



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 Übersetzung der
europäischen Patentschrift

51 Int. Cl.7:
C 12 Q 1/68

97 EP 0 849 364 B 1

10 DE 697 13 866 T 2

- 21 Deutsches Aktenzeichen: 697 13 866.6
- 96 Europäisches Aktenzeichen: 97 122 380.5
- 96 Europäischer Anmeldetag: 18. 12. 1997
- 97 Erstveröffentlichung durch das EPA: 24. 6. 1998
- 97 Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: 10. 7. 2002
- 47 Veröffentlichungstag im Patentblatt: 6. 2. 2003

DE 697 13 866 T 2

30 Unionspriorität:
19653439 20. 12. 1996 DE

73 Patentinhaber:
Roche Diagnostics GmbH, 68305 Mannheim, DE

84 Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU,
NL, PT, SE

72 Erfinder:
Pääbo, Svante Erik Prof. Dr., 81667 München, DE;
Kilger, Christian Alexis Dr., 81679 München, DE

54 Verfahren zur direkten, exponentiellen Amplifikation und Sequenzierung von DNA-Molekülen und seine Anwendung

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 697 13 866 T 2

23.07.00

EP-Anmeldung Nr.: 97 122 380.5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur direkten, exponentiellen Amplifikation und Sequenzierung von DNA-Molekülen sowie die Anwendung dieses Verfahrens. Die direkte, exponentielle Amplifikation und Sequenzierung von DNA-Molekülen wird im folgenden als "DEXAS" bezeichnet.

Technische Grundlagen

Die DNA-Sequenz-Bestimmung wie sie von Sanger et al. entwickelt wurde (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467 (1977)) wird normalerweise mit einer T7-DNA-Polymerase durchgeführt (Tabor, S. und Richardson, C.C., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 4076-4080 (1989)). Dieses Verfahren erfordert relativ große Mengen einer gereinigten einsträngigen DNA-Matrize. In neuerer Zeit wurde das zyklische Sequenzieren entwickelt (Murray, V., Nucleic Acids Res. 17, 8889 (1989)). Bei diesem Verfahren ist keine einsträngige Matrize erforderlich, und die Sequenzierungsreaktion kann mit relativ geringen Mengen an Matrize initiiert werden. Allerdings muß die Matrizen-DNA fast bis zur vollständigen Homogenität gereinigt werden, und sie wird normalerweise durch Klonieren in Plasmiden (Bolivar, F. et al., Gene 2, 95-1133 (1977)) und anschließende Plasmid-Reinigung (Birnboim, H.C. und Doly, J., Nucleic Acids Res. 7, 1513-1523 (1979)) oder durch PCR-Amplifikation hergestellt (Mullis, K.B. und Faloona, F.A., Methods Enzymol. 155, 335-350 (1987)). Bei beiden der vorstehend beschriebenen Verfahren wird nur ein Primer verwendet.

Bei einer Ausführungsform der zyklischen Sequenzierung, die als "gekoppelte Amplifikation und Sequenzierung" oder "CAS" (coupled amplification and sequencing) bezeichnet wird, zeigten Ruano und Kidd (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 2815-2819 (1991); US 5 427 911), daß sich zur Erzeugung von

Sequenzen aus DNA-Matrizen ein zweistufiges Verfahren anwenden läßt. Beim ersten Schritt werden 15 PCR-Zyklen mit Taq-DNA-Polymerase ohne Didesoxynucleotide durchgeführt, um eine hinreichende Menge an Sequenzierungsmatrize herzustellen. In einem zweiten Schritt, bei dem Didesoxynucleotide und ein markierter Primer zugesetzt werden, liefert die CAS die Sequenz sowie die zusätzliche Amplifikation der Zielsequenz. Bei beiden Schritten dieser Methode werden zwei Primer verwendet.

Die bei gekoppelten DNA-Sequenzierungsreaktionen verwendete Taq-DNA-Polymerase diskriminiert ddNTPs in hohem Maße und baut vorzugsweise dNTPs ein, wenn eine Mischung aus ddNTPs und dNTPs zugeführt wird. Außerdem baut sie die jeweiligen ddNTPs, d.h., ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP, mit höchst unterschiedlicher Effizienz ein. Daher bedarf es bei der Optimierung des CAS-Verfahrens einer sorgfältigen Titration der Didesoxynucleotide.

