

(12) Ausschließungspatent

(11) DD 284 692 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 N 15/52
C 12 N 15/70
C 12 Q 1/68

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD C 12 N / 332 343 7	(22)	12.01.88	(44)	21.11.90
(31)	003,227 132,569	(32)	14.01.87 14.12.87	(33)	US

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

(54) Verfahren zur Herstellung prozessiver DNA-Polymerase

(55) DNA-Polymerase prozessiv-Herstellung; DNA-Sequenzierung, Zellenzüchten, codierendes Gen enthaltend; Gen modifiziert; Ernten

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung prozessiver DNA-Polymerase, die zur DNA-Sequenzierung verwendet wird, durch Züchten von Zellen, die das für natürlich vorkommende prozessive DNA-Polymerase codierende Gen enthalten, und Ernten der durch die Zellen produzierten Polymerase, dadurch gekennzeichnet, daß das Gen modifiziert wird, um die Exonucleaseaktivität der entstehenden Polymerase zu reduzieren.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung prozessiver DNA-Polymerase durch Züchten von Zellen, die das für natürlich vorkommende prozessive DNA-Polymerase codierende Gen enthalten, und Ernten der durch die Zellen produzierten Polymerase, dadurch gekennzeichnet, daß das Gen modifiziert wird, um die Exonucleaseaktivität der entstehenden Polymerase zu reduzieren.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Gen für natürlich vorkommende T7-DNA-Polymerase codiert.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Gen in seinem für einen Histidinrest in natürlich vorkommender Polymerase codierenden Abschnitt modifiziert wird.
4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Gen durch Deletion der für His-123 in der natürlich vorkommenden Polymerase codierenden Basenpaare modifiziert wird.
5. Verfahren nach Anspruch 2, 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Gen modifiziert wird, indem die Basenpaare deletiert werden, die für Aminosäuren 118 bis einschließlich 123 in der natürlich vorkommenden Polymerase codieren.

Verfahren zur Herstellung prozessiver DNA-Polymerase

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung prozessiver DNA-Polymerase, die für die DNA-Sequenzierung verwendet wird.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Die DNA-Sequenzierung schließt die Erzeugung von vier Populationen einzelsträngiger DNA-Fragmente mit einem definierten Terminus und einem variablen Terminus ein. Der variable Terminus endet immer an einer spezifischen gegebenen Nucleotidbase (entweder Guanin (G), Adenin (A), Thymin (T) oder Cytosin (C)). Die vier verschiedenen Gruppen von Fragmenten werden jeweils auf der Basis ihrer Länge auf einem Polyacrylamidgel hoher Auflösung getrennt; jede Bande auf dem Gel entspricht kolinear einem spezifischen Nucleotid in der DNA-Sequenz, wodurch die Positionen in der Sequenz der gegebenen Nucleotidbase identifiziert werden.

Im allgemeinen gibt es zwei Methoden der DNA-Sequenzierung. Eine Methode (Maxam- und Gilbert-Sequenzierung) beinhaltet die chemische Degradation isolierter DNA-Fragmente, wovon jedes an seinem definierten Terminus mit einer einzelnen radioaktiven Markierung versehen ist und jede Reaktion eine begrenzte Spaltung spezifisch an einer oder mehr der vier Basen (G, A, T oder C) ergibt. Die andere Methode (Didesoxysequenzierung) beinhaltet die enzymatische Synthese eines DNA-Stranges. Es

werden vier separate Synthesen durchgeführt, wobei jede Reaktion mittels Einbaus des entsprechenden Kettenabbruchdidesoxynucleotids bei einer spezifischen Base (G, A, T oder C) zur Termination gebracht wird. Die letztgenannte Methode wird bevorzugt, weil die DNA-Fragmente gleichmäßig markiert (anstatt endmarkiert) sind und so die größeren DNA-Fragmente zunehmend mehr Radioaktivität enthalten. Außerdem können ^{35}S -markierte Nucleotide anstelle von ^{32}P -markierten Nucleotiden verwendet werden, was eine schärfere Definition zur Folge hat; und die Reaktionsprodukte lassen sich leicht interpretieren, weil jede Spur nur G, A, T oder C entspricht. Das für die Didesoxysequenzierung am häufigsten verwendete Enzym ist das große Fragment DNA-Polymerase-I-Fragment von Escherichia coli. Eine andere verwendete Polymerase ist die AMW Reverse Transkriptase.

Ziel der Erfindung

Durch das erfindungsgemäße Verfahren wird prozessive DNA-Polymerase, die zur DNA-Sequenzierung verwendet wird, zur Verfügung gestellt.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung prozessiver DNA-Polymerase bereitzustellen.

Die Erfindung umfaßt ein Verfahren zur Herstellung prozessiver DNA-Polymerase durch Züchten von Zellen, die das für natürlich vorkommende prozessive DNA-Polymerase codierende Gen enthalten, und Ernten der durch die Zellen

- 2a -

erzeugten Polymerase, dadurch gekennzeichnet, daß das Gen modifiziert wird, um die Exonucleaseaktivität der entstehenden Polymerase zu reduzieren.

Die Erfindung liefert eine DNA-Polymerase, die prozessiv und nichtdiskriminierend ist und kurze Primer verwenden kann. Außerdem besitzt die Polymerase wenig oder keine assoziierte Exonucleaseaktivität. Das sind ideale Eigenschaften für die oben beschriebenen Methoden und insbesondere für die DNA-Sequenzierungsreaktionen, da der Hintergrundwert der Radioaktivität in den Polyacylamidgelen vernachlässigbar ist, wenige oder keine Artefaktbande existieren und die Bande scharf sind - wodurch die DNA-

Sequenz leicht lesbar ist.

Ferner gestattet eine derartige Polymerase neuartige Methoden der Sequenzierung langer DNA-Fragmente, wie es nachstehend ausführlich beschrieben wird.

Andere Merkmale und Vorteile der Erfindung werden aus der folgenden Beschreibung der bevorzugten Ausführungsbeispiele näher veranschaulicht.

Ausführungsbeispiele

Es folgt eine kurze Beschreibung der Zeichnungen.

In den Zeichnungen zeigen:

Fig. 1 - 3 schematische Darstellungen der Vektoren pTrx-2, mGP1-1 bzw. pGP5-5;

Fig. 4 eine grafische Darstellung der selektiven Oxidation von T7-DNA-Polymerase;

Fig. 5 eine grafische Darstellung der Fähigkeit modifizierter T7-Polymerase zur Synthetisierung von DNA in Anwesenheit von Etheno-dATP;

Fig. 6 eine schematische Darstellung der enzymatischen Amplifizierung von genomischer DNA unter Verwendung von modifizierter T7-DNA-Polymerase;

Fig. 7, 8 und 9 die Nucleotidsequenzen von pTrx-2, einem Teil von pGP5-5 bzw. mGP1-2.

DNA-Polymerase

Die erfindungsgemäße DNA-Polymerase ist im allgemeinen prozessiv, besitzt wenig oder keine assoziierte Exonucleaseaktivität, diskriminiert nicht den Nucleotidanalogueinbau und kann kleine Oligonucleotide (wie z. B. tetramere, Hexamere und Octamere) als spezifische Primer verwenden. Diese Eigenschaften sollen nun im einzelnen diskutiert werden.

Prozessivität

Unter Prozessivität ist zu verstehen, daß die DNA-Polymerase in der Lage ist, unter Verwendung der gleichen Primermatrize ohne Dissoziation von der Matrize viele Nucleotide kontinuierlich einzubauen. Der Grad der Prozessivität variiert mit unterschiedlichen Polymerasen; einige inkorporieren nur wenige Basen vor der Dissoziation (z. B. Klenow, T4-DNA-Polymerase und Reverse Transkriptase), während andere, wie die der vorliegenden Erfindung, unter geeigneten Umgebungsbedingungen für mindestens 500 Basen und vorzugsweise mindestens 100 Basen gebunden bleiben. Solche Umgebungsbedingungen schließen adäquate Vorräte aller vier Desoxynucleosidtriphosphate und eine Inkubationstemperatur von 10 °C bis 50 °C ein. Die Prozessivität wird in Anwesenheit von E. coli-Einzelstrangbindungsprotein (ssb) stark erhöht.

