



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 89106712.4

[51] Int.Cl⁵

C12Q 1/68

[43] 公开日 1990 年 2 月 21 日

[22] 申请日 89.7.11

[30] 优先权

[32] 88.7.12 [33] US [31] 218,103

[71] 申请人 哈佛大学校长及研究员协会

地址 美国马萨诸塞州

[72] 发明人 斯坦利·塔伯

查尔斯·C·理查德逊

[74] 专利代理机构 中国专利代理有限公司

代理人 杨九昌

C12Q 1/25 G01N 33/50

说明书页数: 27 附图页数: 11

[54] 发明名称 DNA 顺序测定

[57] 摘要

DNA 链的顺序测定方法, 包括的步骤有: 提供 DNA 链; 使所述链与能与之杂交的引物退火以得到退火混合物; 使混合物与脱氧核苷三磷酸、DNA 聚合酶和链终止剂在这样的条件下保温, 在该条件下, 聚合酶能引起引物延伸而形成一系列长度不同的 DNA 产物, 每一 DNA 产物在其延伸终端上具有链终止剂; 每一 DNA 产物的数目与长度相差 1—20 碱基的差不多所有的 DNA 产物近似相等。

权 利 要 求 书

1. 一种测定 D N A 链顺序的方法, 包括的步骤有:

提供所述 D N A 链,

使用能与所述链杂交的引物与所述链退火, 以得到退火混合物,
和

使所述的退火混合物与脱氧核苷三磷酸、D N A 聚合酶和第一链终止剂保温, 其特征在于在这样的条件下进行所述保温, 在该条件下, 所述聚合酶能引起所述引物延伸, 以形成长度不同的第一系列的第一 D N A 产物, 每个所述第一 D N A 产物在其延伸终端具有所述链终止剂, 每种所述第一 D N A 产物的量与长度相差 1 ~ 2 0 碱基的差不多所有的 D N A 产物近似相同。

2. 权利要求 1 的方法, 它进一步包含的步骤有:

通过凝胶渗透按分子量分离所述第一 D N A 产物, 以形成第一系列的谱带, 每个所述第一系列谱带代表一个特殊分子量的所述第一 D N A 产物, 其中第一系列的每个邻近谱带的强度与差不多所有的所述第一系列的谱带近似相等, 和

测定每个所述第一系列谱带的位置。

3. 权利要求 1 的方法, 进一步的特征是提供 1 到 3 种另外不同的链终止剂于所述的退火混合物中, 每一种的浓度都不同于其他每一种链终止剂的浓度, 其中所述 D N A 聚合酶能引起 1 到 3 种另外系列的另外 D N A 产物的产生, 每一另外系列的每一 D N A 产物在其延伸终端上具有一个所述的另外的链终止剂, 所有在 2 0 碱基长度范围内的具有相同链终止剂的每一所述另外 D N A 产物的量近似相同, 并且与具有不同链终止剂和在不同的系列中但分子量近似相等的所有 D N A

产物的量明显不同。

4. 权利要求3的方法, 进一步包括的步骤有:

通过凝胶渗透法按分子量分离所有的所述DNA产物, 以分别形成总数为2到4个系列的谱带, 系列中的每一谱带代表具有与所述系列中的所有其他谱带相同链终止剂的DNA产物, 并且具有特殊的分子量, 其中, 在同一系列范围内的每一邻近谱带的强度明显不同, 并测量每一系列的每一谱带的位置和强度。

5. 前述任一权利要求的方法, 进一步的特征在于在所述退火混合物中提供锰或铁离子, 其中所述铁离子能引起所述聚合酶不能识别所述链终止剂。

6. 前述任一项权利要求的方法, 进一步的特征在于所述DNA聚合酶选自T7型DNA聚合酶、大肠杆菌DNA聚合酶I的大片段和Taq聚合酶。

7. 前述任一项权利要求的方法, 进一步的特征在于所述链终止剂是双脱氧核苷三磷酸。

8. 前述任一项权利要求的方法, 进一步的特征在于在所述退火混合物中提供螯合剂。

9. 一种用于DNA顺序测定的药盒, 包括提供DNA聚合酶和链终止剂, 其特征它含有锰或铁离子。

10. 权利要求9的药盒, 其特征它在于所述聚合酶是T7型DNA聚合酶、Klenow或Taq聚合酶, 所述链终止剂是双脱氧核苷三磷酸。

11. 权利要求9的药盒, 其特征它含有焦磷酸酶。

D N A 顺序测定

本发明涉及 D N A 顺序测定，尤其是自动测定 D N A 顺序的方法。

D N A 测序通常是按 Sanger 等人 (Proc. Nat. Acad. Sci. U S A 74 : 5463, 1977) 的方法进行的，该方法包括由单链 D N A 模板和引物酶促合成单链 D N A。参照图 1，进行四种独立的合成。提供一个单链模板，并同时提供能与模板杂交的引物。用 D N A 聚合酶使引物延伸，而且每一反应在特殊的碱基 (鸟嘌呤 G、腺嘌呤 A、胸腺嘧啶 T 或胞嘧啶 C) 处借助于合适的链终止剂如双脱氧核苷酸的掺入而终止。通常用于这种测序法的酶包括：大肠杆菌 D N A 聚合酶 I 大片段 (Klenow 片段)、逆转录酶、Taq 聚合酶和修饰型噬菌体 T7 D N A 聚合酶。

再次参照图 1，4 种 D N A 合成反应导致 4 种系列的 D N A 产品形成，每种产品具有一个确定末端和一个可变末端。确定末端以引物分子开始，可变末端由链终止剂终止于特异的核苷酸碱基处 (G、A、T 或 C)，在该碱基处合成反应终止。4 种不同系列的产物，在高分辨率的聚丙烯酰胺凝胶的四个独立泳道中，按其分子量彼此分离，从而形成 4 个系列的谱带，凝胶上的各谱带依次对应于 D N A 顺序中的特异核苷酸。因此，谱带的相对位置决定每一给定核苷酸碱基在 D N A 顺序中的位置。通常，D N A 产物要带有标记以便使产生的谱带易于检测。如图 1 所示，单一泳道中的谱带强度一般是不均匀的，因为谱带强度与特定泳道中分子量相同的 D N A 产物数目或浓度直接相关，该数目在不同的产物之间是不等的，即使当它们的分子量基本相同并含有相同的链终止剂时也是这样。

采用上述方法，已经开发了DNA顺序分析的自动系统。一种由E G & G制造的仪器使用 ^{32}P 标记和DNA聚合酶，并用凝胶电泳分离所获得的DNA产物（Toneguzzo等人，*Biotechniques* 6 : 460, 1988）。凝胶底部的 ^{32}P 检测器在通过凝胶底部时可扫描放射性。每一待测的模板需要有4种合成反应，并且在每一凝胶上要有4条泳道，由每一特殊链终止剂终止的产物要使用独立的泳道，如图1所示。

Kanbara等人（*Biotechnology* 6 : 816, 1988）用荧光标记引物代替了上述 ^{32}P 标记。所得到的荧光标记产物用凝胶底部的激光器激发，再用CRT检测器检测荧光。此方法对待测的每一模板同样需要4种合成反应，并且凝胶上要有4条泳道。

Applied Biosystems制造出一种仪器，它使用4种不同的引物，每种引物用不同的荧光标记物标记（Smith等人，*Nuc. Acid. Res.* 13 : 2399, 1985；*Nature* 321 : 674, 1986）。每一引物用于含4种双脱氧核苷酸之一的独立反应中。在4种反应完成之后，反应物汇合在一起在一条凝胶的单一泳道中电泳。在它们渗透或电泳通过凝胶后，用置于凝胶底部的激发器检测荧光产物。这一系统对每一模板都需要4种独立的退火反应和4种独立的合成反应，但只需一条凝胶泳道。借助于在单泳道中包括进全部4个谱带，很容易进行顺序的计算机分析。

杜邦公司提供了一种仪器，在该仪器中，不同的荧光标记与4种双脱氧核苷三磷酸中的每一种结合（Prober等人，*Science* 238 : 336, 1987）。需要有单一的退火步骤、单一的聚合酶反应（含有4种标记双脱氧核苷三磷酸中的每一种）和测序凝胶中

的单一泳道。当 D N A 产物电泳通过凝胶时，分别检测出 D N A 产物中的 4 种不同荧光记号。

Englert 等人的 4, 7 0 7, 2 3 7 (1 9 8 7) 号美国专利描述了一台具有检测装置的多道电泳设备，该检测装置基本上跨过凝胶的整个宽度，当标记的 D N A 产物在 4 个独立泳道中移过检测器时能被检测出，并鉴定出放置样品的泳道。最好使用放射性同位素标记。

对于目前使用的 D N A 顺序分析法来说，必须通过凝胶渗透法如聚丙烯酰胺或其它凝胶电泳分离放射性或荧光标记的 D N A 产物，然后再检测这些产物沿凝胶的渗透或移动轴向上的相对位置。该方法的准确度部分取决于凝胶上渗透距离大致相同的谱带的信号的均匀性。邻近谱带间信号强度的差别或变化产生好些问题。首先，降低了方法的灵敏度，从而使检测最弱信号谱带的能力受到局限。第二点，产生确定弱信号谱带的困难，即它究竟是由于掺入链终止剂而产生的真正信号，还是由于在聚合酶解离处由 D N A 中止位点产生的伪迹。第三点，降低测定位置密切接近的谱带的 D N A 顺序的准确性，因为一个谱带的强信号可能掩盖邻近的弱信号。

上述所有问题都在本发明中得到了克服。其中，在测序反应中产生数量大致相同的相似分子量的 D N A 产物，因此在测序凝胶中的邻近谱带，在同一泳道中具有大致相同的强度。

产生强度近似相同的邻近谱带的能力是有用的，因为这样更容易阅读测序反应的结果，并且可靠性更大。此外，由于使用特殊链终止剂由测序反应产生的 D N A 产物形成的谱带强度与其邻近谱带近似相同，则谱带强度本身也为这样形成的谱带系列提供了特异标记物。由给定的链终止剂产生的分子量近似相同的 D N A 产物量依链终止剂的

浓度而不同。因此，通过使用不同浓度的四种链终止剂中的一种于合成反应，则掺入一种链终止剂的DNA产物能与掺入另外链终止剂的分子量近似相同的DNA产物是有区别的，它们的数目或量不同，因此DNA产物的谱带能按链终止剂简单地通过其强度与邻近谱带强度的对比加以鉴定。结果，两种或更多种系列的DNA产物（每一系列具有不同的链终止剂）能够经单泳道的凝胶渗透而鉴定，即彼此区别开来，采用的方法就是比较每一谱带与邻近谱带的强度。此外，掺入不同链终止剂的DNA产物的合成反应不必分别在不同容器内进行，而可在一个反应容器内同时全部完成，而且，如果需要，所有的链终止剂都可使用相同的标记物，例如放射性同位素、荧光素，而不必每种使用不同的标记物，从而使程序简单化。

然而，值得注意的是当DNA产物渗透通过凝胶时，所有的谱带强度逐渐减低，其中移动距离最短的谱带强度较移动距离最长的谱带强度低些。虽然如此，每一谱带的相对强度沿渗透轴任一位置与邻近谱带相比基本相同。在整个渗透范围中相对强度的这一恒定现象使本发明可行。

所谓“邻近谱带”指的是在所述谱带前或后约20—30mm范围内同一泳道的谱带，沿渗透轴进行测量。通常，邻近谱带包括的DNA产物与所述谱带相差不大于20碱基（即分子量相差不大于约6000道尔顿）。