Da die gekoppelte Amplifikation und Sequenzierung zudem von der Menge der anfänglichen DNA, der Entfernung zwischen den beiden Primern und der Konzentration der ddNTPs und dNTPs relativ zueinander und von deren Verhältnis zueinander abhängt, ist es für die Optimierung der gekoppelten Amplifikations- und Sequenzierungsreaktionen (CAS) erforderlich, daß die Reaktionsbedingungen für ein bestimmtes DNA-Fragment individuell optimiert werden.

Das vorstehend erwähnte CAS-Verfahren ist z.B. beschrieben in WO93/02212, Hwang et al.: "Direct Automated Sequencing of Single Lambda-Phage Plaques by Exponential Amplification Sequencing", Analytical Biochemistry, Bd. 231, Nr. 2, Nov. 1995, Seite 460-3, sowie in Deng, S.-J., Journal of Microbiological Methods, Bd. 17, Nr. 2, März 1993, und weiterhin in US 5 427 911.

Bei all den vorstehend beschriebenen Verfahren ist eine Unterbrechung zwischen dem ersten Schritt der exponentiellen Amplifikation der Matrizen-DNA und dem zweiten Schritt für die Synthese verkürzter DNA-Moleküle erforderlich, und sie erfordern auch die individuelle Optimierung eines bestimmten DNA-Fragments, was langwierig und zeitraubend sein kann und zu Fehlern führen kann, besonders bei der Sequenzierung vieler verschiedener DNA-Moleküle oder bei der Bearbeitung großer Probenmengen in Krankenhäusern oder Laboratorien oder bei der Sequenzierung außergewöhnlicher Proben für gerichtsmedizinische oder archäologische Untersuchungen.

Aus diesem Grunde wäre es vorteilhaft, ein Verfahren zur Sequenzierung von Nucleinsäuren zur Verfügung zu haben, das gleichzeitig die exponentielle Amplifikation von Molekülen voller Länge und von Molekülen verkürzter Länge in der Reaktion potenziert, was zu einer Verringerung der erforderlichen Menge an Ausgangsnucleinsäuremolekülen führt und keine Unterbrechung des exponentiellen Amplifikations-schritts und des Sequenzierungsschritts erfordert, so daß die gesamte Reaktion schneller und mit weniger Eingriffen durchgeführt werden kann.

Kurzbeschreibung der Erfindung

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines verbesserten, schnellen und verlässlichen Verfahrens zur Sequenzierung von DNA-Molekülen, vorzugsweise genomischer DNA.

Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines direkten Verfahrens zur Nucleinsäure-Sequenzierung, das gleichzeitig die exponentielle Amplifikation von Molekülen voller Länge sowie von Molekülen verkürzter Länge bei der Reaktion erhöht, was zu einer Verrin-

23.07.02

- 4 -

gerung der Ausgangsmenge an Nucleinsäure-Molekülen führt, die für die zyklische Reaktion benötigt werden.

Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines verbesserten, schnellen und verlässlichen Verfahrens zur Sequenzierung von DNA-Molekülen, vorzugsweise genomischer DNA, das in nur einem Schritt in nur einem Gefäß durchgeführt werden kann.

Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung einer erfindungsgemäßen Anwendung für die Sequenzbestimmung in der medizinischen Diagnostik, in der Gerichtsmedizin und in der Populationsgenetik.

Weitere erfindungsgemäße Aufgaben ergeben sich für den Fachmann aus der Beschreibung.