Mit prozessiven Enzymen erfolgt die Termination einer Sequenzierungsreaktion nur bei solchen Basen, bei denen ein Kettenabbruchagens eingebaut ist, wie z. B. ein Didesoxynucleotid. Ist die DNA-Polymerase nichtprozessiv, dann entstehen während der Sequenzierungsreaktionen Artefaktbande, und zwar an Positionen, die dem Nucleotid entsprechen, wo die Polymerasedissoziation erfolgte. Häufige Dissoziation schafft einen Hintergrund von Banden an inkorrekten Positionen und verschleiert die richtige DNA-Sequenz. Dieses Problem wird zum Teil korrigiert, indem das Reaktionsgemisch über einen langen Zeitraum (30 bis 60 Minuten) bei einer hohen Konzentration von Substraten inkubiert wird, wodurch die Artefaktbande in einen Bereich hoher relativer Molekülmasse oben im Gel, weg von der Region, wo die DNA-Sequenz gelesen wird, "gejagt" werden. Das ist keine ideale Lösung, weil eine nichtprozessive DNA-Polymerase eine hohe Wahrscheinlichkeit der Dissoziation von der Matrize in Regionen kompakter Sekundärstruktur oder Haarnadeln aufweist. Reinitiiierung der Primerelongation an diesen Stellen ist nicht effizient, und das übliche Resultat ist die Bildung von Banden in der gleichen Position für alle vier Nucleotide, wodurch die DNA-Sequenz undeutlich wird.

Analogondiskrimination

Die erfindungsgemäßen DNA-Polymerasen unterscheiden nicht signifikant zwischen Didesoxynucleotidanaloga und normalen Nucleotiden. Das heißt, die Möglichkeit des Einbaus eines Analogons ist ungefähr ebenso groß wie die des Einbaus eines normalen Nucleotids. Die erfindungsgemäßen Polymerasen diskriminieren auch nicht signifikant irgendwelche anderen Analoga. Das ist wichtig, weil Sequenzierungsreaktionen zusätzlich zu den vier normalen Desoxynucleosidtriphosphaten (dGTP, dATP, dTTP und dCTP) die Inkorporation anderer Arten von Nucleotidderivaten, üblicherweise zur Markierung der synthetisierten Stränge mit ^{35}S , ^{32}P , oder andere chemische Agenzien erfordern. Wenn eine DNA-Polymerase keine Analoga diskriminiert, besteht für den Einbau eines Analogons die gleiche Wahrscheinlichkeit wie für den Einbau eines normalen Nucleotids. Das ist für markierte Nucleosidtriphosphate wichtig, um die synthetisierten DNA-Stränge mit einem Minimum an Radioaktivität effizient zu markieren. Ferner sind mit solchen Enzymen niedrigere Analogawerte erforderlich, wodurch die Sequenzierungsreaktion billiger wird als mit einem diskriminierenden Enzym.

Diskriminierende Polymerasen zeigen einen anderen Diskriminierungsgrad, bei prozessiver Polymerisation als bei Verzögerung, wenn sie danach streben, die Synthese über ein Sekundärstrukturhindernis durchzuführen. Bei solchen Hindernissen tritt eine Variabilität in der Intensität unterschiedlicher radioaktiver Bande auf dem Gel auf, was die Sequenz verschleiern kann.

Exonucleaseaktivität

Die erfindungsgemäße DNA-Polymerase hat weniger als 50 %, vorzugsweise weniger als 1 % des normalen oder natürlich assoziierten Grades an Exonucleaseaktivität (Ausmaß der Aktivität pro Polymerasemolekül). Unter dem normalen oder natürlich assoziierten Grad ist die Exonucleaseaktivität unmodifizierter T7-Polymerase zu verstehen. Normalerweise beträgt die assoziierte Aktivität

etwa 5000 Einheiten Exonucleaseaktivität pro mg Polymerase, wobei die Messung, wie nachstehend beschrieben, durch eine Modifikation des Verfahrens von Chase et al. (249 J. Biol. Chem. 4545, 1974) erfolgt. Exonucleasen erhöhen die Genauigkeit der DNA-Synthese durch Exzision irgendwelcher neu synthetisierter Basen, die inkorrekte Basenpaarung zur Matrize aufweisen. Solche assoziierten Exonucleaseaktivitäten sind nachteilig für die Qualität der DNA-Sequenzierungsreaktionen. Sie steigern die erforderliche Minimalkonzentration von Nucleotidpräkursoren, die der Reaktion zugesetzt werden müssen, weil sich die Polymeraseaktivität, wenn die Nucleotidkonzentration absinkt, auf einen Wert verlangsamt, der keine Netto-DNA-Synthese oder sogar Abbau der synthetisierten DNA zur Folge hat.

Noch wichtiger ist, daß assoziierte Exonucleaseaktivität eine DNA-Polymerase in Regionen in der Matrize mit Sekundärstrukturhindernissen zum Stillstand bringt. Wenn sich eine Polymerase einer solchen Struktur nähert, verringert sich ihre Synthesegeschwindigkeit, da sie bestrebt ist zu passieren. Eine assoziierte Exonuclease wird die neu synthetisierte DNA ausschneiden, wenn die Polymerase stehenbleibt. Infolgedessen laufen zahlreiche Synthese- und Exzisionszyklen ab. Das kann zur Folge haben, daß die Polymerase möglicherweise über die Haarnadel hinaus synthetisiert (ohne Nachteil für die Qualität der Sequenzierungsreaktion); oder die Polymerase kann von dem synthetisierten Strang dissoziieren (was eine Artefaktbande in der gleichen Position bei allen vier Sequenzierungsreaktionen zu Folge hat); oder ein Kettenabbruchagens kann mit einer hohen Frequenz inkorporiert werden und eine breite Variabilität der Intensität verschiedener Fragmente in einem Sequenzierungsgel erzeugen. Das geschieht, weil sich die Einbaufrequenz eines Kettenabbruchagens an irgendeiner gegebenen Stelle mit der Anzahl der Möglichkeiten erhöht, die die Polymerase zum Einbau eines Kettenabbruchnucleotids hat, und so wird die DNA-Polymerase ein Kettenabbruchagens an Stillstandsstellen mit einer viel höheren Frequenz einbauen als an anderen Stellen.

Eine ideale Sequenzierungsreaktion erzeugt Bande gleichmäßiger Intensität im gesamten Gel. Das ist wesentlich für die Erzielung der optimalen Exposition des Röntgenfilms für jedes radioaktive Fragment. Besteht eine variable Intensität radioaktiver Bande, dann besteht die Möglichkeit, daß schwächere Bande unentdeckt bleiben. Zur Erzielung gleichmäßiger radioaktiver Intensität aller Fragmente sollte die DNA-Polymerase in jeder Position auf der DNA den gleichen Zeitraum zubringen, ohne Bevorzugung weder für den Zusatz noch die Entfernung von Nucleotiden an einer gegebenen Stelle zu zeigen. Das geschieht, wenn der DNA-Polymerase jegliche assoziierte Exonuclease fehlt, so daß sie nur eine Möglichkeit hat, ein Kettenabbruchnucleotid in jeder Position entlang der Matrize einzubauen.

Kurze Primer

Die erfindungsgemäße DNA-Polymerase ist in der Lage, Primer aus 10 Basen oder weniger, sowie längere Primer, am besten aus 4 bis 20 Basen zu verwenden. Die Möglichkeit des Einsatzes kurzer Primer bietet eine Reihe bedeutender Vorteile für die DNA-Sequenzierung. Die kürzeren Primer sind billiger zu kaufen und leichter zu synthetisieren als die üblichen 15-20mer-Primer. Sie hybridisieren (anneal) auch schneller an komplementären Stellen auf einer DNA-Matrize, wodurch die Sequenzierungsreaktion beschleunigt wird. Außerdem gestattet die Möglichkeit des Einsatzes kleiner (z. B. 6 oder 7 Basen) Oligonucleotidprimer für die DNA-Sequenzierung die Anwendung von Strategien, die andernfalls für die Sequenzierung langer DNA-Fragmente nicht anwendbar sind. Zum Beispiel könnte ein 80 Zufallshexamere enthaltender Kit generiert werden, von denen keines mit anderen Stellen im Klonierungsvektor komplementär ist. Statistisch betrachtet, tritt eine der 80 Hexamersequenzen durchschnittlich aller 50 Basen entlang dem zu sequenzierenden DNA-Fragment auf. Die Bestimmung einer Sequenz von 3000 Basen würde nur fünf Sequenzierungszyklen erfordern. Zuerst würde ein "Universal"-Primer (z. B. Biolabs # 1211, Sequenz 5' GTAAAACGACGGCCAGT 3') zur Sequenzierung von etwa 600 Basen an einem Ende des Inserts verwendet werden. Unter Verwendung der Resultate aus dieser Se-

von 84 000 Dalton (Modrich et al. 150 J. Biol. Chem. 5515, 1975), das andere das E. coli-codierte Thioredoxin von 12 000 Dalton (Tabor et al., 82 Proc. Natl. Acad. Sci. 104, 1985). Das Thioredoxin ist ein akzessorisches Protein und heftet das Gen-5-Protein (die tatsächliche DNA-Polymerase) an die Primermatrize. Die natürliche DNA-Polymerase hat eine mit ihr assoziierte sehr aktive 3'-5'-Exonuclease. Diese Aktivität macht die Polymerase unbrauchbar für die DNA-Sequenzierung und muß inaktiviert oder modifiziert werden, bevor die Polymerase verwendet werden kann. Das ist, wie nachstehend beschrieben, leicht auszuführen, und zwar entweder chemisch, durch lokale Oxidation der Exonuclease-domäne, oder genetisch, durch Modifizierung der Codierungsregion des die Aktivität codierenden Polymerasegens.