一般说来，本发明的特征是用于DNA测序反应中的DNA聚合酶，它能在测序反应中以近似相等的量产生分子量稍有差别的DNA产物。因此，当这样的DNA产物在凝胶基质中分离时，在所形成的谱带中，邻近谱带具有近似相等的强度。未与任何特殊理论联系，本

发明者认为此强度均匀性是由于聚合酶不能区别正常的核苷三磷酸和链终止剂，如双脱氧核苷三磷酸。

第一方面，本发明的特征在于 D N A 链的测序方法，包括的步骤有：提供 D N A 链；用能与所给链杂交的引物和所述链退火，以得到退火混合物；用脱氧核苷三磷酸、D N A 聚合酶和第一链终止剂在下述条件下与退火混合物保温；在该条件下聚合酶能使引物延伸而形成长度不同的第一系列的第一 D N A 产物，每个第一 D N A 产物在其延伸终端具有一个链终止剂；每个第一 D N A 产物数与长度相差 1—20 碱基的差不多所有 D N A 产物近似相等。最好该方法进一步包括如下步骤：用凝胶渗透法按分子量分离第一 D N A 产物，以形成第一系列的谱带，第一系列中的每个谱带代表指定分子量的第一 D N A 产物，其中每个邻近的第一系列谱带的强度与差不多所有第一系列的谱带近近相等；并测定各第一谱带的位置。

所谓“差不多所有”是指至少有十分之九（或二十分之十九）的邻近谱带具有近似相同的强度。这就是说，只偶而有一些谱带有不同的强度。这种不同的强度来自伪迹。这种伪迹的一个例子是在一谱带范围内，密集两种或多种不同分子量的 D N A 产物。两种这样的密集结果列于图 2，其中伪迹谱带用星号标明。所谓近似相同指的是谱带强度最多改变 2 倍，最佳优选方案为 1.2 倍。所谓凝胶渗透指的是包括用于 D N A 测序的现行的聚丙烯酰胺凝胶，以及根据分子量分离 D N A 产物的其它任何机制。

在第一实施例中，产生强度近似相同的邻近谱带是通过在一含锰或铁离子的溶液中保温 D N A 聚合酶来完成。

在一优选实施例中，所述方法另外包括如下步骤：在退火混合物

中提供浓度不同于第一链终止剂的第二链终止剂，其中D N A聚合酶引起第二系列的第二D N A产物的产生，各第二D N A产物在其延伸终端具有一个第二链终止剂，每个第二D N A产物数目与长度相差1—20碱基的差不多所有D N A产物近似相同，其中，长度相差1—20碱基的差不多所有的第一和第二D N A产物的数目明显不同。更为优选的是，当采用凝胶渗透法按分子量分离时，第二系列的第二D N A产物形成第二系列的谱带，其中差不多所有的第二系列的邻近谱带的强度近似相等，而差不多所有的第一系列谱带的强度明显而可区别的与第二系列的各邻近谱带的强度不同，该方法进一步包括测定每个谱带的位置和强度的步骤，该强度代表特别的谱带系列。

所谓明显不同是指一个系列的一个谱带能与另外系列的邻近谱带（即长度相差1—20碱基的谱带）相区别。也就是说，一台测量具特殊分子量的D N A产物数的装置，能使两个系列的D N A产物彼此区别。

在另一优选实施例中，该方法包括提供两种另外的链终止剂，其中聚合酶能引起第二和第三系列的第二和第三D N A产物的产生，每个第二和第三D N A产物的数目与长度相差1—20碱基的差不多所有的D N A产物近似相等，其中长度相差1—20碱基的差不多所有的第一、第二和第三D N A产物数目明显不同。最优选的是，当用凝胶渗透法按分子量分离时，各第二和第三系列的第二和第三D N A产物形成不同系列的第二和第三谱带，其中差不多所有的第二系列邻近谱带的强度近似相等，差不多所有的第三系列邻近谱带的强度近似相等，而差不多所有的不同系列的邻近谱带的强度明显不同；该方法还进一步包括测定各谱带的位置和强度的步骤，该强度代表特殊的谱带

系列。

在另一优选实施例中，该方法包括在退火混合物中提供4种不同的脱氧核苷三磷酸和4种不同的链终止剂，其中DNA聚合酶能引起第二、第三和第四系列的第二、第三和第四DNA产物产生，各第二、第三和第四DNA产物的数目对于长度相差1—20碱基的差不多所有的DNA产物近似相等，其中，长度相差1—20碱基的差不多所有的第一、第二、第三和第四DNA产物的数目明显不同。最优选的是，在采用凝胶渗透法按分子量分离时，每个第二、第三和第四系列产生第二、第三和第四系列的谱带，其中差不多所有的第二系列的邻近谱带、或差不多所有的第三系列的邻近谱带、或差不多所有的第四系列的邻近谱带的强度都近似相等，而不同系列中的差不多所有邻近谱带的强度明显不同；最优选的是，该方法还包括测定各谱带位置和强度的步骤，该强度代表特殊的谱带系列。

在其他的优选实施例中，在退火混合物中提供锰和铁离子，其中所述离子能引起聚合酶不能识别链终止剂；DNA产物在少于4条的凝胶泳道中按分子量分离；用凝胶阅读设备测量每一谱带的强度；由T7型DNA聚合酶、大肠杆菌DNA聚合酶I的大片段和Taq聚合酶中挑选DNA聚合酶；以及链终止剂是双脱氧核苷三磷酸。

在相关的方面，本发明的特征是DNA链的测序方法，包括的步骤是（a）提供DNA聚合酶，并保温溶液中的聚合酶和DNA链，该溶液含有锰或铁离子和链终止剂；或（b）提供基本上不能识别链终止剂的DNA聚合酶。

第二方面，本发明的特征在于一种用于DNA测序的DNA聚合酶生产方法，包括混合DNA聚合酶于含锰或铁离子的溶液中的步骤。

第三方面，本发明的特征在于一种包含 T 7 型 D N A 聚合酶或 Taq 聚合酶和锰或铁离子的溶液。所述离子的优选浓度在 0.005—100 毫摩尔浓度。

第四方面，本发明的特征在于一种用于 D N A 测序的具有 D N A 聚合酶、链终止剂和锰或铁离子的药盒。

在优选实施例中，聚合酶是 T 7 型 D N A 聚合酶，大肠杆菌 D N A 聚合酶的大片段或 Taq 聚合酶；链终止剂是双脱氧核苷酸；而药盒还另外包含脱氧核苷三磷酸。

第五方面，本发明的特征在于 D N A 自动测序的方法，包括提供基本上不能识别链终止剂的聚合酶，并产生具有相同链终止剂但分子量不同的一系列 D N A 产物，其中，D N A 产物对于差不多所有的邻近谱带都产生近似相等的强度。

所谓基本上不能识别是指链终止剂沿着 D N A 长度均匀地掺入，与 D N A 顺序无关。所谓近似相等是指强度最多相差 2—3 倍。

第六方面，本发明特征在于一个 D N A 自动测序装置，它具有一个反应器，用于提供由单一引物和 D N A 链生成的至少两个系列的 D N A 产物，每一系列的 D N A 产物具有不同的分子量，并在其末端具有一个链终止剂，用于分离 D N A 产物以形成一系列谱带的分离装置，在一个系列中差不多所有的邻近谱带强度都近似相同，而不同系列中的差不多所有邻近谱带的强度是不同的；在分离后测定每一谱带的位置和强度的谱带阅读装置；和直接由谱带的位置和强度测量 DNA 链的 D N A 顺序的计算装置。

在优选实施例中，反应器包含锰或铁离子，和 T 7 型 D N A 聚合酶。

第七方面，本发明的特征在于一种包含焦磷酸酶、DNA聚合酶和一种链终止剂或dITP的溶液或药盒；以及DNA测序的方法，包括在测序反应中提供焦磷酸酶。在测序反应中加入焦磷酸酶能降低焦磷酸的浓度，从而改善邻近谱带的谱带强度均匀性。

在上述任一方面中，可在螯合物如柠檬酸盐或异柠檬酸盐的存在下提供锰或铁离子。这些螯合物被认为能在DNA测序反应中以控制更好的水平提供所需离子。

最后一方面，本发明的特征在于T7型DNA聚合酶ΔLys118-Arg145，以及编码这种聚合酶的DNA。这种聚合酶不具可检测的核酸外切酶活性。

我们发现了这样的条件，在此条件下，DNA聚合酶能经修饰以改变其在DNA模板存在下在DNA引物延伸末端掺入链终止剂的能力。这一能力使DNA测序能以较低浓度的链终止剂完成，因此大大降低了DNA测序反应的成本。此外，我们还发现，具有这种能力的DNA聚合酶在测序凝胶中产生强度近似均匀的邻近谱带。也就是说，在任何很大的范围内，聚合酶不再区别掺入的链终止剂和正常的脱氧核苷三磷酸。我们已证明，至少有3种聚合酶能以此方式修饰，包括修饰型T7DNA聚合酶、大肠杆菌DNA聚合酶大片段和Taq聚合酶。其他与这些酶同源的聚合酶也可用于本发明。

本发明的另一优点在于容易计算任何给定的用于测序反应中的链终止剂浓度，因为谱带强度与任一链终止剂浓度直接相关，并对每个这种试剂都是相同的。

本发明修饰过的聚合酶特别适用于DNA测序反应，因为只需要单一的含有4种不同浓度的全部四种链终止剂的测序反应。因此，低

于四种的不同测序反应能用于任何特殊的DNA模板。

根据下面对最佳实施例的说明以及权利要求书，本发明的其它特征和优点将是很显然的。

首先对附图作简要说明。

图1是前述Sanger等人方法的DNA顺序测定示意图。

图2—7是采用Applied Biosystems 370A型DNA测序系统扫描六种不同的测序凝胶的相对谱带强度曲线图，每一单凝胶泳道都含有测序反应混合物，该混合物是在各种锰或镁的混合物和各种双脱氧核苷酸存在下，使用遗传修饰的T7 DNA聚合酶产生的。

在所有这些图中，测序的DNA是mGP1—2（编码T7 RNA聚合酶，Tabor等人，Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84: 4767, 1987），而引物是Applied Biosystems的端面（fam）引物。列出了所有情况下端面引物的未经加工的（原始的）输出数据。标明了各输出的开始和终止。另外，相对于在野生型T7 DNA中的相应位置列出了顺序的位置（Dunn等人，J. Mol. Biol. 8: 452, 1983）。每条曲线上用星号作记号的点代表密集区，其中至少有两种不同的DNA产物泳动于凝胶的相同位置。Tabor等人（Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84: 4767, 1987）对密集作用作了一般性的说明。