Im Gegensatz zum vorstehend beschriebenen "CAS"-Verfahren wird eine DNA-Polymerase als thermisch stabile DNA-Polymerase verwendet, die im Vergleich zur Wildtyp-Taq-DNA-Polymerase in dem Puffer und unter den Bedingungen, die für den Thermozyklus angewandt werden, ein vermindertes Unterscheidungsvermögen gegenüber ddNTPs aufweist. Besonders bevorzugt ist die Verwendung einer DNA-Polymerase, die eine "Tabor-Richardson"-Mutation trägt, oder ein funktionelles Derivat derselben, das ebenfalls keine 5'-3'-Exonuclease-Aktivität aufweist wie z.B. AmplitaqFS™ (Taq-DNA-Polymerase (-exo5'-3') (F667Y), Tabor und Richardson (1995), loc. cit.), Taquenase™ (Taq-DNA-Polymerase Δ 235 (-exo5'-3') (F667Y), Tabor und Richardson (1995), loc. cit. EP 0 727 496) und ThermoSequenase™ (Taq-DNA-Polymerase (-exo5'-3') (F667Y), Tabor und Richardson (1995), loc. cit.) sowie Mischungen derselben, oder es können auch andere DNA-Polymerasen und deren Mischungen, die thermisch stabil sind, beim Verfahren der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

Überraschenderweise ermöglicht die Verwendung einer DNA-Polymerase, die im Vergleich zur Wildtyp-Taq-DNA-Polymerase ein vermindertes Unterscheidungsvermögen für die vier ddNTPs aufweist, die gleichzeitige und exponentielle Synthese von verkürzten wie auch vollständigen Fragmenten vom Beginn der zyklischen Reaktion an. Somit betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur direkten Sequenzierung eines Nucleinsäure-Moleküls aus einer komplexen Mischung von Nucleinsäuren wie z.B. der genomischen menschlichen Gesamt-DNA, enthaltend einen Reaktionspuffer, Desoxynucleotide oder Derivate derselben und ein Didesoxynucleotid oder ein anderes terminierendes Nucleotid und eine thermisch stabile Polymerase, die im Vergleich zur Wildtyp-Taq-DNA-Polymerase ein vermindertes Unterscheidungsvermögen für ddNTPs aufweist. Im Sinne der vorliegenden Erfindung bedeutet direktes Sequenzieren, daß das zu sequenzierende Nucleinsäure-Fragment ohne Unterbrechung der Reaktion und ohne vorhergehende Amplifikation des zu sequenzierenden Nucleinsäure-Fragments mit Hilfe bekannter Verfahren in einem Schritt gleichzeitig und in einer Weise amplifiziert und sequenziert wird, daß eine eindeutige Sequenzleiter lesbar ist.

Das Prinzip von DEXAS ist, daß die anfängliche und die anschließende zyklische Sequenzierungsreaktion mit zwei Primern durchgeführt wird, einem ersten Primer und einem zweiten Primer, der auf dem zum ersten komplementären Strang liegt. Es werden vier Reaktionen vorbereitet, jeweils eine für die Bestimmung der jeweiligen Base, so daß jede Reaktion zwei Primer enthält, von denen einer markiert und der andere nicht markiert ist, oder beide unterschiedlich markiert sind. Weiterhin enthält jede Reaktion zu Beginn die zu sequenzierende DNA-Matrize sowie eine Pufferlösung, eine thermisch stabile DNA-Polymerase, eine thermisch stabile Pyrophosphatase (optional), die vier Desoxynucleotide oder Derivate derselben und ein Didesoxynucleotid oder ein ande-

res terminierendes Nucleotid, z.B. ein 3'-Aminonucleotid oder 3'-Ester-derivatisierte Nucleotide.

Danach werden Denaturierungs- und Verlängerungszyklen durchgeführt, so daß bei jedem dieser Zyklen zwei Arten von Verlängerungsprodukten aus jedem Primer gebildet werden. Jeder Primer arbeitet so, daß er Verlängerungsprodukte initiiert, die lang genug sind, um die Position des anderen Primers zu erreichen. Gleichzeitig werden von jedem Primer Produkte initiiert, die aufgrund des Einbaus eines Didesoxynucleotids terminiert werden, ehe die Position des anderen Primers erreicht ist. Die ersteren Produkte (Produkte mit voller Länge) dienen in den folgenden Zyklen als Matrize für die Erzeugung weiterer DNA-Stränge voller Länge und werden auch als Matrizen für Verlängerungen verwendet, die zur Sequenzierungsreaktion beitragen, und die letzteren Produkte (verkürzte Produkte) sammeln sich während des Zyklus an und tragen zur erzeugten Sequenzleiter bei. Somit führt DEXAS zur gleichzeitigen exponentiellen Erzeugung einer Sequenzierungsmatrize und einer Sequenzleiter in nur einem Röhrchen, ohne daß die thermozyklische Reaktion unterbrochen werden muß.

