的试验，通过核酸聚合酶活性来监测 RNA 或 DNA 的合成。核酸聚合酶通过将核苷单磷酸酯从核苷三磷酸酯(NTP)或脱氧核苷三磷酸酯(dNTP)转移到增长的寡核苷酸链的 3'羟基上来合成核酸分子。该反应也释放无机焦磷酸根。已知在聚合酶反应的催化性循环期间，在“正确的” dNTP 或 ddNTP 在活性位点结合之后，形成的 DNA 聚合酶-DNA 复合物进行从“开放”到“闭合”态的限速、构象转变。在没有  $Mg^{2+}$ （或其它金属离子）的情况下，三元复合物（酶-DNA-dNTP（或 ddNTP））可形成，但是 dNTP 或 ddNTP 并未加到该正在增长的核酸分子。这导致下一个“正确”的 dNTP 在紧密三元复合物中的非共价（物理）螯合。本发明利用这一观察，采用该闭合复合物在核酸合成期间冷冻该聚合酶，捕获与下一模板核苷酸互补的核苷酸，从而允许确定下一个正确核苷酸的身份。通过这种方式，DNA 或 RNA 分子的序列可以一次一个核苷酸地被建立起来。

在某些实施方案中，聚合酶是 DNA 聚合酶，例如 DNA 聚合酶 I、II 或 III 或 DNA 聚合酶  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ ，或末端脱氧核苷酸转移酶或端粒末端转移酶。在其它实施方案中，合适的聚合酶包括但是不限于依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶、引发酶或依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶(逆转录酶)。当采用 RNA 聚合酶时，可由 RNA 聚合酶识别的启动子序列含于核酸模板或引物序列中。

用于本发明方法中测序的核酸模板可包括 RNA 或 DNA 模板。当 RNA 用作模板时，核酸聚合酶可以是逆转录酶或 RNA 聚合酶。

本发明提供的方法使用核苷多磷酸酯，如脱氧核苷多磷酸酯、二脱氧核苷多磷酸酯、碳环核苷多磷酸酯或非环核苷多磷酸酯类似物，其具有生色染料或荧光标记。这些核苷酸多磷酸酯中的碱基选自由尿嘧啶、胸腺嘧啶、胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、鸟嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、次黄嘌呤、

7-脱氮次黄嘌呤、腺嘌呤、7-脱氮腺嘌呤、2,6-二氨基嘌呤及其类似物构成的组。为鉴定结合的核苷酸，核苷酸由荧光染料或生色染料或其它可检测标志物进行标记。合适的荧光染料可选自夹氧杂蒽染料、花青染料、merrocynine 染料、偶氮染料、卟啉染料、香豆素染料、bodipy 染料和其衍生物构成的组。合适的生色染料可选自偶氮染料、merrocynine 染料、花青染料、夹氧杂蒽染料、卟啉染料、香豆素染料、bodipy 染料和其衍生物构成的组。这些染料是众所周知的，并且商业来源广泛。

如上所述，本发明的方法可用于检测单个分子或分子同种群 (homogeneous population) 的序列。尽管该方法可用于对未知模板测序，但是除此以外其也可确认已知序列，鉴定单一核苷酸多态性，并且进行单一碱基延伸反应。该方法多个步骤的循环致使能检测同一分子的其它序列，每次循环检测一个。当旨在对单一分子，或分子的同种群测序时，可以顺序方式在流通 (flow through) 或停流 (stop flow) 系统中执行各步骤。在这种流通或停流系统中，聚合酶-模板-核苷酸的三元复合物可以固定于珠粒上，并且该珠粒可位于微通道的一部分内。

备选地，如下所述，本发明方法也可适用于执行大量平行反应，从而同时对多个模板测序。对于多元检测，聚合酶-模板-核苷酸的三元复合物可以固定于处于载体 (如毛细管) 限定位置内的珠粒上，或其可以固定于微通道的内表面上，或固定于载玻片表面上，等等。载玻片表面可以是平坦的表面或经涂覆的表面。此外，该表面可包括多个微特征，其布置于空间上离散的区域中以在表面上产生纹理，其中，与无纹理表面相比，该具有纹理的表面提供了增加的表面积。

本发明的方法需要模板-聚合酶-核苷酸复合物固定到支持物表面。预期该固定可发生于三元复合物形成之前或之后。当固定发生于三元复合物形成之前时，数种组分之一可被固定。这包括引物、核酸模板、核酸聚合酶，或引物-模板复合物。当固定发生于三元复合物形成之后时，复合物自身被固定。对于很多样品模板的多元分析而言，固定的物种 (引物、核酸模板、核酸聚合酶，或引物-模板复合物，或三元复合物) 可在支持物表面上形成有序图案。该物种也可随机固定于表面上。然而，每个不同物种位于离散位置，使得来自结合于一个复合物 (或复合物的同种群) 的任何染料的信号容易与来自附近固定的复合物的另一信号区分。

三元复合物的稳定性发生变化。如下所示，FY7 DNA 聚合酶 (美国

专利 6479267) 可与模板和染料标记的核苷酸形成非常稳定的复合物。在这种情况下, 使用标记的 dNTP 来对核酸单个分子进行逐步测序是可行的。当这一方法以多元模式使用时, 可允许在极短的时间内同时对数万个模板进行测序或对长 DNA 区域测序。以下更加详细地描述了这些方法。

在分析核酸模板目标区域的方法的一个实施方案中, 其步骤包括: a) 通过形成反应混合物, 在支持物上启动核酸聚合反应, 该反应混合物包含核酸模板、引物、核酸聚合酶、和四种各自含有不同标记的末端磷酸标记的核苷酸, 其中该反应混合物的组分或两种或多种所述组分的第一复合物被固定在该支持物上, 并且所述一种或多种组分选自所述核酸模板、引物和核酸聚合酶, 且其中所述四种末端磷酸标记的核苷酸各自均含有与四种天然存在的碱基中的每一种互补的碱基; b) 通过温育反应混合物以形成包含核酸模板、引物、核酸聚合酶、和末端磷酸标记的核苷酸的第二复合物来进行核酸聚合反应, 其中所述末端-酸标记的核苷酸含有与聚合位点处模板碱基互补的碱基; c) 除去未结合的末端磷酸标记的核苷酸和反应混合物的其它组分; d) 检测来自第二复合物的末端磷酸标记的核苷酸的标记; 且由此鉴定结合的核苷酸。