图8是遗传上修饰的T7 DNA聚合酶，在4.0 mM 异柠檬酸盐存在和不存在情况下，DNA聚合酶活性的镁和锰最佳浓度曲线。

图9是在10 mM 镁或锰存在下，不同浓度的异柠檬酸盐对遗传修饰的T7 DNA聚合酶的DNA聚合酶活性的影响曲线。

图10是一种质粒pGP5—8的示意图，该质粒编码缺少氨基

酸 Lys 118 到 Arg 145 的遗传修饰的 T7 DNA 聚合酶, 此修饰酶缺少核酸外切酶活性。

图 11 是本发明自动测序设备的示意图。

DNA 聚合酶

用于本发明的 DNA 聚合酶包括属于一类同源酶的 DNA 聚合酶, 包括 T7 型 DNA 聚合酶 (如 T7、T3、 ϕ I、 ϕ II、H、W31gh-1、Y、A1122 或 Sp 6)、大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的大片段和 Taq 聚合酶。所谓同源聚合酶指的是在镁存在下, 该酶不能识别脱氧核苷三磷酸和双脱氧核苷三磷酸; 然而, 当用锰代替镁时, 不能识别双脱氧核苷三磷酸的能力就下降。这些聚合酶在下述条件下用于 DNA 测序反应中, 在这些条件下, 当测序反应的 DNA 产物作凝胶电泳时能产生强度近似均匀的邻近谱带 (其强度变化约为 1.5—2.0 倍)。所谓邻近谱带是指包括分子量相差 6000 之多, 即相差 20 碱基的 DNA 产物的谱带。此强度的实际值将沿凝胶长度降低, 这一点可参见下文和附图。谱带强度反映某一谱带内 DNA 产物的数目。用标记物 (如荧光或放射性同位素) 产生易检测的、反映这种 DNA 产物数目的强度的谱带。因此, 在本发明中, 使用一种链终止剂由一种测序反应得到的邻近谱带具有的 DNA 产物数目近似相同, 因此谱带强度均匀。测序条件包括在特定二价或三价阳离子如锰 (II 和 III)、亚铁和铁离子, 对于 DNA 合成不具有可检测影响或有害性的一价和二价阳离子, 包括: K、Na、Ba、Be、Ca、Ce、Cr、Co、Cu、Ni、Si 和 Zn 的存在下保温聚合酶。阴离子是不重要的, 例如可使用氯化物、乙酸盐和硫酸盐。在这些条件下, 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的大片段和 Taq 聚合酶能将链终止剂如双脱氧核苷的需要量

减少几乎1000倍，修饰型T7聚合酶能减少10倍左右。在该溶液中也提供一种螯合剂，为的是有助于调节可获得的二价金属离子的浓度。例如，柠檬酸盐或异柠檬酸盐都可提供。这些螯合剂被认为能在一个很宽的锰浓度范围内将游离锰离子的浓度保持在10和100 μM 之间。也就是说，该螯合剂起到缓冲剂的作用。

本发明的DNA聚合酶沿着DNA模板不能显著识别双脱氧核苷类似物和脱氧核苷。也就是说，在锰或铁的存在下，这些聚合酶不能区别有3'羟基的核苷酸和没有3'羟基的核苷酸（即在核糖的3'位上有两个氢）。然而，这些聚合酶即使在锰或铁的存在下，也能区别在核苷其他位置上的修饰。例如，这些聚合酶能够识别结合有荧光基团的双脱氧核苷类似物和脱氧核苷。然而，基于双脱氧核苷修饰的存在与否，该聚合酶不能区别不同范围内的邻近或附近核苷酸。因此，虽然它们能强烈地区别这些类似物，并与未修饰的双脱氧核苷相比需要更高的浓度以用于DNA测序反应，但邻近谱带的强度仍然是均匀的。例如，在Mn存在下，与双脱氧GTP（ddGTP）相比较，对于双脱氧ITP（ddITP）的识别能力提高10倍。然而，测序反应产生的所有谱带与用ddITP的强度一样，因为沿着DNA模板的识别不存在差别。

因此，本发明的聚合酶能提供均匀的链终止剂掺入效率，即使它们在整个掺入过程中能够识别也是这样。

用于本发明的链终止剂包括具有2'、3'双脱氧结构的双脱氧核苷。在本发明中有用的其它终止剂是明确能在特殊碱基上终止DNA测序反应，并在上述条件下不被聚合酶识别的那些。

为了确定哪一种特殊的DNA聚合酶，配合哪一种链终止剂或测

序反应混合物中的其它成分可用于本发明中，如下述和图示进行一项标准的测序反应，讨论谱带形成的范围和测序凝胶中邻近谱带的均匀性。如果聚合酶反应没有使引物至少增加2.0碱基，那么它在所用条件下是不合适的。邻近谱带均匀性在2倍或更小的范围内可用于本发明中。优选的均匀性在1.0—1.5倍的范围内。同样，最佳阳离子浓度的测定，或在本发明中有用的其他潜在阳离子，都通过各种条件下的测序反应进行确定。例如，检验的阳离子范围在0.005—100 mM。该实验的例子如下：

DNA合成是采用17聚体引物测量的，其顺序为5'-GTAAACGACGGCCAGT-3' (New England Biolabs, 目录号1211)，该引物在其5'端上有³²P标记，并退火成单链mG P1-2 DNA。Tabor等人, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84:4767, 1987; Tabor等人, J. Biol. Chem. 262:16212, 1987。在本反应中可同样使用任何其他的模板。在具有一定浓度范围的金属离子条件下，将这种引物—模板用于含有一种DNA聚合酶的反应中。反应是在给定浓度的全部四种脱氧核苷酸(dNTP, 20—200 μM)存在下完成的，并且有一种一定浓度的双脱氧核苷酸(ddNTP, 在本实例中, 10—500 μM的ddGTP)。然后，用聚丙烯酰胺凝胶电泳分析DNA产物，此处DNA合成是按产生谱带的引物延伸检测的，代表凝胶中各种分子量的延伸。

在一具体实例中，每一反应混合物(10 μl)含0.1 μg ³²P引物—模板，40 mM Tris-HCl_{pH 7.5}，5 mM二硫苏糖醇(DTT)，5 μM—20 mM金属离子，10—500 μM 4种

d N T P, 1—500 μ M d d N T P 和 2 单位的 D N A 聚合酶。在 37 °C 下保温 15 分钟, 该反应通过加入 10 μ l 90 % 甲酰胺、50 m M E D T A 和 0.1 % 的溴苯酚蓝而终止。

使样品于 75 °C 加热 2 分钟, 然后立即装入在 7 M 脲、100 m M Tris—硼酸盐_{pH 8.9} 中的聚丙烯酰胺凝胶中 (8 % 丙烯酰胺、0.3 % 双丙烯酰胺)。电泳分析于 2000 伏下进行 2 小时。该凝胶用 50 % 甲醇、10 % 乙醇固定 30 分钟, 干燥, 并曝光进行放射自显影。用光密度计扫描每一泳道, 以测定所得到的底片中每一泳道的谱带强度。所用光密度计为双光路自动记录式仪器, 型号为 M K I I I C (Joyce, Lobel & Co, Ltd, Gateshead—on—tyne, II, England)。任意对扫描凝胶合适的光密度计量仪都可使用。另一种选择是, 所得谱带的均匀性的测量通过 D N A 产物在凝胶内电泳后进行扫描。

任意一种酶掺入给定 d d N T P 的能力与掺入其相应的 d N T P 的能力的比较, 是以在固定范围内终止 D N A 合成反应所必需的 d d N T P 与 d N T P 的比值进行测量的, 检测所产生的不大于固定分子量的谱带。也就是说, 在测序凝胶的特定范围内反应终止时产生的谱带。因此, 如果一种酶比另外一种酶的对给定 d d N T P 的识别能力高 1000 倍, 那么就需将 d d N T P 与 d N T P 的比值提高 1000 倍, 以获得在相同凝胶范围内在相邻部位上终止的谱带。

锰 (Mn)

下述一系列实例中, 在 D N A 测序反应中使用修饰的 T7 D N A 聚合酶或大肠杆菌 D N A 聚合酶 I 的大片段, 并且测序缓冲液中存在有锰。这些实例并不限制本发明, 只是简要地为所属技术领域的一般

技术人员提供使用本发明DNA聚合酶的指南。如上所述，所属技术领域的一般技术人员很容易决定其他一些条件，在这些条件下，能产生本发明的DNA聚合酶，这些酶将具有此处所述的链终止剂掺入均匀性和在测序反应中使用的性质。

用于下述例子中的特异的修饰型T7 DNA聚合酶是在遗传上修饰的，使其不具有可检测的核酸外切酶活性。这种遗传上修饰的DNA聚合酶被称为 Δ Lys 118—Arg 145 (Δ 28)，因为它缺失T7 DNA聚合酶中由Lys 118到Arg 145的氨基酸区。质粒 $p_{G P 5-8}$ 是质粒 $p_{G P 5-5}$ 的变种，使用前者构建编码这种聚合酶的基因，质粒 $p_{G P 5-5}$ 在Tabor等人的US 4, 795, 699中有说明。

参阅图10， $p_{G P 5-8}$ 包括在BamHI和HincII位点切除的 $p_{A C Y C 177}$ ，含有 $\phi 1.1A$ 和 $\phi 1.1B$ 的由碱基5667至6166的T7 DNA，并含有基因5的T7 DNA碱基14306—16869，该基因具有示于图10的修饰。 $p_{G P 5-8}$ 是通过首先合成34聚体5'—CCGGCAAGTTGCCCGGAATGCTCGAGGAGCAGGG3'构建的。该寡核苷酸被用作M13 $m_{G P 5-2}$ 的单链DNA的DNA合成引物，它含有的插段编码T7基因5，并在同处为Tabor等人所描述。DNA合成和突变体的选择按同处Tabor等人的说明完成。在 $m_{G P 5-2}$ 中构建好所需突变后，将含有84 bp缺失的T7基因5的合适区域插至 $p_{G P 5-5}$ 中，步骤是分离含有T7 DNA中由14,306到15,610的EcoRI—HpaI片段，其中包括含有84 bp缺失的区域，并将它连接至 $p_{G P 5-5}$ 的对应区域中，通过下述以证实衍生的 $p_{G P 5-8}$

8 含有缺失, 即检查是否存在有由诱变产生的 Sma I 和 Xho I 位点, 和对含 8 4 b p 缺失的区域进行 D N A 顺序分析。将 p^{G P 5-8} 转化至菌株 K 3 8 / p^{Trx-3} 中, 以产生菌株 K 3 8 / p^{Trx-3} / p^{G P 5-8}。K 3 8 / p^{Trx-3} / p^{G P 5-8} 的诱导, 和遗传改建的 T 7 D N A 聚合酶的纯化, 按同处 Tabor 等人为类似菌株 K 3 8 / p^{Trx-3} / p^{G P 5-5} 说明的相同程序进行。如 Tabor 等人在同处所述, 由于这种聚合酶不具有可检测的核酸外切酶活性, 所以在其用于 D N A 测序反应之前没有必要进行化学修饰。下文用于实例中的遗传修饰的 T 7 D N A 聚合酶是一种具有 1 0 0 0 单位 / ml 活性的制剂。

实例 1 使用锰的 D N A 测序反应

在 D N A 顺序测定中使用在 M n 存在下的标准的 D N A 顺序的测定法。对于 T 7 D N A 聚合酶来说, 一般的测序步骤 Tabor 等人在同处已作了详细说明。简单说, 步骤和条件如下:

A 退火反应

在退火反应中制备下列溶液:

在 1 0 m M Tris-HCl p ^H 7. 5, 0. 1 m M E D T A 中的	
顺序待测的 D N A (例如 m G P 1 - 2 D N A)	2 μl / 7 μl. 7 μl
5 × Seq Buf (2 0 0 m M Tris-HCl p ^H 7. 5, 5 m M	
MnCl ₂ , 2 5 0 m M NaCl)	2
引物 (New England Biolabs, 1 7 聚体, 产	
品号 1 2 1 0, 0. 5 p m / μl)	1

共计 1 0 μl

该溶液于 6 5 °C 加热 2 分钟, 然后缓慢冷却至室温。

B 标记反应

在标记反应中需制备下述溶液:

退火反应混合物	10 μ l
二硫苏糖醇 0.1 M	1
[^{35} S]dATP, New England Nuclear NEG-034H	1
dTTP、dCTP、dGTP各1.5 μ M	2
遗传修饰的 T7 DNA 聚合酶, 1 单位/ μ l	
(Δ LYS 118 - Arg145, 如上所述)	2
共计	16 μ l

该溶液在室温下保温5分钟。

C、 终止反应

在终止反应中, 制备的四种溶液如下:

	G	A	T	C	
5 $\times$ Seq Buf	0.6	0.6	0.6	0.6	μ l
4 种 dNTP (3mM)	0.3	0.3	0.3	0.3	μ l
H ₂ O	1.9	1.9	1.9	1.9	μ l
ddGTP 0.2 mM (dd = 双脱氧)	0.2				μ l
ddATP 0.2 mM		0.2			μ l
ddTTP 0.2 mM			0.2		μ l
ddCTP 0.2 mM				0.2	μ l
共计	3	3	3	3	μ l

终止混合物于37℃下保温2分钟, 然后向每一终止混合物中加入3 μ l 完成标记反应的等分试样。所得到的溶液于37℃保温5分钟。

终止反应用 5 μ l 的 90% 甲酰胺、20 mM EDTA、0.2% 溴苯酚蓝、二甲苯—苯胺、PH 8.0 的溶液停止。所得到的样品在 75 $^{\circ}$ C 下加热两分钟，装入在 7 M 脲、100 mM Tris—硼酸盐 PH 8.9 中的聚丙烯酰胺凝胶中（8% 丙烯酰胺，0.3% 双丙烯酰胺），再于 2000 伏下电泳 2 小时。将凝胶用 50% 甲醇、10% 乙酸固定 30 分钟，干燥，再通过放射自显影使底片曝光。

冲洗曝光过的凝胶，用光密度计（Joyce, Loebel & Co, Ltd, 型号 MK III C）通过每一泳道的扫描测定每个泳道中谱带的放射性强度。

在用锰代替镁的条件下，使相同样品电泳时，下述三联体不论何时出现，其中用横线标出的碱基的密度比邻近碱基高 2—5 倍；T C T、A A G、G C A、C C T。然而，在刚说明的例子中，相应于上述所有三联体中每个碱基的谱带具有相同的强度，彼此不同最多达 20%。

实施例 2 采用锰、2 $\times$ d d G T P 和 1 $\times$ d d C T P 进行测序反应，以分化 G 和 C 之间的相对谱带强度

在本实例中，只用一个容器进行测序反应，以确定 DNA 模板中两种类型的碱基（即 C 和 G）顺序。步骤如下：

在退火反应中制备下列溶液：

m G P 1 — 2 D N A (2.7 mM , 在 10 mM Tris—HCl PH 7.5, 0.1 mM EDTA 中)	8.6 μ l
5 $\times$ SeqBuf	4
引物 (A B I 端面引物, 0.4 pm / μ l)	2
H ₂ O	5.4
共计	20 μ l

此溶液于 65 °C 下加热 2 分钟，再缓慢冷却至室温。端面 (fam) 引物用荧光标记物标记，该标记物通过测序凝胶时能被检测到，采用 ABI 370 A 型 DNA 测序系统检测。

在延伸反应中制备下述溶液。

退火反应混合物	20 μ l
二硫苏糖醇 0.1 M	1
4 种 dNTP 3 mM	3
ddGTP 30 μ M	3
ddCTP 30 μ M	1.5

共计 28.5 μ l

此溶液于 37 °C 下保温 2 分钟，再加入 1.5 μ l 遗传修饰的 T7 DNA 聚合酶 (Δ 28)，1 单位/ μ l，并将此溶液于 37 °C 下保温 10 分钟。加入 5 μ l 的 100 mM EDTA，PH 8.0 使反应停止。

如下述沉淀所得到的片段：加入 3.5 μ l 的 3 M 乙酸钠，和 100 μ l 的 100% 乙醇。在冰上保温 10 分钟后，于 4 °C 下用缩型离心机离心该混合物 30 分钟。用 500 μ l 的 70% 乙醇洗涤沉淀，再离心 5 分钟。倾出上清液，通过真空离心以干燥沉淀数分钟。将样品重悬浮于 5 μ l 90% 的甲酰胺和 50 mM EDTA PH 8.0 中，于 75 °C 下加热两分钟后，装入 ABI 370 A 型的测序系统中。按 37.0 A 型仪器的用户手册所述 (Preliminary Version, March 1987, Sections 3、4 和 5) 操作仪器，并收集未经处理 (原始的) 的数据。只给出了端面引物的未经处理 (原始的) 的输出数据。

该反应的输出列于图 4 中。每个 G 由一高峰代表，而每个 C 则由一矮峰代表。因此，DNA 中 G 和 C 的顺序可由峰高确定。这样，只需在一个测序反应中对所有的 DNA 产物使用一种标记物，就能测定 DNA 顺序中的 G 和 C。由于高分子量的产物存在量较小，所以峰高沿着凝胶逐渐变矮。然而，沿着凝胶的邻近 G 和 C 的差别仍保持 2 倍，而一对邻近 G 或一对邻近 C 大致是均匀的（变化大约 1.1—1.4 倍），但要校正沿着顺序的每加一个位置后的强度降低。例如，在图 4 中，对于一给定的谱带系列来说，信号在约 60 碱基的范围内下降 2 倍。因此在本实例中，沿着模板每加一个位置必定下降 1.16%（因为对于 $Ch^{6.0} = 2$ 来说， Ch 是 1.0116）。

重要的是要分辨由于在邻近谱带、在电泳时一起泳动的两个或多个谱带范围内链终止效率的不同而产生的不同强度的谱带。后一过程称为密集作用，它是凝胶电泳的伪迹，而不是来自 DNA 测序反应本身，而且使用锰也不会被消除。这种密集作用的一个实例在图 4 中用星号（*）标出。如果人们了解这样的密集作用是代表两种 DNA 产物的共同移动，如在图 4 中指出的，那么该谱带是 2 倍强度谱带的准确标记。

在密集区域内精确的顺序是测不出来的。为了测定这种顺序，就必须 1）在相反方向测定顺序或 2）在较强的变性条件下使测序凝胶泳动，即较高的温度，或加入 50% 的甲酰胺，或 3）使用核苷酸类似物，例如 dITP 或脱氮杂 GTP 以代替 dGTP。密集现象是由于在凝胶电泳的条件下，在 DNA 中形成了稳定发夹而产生的；核苷酸类似物的加入会使大多数的这种发夹不稳定。

产生于发夹结构的密集现象实际上可以是任意长度的，这取决于

发夹的范围和强度。因此，使用锰会使所有的邻近谱带中具有相等分子量的DNA产物数目近似相等，然而由于密集现象并不一定具有相似的谱带强度。

参阅图2，在终浓度为1 mM的锰存在下，仅仅用ddGTP来进行上述方法。在所得到的凝胶上，每一谱带都在图2中被表示成一个峰。谱带的强度是其峰高度的反映。使用锰时，邻近谱带强度以及峰高沿着凝胶是大概一致的，邻近谱带的差别低于5或10%。

相反，图3表示的输出代表用镁代替锰进行的相同实验。此时邻近谱带强度以及峰高的变化大到10倍。

参阅图5，在锰存在下的测序反应中使用相同浓度的所有四种双脱氧核苷酸（每种ddNTP的终浓度为0.75 μM ，如实例2），邻近谱带和相应的峰值几乎是均匀的，差别不超过大约1.5倍，更高分子量的DNA产物的绝对强度也是逐渐降低。相反，在镁存在下并使用相同浓度的全部四种双脱氧核苷酸时，如图6所示，邻近谱带的强度变化很大。

通过改变测序反应中的每一种ddNTP浓度，DNA链的完整核苷酸顺序能被测定。这种程序的一个例子列于图7中，其中每一种ddNTP的浓度差别为30%的间隔：ddGTP（4.5 μM ，2.2x）、ddATP（3.0 μM ，1.7x）、ddTTP（2 μM ，1.3x）和ddCTP（1.4 μM ，1.0x）。根据该曲线确定的DNA顺序出示在图的第二条线的下面。与实际DNA顺序相比只有6个错误（用‘v’表示）。这些错误可通过使用更大比例的每种ddNTP（例如1x ddCTP、2x ddTTP、4x ddATP和8x ddGTP）来消除。同样地，通过测量峰面

积，而不是峰高，结果会更准确。对于所使用的DNA测序设备来说，测量这种峰面积的计算机程序是很容易写出来的。

参阅图8，在螯合剂如柠檬酸盐或异柠檬酸盐不存在的情况下，锰在测序反应中的最佳浓度是1 mM，而镁是20 mM。当反应中存在40 mM 异柠檬酸盐时，在锰存在下聚合酶活性增加4倍，最佳锰浓度为5—20 mM。

参阅图9，在10 mM 锰浓度下，最佳异柠檬酸盐浓度为40 mM，导致聚合酶活性增加4倍。在镁浓度为10 mM时，任何量的异柠檬酸盐都有对聚合酶的抑制效应。如下文所述，在各种螯合剂和离子浓度存在的情况下，通过进行聚合酶反应可获得这些结果。具体地说，反应液(200 μ l)含有40 mM Tris-HCl PH 7.5，5 mM 二硫苏糖醇，0.5 mM 变性的小牛胸腺DNA，0.3 mM dGTP、dATP、dCTP和(^{3} H) dTTP (20 cpm / pm)，50 μ g / ml BSA和指定浓度的MgCl₂，MnCl₂或异柠檬酸钠。反应由加入0.1单位遗传修饰的T7 DNA聚合酶而开始(Δ Lys 118-Arg 145)。保温于37℃下30分钟。反应再通过加入3 ml 1 N HCl和0.1 M焦磷酸钠而停止，最后测定酸不溶性物质的放射性。在检测条件下，一单位DNA聚合酶在30分钟内将10微微摩尔的全核苷酸催化掺入酸不溶的形式中(Tabor等人, J. Biol. Chem. 262:16212, 1987)。

焦磷酸钠酶

当化学修饰的T7 DNA聚合酶被用于DNA测序时，特殊的片段由于加长保温时间而消失(Tabor 和 Richardson, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84:4767, 1987)。由

于该过程在测序凝胶中产生空间，所以我们把出现这种现象的部位称为“孔”。当用 d I T P 代替 d G T P 使用时，孔出现得较为频繁。

在阅读 D N A 测序凝胶时，特殊片段的降解是一个显而易见的问题。当阅读顺序时，片段缺乏或者完全被漏掉，从而在测定的顺序中产生缺失，或者观察到一个孔，而这个孔只能被认为是该位置的未知碱基。

对于这个问题的现行解决办法是维持短的反应时间。有两个理由使这一点令人不满意。首先，它使反应的控制在技术上更困难，因为为了使反应开始后很快终止，人们必须非常迅速地动作。更重要的是，一些谱带对这种降解特别灵敏，甚至在非常短的反应时间之后就消失。

我们已构建了遗传上改建的 T 7 D N A 聚合酶 ($\Delta 28$ ，见上文)，该聚合酶不具有可检测水平的核酸外切酶活性（野生型酶水平 $< 10^{-7}$ ，或比化学修饰的 T 7 D N A 聚合酶低 10,000 倍以上）。我们认为，由于孔出现与加长保温时间有关，所以孔的出现大概是由于核酸外切酶活性的作用，这样当使用遗传修饰型 T 7 D N A 聚合酶时则不应出现孔。然而，当使用化学或遗传修饰的 T 7 D N A 聚合酶时，上述的放射性片段仍以同样速率消失。

我们已确定这种特殊谱带的损失是由于聚合酶的焦磷酸解活性所致。此活性并不是由于 D N A 聚合酶的核酸外切酶活性造成的，而是聚合酶活性的逆转：在焦磷酸 (P P i) 存在下，聚合酶将向位于链的 3' 端的末端核苷酸加入 P P i，在此情况下释放双脱氧核苷 5'—三磷酸。一般参阅 Deutscher 等人, J. Biol. Chem. 244:

3019, 1969; Kornberg, D N A Replication pp. 125-126, 由 Freeman & Co, S F 出版。此反应具有排除 3'