Die Anwendung der vorliegenden Erfindung ermöglicht daher die Bestimmung der DNA-Sequenz von Multikopie- und Einzelkopieregionen von DNA in nur einem Schritt.

Die vorliegende Erfindung macht somit erstmals ein Verfahren verfügbar, das die gleichzeitige Amplifikation und Sequenzierung der zu sequenzierenden Nucleinsäure aus einer komplexen Mischung von Nucleinsäuren wie z.B. der genomischen menschlichen Gesamt-DNA ohne vorhergehende Amplifikation mit Hilfe bekannter Verfahren in einem Schritt erlaubt, d.h., ohne Unterbrechung der Reaktion und in einer Weise, daß eine eindeutige Sequenzleiter lesbar ist, wobei wenigstens eine thermisch stabile DNA-Polymerase, ein

Nucleinsäure-Molekül, ein erster Primer, ein zweiter Primer, ein Reaktionspuffer, Desoxynucleotide oder Derivate derselben und wenigstens ein Didesoxynucleotid oder ein anderes terminierendes Nucleotid in der anfänglichen Reaktionsmischung vorhanden sind.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens weisen die Primer eine solche Länge auf, daß das Signal/Rausch-Verhältnis zwischen den spezifischen verkürzten DNA-Molekülen und den unspezifischen DNA-Molekülen groß genug ist, um das Ablesen der Sequenz im wesentlichen nicht zu verhindern. Die Primer haben vorzugsweise eine Länge von wenigstens 25 Nucleotiden.

Die Primer können mit Hilfe von Verfahren synthetisiert werden, die im Stande der Technik bekannt sind. Zum Beispiel können die Primer mit Hilfe bekannter Verfahren synthetisiert werden, die die Stabilität oder Funktion der Primer beim Nucleinsäure-Sequenzierungsverfahren der vorliegenden Erfindung nicht wesentlich verändern.

Des weiteren werden auch PNA-DNA-Hybridoligonucleotide (siehe Finnen, P.J. et al., N.A.R. 24, 3357-3363 (1996); Koch, T. et al., Tetrahedron Letters 36, 6933-6936 (1995); Stetsenko, D.A. et al., Tetrahedron Letters 37, 3571-3574 (1996); Bergmann, F. et al., Tetrahedron Letters 36, 6823-6826 (1995); und Will, D.W. et al., Tetrahedron 51, 12069-12082 (1995)) als Primer für das erfindungsgemäße Verfahren erachtet.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist der erste Primer markiert. Bevorzugt wird überdies, daß erster und zweiter Primer unterschiedlich markiert sind. Es können alle im Stand der Technik bekannten Agenzien oder Verfahren als einzelne oder differentielle Markierungsagenzien und -verfahren angewandt werden, vorausgesetzt, daß

die Stabilität oder Funktion des Primers beim DNA-Sequenzierungsverfahren der vorliegenden Erfindung nicht wesentlich verändert wird. Zum Beispiel können einzelne und differentielle Markierungen ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus solchen Enzymen wie etwa β -Galactosidase, alkalische Phosphatase und Peroxidase, Enzymsubstraten, Coenzymen, Farbstoffen, Chromophoren, fluoreszierenden, chemilumineszenten und biolumineszenten Markierungen wie etwa FITC, Cy5, Cy5.5, Cy7, Texas-Rot und IRD40 (Chen et al., J. Chromatog. A 652, 355-360 (1993); und Kambara et al., Electrophoresis 13, 542-546, (1992)), Liganden oder Haptenen wie z.B. Biotin und radioaktiven Isotopen wie etwa ^3H , ^{35}S , ^{32}P , ^{125}I und ^{14}C .