pTrx-2

Zur Klonierung des trxA-(Thioredoxin)-Gens von E. coli wurde Wildtyp-E. coli-DNA mit Sau3A teilweise gespalten und die Fragmente an BamHI-gespaltene T7 DNA ligiert, die von Stamm T7 ST9 isoliert wurde. (Tabor et al., in Thioredoxin and Glutaredoxin Systems: Structure and Function (Homgren et al., Hrsg.) S. 285-300, Raven Press, NY; und Tabor et al., siehe oben). Die ligierte DNA wurde in E. coli-TrxA⁻-Zellen transfiziert, das Gemisch wurde auf trxA-Zellen plattiert, und die entstehenden T7-Plaques wurden gesammelt. Da T7 nicht ohne ein aktives E. coli-trxA-Gen wachsen kann, konnten nur die das trxA-Gen enthaltenden Phagen Plaques bilden. Die klonierten trxA-Gene wurden auf ein 470-Basenpaar-HincII-Fragment gebracht.

Um eine Überproduktion von Thioredoxin zu erzielen, wurde ein Plasmid, pTrx-2, konstruiert. Kurz gesagt, wurde das trxA-Gen enthaltende 470-Basenpaar-HincII-Fragment durch Standardverfahren (Maniatis et al., Cloning: A Laboratory Manual (Klonierung: Ein Laborhandbuch) Cold Spring Harbor Labs., Cold Spring Harbor, N. Y.) isoliert und an ein Derivat von pBR322, das einen P_{tac}-Promotor (ptac-12, Amann et al., 25 Gen 167, 1983) enthielt, ligiert. Mit Bezug auf Fig. 2 ist festzustellen, daß ptac-12, das

β -Lactamase und einen Col-EL-Ursprung aufweist, mit PvuII geschnitten wurde, um ein Fragment von 2290 Basenpaaren zu gewinnen, das dann unter Verwendung von im Handel erhältlichen Linkern (SmaI-BamHI-Polylinker) an zwei Tandem-Kopien von *trxA* (HincII-Fragment) ligiert wurde, um pTrx-2 zu bilden. Die komplette Nucleotid-Sequenz von pTrx-2 ist in Figur 7 dargestellt. Die Thiothioninproduktion läuft nun unter der Kontrolle des tac-Promotors ab und kann so spezifisch, z. B. durch IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactosid), induziert werden.

pGP5-5 und mGP1-2

Einige Genprodukte von T7 sind bei Expression in E. coli letal. Es wurde ein Expressionssystem entwickelt, um Klonierung und Expression von letalen Genen, auf der Basis der induzierbaren Expression von T7-RNA-Polymerase, zu erleichtern. Gen-5-Protein ist in einigen E. coli-Stämmen letal, und ein Beispiel für ein solches System wird von Tabor et al., 82 Proc. Nat. Acad. Sci. 1074 (1985) beschrieben, wo T7-Gen-5 unter die Kontrolle des $\phi 10$ -Promotors gestellt wurde und nur exprimiert wird, wenn T7-RNA-Polymerase in der Zelle vorhanden ist.

Kurz gesagt, wurde pGP5-5 (Fig. 3) durch Standardverfahrensweisen konstruiert, wobei synthetische BamHI-Linker verwendet wurden, um T7-Fragment von 14306 (NdeI) bis 16869 (AhaIII) mit Gen-5-Gehalt mit dem 560-Basenpaar-Fragment von T7 von 5667 (HincII) bis 6166 (Fnu4H1), das sowohl die $\phi 1.1A$ -Promotoren als auch die $\phi 1.1B$ -Promotoren enthält, die durch T7-RNA-Polymerase erkannt werden, und dem 3-Kilobasenpaar-BamHI-HincII-Fragment von pACYC177 zu verbinden (Chang et al., 134 J. Bacteriol. 1141, 1978). Die Nucleotidsequenz der T7-Inserts und Linker wird in Fig. 8 gezeigt. In diesem Plasmid wird Gen 5 nur exprimiert, wenn T7-RNA-Polymerase in der Zelle vorhanden ist.

Unter Bezugnahme auf Fig. 3 ist zu sagen, daß T7-RNA-Polymerase auf Phage-Vektor mGP1-2 zur Verfügung steht. Dieser ähnelt pGP1-2 (Tabor et al., ebenda), mit dem Unterschied, daß das Fragment von

von T7 von 3133 (HaeIII) bis 5840 (HinfI), das T7-RNA-Polymerase enthält, unter Verwendung von Linkern (BglII bzw. SalI) an BamHI-SalI-geschnittenes M13 mp8 ligiert wurde, wodurch das Polymerasegen unter die Kontrolle des lac-Promotors gestellt wurde. Die komplette Nucleotidsequenz von mGP1-2 wird in Fig. 9 dargestellt.

Da pGP5-5 und pTrx-2 unterschiedliche Replikationsursprünge haben (bzw. einen P15A- und einen ColE1-Ursprung), können sie gleichzeitig in eine Zelle transformiert werden. pTrx-2 exprimiert große Mengen Thioredoxin in Anwesenheit von IPTG. mGP1-2 kann in der gleichen Zelle koexistieren wie diese beiden Plasmide und kann zur Regulierung der Expression von T7-DNA-Polymerase aus pGP5-5 verwendet werden, indem einfach die Produktion von T7-DNA-Polymerase durch Induktion des lac-Promotors mit beispielsweise IPTG herbeigeführt wird.

Überproduktion von T7-DNA-Polymerase

Es gibt mehrere potentielle Strategien für die Überproduktion und Rekonstituierung der beiden Genprodukte trxA und Gen 5. Für alle Strategien können die gleichen Zellstämme und Plasmide eingesetzt werden. Bei der bevorzugten Strategie werden die beiden Gene in der gleichen Zelle gemeinsam überexprimiert. (Und zwar, weil Gen 5 gegenüber Proteasen empfindlich ist, bis Thioredoxin daran gebunden ist). Wie nachstehend detailliert beschrieben, besteht eine Verfahrensweise darin, die beiden Gene separat auf je zwei kompatiblen Plasmiden in der gleichen Zelle zu placieren. Wahlweise könnten die beiden Gene "in Tandem" auf dem gleichen Plasmid placiert werden. Es ist wichtig, daß das T7-Gen-5 unter die Kontrolle eines "non-leaky" (nicht durchlässigen) induzierbaren Promotors wie z. B. Φ 1.1A, Φ 1.1B und Φ 10 von T7 gestellt wird, da die Synthese selbst kleiner Mengen der beiden Polypeptide zusammen in den meisten E. coli-Zellen toxisch ist.

Unter "non-leaky" ist zu verstehen, daß weniger als 500 Moleküle des Genproduktes pro Zellengenerationszeit aus dem Gen produziert werden, wenn der die Expression des Gens kontrollierende Promotor

nicht aktiviert wird. Vorzugsweise wird das T7-RNA-Polymerase-Expressionssystem verwendet, obwohl andere Expressionssysteme, die induzierbare Promotoren ausnutzen, ebenfalls eingesetzt werden könnten. Ein "leaky" (durchlässiger) Promotor, z. B. plac, gestattet, daß mehr als 500 Proteinmoleküle synthetisiert werden, selbst wenn keine Induktion erfolgt, wodurch Zellen, die letale Gene enthalten, unter der Kontrolle eines solchen Promotors schlecht wachsen und für diese Erfindung nicht geeignet sind. Es ist natürlich möglich, diese Produkte in Zellen zu produzieren, wo sie nicht letal sind, beispielsweise ist der plac-Promotor in solchen Zellen geeignet.

Bei einer zweiten Strategie kann jedes Gen kloniert und separat überexprimiert werden. Wird diese Strategie angewendet, so werden die Zellen, die die individuell überproduzierten Polypeptide enthalten, vor der Herstellung der Extrakte kombiniert, zu welchem Zeitpunkt die beiden Polypeptide eine aktive T7-DNA-Polymerase bilden.