末端阻断的效果，并允许合成作用沿着模板进一步延伸。一般情况下在DNA合成反应混合物中积累 PPi ，这是因为 PPi 是聚合反应的产物。焦磷酸解作用的部位是依赖DNA顺序的，因此上述孔的产生只发生在特殊部位。

为了克服这一问题，必须抑制焦磷酸解作用。抑制焦磷酸解作用的一条途径是当焦磷酸在聚合酶反应中产生时通过加入焦磷酸酶将它分解掉。其他解决办法包括通过其他的酶反应改变焦磷酸，或通过加入能抑制DNA聚合酶这一活性的类似物来防止焦磷酸解反应。我们已发现，甚至向测序反应加入痕量的这种酶（DNA聚合酶分子的千分之一摩尔比）就能完全稳定上文指出的特殊类别的片段，并且消除孔的产生。在遗传改建型T7 DNA聚合酶（ $\Delta 28$ ）和焦磷酸酶两者都存在的情况下，即使延长保温时间（最高2小时），所有的谱带也是稳定的。

对于自动的顺序测定则采用不同的谱带强度，关键在于完全通过 ddNTP 与 dNTP 的比例来确定每条谱带的强度。由于一些谱带强度的降低，焦磷酸解作用变得模糊。因此，在此测序过程中加入焦磷酸酶是特别有用的。

无论什么时候都可将焦磷酸酶加到用于测序的化学或遗传修饰的T7 DNA聚合酶或别的聚合酶中，其量至少足够催化以一定速率生成的 PPi 的水解，该水解反应将防止 PPi 积累到能导致发生焦磷酸解作用的水平。当用 dITP 取代 dGTP 时，这一点特别重要，因为在这种情况下，由于焦磷酸解反应而发生大量孔的出现。

实例3 在测序反应中使用焦磷酸酶的方法

在本实例中使用常规的测序方法。唯一不同的是使用酵母的无机

焦磷酸酶。焦磷酸酶的来源并不重要，然而在本实例中，我们使用 Sigma 的酵母无机焦磷酸（产品目录号 I-4503），而无须进一步纯化，或进一步在 FPLC 单 Q 柱上纯化，以及不经进一步纯化的 Worthington 酵母无机焦磷酸酶。在将聚合酶加到标记反应之前，把焦磷酸酶加到修饰的 T7 DNA 聚合酶中。有代表性的是每套测序反应使用 2 单位（0.25 μ g）的聚合酶，和 0.001 单位的酵母无机焦磷酸酶（4 ng）。很宽范围的焦磷酸酶活性都将有效：每个测序反应使用 0.01 ng 到 1 μ g 的酵母焦磷酸酶已成功地进行了实验。

例如，在退火反应中制备下述溶液：

m G P 1 $\rightarrow$ 2 DNA (在 10 mM Tris-HCl PH 7.5, 0.1	
m M EDTA 中)	7 μ l
5 $\times$ SeqBuf	2
引物 (New England Biolabs - 17 聚体,	
0.5 pm/ μ l, 产品号 1211)	1
共计	10 μ l

此溶液于 65°C 下加热两分钟，然后缓慢冷却至室温。

在标记反应中制备下列溶液：

退火反应混合物	10 μ l
二硫苏糖醇 0.1 M	1
^{32} S dATP, New England Nuclear NEG-034H	1
3 种 dNTP (dTTP、dCTP 各为 1.5 μ M,	
3 μ M dITP)	2
酶混合物 (见下文)	2
共计	16 μ l

酶混合物:

遗传修饰的 T7 DNA 聚合酶, Δ Lys 118 - Arg 145
1 单位/ μ l;

酵母无机焦磷酸酶 (在 20 mM Tris-HCl PH 7.5,
10 mM β -巯基乙醇, 50 μ g/ml 牛血清清蛋白中)
0.01 单位/ml

此溶液于室温下保温 5 分钟。

在终止反应中制备下述 4 种反应混合物:

	G	A	T	C
5 $\times$ SeqBuf (见上文)	0.6	0.6	0.6	0.6 μ l
4 种 dNTP (dATP、 dTTP、dCTP 各 3 mM, 6 mM 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 0.3 mM	0.2 μ l			
ddATP 0.2 mM		0.2 μ l		
ddTTP 0.2 mM			0.2 μ l	
ddCTP 0.2 mM				0.2 μ l
共计	3	3	3	3 μ l

这些终止混合物于 37 °C 保温 2 分钟, 往每一终止混合物中加入等分的标记反应试样。所得到的溶液在 37 °C 下保温 60 分钟。

用 5 μ l 90% 甲酰胺、20 mM EDTA、0.2% 溴苯酚蓝、二甲苯-苯胺, PH 8.0 的溶液停止各终止反应。

将所得到的样品于 75 °C 下加热 2 分钟, 装入在 7 M 脲、100

m M Tris—硼酸盐, PH 8.9 中的聚丙烯酰胺凝胶 (8% 丙烯酰胺, 0.3% 双丙烯酰胺) 中, 再于 2000 伏下电泳 2 小时。使该凝胶在 50% 甲醇和 10% 乙醇中固定 30 分钟, 干燥后通过放射自显影使底片曝光。

设备

参阅图 11, 设备 100, 适于自动化 DNA 顺序测定, 它包括反应器 102, 所述反应器包含上述试剂 104, 例如 DNA 聚合酶、镁或铁离子、螯合剂和焦磷酸酶。该设备还装有凝胶盒 106, 以按照 DNA 产物的分子量将其分离, 和凝胶阅读装置 108, 以当 DNA 产物通过凝胶时 (用虚线箭头 107 表示) 检测 DNA 产物。此外, 还提供有计算装置以计算 DNA 产物的谱带强度, 以及谱带之间的相互位置。假若 DNA 产物在一条泳道中电泳, 那么计算机装置即可根据谱带强度和位置计算出 DNA 顺序。用标准的计算机程序完成此功能。

其他实例亦在下列权利要求的范围内。

说明书附图

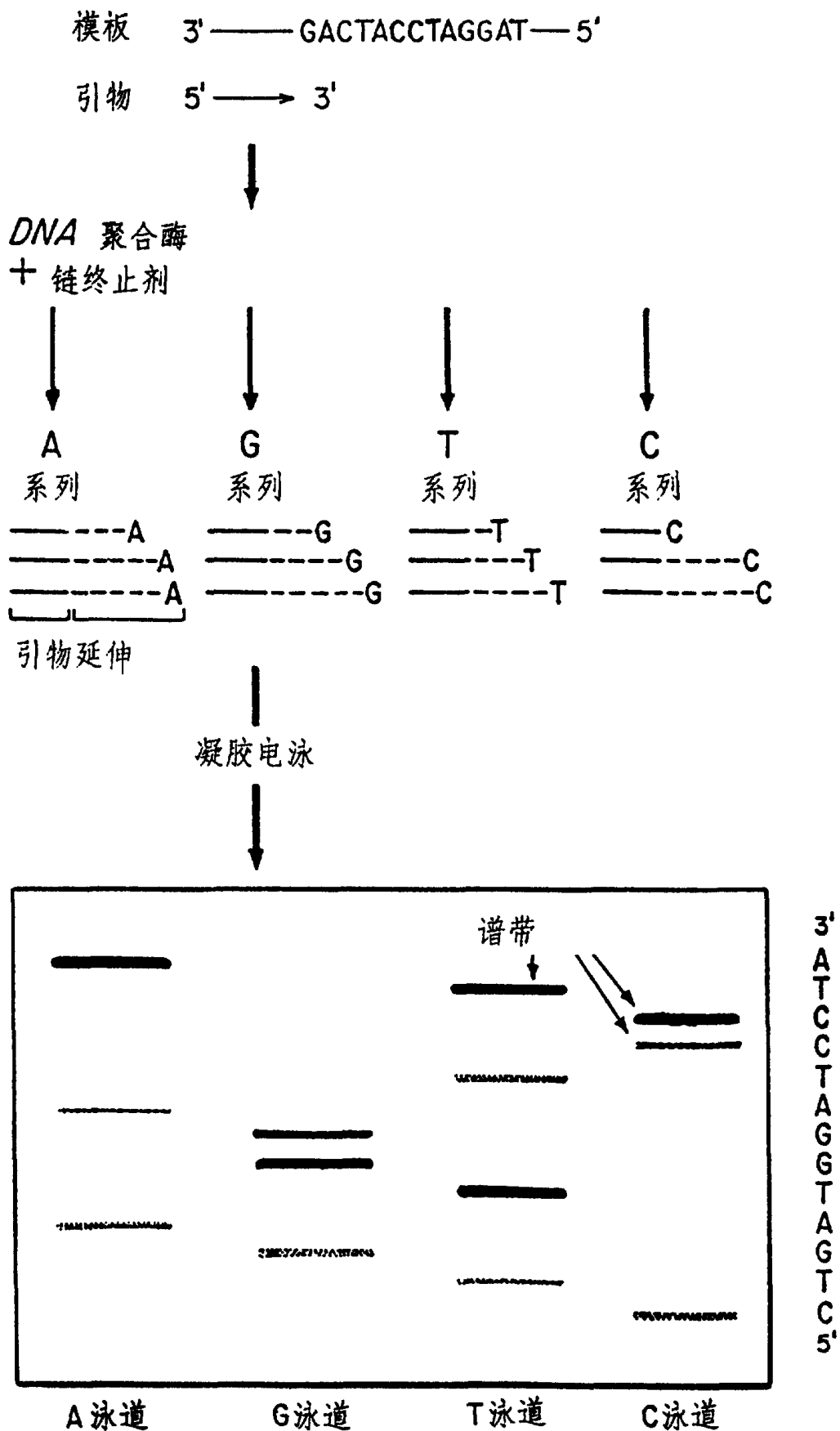
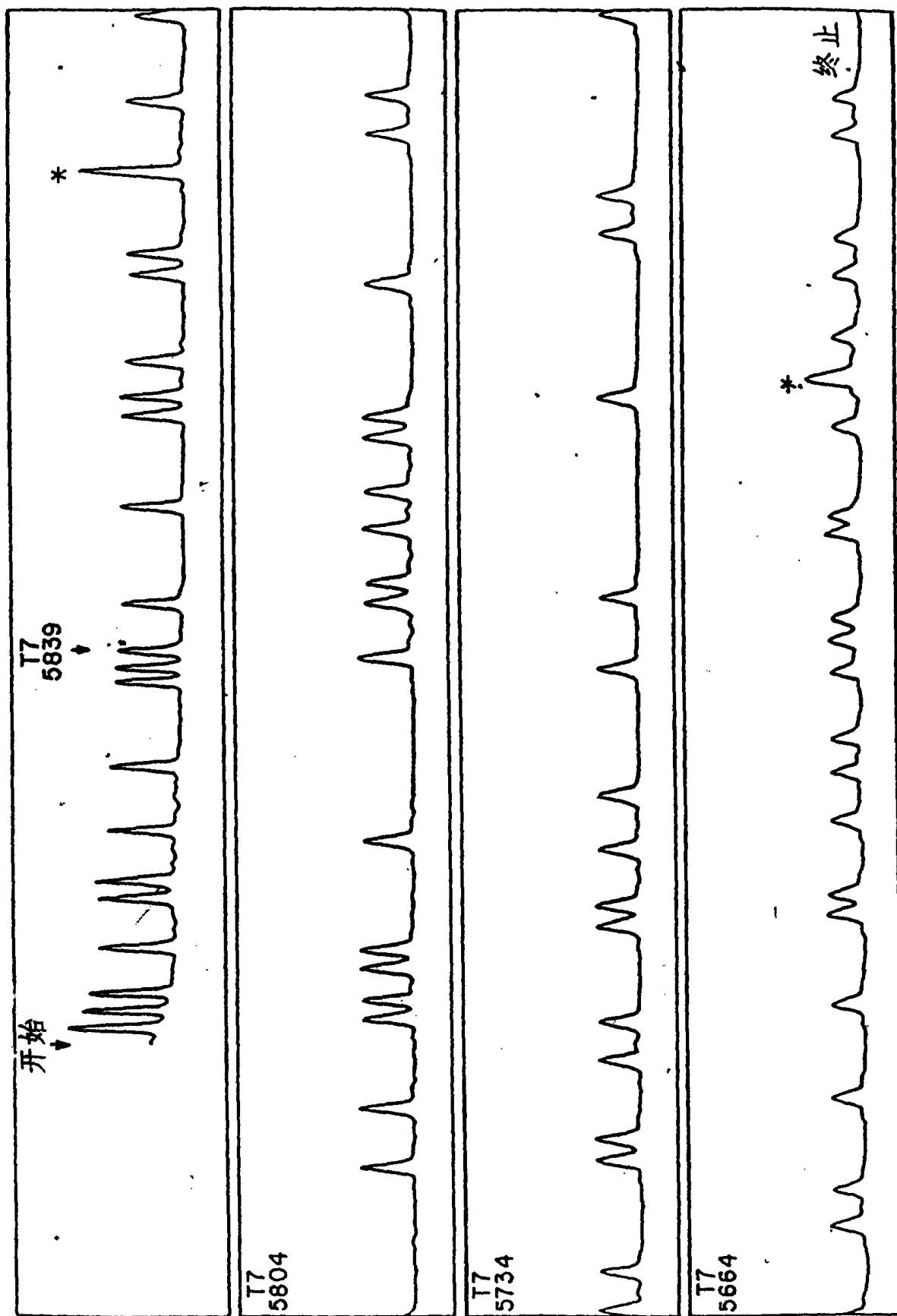