Das erfindungsgemäße Verfahren kann auch als "hot start"-Verfahren durchgeführt werden. Dabei wird sichergestellt, daß die Aktivität der Polymerase oder Polymerasen erst bei höherer Temperatur einsetzt, um eine Polymerisation an unspezifisch hybridisierten Primern bei niedrigeren Temperaturen zu unterdrücken. Eine Möglichkeit wäre, daß die thermostatische Reaktion zusätzlich ein Polymerase-hemmendes Agens enthält. Beispielsweise sind Polymerase-Antikörper im Handel erhältlich, die erst bei höheren Temperaturen denaturieren und so die Enzymaktivität der Polymerase freisetzen. Denkbar sind aber auch gentechnisch veränderte Polymerasen, die bei niedrigeren Temperaturen in einer inaktiven Form vorliegen.

DEXAS ist relativ unempfindlich gegenüber verschiedenen Puffern und verschiedenen Desoxynucleotiden und Didesoxynucleotid-Konzentrationen und läßt sich mit verschiedenen thermisch stabilen DNA-Polymerasen durchführen.

Die Anzahl der Thermozyklen kann je nach Menge der Matrizen-DNA und deren Reinheit etwa 18 bis etwa 50 Zyklen betragen.

Zu den verwendbaren Pufferkomponenten gehören Tris-HCl bei einem pH von etwa 9,0 bis 9,5 und in einer Konzentration von etwa 10 bis 30 mM, Ammoniumsulfat in einer Konzentration von etwa 10 bis 20 mM, vorzugsweise 15 mM, MgCl₂ in einer Konzentration von etwa 3,5 bis 5,5 mM, gegebenenfalls etwa 0,05 mM Mercaptoethanol, etwa 0,28% Tween 20® und/oder etwa 0,02% Nonidet 40®, sind aber nicht auf diese beschränkt.

Die Desoxynucleotide können ausgewählt sein aus dGTP, dATP, dTTP und dCTP, sind aber nicht auf diese beschränkt. Erfindungsgemäß ist es zudem auch möglich, Derivate von Desoxynucleotiden zu verwenden, die als solche Desoxynucleotide definiert sind, welche durch eine thermisch stabile DNA-Polymerase in wachsende DNA-Moleküle eingebaut werden können, die in der thermozyklischen Reaktion synthetisiert werden. Zu diesen Derivaten können Thionucleotide, 7-Desaza-2'-dGTP, 7-Desaza-2'-dATP sowie Desoxyinosintriphsphat zählen, das ebenfalls als Ersatz-Desoxynucleotid für dATP, dGTP, dTTP oder dCTP verwendet werden kann, sind aber nicht auf diese beschränkt. Die obengenannten Desoxynucleotide und deren Derivate werden vorzugsweise in einer Konzentration zwischen etwa 300 µM und 2 mM eingesetzt.

Die Didesoxynucleotide können ausgewählt sein aus ddGTP, ddATP, ddTTP und ddCTP, sind aber nicht auf diese beschränkt. Erfindungsgemäß ist es zudem auch möglich, Derivate von Didesoxynucleotiden zu verwenden, die als solche Didesoxynucleotide definiert sind, welche durch eine thermisch stabile DNA-Polymerase in wachsende DNA-Moleküle eingebaut werden können, die in einer thermozyklischen Reaktion synthetisiert werden. Zudem können auch andere terminierende Nucleotide eingesetzt werden, z.B. ein 3'-Aminonucleotid oder 3'-Ester-derivatisierte Nucleotide. Die bevorzugten Konzentrationen der ddNTPs liegen zwischen etwa 1 und 5 µM.