Beispiel 1: Produktion von T7-DNA-Polymerase

E. coli-Stamm JM103 (Messing et al., 9 Nuc. Acid Res. 309, 1981) wird zur Herstellung von Vorräten an mGP1-2 verwendet. JM103 wird bei -80°C in 50 % Glycerol aufbewahrt und auf einer Standard-Minimalmedien-Agarplatte ausgestrichen. Über Nacht wird in 25 ml Standard-M9-Medien bei 37°C eine Einzelkolonie gezüchtet, und eine einzelne Plaque von mGP1-1 wird gewonnen, indem der Vorrat mit frisch hergestellten JM103-Zellen titriert wird. Die Plaque wird verwendet, um 10 ml 2X LB (2 % Bacto-Trypton, 1 % Hefeextrakt 0,5 % NaCl, 8 mM NaOH) mit JM103-Gehalt, das auf einen Wert von $A_{590} = 0,5$ gezüchtet wurde, zu inokulieren. Diese Kultur liefert den Phagenvorrat für die Herstellung einer großen Kultur von mGP1-2. Nach 3 bis 12 Stunden wird die 10-ml-Kultur zentrifugiert, und die überstehende Flüssigkeit wird verwendet, um die große Kultur (2 l) zu infizieren. Für die große Kultur werden 4 x 500ml 2X LB mit 4 x 5 ml in M9 gezüchteten 71.18-Zellen geimpft und bei 37°C geschüttelt. Wenn die große Zellkultur auf einen Wert von

$A_{590} = 1,0$ (etwa drei Stunden) gewachsen ist, wird sie mit 10 ml überstehender Flüssigkeit, die das Starterlysat von mGP1-2 enthält, geimpft. Die infizierten Zellen werden dann über Nacht bei 37°C gezüchtet. Am nächsten Tag werden die Zellen durch Zentrifugation entfernt, und die überstehende Flüssigkeit ist bereit zur Verwendung für die Induktion von K38/pGP5-5/pTrx-2 (siehe unten). Die überstehende Flüssigkeit kann etwa 6 Monate bei 4°C bei einem Titer von $\sim 5 \times 10^{11}$ Φ /ml gelagert werden. Bei diesem Titer infiziert 1 l Phage 12 l Zellen bei einem Wert von $A_{590} = 5$ mit einer Infektionsmultiplizität von 15. Ist der Titer niedrig, kann der mGP1-2-Phage aus der überstehenden Flüssigkeit konzentriert werden, indem NaCl (60 g/l) und PEG-6000 (65 g/l) in der überstehenden Flüssigkeit gelöst werden, gestattet wird, daß sich das Gemisch im Verlaufe von 1 bis 72 Stunden bei 0°C absetzt, und dann zentrifugiert wird (7000 U/Min., 20 Minuten lang). Das Präzipitat, das den mGP1-2-Phagen enthält, wird in etwa einem Zwanzigstel des ursprünglichen Volumens von M9-Medien resuspendiert.

K38/pGP5-5/pTrx-2 ist der E. coli-Stamm (Genotyp HfrC (Λ)), der die beiden kompatiblen Plasmide pGP5-5 und pTrx-2 enthält. Plasmid pGP5-5 hat einen P15A-Replikationsursprung und exprimiert das Kanamycin(Km)-Resistenzgen. pTrx-2 hat einen ColEI-Replikationsursprung und exprimiert das Ampicillin(Ap)-Resistenzgen. Die Plasmide werden durch Standardverfahren in K38 eingeführt, wobei Km^{R} bzw. Ap^{R} ausgewählt werden. Die Zellen K38/pGP5-5/pTrx-2 werden in 50 % Glycerol bei -80°C aufbewahrt. Vor der Verwendung werden sie auf einer Platte ausgestrichen, die 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin und Kanamycin enthält, über Nacht bei 37°C gezüchtet, und eine einzelne Kolonie wird 4 bis 6 Stunden bei 37°C in 10 ml LB-Medien mit einem Gehalt von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin und Kanamycin gezüchtet.

Die 10-ml-Zellkultur wird verwendet, um 500 ml LB-Medien mit einem Gehalt von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin und Kanamycin zu impfen, und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am folgenden Tag wird die 500-ml-Kultur verwendet, um 12 l 2X LB- KPO_4 -Medien (2 % Bacto-Trypton, 1 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl, 20 mM KPO_4 , 0,2 % Dextrose und

0,2 % Casaminsäuren, pH 7,4) zu impfen, und wird unter Belüftung bei 37 °C in einem Fermentor gezüchtet. Wenn die Zellen einen Wert von $A_{590} = 5,0$ erreichen (d. h. Zellen der logarithmischen und der stationären Wachstumsphase), werden sie mit mGP1-2 bei einer Infektionsmultiplizität von 10 infiziert, und IPTG wird zugesetzt (Endkonzentration 0,5 mM). IPTG induziert die Produktion von Thioredoxin und die T7-RNA-Polymerase in mGP1-2 und induziert folglich die Produktion der klonierten DNA-Polymerase. Die Zellen werden weitere 2,5 Stunden unter Rühren und Belüftung gezüchtet und dann geerntet. Das Zellenpellet wird in 1,5 l von 10 % Sucrose/20 mM Tris-HCl, pH 8,0/25 mM EDTA resuspendiert und erneut geschleudert ("re-spin"). Schließlich wird das Zellenpellet in 200 ml von 10 % Sucrose/20 mM Tris-HCl, pH 8,0/1,0 mM EDTA resuspendiert und in flüssigem N₂ gefroren. Aus 12 l induzierten Zellen werden 70 g Zellpaste gewonnen, die etwa 700 mg Gen-5-Protein und 100 mg Thioredoxin enthalten.

K38/pTrx-2 (K38, das nur pTrx-2 enthält) liefert eine Überproduktion von Thioredoxin, und es wird als "Booster" zu Extrakten von K38/pGP5-5/pTrx-2 hinzugegeben, um zu sichern, daß Thioredoxin im Überschuß am Anfang der Reinigung vorhanden ist. Die K38/pTrx-2-Zellen werden bei -80 °C in 50 % Glycerol aufbewahrt. Vor der Verwendung werden sie auf einer 50 µg/ml Ampicillin enthaltenden Platte ausgestrichen, 24 Stunden bei 37 °C gezüchtet, und eine einzelne Kolonie wird über Nacht bei 37 °C in 25 ml LB-Medien mit einem Gehalt von 50 µg/ml Ampicillin gezüchtet. Die 25-ml-Kultur wird verwendet, um 2 l 2X LB-Medien zu impfen, und bei 37 °C geschüttelt. Wenn die Zellen einen Wert von $A_{590} = 3,0$ erreichen, werden der ptac-Promotor und somit die Thioredoxinproduktion durch den Zusatz von IPTG (Endkonzentration 0,5 mM) induziert. Die Zellen werden unter Schütteln weitere 12 bis 16 Stunden bei 37 °C gezüchtet, geerntet, in 600 ml von 10 % Sucrose/20 mM Tris-HCl, pH 8,0/25 mM EDTA resuspendiert und erneut geschleudert. Schließlich werden die Zellen in 40 ml von 10 % Sucrose/20 mM Tris-HCl, pH 8,0/0,5 mM EDTA resuspendiert und in flüssigem N₂ gefroren. Aus 2 l Zellen werden 16 g Zellpaste mit einem Gehalt von 150 mg Thioredoxin gewonnen.

Analysen auf die Polymerase umfassen die Verwendung von einzelsträngiger Kalbsthymus-DNA (6 mM) als Substrat. Diese wird unmittelbar vor der Verwendung durch Denaturierung von doppelsträngiger Kalbsthymus-DNA mit 50 mM NaOH bei 20 °C über einen Zeitraum von 15 Minuten, woran sich Neutralisierung mit HCl anschließt, hergestellt. Jede gereinigte DNA kann als Matrice für die Polymeraseanalyse verwendet werden, wenngleich sie vorzugsweise eine Länge von mehr als 1000 Basen haben sollte.

Die angewendete Standard-T7-DNA-Polymerase-Analyse ist eine Modifikation des von Grippo et al. (246 J. Biol. Chem. 6867, 1971) beschriebenen Verfahrens. Das Standardreaktionsgemisch (200 µl Endvolumen) enthält 40 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 5 mM Dithiothreitol, 100 nmol Alkali-denaturierte Kalbsthymus-DNA, 0,3 mM dGTP, dATP, dCTP und ³H/dTTP (20 cpm/pm), 50 µg/ml BSA und variierende Mengen T7-DNA-Polymerase. Die Inkubation erfolgt bei 37 °C (10 °C - 45 °C) über einen Zeitraum von 30 Minuten (5 Minuten - 60 Minuten). Die Reaktion wird durch den Zusatz von 3 ml kaltem (0 °C) 1 N HCl - 0,1 M Pyrophosphat gestoppt. Säureunlösliche Radioaktivität wird durch das Verfahren von Hinkle et al. (250 J. Biol. Chem. 5523, 1974) bestimmt. Die DNA wird 15 Minuten (5 Minuten - 12 Stunden) auf Eis, dann durch Filtration auf Glasfaserfiltern präzipitiert. Die Filter werden fünfmal mit 4 ml kaltem (0 °C) 0,1 M HCl - 0,1 M Pyrophosphat und zweimal mit kaltem (0 °C) 90 %igem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wird die Radioaktivität auf den Filtern unter Verwendung von nichtwäßrigem Szintillationsfluor gezählt.