图 1

图 2



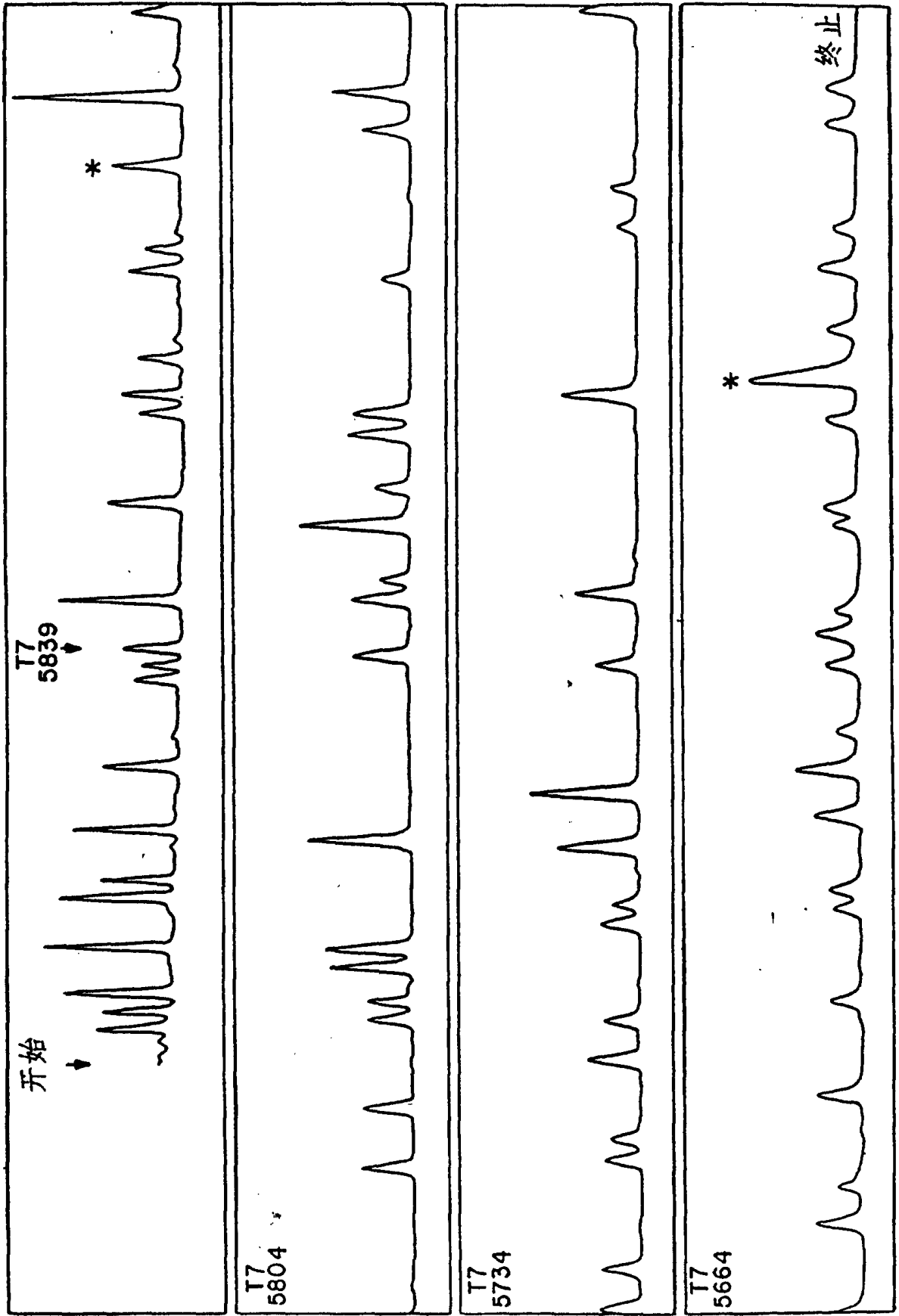


图 3

图 4

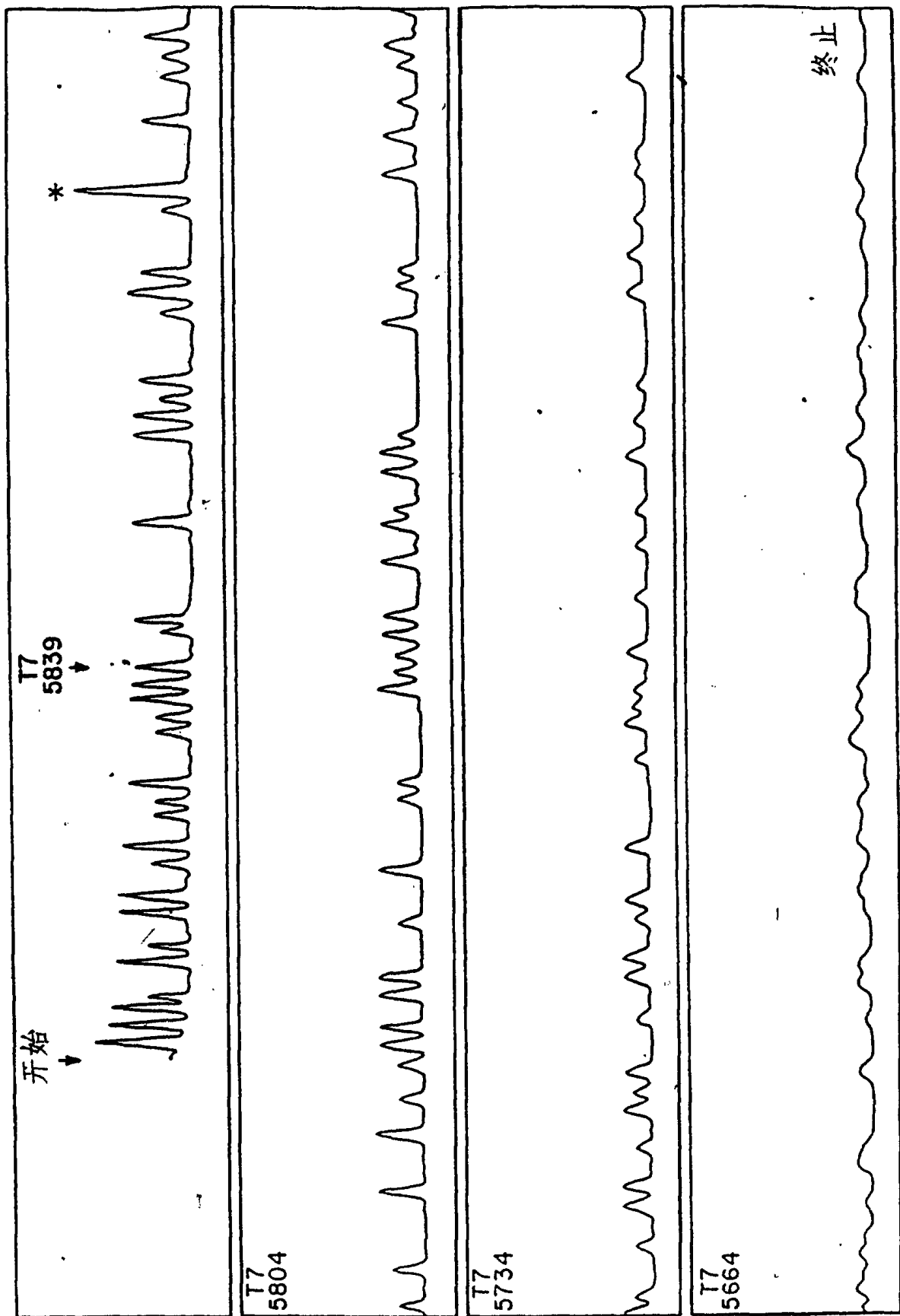


图 5