Beim erfindungsgemäßen Verfahren liegt das bevorzugte Verhältnis von dNTPs zu ddNTPs (dNTPs/ddNTPs) zwischen 100:1 und 1000:1, vorzugsweise zwischen 300:1 und 600:1.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird das Verfahren bei einer Temperatur durchgeführt, bei der das Signal/Rausch-Verhältnis von spezifischen verkürzten DNA-Moleküle zu unspezifischen DNA-Molekülen genügend groß ist, daß das Ablesen der Sequenz nicht wesentlich beeinträchtigt wird. Weniger wichtig ist die Optimierung der Annealing-Temperatur. Im Falle von menschlichen Einzelkopie-DNA-Sequenzen wird durch die höchstmögliche Annealing-Temperatur der Hintergrund drastisch abgesenkt. Dabei werden die Annealing- und Syntheseschritte der thermozyklischen Reaktion vorzugsweise bei einer Mindesttemperatur von 62°C, besonders bevorzugt bei 65°C und ganz besonders bevorzugt bei wenigstens etwa 68°C durchgeführt.

Die Matrize des zu sequenzierenden DNA-Moleküls liegt vorzugsweise als genomische Gesamt-DNA vor, die nicht kloniert oder gereinigt werden muß, doch kann dies der Fall sein. In einer Ausführungsform der Erfindung hat die genomische DNA eine Länge von mehr als oder gleich 2 kb. Zu den weiteren DNA-Formen, die als Matrizen verwendet werden können, zählt klonierte oder unklonierte Mitochondrien-DNA, teilweise gereinigte oder ungereinigte DNA wie z.B. Plasmid-DNA aus Bakterienkolonien. Die DEXAS arbeitet gut mit etwa 250 ng Matrizen-DNA zur Bestimmung von Mitochondrien-DNA-Sequenzen und mit etwa 1 µg Matrizen-DNA zur Bestimmung von Einzelkopie-DNA-Sequenzen wie z.B. genomischer Gesamt-DNA, sie arbeitet aber auch mit kleineren Mengen an Mitochondrien- oder genomischer DNA. Das erfindungsgemäße Verfahren kann auch zur direkten Sequenzierung von ungereinigter einzelsträngiger oder doppelsträngiger DNA aus Bakteriophagen an-

gewandt werden. Die DEXAS ist zudem relativ unabhängig von der Basenzusammensetzung der Matrize.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das erfindungsgemäße Verfahren weiterhin dadurch gekennzeichnet, daß jede thermozyklische Reaktion zur Bestimmung der Position von A, G, C und T im DNA-Molekül in nur einem Schritt in nur einem Behältnis, Gefäß oder Röhrchen durchgeführt wird.

Geeignete Quellen für Nucleinsäure-Moleküle beim erfindungsgemäßen Verfahren sind Körperflüssigkeiten wie Sperma, Urin, Blut oder Fraktionen derselben, Haare, eine einzelne Zelle, Zellen oder Fraktionen derselben, Hartgewebe wie etwa Knochen oder Weichgewebe oder Fraktionen derselben und Zellkulturen oder Fraktionen derselben.

Die vorliegende Erfindung dient auch der Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens für die Bestimmung einer Nucleotid-Sequenz eines gegebenen Nucleinsäure-Moleküls, z.B. zur Sequenzierung von Schrotschuß-Bibliotheken mit zwei Markierungen für großangelegte Genom-Projekte und in der medizinischen Diagnostik, in der Gerichtsmedizin und in der Populationsgenetik. Das Verfahren der vorliegenden Erfindung kann dazu eingesetzt werden, genetische Mutationen oder Polymorphismen aufzuspüren, den Ursprung der sequenzierten Nucleinsäure zu identifizieren, oder die Gegenwart fremder oder infektiöser Agenzien in einer Probe nachzuweisen.

Die vorliegende Erfindung betrifft sämtliche Kombinationen aus all den obigen Verfahren.

Nach der Vorbereitung können die Sequenzierungsreaktionen direkt auf ein Sequenzierungsgel aufgetragen werden, z.B. nach Zugabe eines üblicherweise verwendeten Beschickungspuffers (z.B. Formamid, das 20 mM EDTA (pH 7,4) und 6 mg/ml Dextranblau enthält) und Denaturierung (z.B. über 4 Minuten