Eine Einheit Polymeraseaktivität katalysiert bei 37 °C im Verlaufe von 30 Minuten den Einbau von 10 nmol Gesamtnucleotid in eine säurelösliche Form unter den oben angegebenen Bedingungen. Native T7-DNA-Polymerase und modifizierte T7-DNA-Polymerase (siehe nachstehend) haben die gleiche spezifische Polymeraseaktivität \pm 20 %, die, je nach Herstellung, bei Anwendung der oben angegebenen Standard-Analysebedingungen zwischen 5000 und 8000 Einheiten/mg liegt.

T7-DNA-Polymerase wird aus den obigen Extrakten durch Präzipitation und chromatografische Verfahrensweisen gereinigt. Es folgt ein Beispiel für eine solche Reinigung.

Ein Extrakt gefrorener Zellen (200 ml K38/pG5-5/pTrx-2 und 40 ml K38/pTrx-2) wird über Nacht aufgetaut. Die Zellen werden zusammengekommen, und 5 ml Lysozym (15 mg/ml) und 10 ml NaCl (5 M) werden zugesetzt. Nach 45 Minuten bei 0 °C werden die Zellen in ein Wasserbad von 37 °C gelegt, bis ihre Temperatur 20 °C erreicht. Dann werden die Zellen in flüssigem N₂ gefroren. Weitere 50 ml NaCl (5 M) werden zugesetzt, und die Zellen werden in einem Wasserbad von 37 °C aufgetaut. Nach dem Auftauen werden die Zellen bei 0 °C 60 Minuten lang sanft gemischt. Das Lysat wird eine Stunde lang in einem Beckman-45Ti-Rotor bei 35 000 U/Min. zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit (250 ml) ist Fraktion I. Sie enthält ungefähr 700 mg Gen-5-Protein und 250 mg Thioredoxin (in einem Verhältnis von Thioredoxin zu Gen-5-Protein von 2:1).

90 mg Ammoniumsulfat werden in Fraktion I (250 ml) gelöst und 60 Minuten lang gerührt. Man läßt die Suspension sich 60 Minuten lang absetzen, und das entstehende Präzipitat wird durch 60minütiges Zentrifugieren bei 8000 U/Min. gesammelt. Das Präzipitat wird in 300 ml 20 mM Tris-HCl pH 7,5/5 mM 2-Mercaptoethanol/0,1 mM EDTA/10 % Glycerol (Puffer A) wieder aufgelöst. Das ist Fraktion II.

Es wird eine Whatman-DE52-DEAE-Säule (12,6 cm² x 18 cm) hergestellt und mit Puffer A gewaschen. Fraktion II wird über Nacht mit Hilfe von zwei Wechsellern von je 1 l Puffer A dialysiert (Puffer mit einer Endleitfähigkeit, die gleich der von Puffer A mit Gehalt von 100 mM NaCl ist). Die dialysierte Fraktion II wird mit einer Fließgeschwindigkeit von 100 ml/h auf die Säule gebracht und mit 400 ml Puffer A mit Gehalt von 100 mM NaCl gewaschen. Proteine werden mit einem 3,5-l-Gradienten von 100 bis 400 mM NaCl in Puffer A mit einer Fließgeschwindigkeit von 60 ml/h eluiert. Fraktionen mit Gehalt von T7-DNA-Polymerase, die bei 200 mM NaCl eluiert, werden "gepoolt". Das ist Fraktion III (190 ml).

Der Grad oder das Ausmaß der Exonucleaseaktivität in prozessiver DNA-Polymerase kann folgendermaßen analysiert werden.

³H-markierte doppelsträngige DNA (6 cpm/pmol) wurde, wie von Richardson beschrieben (15 J. Molec. Biol. 49, 1966), aus Bacteriophage T7 hergestellt. ³H-markierte einzelsträngige T7-DNA wurde unmittelbar vor der Verwendung durch Denaturierung von doppelsträngiger ³H-markierter T7-DNA mit 50 mM NaOH bei 20 °C im Verlaufe von 15 Minuten hergestellt, woran sich Neutralisierung mit HCl anschloß. Die angewendete Standard-Exonucleaseanalyse ist eine Modifikation des von Chase et al. (siehe oben) beschriebenen Verfahrens. Das Standard-Reaktionsgemisch (100 µl Endvolumen) enthielt 40 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM Dithiothreitol, 60 nmol ³H-markierte einzelsträngige T7-DNA (6 cpm/pm) und variierende Mengen T7-DNA-Polymerase. ³H-markierte doppelsträngige Ty-DNA kann auch als Substrat verwendet werden. Ebenso kann jede gleichförmig radioaktiv markierte DNA, ob einzel- oder doppelsträngig, für die Analyse eingesetzt werden. Auch 3'-markierte einzel- oder doppelsträngige DNA kann für die Analyse verwendet werden. Nach Inkubation über einen Zeitraum von 15 Minuten bei 37 °C wird die Reaktion durch den Zusatz von 30 µl BSA (10 mg/ml) und 25 µl TCA (100 % Masse/Vol.) gestoppt. Die Analyse kann bei 10 °C - 45 °C über einen Zeitraum von 1 bis 60 Minuten durchgeführt werden. Die DNA wird im Verlaufe von 15 Minuten (1 Minute - 12 Stunden) auf Eis präzipitiert, dann bei 12 000 g 30 Minuten (5 Minuten - 3 Stunden) lang zentrifugiert. 100 µl der überstehenden Flüssigkeit werden zur Bestimmung der säurelöslichen Radioaktivität verwendet, indem sie zu 400 µl Wasser und 5 ml wäßrigem Szintillationscocktail hinzugegeben werden.

Eine Einheit Exonucleaseaktivität katalysiert die Säuresolubilisierung von 10 nmol Gesamtnucleotid unter den Bedingungen der Analyse im Verlaufe von 30 Minuten. Native T7-DNA-Polymerase hat bei Anwendung der oben angegebenen Standardanalysebedingungen eine spezifische Exonucleaseaktivität von 5000 Einheiten/mg. Die spezifische Exonucleaseaktivität der modifizierten T7-DNA-Polymerase kann variieren, ist aber idealerweise mindestens 10- bis

100fach niedriger als die der nativen T7-DNA-Polymerase, bzw. beträgt bei Anwendung der oben angegebenen Standardanalysebedingungen 500 bis 50 oder weniger Einheiten/mg.

Es ist möglich, das T7-Gen-5 genetisch zu mutieren, um die Exonuclease-Domäne des Proteins spezifisch zu inaktivieren. Das aus solchen Mutanten gereinigte T7-Gen-5-Protein ist ideal zum Einsatz bei der DNA-Sequenzierung, ohne daß die Exonuclease durch Oxidation chemisch inaktiviert werden muß.

Genetisch modifizierte T7-DNA-Polymerase wird isoliert, indem das Gen 5 einer Zufallsmutagenese unterzogen wird und dann eine Auslese (Screening) hinsichtlich jener Mutanten erfolgt, die die Exonucleaseaktivität verloren haben, ohne Polymeraseaktivität einzubüßen. Die Mutagenese wird wie folgt durchgeführt:

Einzelsträngige DNA mit Gen-5-Gehalt (z. B. kloniert in pEMBL-8, einem Plasmid, das einen Replikationsursprung für einzelsträngige DNA enthält) wird durch Standardverfahren hergestellt und mit zwei verschiedenen chemischen Mutagenen behandelt: Hydrazin, das C's und T's mutiert, und Ameisensäure, die G's und A's mutiert. Myers et al. 229 Science 242, 1985. Die DNA wird in einer Dosis mutagenisiert, die in durchschnittlich einer veränderten Base pro Plasmidmolekül resultiert. Die einzelsträngigen mutagenisierten Plasmide werden dann mit einem Universal-17-mer-Primer (siehe oben) gestartet und als Matrizen zur Synthese der gegenüberliegenden Stränge verwendet. Die synthetisierten Stränge enthalten zufällig eingebaute Basen in Positionen, die den mutierten Basen in den Matrizen entsprechen. Die doppelsträngige mutagenisierte DNA wird dann verwendet, um den Stamm K38/pGP1-2, d. h. den Stamm K38, der das Plasmid pGP1-2 enthält (Tabor et al., siehe oben) zu transformieren. Bei Wärmeinduktion exprimiert dieser Stamm T7-RNA-Polymerase. Die transformierten Zellen werden bei 30 °C mit ungefähr 200 Kolonien pro Platte plattiert.