在该实施方案中, 用于核酸聚合酶反应的模板是单分子, 或分子同种群。至于对第一碱基之后的其它碱基的测序, 除了以上 (a) - (d) 的步骤以外, 执行以下步骤: e) 加入二价阳离子以完成该聚合反应 (此时没有游离核苷酸); f) 除去二价阳离子和来自该聚合反应的其它终产物; 和 g) 重复步骤 (a) - (f), 以确定序列中的其它核苷酸。

任选地, 可在步骤 (a) - (d) 中的所有或任一步骤中, 尤其是步骤 (f) 中加入过量螯合剂 (例如 EDTA), 以螯合可能存在于反应混合物中的任何残余二价阳离子。为了相同目的, 预期可以在任何需要的时候将螯合剂加入本发明公开的每一种方法。螯合剂的加入不会干扰模板-聚合酶-dNTP (或 ddNTP) 三元复合物的形成。这试验性地显示于以下提供的实施例。通过加入二价阳离子 (例如锰或镁) 来去除这些螯合剂, 这样能使聚合酶反应循环完成。

当采用以上实施方案来鉴定核酸模板的核酸序列时, 有时可采用少于四种的末端磷酸标记的核苷酸。例如, 当鉴定样品模板的双等位基因 SNP 时, 仅需要两种末端磷酸标记的核苷酸。当确定样品模板中特定核

酸序列的存在时，仅需要单一的末端磷酸标记的核苷酸。

当以多元模式使用这些实施方案时，可允许在极短的时间内同时对数万个模板进行测序或对长 DNA 区域测序。因此，在本文提供的、对多个核酸模板的目标区域进行平行鉴定的一个实施方案中，步骤包括：a) 在支持物结构上固定多种引物或核酸模板，其中各引物或模板均含有独特的序列，且其中各引物（或同一引物的多个拷贝）或模板均位于支持物结构上的可识别的离散位置；b) 通过形成反应混合物，在支持物结构上启动多个核酸聚合反应，该反应混合物包含多种引物、多种核酸模板、核酸聚合酶、和至少一种各自含有不同标记的末端磷酸标记的核苷酸，其中每一种末端磷酸标记的核苷酸均含有与四种天然存在的碱基中的每一种互补的碱基；c) 进行核酸聚合反应，通过温育反应混合物以形成多种复合物，其各自均含有多种引物之一、多种核酸模板之一、核酸聚合酶、和末端磷酸标记的核苷酸，其中末端磷酸标记的核苷酸含有与聚合位点处模板碱基互补的碱基；d) 除去未结合的末端磷酸标记的核苷酸和反应混合物的其它组分；e) 在各可识别的离散位置检测来自该复合物的末端磷酸标记的核苷酸的不同标记。此外，检测结构任选被记录到数据储存介质；且结果被转化为所述四种核苷酸序列之一。

在该方法中，用于核酸聚合酶反应的模板（或引物）每种都是单分子，或分子同种群。至于对第一碱基之后的其它碱基的测序，除了以上步骤（a）-（e）以外，执行以下步骤：f) 加入二价阳离子以完成该聚合反应；g) 除去二价阳离子和来自该聚合反应的其它终产物；和 h) 重复步骤（a）-（g），以鉴定多个核酸模板的每个另外的核苷酸。图 1 描述了本发明的多元实施方案。

在本文提供的对核酸模板目标区域进行测序的方法的另一实施方案中，其步骤包括：a) 通过形成反应混合物，在支持物上启动核酸聚合反应，该反应混合物包含核酸模板、引物、核酸聚合酶、和至少一种各自含有不同标记的末端磷酸标记的核苷酸，其中该反应混合物的组分或两种或多种所述组分的第一复合物被固定在该支持物上，并且所述一种或多种组分选自所述核酸模板、引物和核酸聚合酶，且其中该至少一种末端磷酸标记的核苷酸各自均含有与四种天然存在的碱基互补的碱基；b) 进行核酸聚合反应，通过温育反应混合物以形成包含核酸模板、引物、核酸聚合酶、和末端磷酸标记的核苷酸的第二复合物，其中该末端磷酸

标记的核苷酸含有与聚合位点处模板碱基互补的碱基；c) 除去未结合的末端磷酸标记的核苷酸和反应混合物的其它组分；d) 加入二价阳离子以完成该聚合反应；e) 检测来自第二复合物的末端磷酸标记核苷酸的标记；f) 鉴定该结合的核苷酸；g) 除去二价阳离子和来自该聚合反应的其它终产物；和 h) 重复步骤 a) -g) 以确定序列中每一个另外的核苷酸。在该实施方案中，用于核酸聚合酶反应的模板是单个分子，或分子同种群。

本发明还提供了在连续流动或停止 - 流动体系中采用上述步骤对目标序列进行测序的方法，其中通过本领域任何一种已知方法将固定材料保持在适当的位置，不同的试剂和缓冲液从体系的一端泵入，从体系的另一端排出。试剂和缓冲液可以连续流动或在适当的位置保持一定时间，以便进行聚合反应。在图 2 中展示了所述方法的图解说明。如图 2 所示，在微通道内的珠粒给反应复合物的固定提供了支持物表面。随着缓冲液和试剂沿该系统移动通过，从聚合酶反应释放的染料定向朝着微通道的出口端移动。可在系统内的大量位置，甚至在由于二价阳离子的加入染料从核苷酸释放之后，进行对由聚合酶捕获的染料标记的 dNTP（或 ddNTP）的检测。这些位置包括珠粒被保持的位置（在加入二价阳离子之前或之后），或者在珠粒被保持位置的下游但是在染料离开该系统之前。备选地，含染料的溶液可以先随着其离开该系统被收集，然后被检测。

若闭合复合物（其可处于例如 pH 或温度的反应条件）的稳定性使得其仅为数秒而非数分钟，该方法仍可用于对单一分子测序。检测技术涉及观察复合物位点处荧光的显微“闪光”，这将显示下一个正确的核苷酸（标记的）的暂时（持续数秒）结合（导致该 DNA-DNA 聚合酶复合物的有色“闪烁”）。既然仅与下一个正确的核苷酸形成的“闭合复合物”具有至少 10 倍于含有不正确的下一个核苷酸的开放复合物的寿命，则其荧光将主导该复合位点处观察到的信号。这很容易与仅在复合位点保持极短暂时间，尤其是低浓度存在的游离核苷酸的荧光区别。在可使用末端磷酸标记的 dNTP 或 ddNTP 的同时，碱基标记的 ddNTP 也可使用。结果是鉴别出在引物 3'端出现的单一“下一个”核苷酸。若选择的引物邻近感兴趣的位置例如 SNP，该信息可能是单独存在即有用的。