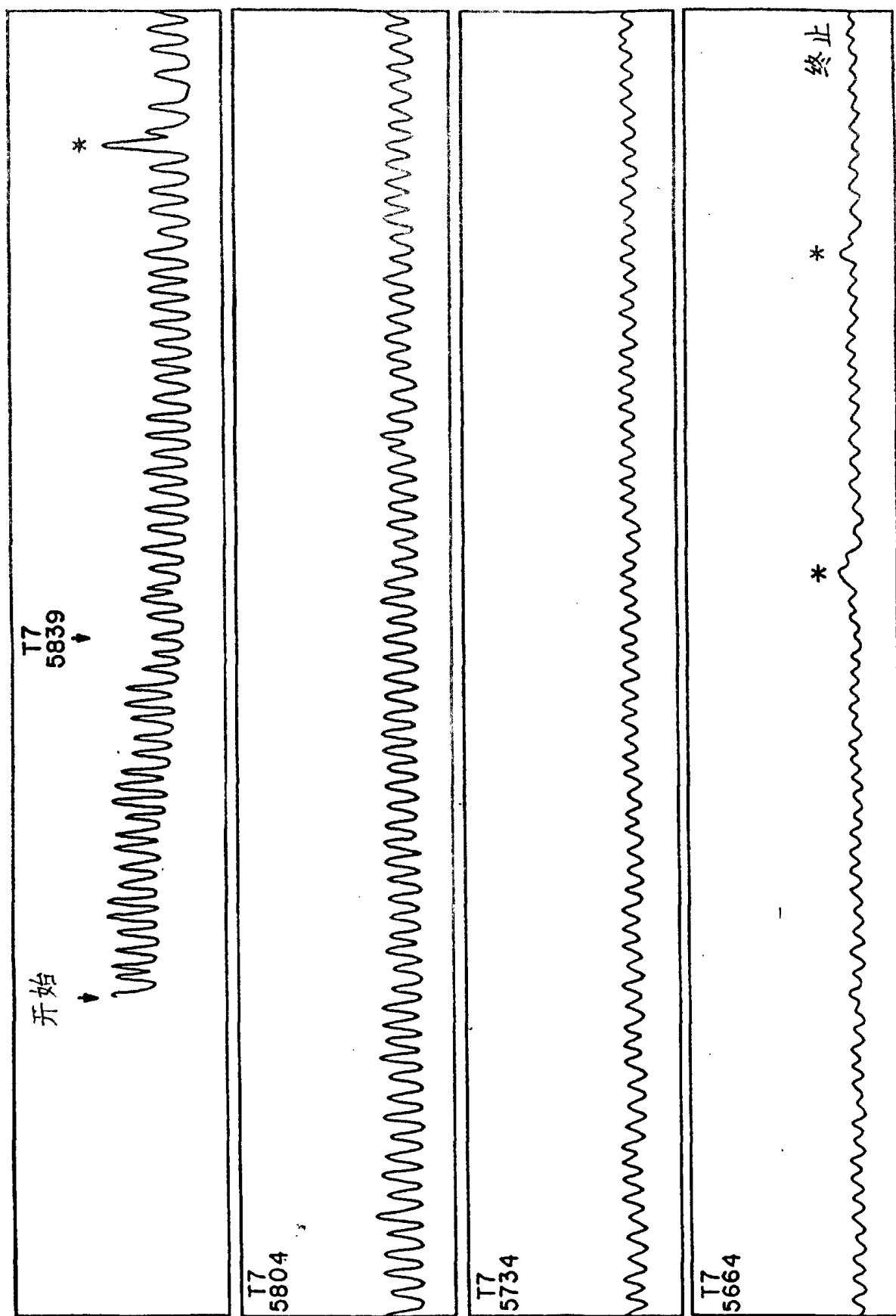


图 6

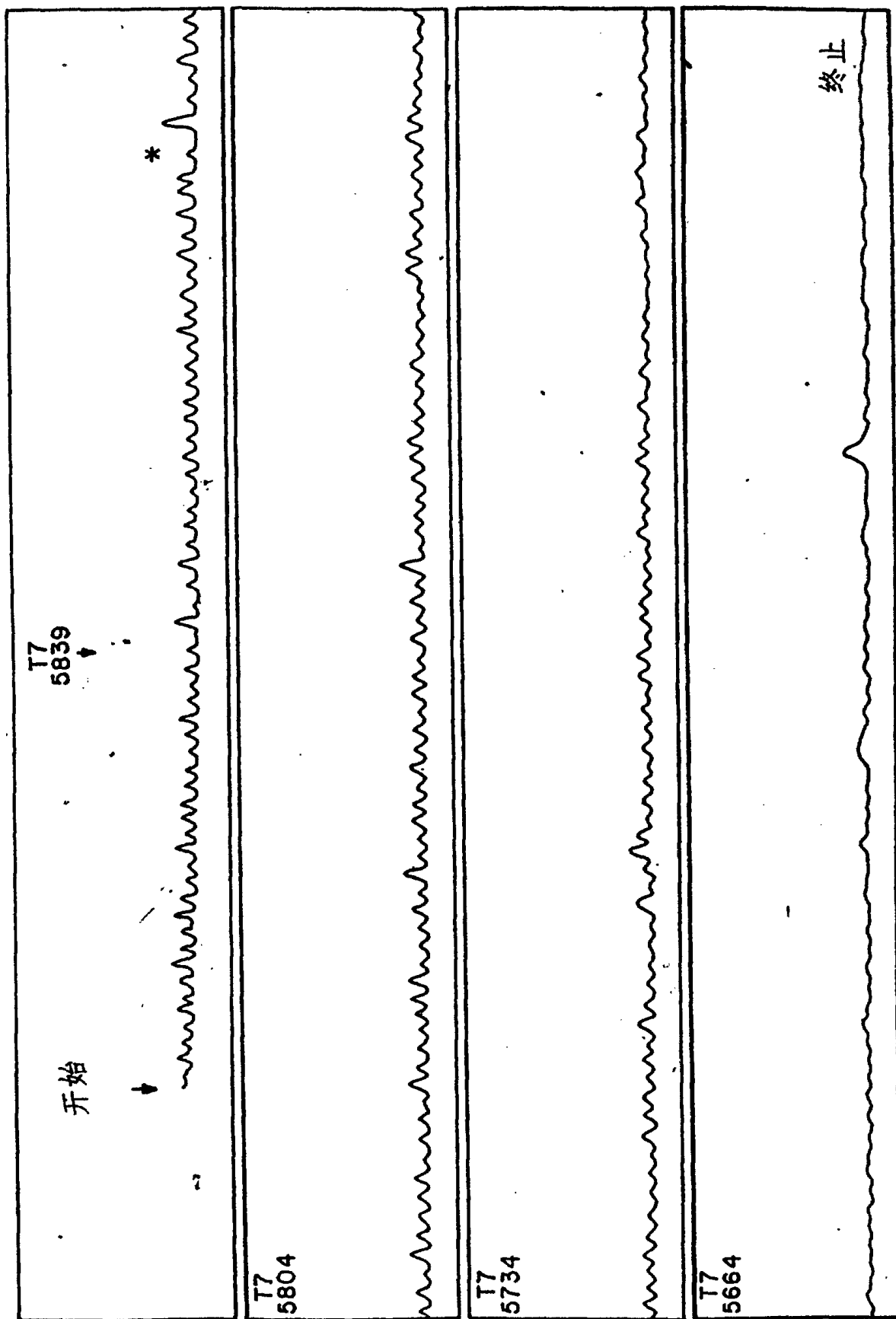
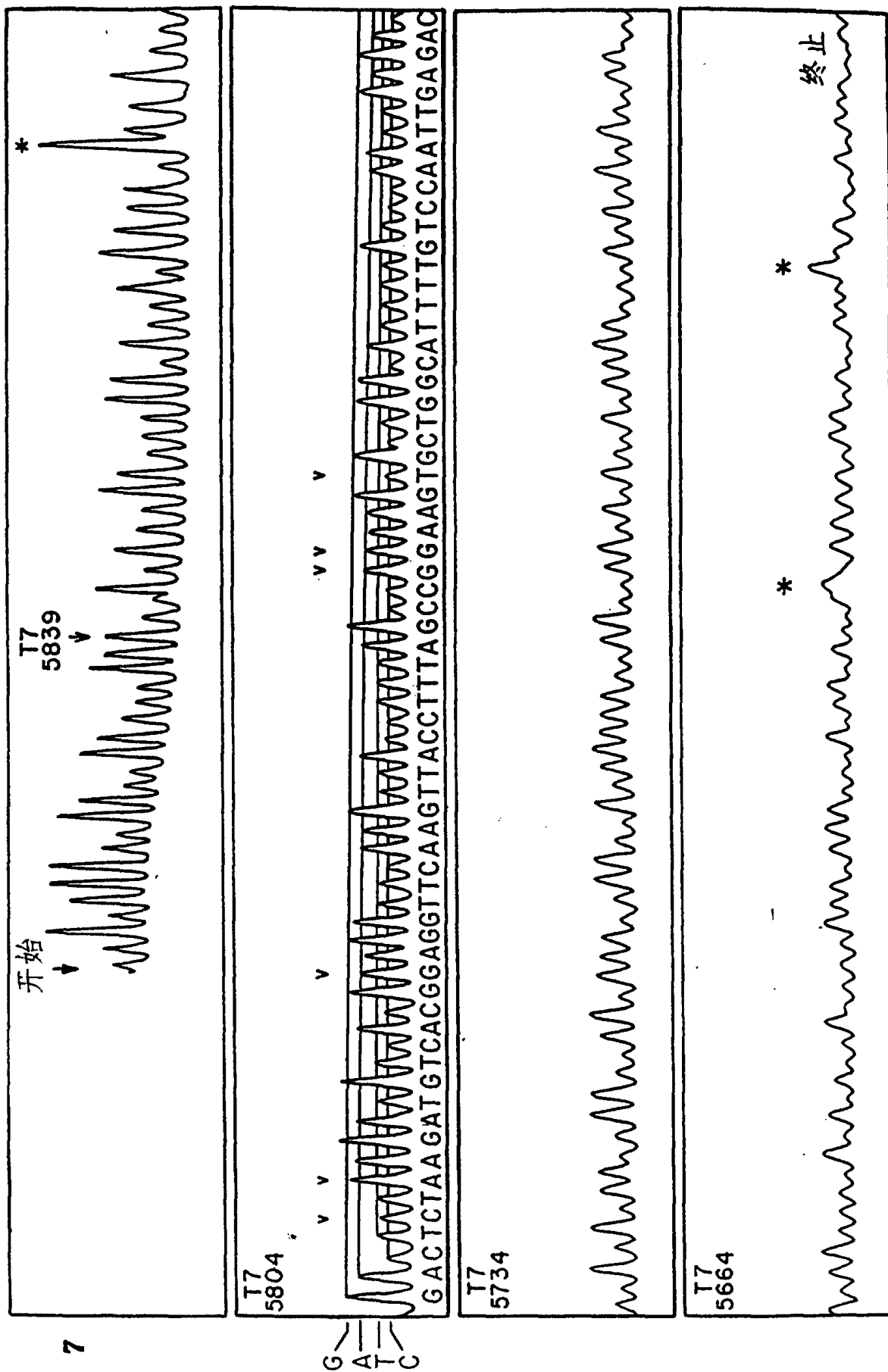