Screening hinsichtlich Zellen mit T7-DNA-Polymerase ohne Exonucleaseaktivität basiert auf der folgenden Erkenntnis. Die

3'-5'-Exonuclease von DNA-Polymerasen erfüllt eine Korrekturlesefunktion. Wenn Basen falsch eingebaut werden, entfernt die Exonuclease die neu eingebaute Base, die als "abnorm" erkannt wird. Das ist der Fall bei dem Analogon von dATP, Etheno-dATP, das anstelle von dATP leicht durch T7-DNA-Polymerase eingebaut werden kann. In Anwesenheit der 3'-5'-Exonuclease von T7-DNA-Polymerase wird es jedoch ebenso schnell ausgeschnitten wie eingebaut, was zum Ergebnis hat, daß netto keine DNA-Synthese erfolgt ist. Wie in Fig. 6 dargestellt, katalysiert native T7-DNA-Polymerase unter Verwendung des alternierenden Copolymers Poly-d(AT) als Matrize die extensive DNA-Synthese nur in Anwesenheit von dATP und nicht Etheno-dATP. Im Gegensatz dazu baut modifizierte T7-DNA-Polymerase aufgrund des Fehlens von assoziierter Exonuclease Etheno-dATP stabil in DNA ein, wobei die Rate mit dATP vergleichbar ist. Folglich ist bei Verwendung von Poly-d(AT) als Matrize und dTTP und Etheno-dATP als Präkursoren native T7-DNA-Polymerase nicht in der Lage, DNA von dieser Matrize zu synthetisieren, während T7-DNA-Polymerase, die ihre Exonucleaseaktivität verloren hat, in der Lage ist, diese Matrize zur Synthetisierung von DNA zu verwenden.

Das Verfahren zum Lysieren und zum Screening einer großen Anzahl Kolonien wird bei Raetz (72 Proc. Nat. Acad. Sci. 2274, 1975) beschrieben. Kurz gesagt, werden die K38/pGP1-2-Zellen, die mit den mutagenisierten Gen-5-haltigen Plasmiden transformiert sind, von der Petrischale, wo sie zu etwa 200 Kolonien pro Platte vorhanden sind, auf ein Stück Filterpapier übertragen ("Replika-Plattierung"). Die Filterpapierscheiben werden dann 60 Minuten bei 42 °C placiert, um die T7-RNA-Polymerase zu induzieren, die wiederum das Gen-5-Protein exprimiert. Thioredoxin wird konstitutiv aus dem chromosomalen Gen hergestellt. Lyscym wird auf das Filterpapier gegeben, um die Zellen zu lysieren. Nach einem Gefrier-Tau-Schritt, um die Zell-Lyse zu gewährleisten, werden die Filterpapierscheiben mit Poly-d(AT), μ ^{32}P /dTTP und Etheno-dATP 60 Minuten lang bei 37 °C inkubiert. Die Filterpapierscheiben werden dann mit Säure gewaschen, um nichtinkorporiertes ^{32}P /dATP zu entfernen. DNA fällt auf dem Filterpapier in Säure

aus, während Nucleotide löslich sind. Das gewaschene Filterpapier wird dann verwendet, um Röntgenfilm zu exponieren. Kolonien, die eine aktive T7-DNA-Polymerase induziert haben, die Exonuclease verloren hat, weisen eingebautes, säurelösliches ^{32}P auf und werden durch Autoradiographie sichtbar. Kolonien, die native T7-DNA-Polymerase exprimieren oder die eine T7-DNA-Polymerase mit mangelnder Polymeraseaktivität exprimieren, erscheinen nicht auf dem Autoradiogramm.

Kolonien, die positiv erscheinen, werden aus der Master-Petrischale, die die Originalkolonien enthält, rückgewonnen. Zellen, die jeden potentiellen positiven Klon enthalten, werden im größeren Maßstab (ein Liter) induziert, und T7-DNA-Polymerase wird aus jedem Präparat gereinigt, um die mit jedem Mutanten assoziierten Exonucleasewerte zu ermitteln. Diejenigen, denen Exonuclease fehlt, eignen sich für die DNA-Sequenzierung.

DNA-Sequenzierung unter Verwendung von modifizierter T7-DNA-Polymerase

DNA-Synthesereaktionen unter Verwendung von modifizierter T7-DNA-Polymerase resultieren in Kettenabbruchfragmenten gleichförmiger radioaktiver Intensität im gesamten Bereich von einigen Basen bis zu Tausenden Basen Länge. Es besteht praktisch kein Hintergrund aufgrund von Abbrüchen an Stellen, die unabhängig vom Einbau von Kettenabbruchagenzien sind (d. h. "Pause"-Stellen oder Sekundärstrukturhindernisse).

Sequenzierungsreaktionen unter Verwendung von modifizierter T7-DNA-Polymerase bestehen aus "pulse" und "chase". Unter "pulse" ist zu verstehen, daß ein kurzes markiertes DNA-Fragment synthetisiert wird; unter "chase" ist zu verstehen, daß das kurze Fragment verlängert wird, bis ein Kettenabbruchagenz eingebaut wird. Das Prinzip für jeden Schritt unterscheidet sich von konventionellen DNA-Sequenzierungsreaktionen. Beim "pulse" wird die Reaktion bei 0°C - 37°C über einen Zeitraum von 0,5 bis 4 Minuten in Anwesenheit hoher Werte von drei Nucleotidtriphosphaten (z. B.

dGTP, dCTP und dTTP) und von Grenzwerten eines anderen markierten, trägerfreien Nucleotidtriphosphats, z. B. $^{35}\text{S}/\text{dATP}$, inkubiert. Unter diesen Bedingungen kann die modifizierte Polymerase ihren prozessiven Charakter nicht zeigen, und eine Population radioaktiver Fragmente, deren Größe von einigen wenigen Basen bis zu mehreren hundert Basen reicht, wird synthetisiert. Der Zweck des "pulse" besteht darin, jeden Primer radioaktiv zu markieren, wobei maximale Radioaktivität unter Einsatz minimaler Mengen radioaktiver Nucleotide eingebaut wird. Bei diesem Beispiel verhindern zwei Bedingungen in der "pulse"-Reaktion (niedrige Temperatur, z. B. $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ und Grenzwerte von dATP, z. B. $0,1\text{ }\mu\text{M}$ bis $1\text{ }\mu\text{M}$), daß die modifizierte T7-DNA-Polymerase ihren prozessiven Charakter entfaltet. Andere wesentliche Umgebungskomponenten des Gemisches haben ähnliche Effekte, z. B. die Limitierung von mehr als einem Nucleotidtriphosphat. Ist der Primer bereits markiert (z. B. durch Kinasierung), ist kein "pulse"-Schritt erforderlich. Beim "chase"-Schritt wird die Reaktion bei $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ über einen Zeitraum von 1 bis 30 Minuten in Anwesenheit hoher Werte ($50 - 500\text{ }\mu\text{M}$) aller vier Desoxynucleosidtriphosphate und von Grenzwerten ($1\text{ bis }50\text{ }\mu\text{M}$) von einem der vier Kettenabbruchagenzien, z. B. Didesoxynucleosidtriphosphaten, inkubiert, so daß die DNA-Synthese nach durchschnittlich 50 bis 600 Basen abgebrochen wird. Der Zweck von "chase" besteht darin, jeden radioaktiv markierten Primer unter Bedingungen prozessiver DNA-Synthese zu verlängern, wobei jede Extension ausschließlich an korrekten Stellen in vier separaten Reaktionen unter Einsatz jedes der vier Didesoxynucleosidtriphosphate terminiert wird. Zwei Bedingungen von "chase" ((hohe Temperatur (z. B. $30 - 50\text{ }^{\circ}\text{C}$) und hohe Werte (über $50\text{ }\mu\text{M}$) aller vier Desoxynucleosidtriphosphate)) gestatten es, daß die modifizierte T7-DNA-Polymerase ihren prozessiven Charakter für Zehntausende Basen entfaltet; so synthetisiert das gleiche Polymerasemolekül aus der Primermatrize, bis ein Didesoxynucleotid eingebaut ist. Bei einer "chase"-Temperatur von $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ erfolgt die Synthese mit > 700 Nucleotiden/Sekunde. Somit ist der "chase"-Schritt für Sequenzierungsreaktionen in weniger als einer Sekunde komplett. ssb erhöht die Prozessivität beispielsweise, wenn dITP verwendet wird oder wenn niedrige Temperaturen oder niedrige Tri-

phosphatwerte über die gesamte Sequenzierungsreaktion angewendet werden.