以下更详细地描述本发明。在本文提供的对核酸模板的目标区域进行分析的方法一个实施方案中，其步骤包括：a) 通过形成反应混合物，

在支持物上启动核酸聚合反应，该反应混合物包含核酸模板、引物、核酸聚合酶、和至少一种各自含有不同标记的核苷酸，其中该反应混合物的组分或两种或多种所述组分的第一复合物被固定在该支持物上，并且该一种或多种组分选自该核酸模板、引物和核酸聚合酶，且其中所述至少一种标记核苷酸之一含有与聚合位点出现的模板碱基互补的碱基；b) 温育反应混合物以形成包含核酸模板、引物、核酸聚合酶、和至少一种标记的核苷酸之一的第二复合物，其中该标记的核苷酸含有与聚合位点处模板碱基互补的碱基，且其中该标记的核苷酸在第二复合物内处于动态平衡；c) 检测该标记的核苷酸的标记；d) 基于检测的不同标记鉴定核苷酸。

在该方法中，用于核酸聚合酶反应的模板是单分子，或分子同种群。至于分析第一碱基之后的其它碱基，除了以上步骤(a)-(d)以外，执行以下步骤：e) 除去至少一种标记的核苷酸和反应混合物的其它组分；f) 向反应混合物加入核酸聚合酶、二价阳离子、和含有与聚合位点的模板碱基互补的碱基的核苷酸；g) 通过温育反应混合物一段时间来完成该聚合反应；h) 除去该二价阳离子、核苷酸和来自该聚合反应的其它终产物；和I) 针对待分析的每个另外的核苷酸重复步骤(a)-(h)。

该方法的缺点可能会是相同碱基的轮次(run)可能没有被充分测序。例如，序列GGGTTTCCTCTC (SEQ ID NO: 1)可能被读取为GTCTCTC (SEQ ID NO: 2)，但是这一信息在很多情况下是有用的，尤其是当确认已知序列时。

当这一方法以多元模式使用时，可允许在极短的时间内同时对数万个模板进行测序或对长DNA区域测序。因此，在本文提供的对多个核酸模板的目标区域进行平行鉴定的一个实施方案中，步骤包括：a) 在支持物结构上固定多种引物，其中各引物均含有独特的序列，且其中各引物(或同一引物的多个拷贝)均位于支持物结构上的可识别的离散位置；b) 通过形成反应混合物，在支持物结构上启动多个核酸聚合反应，该反应混合物包含多种固定引物、多种核酸模板、核酸聚合酶、和四种各自含有不同标记的标记核苷酸，其中该四种标记的核苷酸中的每一种均含有与四种天然存在的碱基中的每一种互补的碱基；c) 温育反应混合物以形成多种第二复合物，其各自均含有多种固定引物之一、多种核酸模板之一、核酸聚合酶、和标记核苷酸，其中标记核苷酸含有与聚合位点处

模板碱基互补的碱基，且其中所述标记核苷酸在第二复合物内处于动态平衡；d) 在各可识别的离散位置检测标记核苷酸的标记；e) 将从步骤d) 获得的数据记录到数据储存介质；和 f) 通过将记录的数据转化为所述四种核苷酸之一，鉴定出该多个核苷酸模板中的每一个的目标序列。

在该方法中，用于核酸聚合酶反应的模板（或引物）是单分子，或分子同种群。该方法的缺点可能会是相同碱基的存在可能没有被充分测序。例如，如上所述，序列 GGGTTTCCTCTC (SEQ ID NO: 1) 可能被读取为 GTCTCTC (SEQ ID NO: 2)，但是这一信息在很多情况下是有用的。尽管该方法只能提供第一碱基的序列信息，但对类似方法的循环可提供针对各模板的多个碱基的序列信息。

可以多元模式使用的另一方法也允许在极短的时间内同时对数万个模板进行测序或对长 DNA 区域测序。该方法可用于从同一模板获得多个碱基的序列，也存在同样限制。同样碱基的轮次可能不容易被检测到（例如序列 GGGTTTCCTCTC (SEQ ID NO: 1) 可能被读取为 GTCTCTC (SEQ ID NO: 2)）。因此，在本文提供的对多个核酸模板的目标区域进行平行鉴定的另一个实施方案中，步骤包括：a) 在支持物结构上固定多种引物，其中各引物均含有独特的序列，且其中各引物均位于支持物结构上的可识别的离散位置；b) 通过形成反应混合物，在支持物结构上启动多个核酸聚合反应，该反应混合物包含多种固定引物、多种核酸模板、核酸聚合酶、和一种标记核苷酸；c) 温育反应混合物以形成多种第二复合物，其各自均含有多种固定引物之一、多种核酸模板之一、该核酸聚合酶、和该标记核苷酸，其中标记核苷酸含有与聚合位点处模板碱基互补的碱基，且其中所述标记核苷酸在第二复合物内处于动态平衡；d) 在可识别的离散位置检测标记核苷酸的标记；e) 将从检测步骤获得的数据记录到数据储存介质；和 f) 除去标记的核苷酸和反应混合物的其它组分；g) 向反应混合物加入核酸聚合酶、二价阳离子、和标记核苷酸的未标记等同物；h) 通过温育反应混合物一段时间来完成该聚合反应；i) 除去该二价阳离子和来自该聚合反应的其它终产物；j) 用其它三种核苷酸之一重复步骤 (a) - (i)，直到所有四种核苷酸均被测试；和 k) 重复步骤 a) - j) 以确定另外的核苷酸序列。