图 7



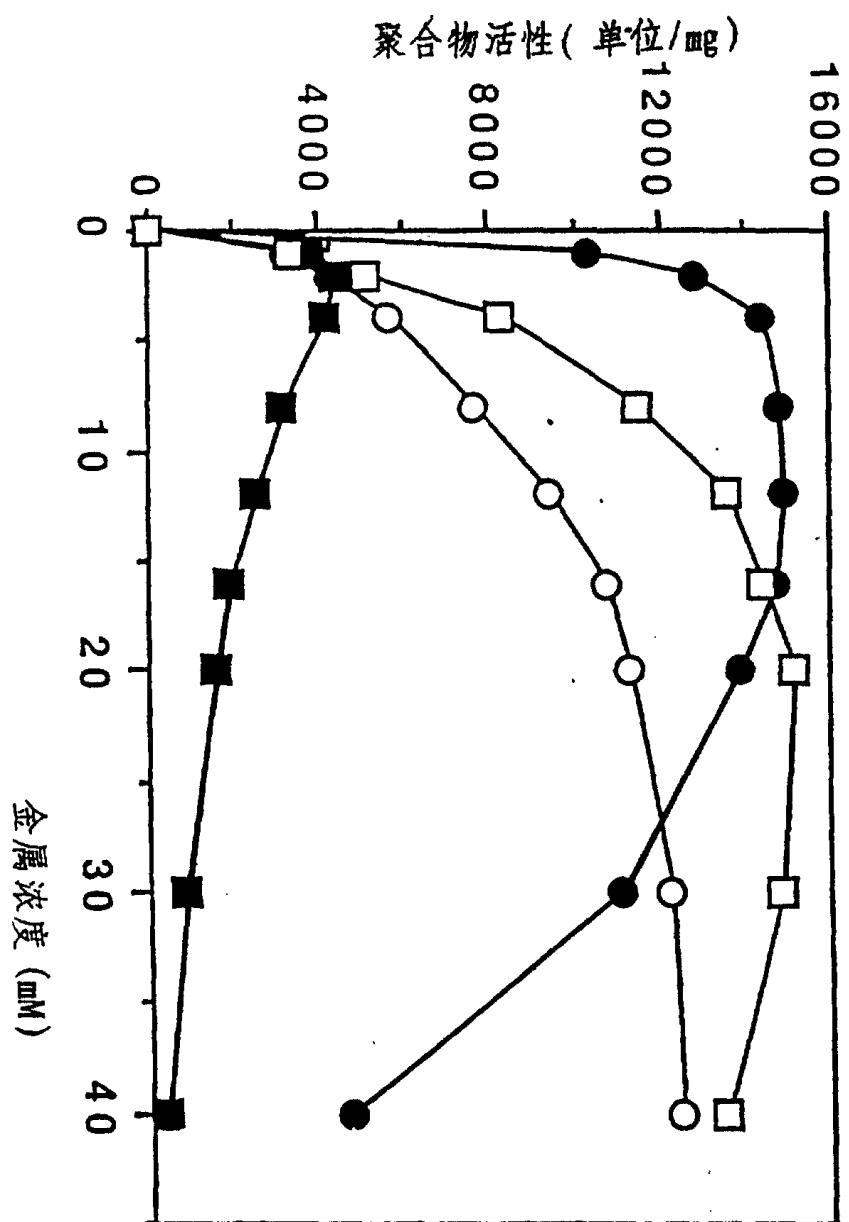


图 8

镁

镁 + 40mM 异柠檬酸盐

锰 + 40mM 异柠檬酸盐

锰

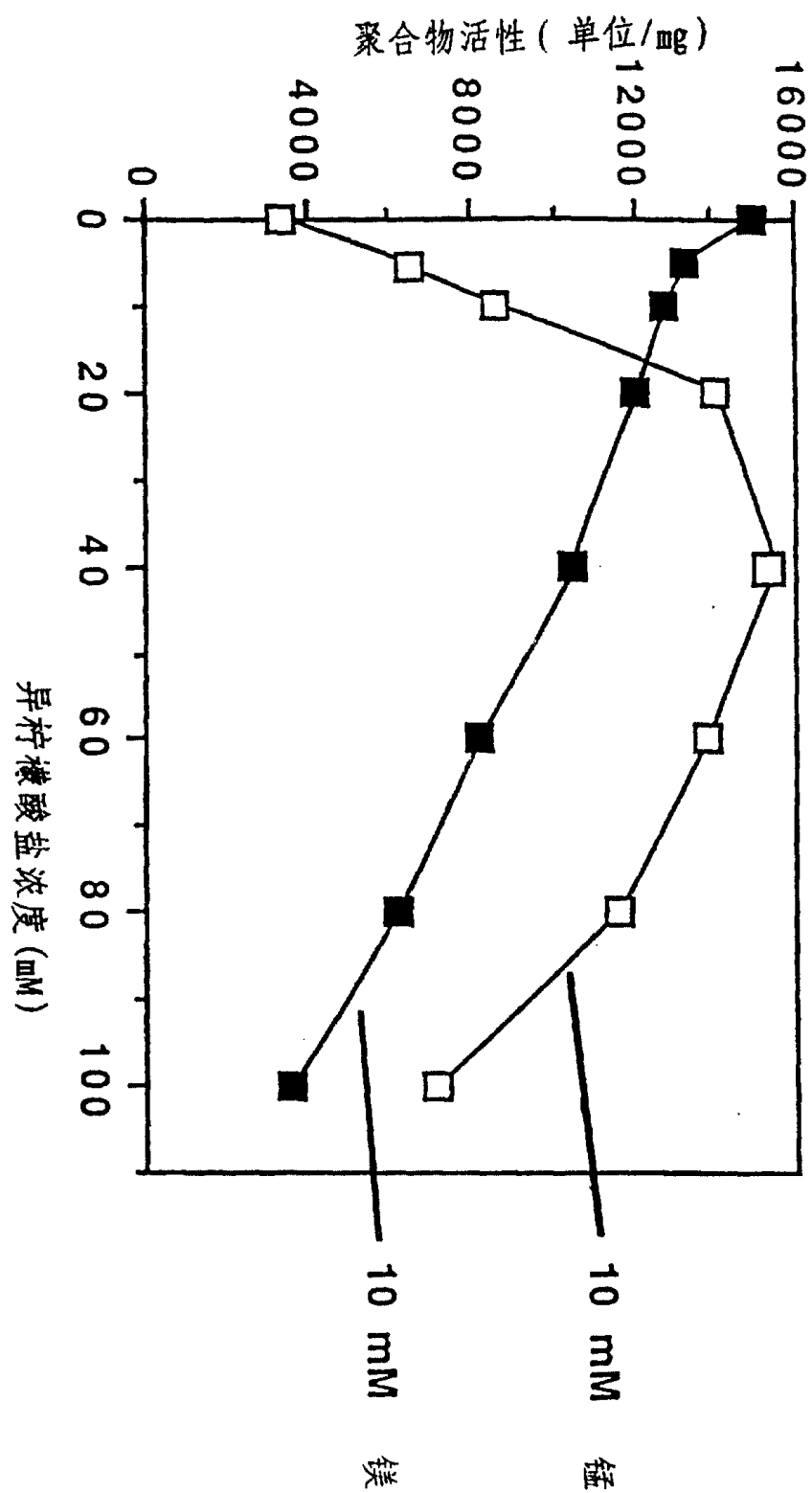


图 9

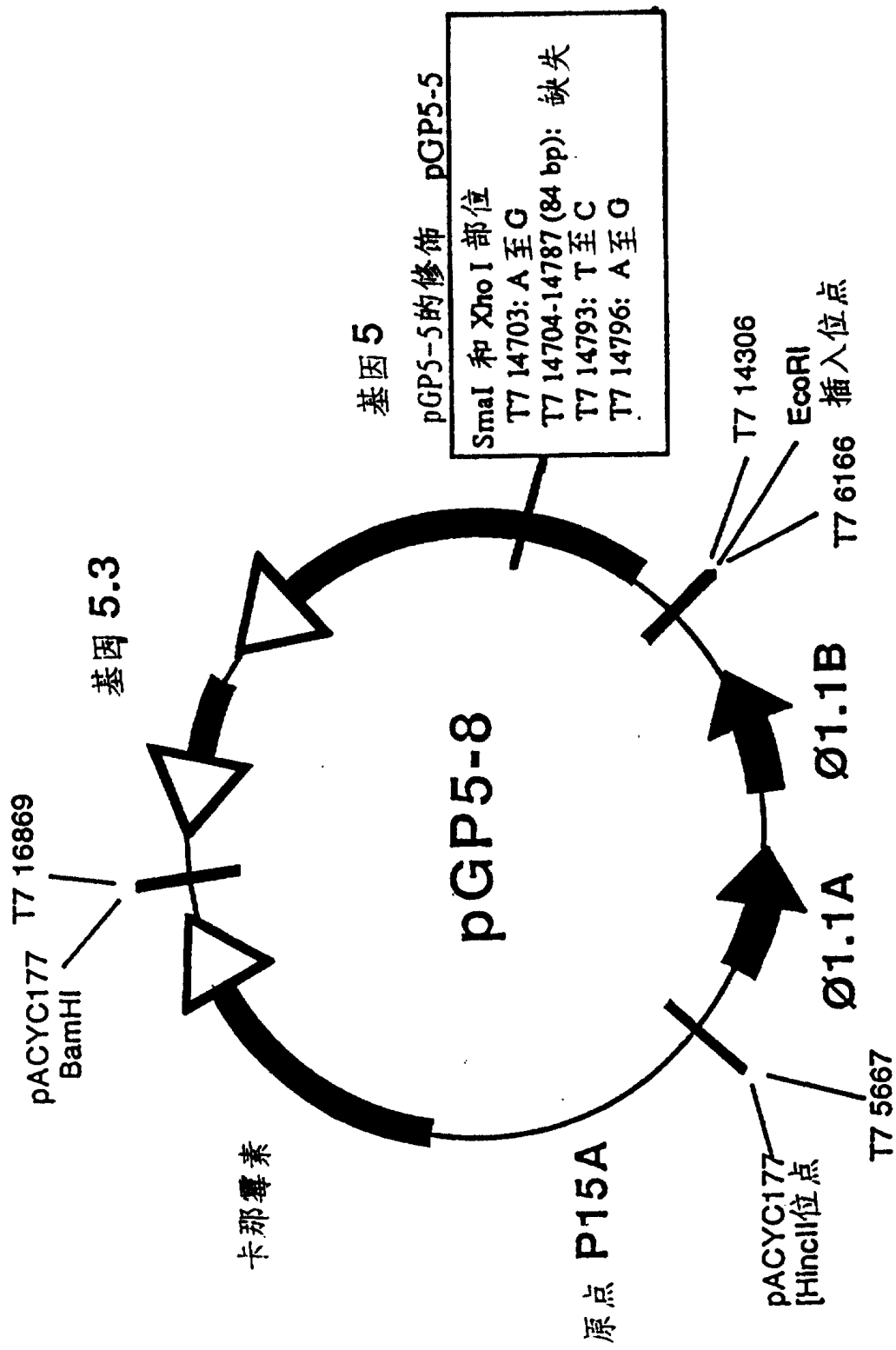


图 10

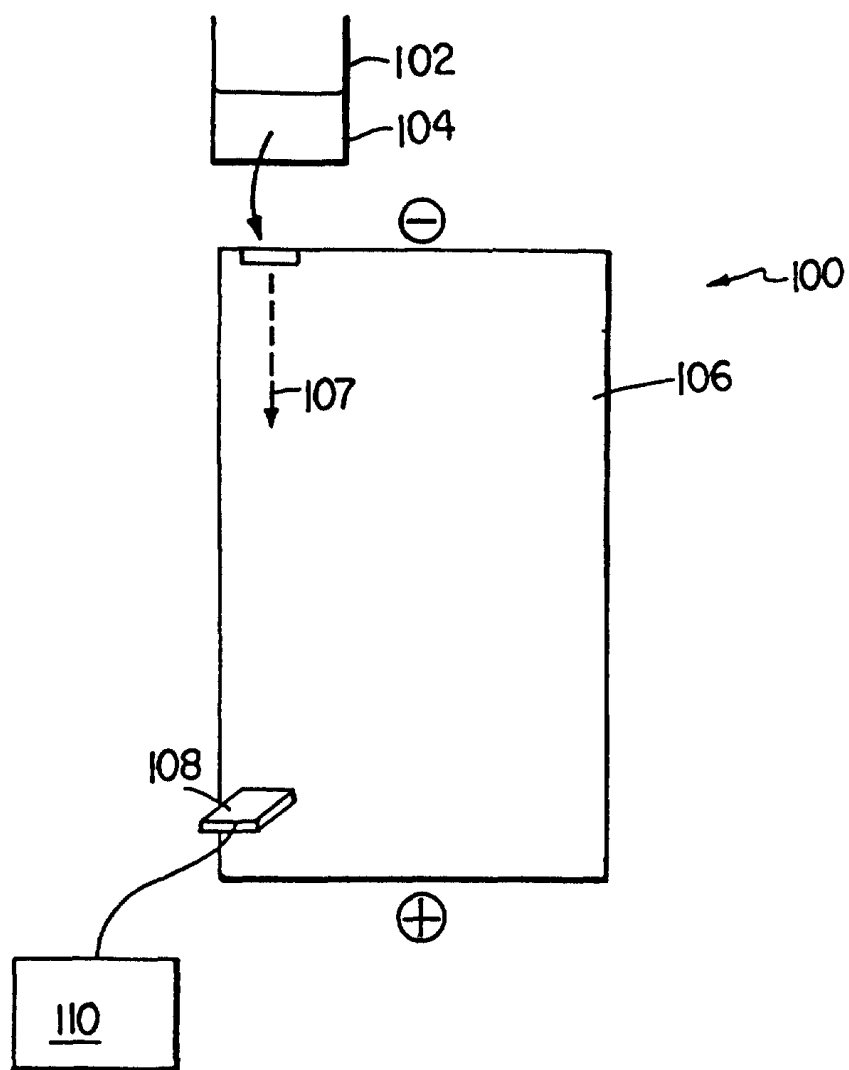


图 1 1