Bei den DNA-Sequenzierungsreaktionen mit modifizierter T7-DNA-Polymerase können entweder α - ^{35}S /dATP, α - ^{32}P /dATP oder fluoreszenzmarkierte Nucleotide verwendet werden. Ist ein Analogon fluoreszierend, dann werden endmarkierte Primer verwendet, und es ist kein Sondenschritt erforderlich.

Zwei Komponenten bestimmen die durchschnittlichen Extensionen der Synthesereaktionen. Die erste Komponente ist die Zeitdauer der "pulse"-Reaktion. Da der "pulse" in Abwesenheit von Kettenabbruchagenzien ausgeführt wird, gilt: Je länger die "pulse"-Reaktionszeit, desto länger die Primerextensionen. Bei 0 °C betragen die Polymeraseextensionen im Durchschnitt 10 Nucleotide/Sekunde. Die zweite Komponente ist das Verhältnis der Desoxynucleosidtriphosphate zu den Kettenabbruchagenzien in der "chase"-Reaktion. Eine modifizierte T7-DNA-Polymerase wendet sich nicht gegen den Einbau dieser Analoga, so beträgt die durchschnittliche Länge der Extension bei "chase" viermal das Verhältnis der Desoxynucleosidtriphosphatkonzentration zur Konzentration des Kettenabbruchagens bei der "chase"-Reaktion. So wird, um die durchschnittliche Größe der Extensionen abzukürzen, die "pulse"-Zeit verkürzt, z. B. auf 30 Sekunden, und das Verhältnis des Kettenabbruchagens zur Desoxynucleosidtriphosphatkonzentration bei der "chase"-Reaktion wird erhöht. Das kann bewirkt werden, indem entweder die Konzentration des Kettenabbruchagens erhöht wird oder die Konzentration des Kettenabbruchagens erhöht wird oder die Konzentration von Desoxynucleosidtriphosphat gesenkt wird. Zur Erhöhung der durchschnittlichen Länge der Extensionen wird die "pulse"-Zeit erhöht, z. B. auf 3 bis 4 Minuten, und die Konzentration des Kettenabbruchagens bei der "chase"-Reaktion wird gesenkt (z. B. von 20 μM auf 2 μM).

Beispiel 2: DNA-Sequenzierung unter Verwendung von modifizierter T7-DNA-Polymerase

Es folgt ein Beispiel für ein Sequenzierungsprotokoll unter Einsatz von Didesoxynucleotiden als Abbruchagenzien.

9 μ l einzelsträngige M13-DNA (mGP1-2, hergestellt nach Standardverfahren) mit einer Konzentration von 0,7 mM werden mit 1 μ l komplementärem Sequenzierungsprimer (Standard-Universal-17-mer, 0,5 pmol-Primer/ μ l) und 2,5 μ l 5X "annealing"-Puffer (Hybridisierungspuffer) (200 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM MgCl₂), der auf 65 °C erhitzt ist, 3 Minuten lang gemischt und langsam im Verlaufe von 30 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt. Bei der "pulse"-Reaktion wurden 12,5 μ l des obigen hybridisierten "annealed" Gemisches mit 1 μ l Dithiothreitol 0,1 M, 2 μ l 3 dNTP_s (dGTP, dCTP, dTTP) und je 3 mM (P. L Biochemicals, in TE), 2,5 μ l/ ³⁵S/dATP, (1500 Ci/nmol, New England Nuclear) und 1 μ l der in Beispiel 1 beschriebenen modifizierten T7-DNA-Polymerase (0,4 mg/ml, 2500 Einheiten/ml, d. h. 0,4 μ g, 2,5 Einheiten) gemischt und, nach Wirbelbehandlung und Zentrifugieren in einer Mikrozentrifuge für die Dauer von 1 Sekunde, bei 0 °C 2 Minuten lang inkubiert. Die Inkubationszeit kann zwischen 30 Sekunden und 20 Minuten variieren, und die Temperatur kann zwischen 0 °C und 37 °C liegen. Längere Zeiten werden für die Sequenzierung von Sequenzen verwendet, die weiter vom Primer entfernt liegen.

4,5- μ l-Aliquoten der obigen "pulse"-Reaktion werden in jedes der vier Röhrchen gegeben, die die auf 45 °C vorgewärmten "chase"-Gemische enthalten. Die vier mit G, A, T, C markierten Röhrchen enthalten jeweils Spuren von Didesoxy (dd) G, A, T oder C (P-L Biochemicals). Die spezifischen "chase"-Lösungen sind nachstehend angegeben. Jedes Röhrchen enthält 1,5 μ l dATP 1 mM, 0,5 μ l 5X "annealing"-Puffer (200 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM MgCl₂) und 1,0 ddNTP 100 μ M (wobei ddNTP ddG, A T oder C in den betreffenden Röhrchen entspricht). Jede "chase"-Reaktion wird 10 Minuten bei 45 °C (oder 30 °C - 50 °C) inkubiert, und dann werden 6 μ l Stopp-

lösung (90 % Formamid, 10 mM EDTA, 0,1 % Xylencyanol) in jedes Röhrchen gegeben, und das Röhrchen wird auf Eis gestellt. Die "chase"-Zeiten können von 1 bis 30 Minuten variieren.

Die Sequenzierungsreaktionen werden 6 Stunden bei 30 Watt auf Standard-6-%-Polyacrylamid-Sequenzierungsgel in 7M Harnstoff durchgeführt. Bevor die Reaktionen auf einem Gel ablaufen, wird 2 Minuten auf 75 °C erhitzt. Das Gel wird in 10 % Essigsäure, 10 % Methanol fixiert, auf einem Geltrockner getrocknet und über Nacht einem Kodak-OM1-Hochkontrast-Autoradiografiefilm ausgesetzt.

Beispiel 3: DNA-Sequenzierung unter Verwendung von Grenzkonzentrationen von dNTPs

Bei diesem Beispiel wird die DNA-Sequenzanalyse von mGP1-2-DNA unter Verwendung von Grenzwerten aller vier Desoxyribonucleosidtriphosphate in der "pulse"-Reaktion ausgeführt. Diese Methode weist eine Reihe von Vorteilen gegenüber dem Protokoll von Beispiel 2 auf. Erstens verläuft die "pulse"-Reaktion bis zum Abschluß, während es bei dem vorherigen Protokoll notwendig war, einen Zeitablauf zu unterbrechen. Folglich lassen sich die Reaktionen leichter durchführen. Zweitens ist es bei dieser Methode leichter, das Ausmaß der Elongationen beim "pulse" zu kontrollieren, und so wird die Effizienz der Markierung von Sequenzen in der Nähe des Primers (die ersten 50 Basen) auf etwa das Zehnfache erhöht.

7 µl 0,75 mM einzelsträngige M13-DNA (mGP1-2) wurden mit 1 µl komplementärem Sequenzierungsprimer (17-mer, 0,5 pmol Primer µl) und 2 µl 5X "annealing"-Puffer (200 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM MgCl₂, 250 mM NaCl) gemischt, 2 Minuten lang auf 65 °C gehalten und langsam im Verlaufe von 30 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt. Bei der "pulse"-Reaktion wurden 10 µl des obigen hybridisierten Gemisches mit 1 µl Dithiothreitol 0,1 M, 2 µl 3 dNTPs (dGTP, dCTP, dTTP) je 1,5 µM, 0,5 µl / μ ³⁵S/dATP, (1500 Ci/mmol,

New England Nuclear) und 2 μ l modifizierter T7-DNA-Polymerase (0,1 mg/ml, 2000 Einheiten/ml, d. h. 0,2 μ g, 2 Einheiten) gemischt und 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. (Inkubationstemperatur und -zeit können von 20 °C - 45 °C bzw. von 1 bis 60 Minuten variieren).

Es wurden 3,5 μ l-Aliquoten der obigen "pulse"-Reaktion in jedes von vier Röhrchen gegeben, welche die "chase"-Gemische, die auf 37 °C vorgewärmt waren, enthielten. Die vier mit G, A, T, C markierten Röhrchen enthalten jeweils Spuren von Didesoxy-G, -A, -T, -C. Die spezifischen "chase"-Lösungen sind nachstehend angegeben. Jedes Röhrchen enthält 0,5 μ l 5X "annealing"-Puffer (200 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM MgCl₂, 250 mM NaCl), 1 μ l 4dNTPs (dGTP, dATP, dTTP, dCTP), jeweils 200 μ M, und 1,0 μ l ddNTP 20 μ M. Jede "chase"-Reaktion wird 5 Minuten bei 37 °C (bzw. 1 bis 60 Minuten bei 20 °C - 45 °C) inkubiert, und dann werden 4 μ l einer Stopplösung (95 % Formamid, 20 mM EDTA, 0,05 % Xylen-Cyanol) in jedes Röhrchen gegeben, und das Röhrchen wird auf Eis gestellt.