在计算机系统中通过合适的算法对从该方法获得的数据（染料标记信息）进行处理。在数据产生的同时或者在试验反应的末尾，数据被转

化为四种核苷酸中每一种的序列信息。该序列随后针对多个核苷酸模板中的每一个被装配。应当注意，标记核苷酸的加入次序可以以预设循环出现，但这并非必需的。

以下实施例阐述了采用以上方法测定两种模板核酸分子序列的方法。假定待分析的序列是 (a) GGGTTTCCTCTC (SEQ ID NO: 1) 和 (b) CTCTCCTTTTGGG (SEQ ID NO: 3)，并且与 G、C、A、T 互补的核苷酸以该次序加入。在以上步骤 (j) 的第一次循环中，加入了与 G 互补的核苷酸。从模板上下一个核苷酸碱基是 G 的位置上 (在 SEQ ID NO: 1 的情况中) 检测到信号。从模板上下一个核苷酸碱基不是 G 的位置上 (在 SEQ ID NO: 3 的情况，其含有下一个 C) 没有检测到信号。将该信息记录到数据储存介质。在第二次循环中，加入与 C 互补的核苷酸。现在，从含有 SEQ ID NO: 3 模板的位置上 (具有下一个 C) 检测到信号。从含有 SEQ ID NO: 1 模板的位置上 (具有下一个 T) 没有检测到信号。同样，将该信号记录到数据储存介质。随着循环的继续，获得关于这两条模板的数据。若通过所述四种核苷酸的每一种进行的反应的完全循环没有给出可检测信号，则表明该模板序列被全部测序。对于 SEQ ID NO: 1 模板，来自该反应的最终结果读取为 GTCTCTC (SEQ ID NO: 2)，而对于 SEQ ID NO: 3 模板，来自该反应的最终结果读取为 CTCTCTG (SEQ ID NO: 4)。

若闭合复合物的稳定性使得其仅能被测量数秒到几分钟，则该方法仍可用于测序单一分子。检测技术涉及观察复合物位点处的显微“闪光”，这将显示下一个正确的核苷酸 (标记的) 的暂时 (持续数秒到数分钟) 结合。在可使用末端磷酸根标记的 dNTP 或 ddNTP 的同时，碱基标记的 ddNTP 也可使用。该技术的唯一缺点可能是相同碱基的轮次可能没有被充分测序。例如，序列 GGGTTTCCTCTC (SEQ ID NO: 1) 可能被读取为 GTCTCTC (SEQ ID NO: 2)，但是这一信息是有用的。

以下更详细地描述这些方法。在本文提供的对核酸模板目标区域进行分析的方法的一个实施方案中，其步骤包括：a) 通过形成反应混合物，在支持物上启动核酸聚合反应，该反应混合物包含核酸模板、引物、核酸聚合酶、和至少一种各自含有不同标记的核苷酸，其中该反应混合物的组分或两种或多种所述组分的第一复合物被固定在该支持物上，并且该一种或多种组分选自该核酸模板、引物和核酸聚合酶，且其中该至少

一种标记核苷酸之一含有与聚合位点的模板碱基互补的碱基；b) 温育反应混合物以形成包含核酸模板、引物、核酸聚合酶、和至少一种标记核苷酸之一的第二复合物，其中该标记的核苷酸含有与聚合位点处模板碱基互补的碱基，且其中该标记的核苷酸在第二复合物内处于动态平衡；c) 从反应混合物中除去所述至少一种标记核苷酸的未结合部分和反应混合物的其它组分；d) 检测标记的核苷酸的标记；和 e) 基于检测到的不同标记鉴定核酸序列。

在该方法中，用于核酸聚合酶反应的模板是单分子，或分子同种群。至于分析第一碱基之后的其它碱基，除了以上步骤 (a) - (e) 以外，执行以下步骤：f) 向反应混合物加入核酸聚合酶、二价阳离子、和含有经鉴定的碱基序列的未标记的核苷酸；g) 通过温育反应混合物一段时间来完成该聚合反应；h) 除去该二价阳离子和来自该聚合反应的其它终产物；和 i) 针对每一个另外的待测核苷酸，重复步骤 (a) - (h)。若标记的核苷酸是碱基标记的，则优选在步骤 f) 之前执行额外的洗涤步骤以除去模板-引物-聚合酶复合物捕获的标记核苷酸。

附图 3 描述了如上详述的在闭合复合物阶段通过磷酸标记的核苷酸中止进行测序的反应和检测方案。该方法的唯一缺点可能是相同碱基的轮次可能没有被充分测序。例如，序列 GGGTTTCCTCTC (SEQ ID NO: 1) 可能被读取为 GTCTCTC (SEQ ID NO: 2)，但是这一信息在很多情况下是有用的。

当这些方法以多元模式使用时，可允许在极短的时间内同时对数万个模板进行测序或对长 DNA 区域测序。因此，在本文提供的对多个核酸模板的目标区域进行平行鉴定的一个实施方案中，步骤包括：a) 在支持物结构上固定多种引物，其中各引物均含有独特的序列，且其中各引物（或同一引物的多个拷贝）均位于支持物结构上的可识别的离散位置；b) 通过形成反应混合物，在载体结构上启动多个核酸聚合反应，该反应混合物包含多种固定引物、多种核酸模板、核酸聚合酶、和四种各自含有不同标记的标记核苷酸，其中所述四种标记的核苷酸中的每一种均含有与四种天然出现的碱基中的每一种互补的碱基；c) 温育反应混合物以形成多种第二复合物，其各自均含有多种固定引物之一、多种核酸模板之一、核酸聚合酶、和标记核苷酸，标记核苷酸含有与聚合位点处模板碱基互补的碱基，且所述标记核苷酸在第二复合物内处于动态平衡；d)

从反应混合物中除去未结合的标记核苷酸和反应混合物的其它组分；e) 在各可识别的离散位置检测标记核苷酸的标记；f) 将获得的关于标记的信息记录到数据储存介质；和 g) 通过将记录的数据转化为所述四种核苷酸之一，鉴定出所述多个核苷酸模板中的每一个的目标序列。

在该方法中，用于核酸聚合酶反应的模板（或引物）是单分子，或分子同种群。图 4 描述了以上详述的平行测序反应方案。该方法的缺点可能是相同碱基的轮次可能没有被充分测序。例如，如上所述，序列 GGGTTTCCTCTC (SEQ ID NO: 1) 可能被读取为 GTCTCTC (SEQ ID NO: 2)，但是这一信息在很多情况下是有用的。尽管该方法只能提供第一碱基的序列信息，但对类似方法的循环可提供针对各模板的多个碱基的序列信息。