Beispiel 4: Ersatz von dGTP durch dITP zur DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung durch Kompressionsregionen in DNA, d. h. Regionen mit kompakter Sekundärstruktur, hindurch, ist es üblich, dITP oder Deazaguanosintriphosphat (Deaza-GTP, Mizusawa et al., 14 Nuc. Acid Res. 1319, 1986, und Mills et al., 76 Proc. Natl. Acad. Sci. 2232, 1979) als Ersatz für dGTP zu verwenden. Es wurde festgestellt, daß beide Analoga gut mit T7-DNA-Polymerasen, insbesondere mit dITP in Anwesenheit von ssb wirken. Diese Reaktionen werden vorzugsweise mit der oben beschriebenen genetisch modifizierten T7-Polymerase durchgeführt, oder die "chase"-Reaktion erfolgt 1 bis 2 Minuten und/oder bei 20 °C, um die Exonucleasedegradation zu reduzieren.

Modifizierte T7-DNA-Polymerase nutzt effizient dITP oder Deaza-GTP anstelle von dGTP. dITP wird für dGTP sowohl in den "pulse"- als auch "chase"-Gemischen in einer Konzentration verwendet, die dem Zwei- bis Fünffachen derjenigen entspricht, bei der dGTP ein-

gesetzt wird. In dem ddG-"chase"-Gemisch wird noch ddGTP (nicht ddITP) verwendet.

Die "chase"-Reaktionen unter Verwendung von dITP sind empfindlich gegenüber niedrigen Restwerten (etwa 0,5 Einheiten) von Exonucleaseaktivität.

Um dieses Problem auszuschalten, sollten bei Verwendung von dITP die "chase"-Reaktionszeiten 5 Minuten nicht überschreiten. Es wird empfohlen, die vier dITP-Reaktionen in Verbindung mit, nicht unter Ausschluß der vier Reaktionen unter Verwendung von dGTP durchzuführen. Werden sowohl dGTP als auch dITP routinemäßig eingesetzt, kann die Anzahl der erforderlichen Gemische minimiert werden durch: (1) Auslassen von dGTP und dITP aus den "chase"-Gemischen, was bedeutet, daß die vier "chase"-Gemische sowohl für dGTP- als auch dITP-"chase"-Reaktionen verwendet werden; (2) Zusetzen einer hohen Konzentration dGTP oder dITP (2 µl bei 0,5 mM bzw. 1 - 2,5 mM) zu dem entsprechenden "pulse"-Gemisch. Die beiden "pulse"-Gemische enthalten dann jeweils eine niedrige Konzentration an dCTP, dTTP und $^{35}\text{S}/\text{dATP}$ und eine hohe Konzentration dGTP oder dITP. Diese Modifizierung beeinflusst die Qualität der Sequenzierungsreaktionen nicht nachteilig und verringert die erforderliche Anzahl der "pulse"- und "chase"-Gemische zur Durchführung von Reaktionen unter Einsatz von sowohl dGTP als auch dITP auf sechs.

Die Sequenzierungsreaktion ist wie in Beispiel 3, mit dem Unterschied, daß zwei der "pulse"-Gemische enthalten a) 3 dNTP-Mischung für dGTP: 1,5 µM dCTP, dTTP und 1 mM dGTP und b) 3 dNTP-Mischung für dITP: 1,5 µM dCTP, dTTP und 2 mM dITP. Bei der "chase"-Reaktion wird dGTP aus den "chase"-Gemischen entfernt (d. h. die "chase"-Mischungen enthalten 30 µM dATP, dTTP und dCTP und einen der vier Didesoxynucleotide bei 8 µM), und die "chase"-Zeit überschreitet bei Verwendung von dITP nicht 5 Minuten.

Hinterlegungen

Die Stämme K38/pGP5-5/pTrx-2, K38/pTrx-2 und M13 mGP1-2 wurden beim ATCC deponiert und erhielten die Nummern _____, _____ bzw. _____.

Die Patentanmelder und ihre Zessionäre bekunden ihre Verantwortung dafür, daß diese Kulturen ersetzt werden, sollten sie vor Ablauf der Patenterteilungsfrist hierfür, von 5 Jahren nach der letzten Anforderung einer Kultur oder von 30 Jahren sterben, wobei jeweils der längste Zeitraum gilt, sowie ihre Verantwortung dafür, die Hinterlegungsstelle über die Erteilung eines solchen Patentes zu informieren, zu welchem Zeitpunkt die deponierten Materialien der Öffentlichkeit zugänglich gemacht werden. Bis zu diesem Zeitpunkt sind die deponierten Materialien nach den Bestimmungen von 37 CFR, Abschnitt 1 - 14, und 35 USC, Abschnitt 112, dem Leiter des Patentamtes zugänglich.

Andere Ausführungsbeispiele

Innerhalb der nachfolgenden Patentansprüche sind weitere Ausführungsbeispiele einbegriffen.

Zu anderen Anwendungen der erfindungsgemäßen modifizierten DNA-Polymerasen, bei denen ihre Prozessivität und das Fehlen der Exonucleaseaktivität genutzt werden, gehört die direkte enzymatische Amplifikation genomischer DNA-Sequenzen. Das wurde für andere Polymerasen von Saiki et al., 230 Science 1350, 1985, und Scharf, 233 Science 1076, 1986, beschrieben.

Es wird nun auf Fig. 6 Bezug genommen. Die enzymatische Amplifikation einer spezifischen DNA-Region beinhaltet die Verwendung von zwei Primern, die gegenüberliegende Stränge einer doppelsträngigen DNA-Sequenz in der interessierenden Region hybridisieren "anneal", wobei die 3'-Enden gegeneinander gerichtet sind (siehe dunkle Pfeile). Das eigentliche Verfahren umfaßt multiple (10 - 40, vorzugsweise 16 - 20) Zyklen von Denaturierung, Hybridisie-

zung ("annealing") und DNA-Synthese. Bei Anwendung dieses Verfahrens ist es möglich, eine spezifische Region menschlicher genomischer DNA mehr als 200.000fach zu amplifizieren. Als Folge davon stellt das spezifische Genfragment etwa einen Teil in fünf statt des anfänglichen einen Teils in einer Million dar. Das erleichtert sowohl das Klonieren als auch die direkte Analyse genomischer DNA in starkem Maße. Für Diagnosezwecke kann dadurch die Analyse von mehreren Wochen auf 1 bis 2 Tage verkürzt werden.

Im Gegensatz zum Klenow-Fragment, bei dem der Amplifikationsprozeß auf Fragmente mit einer Länge von weniger als 200 Basen begrenzt ist, sollten modifizierte T7-DNA-Polymerasen (vorzugsweise in Verbindung mit E. coli-DNA-Bindungsprotein oder ssb zur Verhinderung von "Zurückschnapp"-Bildung von doppelsträngiger DNA) die Amplifikation von DNA-Fragmenten mit einer Länge von Tausenden Fragmenten ermöglichen.

Die modifizierten T7-DNA-Polymerasen sind auch in Standardreaktionsgemischen geeignet: a) zum Füllen der 5' vorstehenden Termini von DNA-Fragmenten, die durch Restriktionsenzymspaltung erzeugt wurden; um beispielsweise stumpfendige doppelsträngige DNA aus einem linearen DNA-Molekül mit einer einzelsträngigen Region ohne 3' vorstehende Termini zu erzeugen; b) zum Markieren der 3'-Termini von Restriktionsfragmenten, zum Kartieren von mRNA-Startstellen oder Sequenzieren von DNA unter Anwendung des chemischen Modifizierungsverfahrens von Maxam und Gilbert; und c) für die in-vitro-Mutagenese von klonierten DNA-Fragmenten. Zum Beispiel wird ein chemisch synthetisierter Primer, der spezifische "mismatched" (nicht übereinstimmende) Basen enthält, an eine DNA-Matrize hybridisiert und dann durch die modifizierte T7-DNA-Polymerase verlängert. Auf diese Weise wird die Mutation permanent in den synthetisierten Strang eingebaut. Es ist für die Polymerase vorteilhaft, wenn die Synthetisierung vom Primer über die gesamte Länge der DNA verläuft. Das geschieht am wirksamsten unter Verwendung einer prozessiven DNA-Polymerase. Alternativ erfolgt die Mutagenese durch Fehleinbau während der DNA-Synthese (siehe oben). Diese Anwendung dient der Mutagenisierung spezifischer Regionen

284692

- 29 -

klonierter DNA-Fragmente. Es ist wichtig, daß das verwendete Enzym keine Exonucleaseaktivität aufweist. Unter Standardreaktionsgemisch ist eine gepufferte Lösung, die die Polymerase und alle notwendigen Desoxynucleotide oder anderen Verbindungen enthält, zu verstehen.