可以多元模式使用的另一方法也允许在极短的时间内同时对数万个模板进行测序或对长 DNA 区域测序。该方法可用于从同一模板获得多个碱基的序列。因此，在本文提供的对多个核酸模板的目标区域进行平行鉴定的另一个实施方案中，步骤包括：a) 在支持物结构上固定多种引物，其中各引物均含有独特的序列，且其中各引物均位于载体结构上的可识别的离散位置；b) 通过形成反应混合物，在支持物结构上启动多个核酸聚合反应，该反应混合物包含多种固定引物、多种核酸模板、核酸聚合酶、和至少一种标记核苷酸；c) 温育反应混合物以形成多种第二复合物，其各自均含有多种固定引物之一、多种核酸模板之一、该核酸聚合酶、和该至少一种标记核苷酸之一，其中各标记核苷酸均含有与聚合位点处模板碱基互补的碱基，且其中所述标记核苷酸在第二复合物内处于动态平衡；d) 从反应混合物中除去未结合的标记核苷酸和反应混合物的其它组分；e) 在可识别的离散位置检测标记核苷酸的标记；f) 将从检测步骤获得的数据记录到数据储存介质；g) 向反应混合物加入核酸聚合酶、二价阳离子、和标记核苷酸的未标记等同物；h) 通过温育反应混合物一段时间来完成该聚合反应；i) 除去该二价阳离子和来自该聚合反应的其它终产物；j) 用其它三种核苷酸之一重复步骤 a) - i)，直到所有四种核苷酸均被测试；和 k) 重复步骤 a) - j) 以确定另外的核苷酸序列。若标记的核苷酸是碱基标记的，则优选在步骤 g) 之前执行额外的洗涤步骤以除去模板-引物-聚合酶复合物捕获的标记核苷酸。

在计算机系统中通过合适的算法对从该方法获得的数据（染料标记

信息) 进行处理。在数据产生的同时或者在试验反应的末尾, 数据被转化为四种核苷酸中每一种的序列信息。该序列随后针对多个核苷酸模板中的每一个被装配。应当注意, 标记核苷酸的加入次序可以以预设循环出现, 但这并非必需的。

### 实施例

以下实施例陈述了本发明的某些优选实施方案, 但是无意于阐述所有的实施方案。这些实施例不应被认为是对其所附权利要求和/或本发明范围的限制。

#### 实施例 1: 展示“闭合复合物”的形成

附图 5 陈述了采用荧光标记的核苷酸形成该类型稳定闭合复合物的证据。其清楚地展示了复合物可如本文所述被检测。聚合酶反应 (20  $\mu$ l) 在 (25 mM Tris: 硼酸盐, pH=7.5, 0.1 mM EDTA, 10% 甘油) 中进行并且含有: 所示 50 pmole 引发的模板, +/-20 pmole 标记的、带正电的 ddGTP 和/或 ddATP; +/-3 pmole FY7 DNA 聚合酶。反应产物在 50mM Tris: 硼酸盐, pH=7.5 中的 7% PAGE 上分离。仅当聚合酶、引物模板、和正确的核苷酸存在时才观察到复合物形成。

附图 6 展示了“闭合复合物”可在多达 50mM EDTA 中形成, 可被 SDS 破坏、且与“冷”竞争物竞争。反应 (20  $\mu$ l) 在 (25 mM Tris: 硼酸盐, pH=7.5, 或附图上所示的 0.1 mM EDTA, 和 10% 甘油) 中进行并且含有: 由 T 作为下一模板核苷酸的 50 pmole 引发的模板, 20 pmole 标记的、带正电的 ddATP (下一个正确的核苷酸); 所示 +/-3 pmole FY7 DNA 聚合酶。在允许形成复合物之后, 如附图所示加入 [4 mM ddATP]<sub>r</sub>, 且样品被加热到 95 $^{\circ}$ C 持续 30 秒并且在如附图所示上样之前允许冷却。反应产物被上样到 50mM Tris: 硼酸盐, pH=7.5 中的 7% PAGE 上进行分离。ddATP-模板-FY7 DNA 聚合酶的闭合复合物可以在 50mM EDTA 和 0.1mM EDTA 下形成。然而, 闭合复合物在 0.1% SDS 的存在下被破坏, 并与未标记的“冷” ddATP 竞争。

附图 7 展示了闭合复合物的聚合酶滴定。反应 (20  $\mu$ l) 在 (25 mM Tris: 硼酸盐, pH=7.5, 或 5 mM EDTA, 和 10% 甘油) 中进行并且含有: 由 T 作为下一模板核苷酸的 20 pmole 引发的模板, 10 pmole 标记的、带正

电的 ddATP (下一个正确的核苷酸); 所示 FY7 DNA 聚合酶。通过使用 50mM Tris: 硼酸盐, pH=7.5 中的 7% PAGE 来分离反应产物。下一正确核苷酸通过 FY7 DNA 聚合酶的结合形成了稳定的“闭合复合物”, 其可以由非变性 PAGE 分离。通过 FY7 DNA 聚合酶的增加, 观察到闭合复合物形成以近线性方式增加。

显然可以在不背离本发明精神和范围的情况下作出如上所述的本发明的很多改变和变型。所述具体实施方案仅是以实施例的方式给出, 且本发明仅由所附权利要求的术语限制。

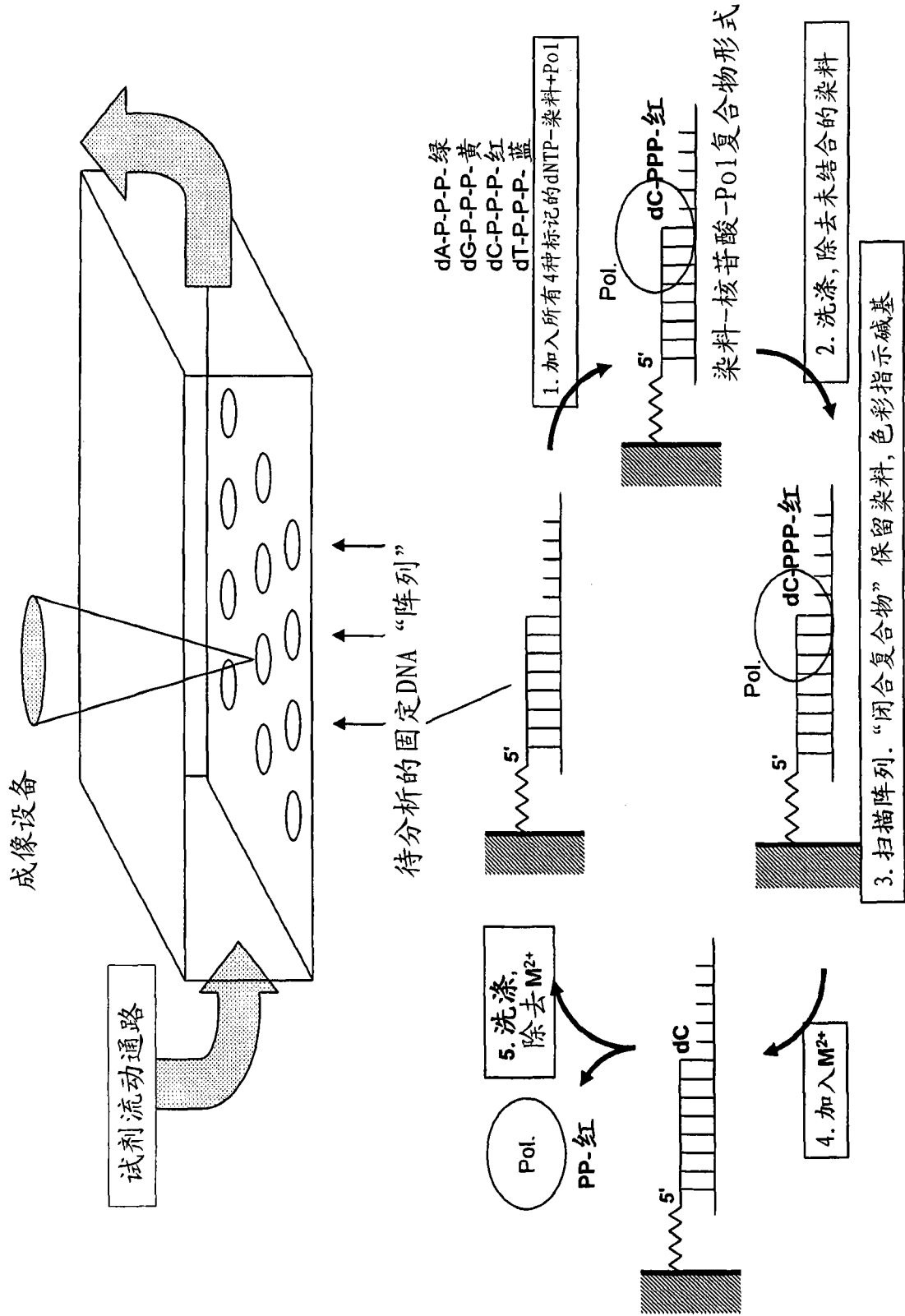


图 1

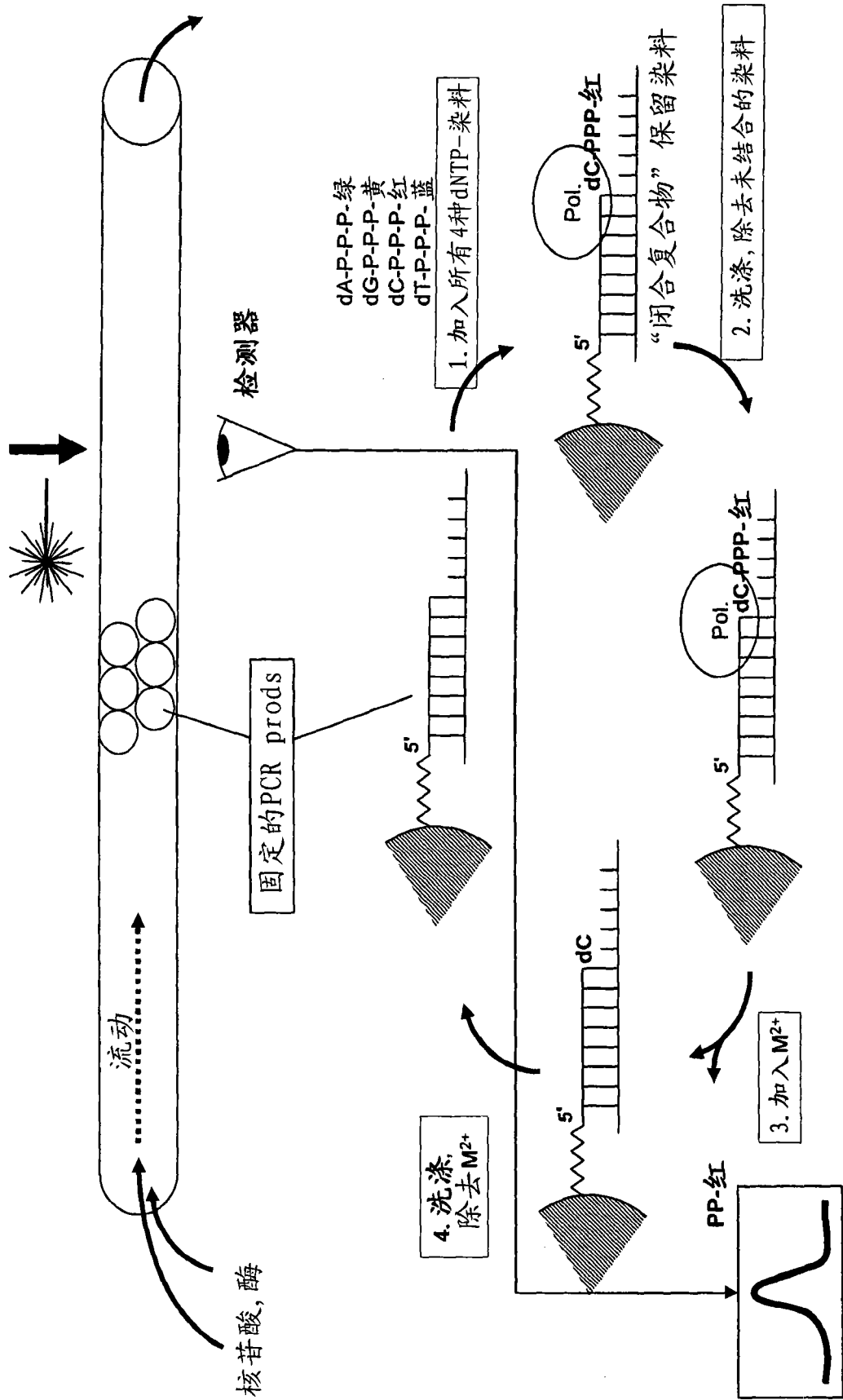


图 2

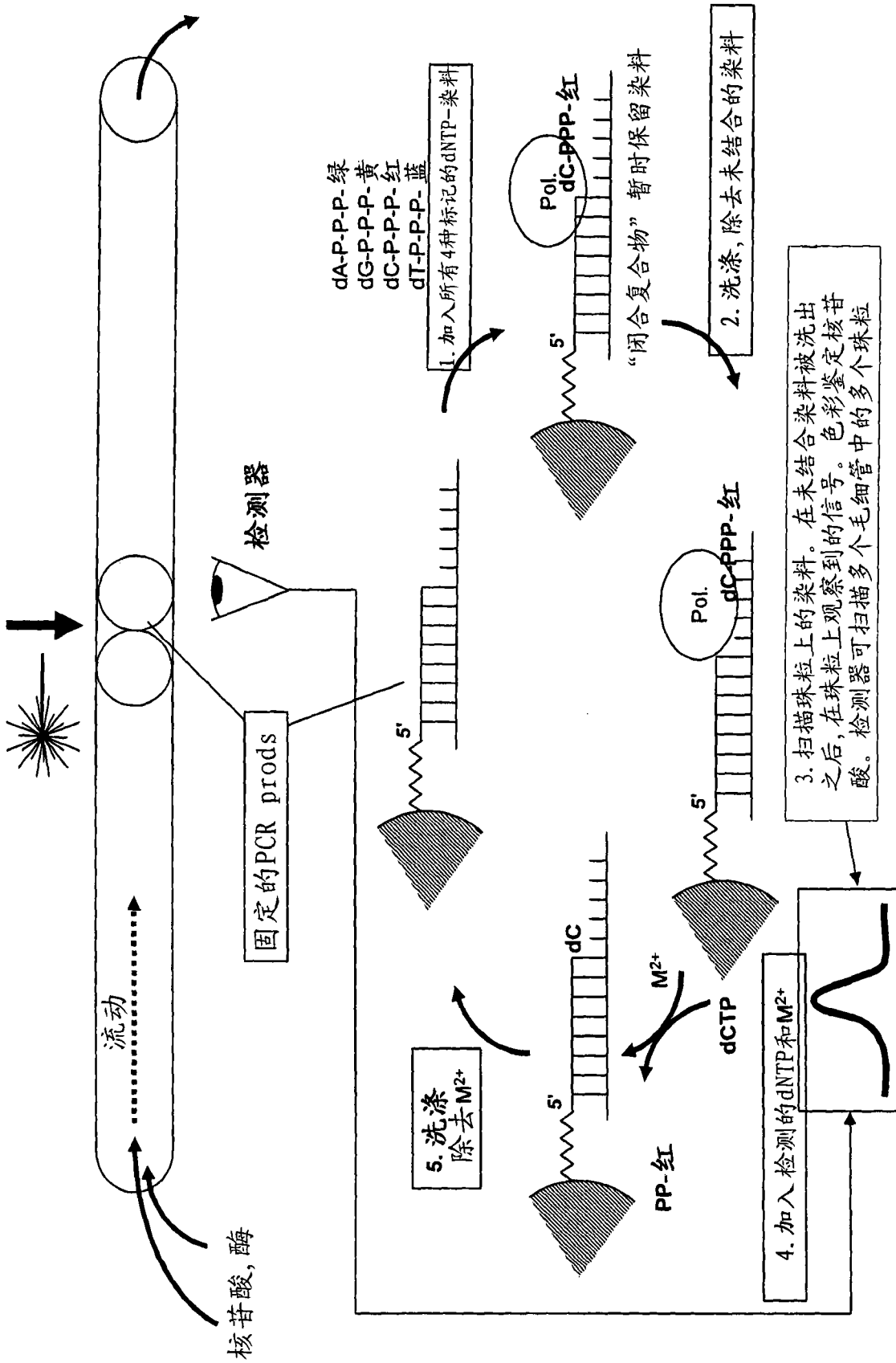


图 3



由FY7 DNA聚合酶结合下一正确核苷酸形成稳定的  
“闭合”复合物，其可由非变性PAGE分离

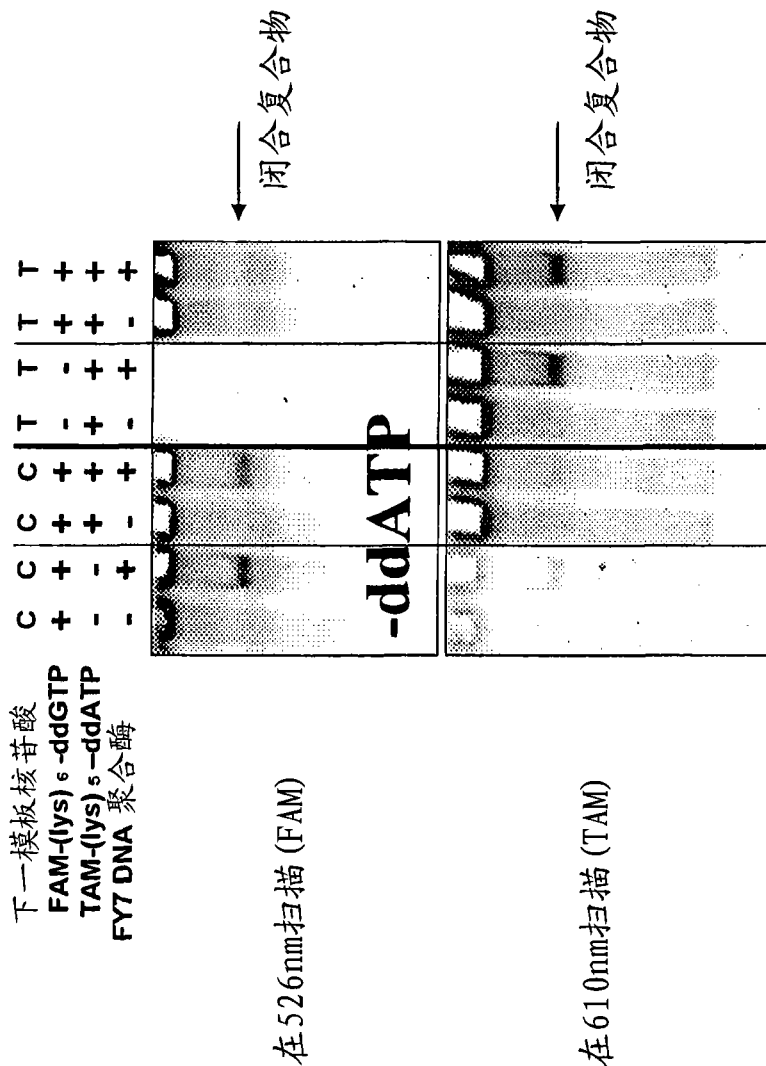


图 5

“闭合”复合物可形成于50mM EDTA中，  
可由SDS破坏，且与“冷”竞争物竞争

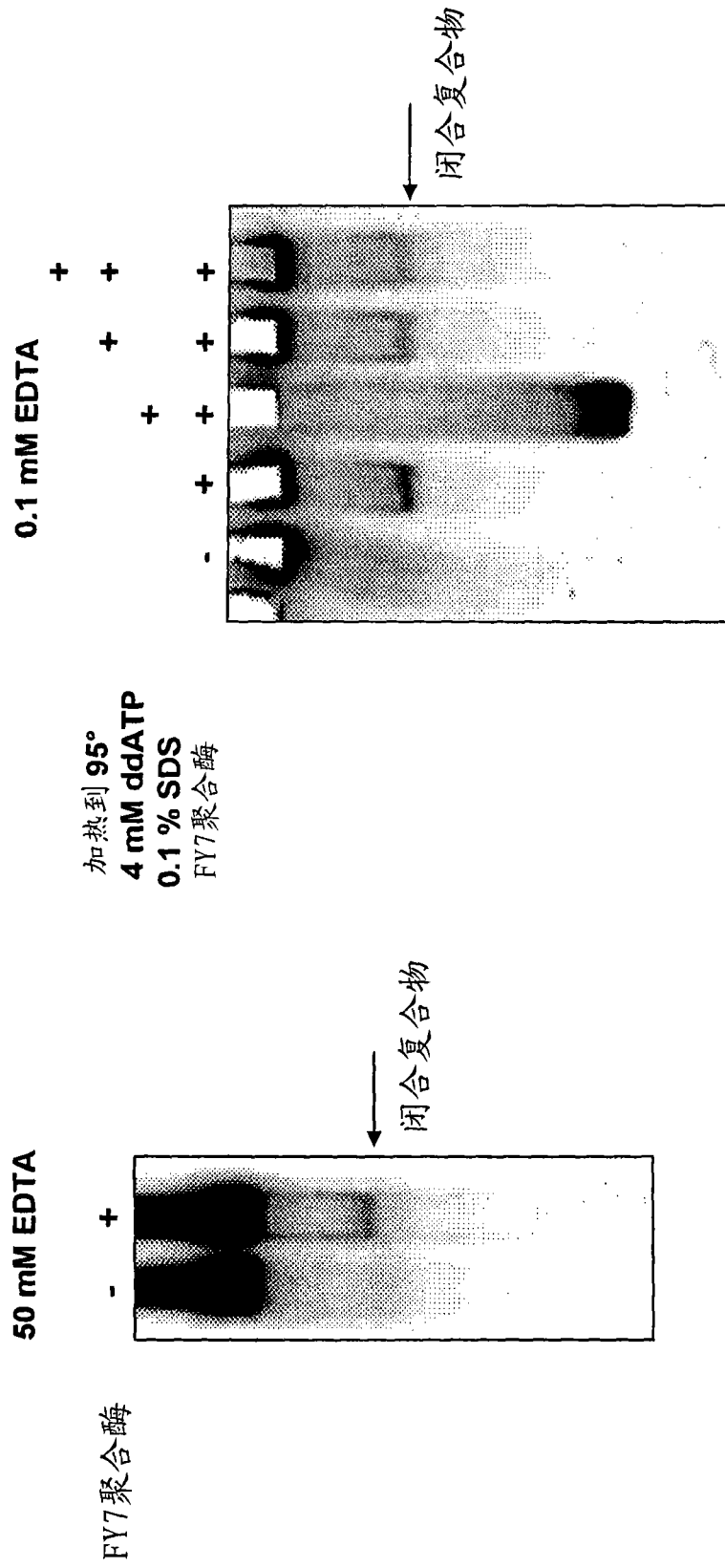


图 6

闭合复合物的聚合酶滴定

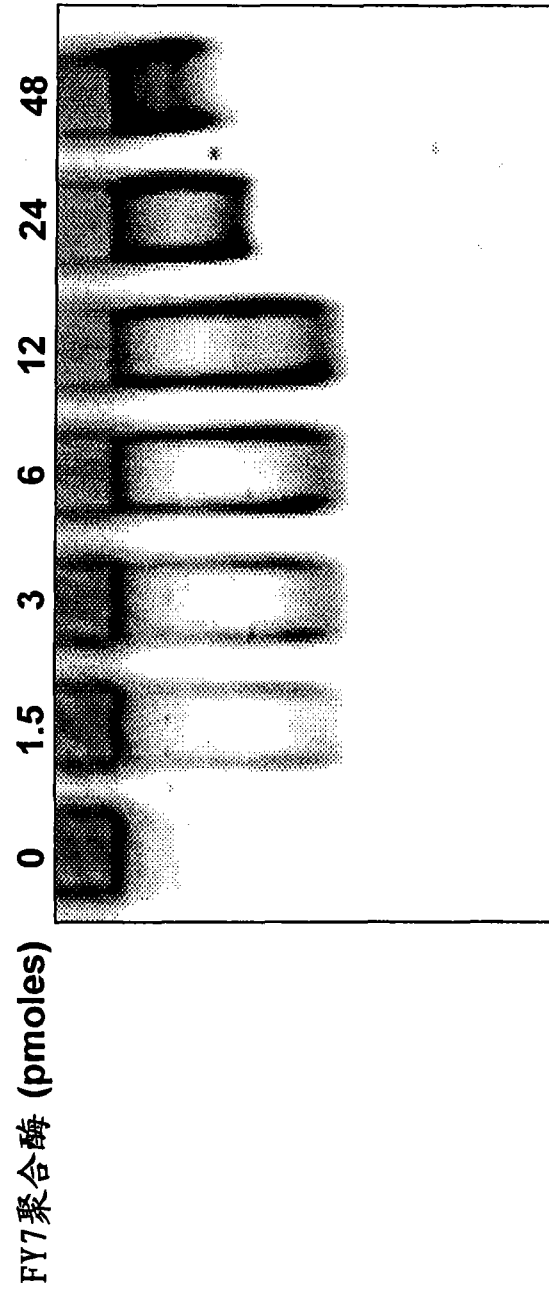


图 7