bei 96°C). Die Sequenzleiter kann nach bekannten Methoden abgelesen werden. Das erfindungsgemäße Verfahren ist für eine Automatisierung gut geeignet. Da die beiden Primer in der Reaktion mit unterschiedlichen Markierungen bereitgestellt werden, die zum Beispiel mit zwei unterschiedlichen Wellenlängen erfaßt werden können, ermöglicht das Verfahren der vorliegenden Erfindung die gleichzeitige Sequenzierung beider Stränge einer Matrize und die Erfassung beider Reaktionen in einer oder mehreren Gelbahnen. Im allgemeinen können viele DEXAS-Reaktionen, die unter Verwendung unterschiedlicher Farbstoffe gleichzeitig durchgeführt werden, im gleichen Röhrchen durchgeführt und auf ein mit mehreren Lasern ausgestattetes Sequenzierungsgerät aufgebracht oder mit Hilfe anderer Methoden wie z.B. Autoradiographie erfaßt werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit zur direkten Sequenzierung eines Nucleinsäure-Moleküls aus einer komplexen Mischung von Nucleinsäuren wie z.B. der genomischen menschlichen Gesamt-DNA, enthaltend einen Reaktionspuffer, Desoxynucleotide oder Derivate derselben und ein Didesoxynucleotid oder ein weiteres terminierendes Nucleotid und eine thermisch stabile Polymerase, die im Vergleich zur Wildtyp-Taq-DNA-Polymerase ein vermindertes Unterscheidungsvermögen für ddNTPs aufweist. Im Sinne der vorliegenden Erfindung bedeutet direktes Sequenzieren, daß das zu sequenzierende Nucleinsäure-Fragment ohne Unterbrechung der Reaktion und ohne vorhergehende Amplifikation des zu sequenzierenden Nucleinsäure-Fragments mit Hilfe bekannter Verfahren in nur einem Schritt gleichzeitig und in einer Weise amplifiziert und sequenziert wird, daß eine eindeutige Sequenzleiter lesbar ist.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit zur direkten Sequenzierung eines Nucleinsäure-Moleküls aus einer komplexen Mischung von Nucleinsäuren, enthaltend

einen Reaktionspuffer, Desoxynucleotide oder Derivate derselben und ein Didesoxynucleotid oder ein anderes terminierendes Nucleotid, eine thermisch stabile Polymerase sowie zwei Primer, deren Verhältnis größer als 1 ist. Besonders bevorzugt enthält das Kit eine thermisch stabile Polymerase, die im Vergleich zur Wildtyp-Taq-DNA-Polymerase ein vermindertes Unterscheidungsvermögen für ddNTPs aufweist.

Kurze Beschreibung der Figuren

Fig. 1: Schematische Darstellung der DEXAS. Zwei Oligonucleotide (27mere), entweder ein markiertes und ein unmarkiertes Oligonucleotid oder ein mit FITC markiertes Oligonucleotid und ein mit Cy5 markiertes Oligonucleotid (Verhältnis 2:1) werden in vier Röhrchen mit menschlicher genomischer DNA (250 ng bis 3 µg), einer wärmebeständigen DNA-Polymerase, den vier Desoxynucleotiden und jeweils einem der Didesoxynucleotide gemischt. Es werden Zyklen für die Denaturierung und das anschließende Annealing und die Verlängerung durchgeführt. Bei jeder Verlängerung werden die Primer entweder bis zur Position des komplementären Primers verlängert oder es kommt zu einer Unterbrechung durch Einbau eines Didesoxynucleotids. Die ersteren Produkte dienen in den darauffolgenden Zyklen als Matrizen für die weitere Erzeugung von Produkten voller Länge sowie für die Terminierungsreaktionen, während sich die letzteren Produkte im Verlauf sämtlicher durchgeführter Zyklen ansammeln und zum Sequenzsignal beitragen. Nach den Durchläufen werden die Reaktionen denaturiert und je nach Markierung entweder auf einem A.L.F. oder A.L.F. Express analysiert.

Fig. 2: DEXAS-Reaktion, durchgeführt an einem 521 bp-Segment der Humanmitochondrien-Kontrollregion. Es wurden 8 pmol eines FITC-markierten Primers (mtDNA1-L16026) und 4 pmol eines unmarkierten Primers (mtDNA2-H16498) zusammen

mit 250 ng genomischer menschlicher Gesamt-DNA verwendet (Details siehe Text). Ein starkes Signal ist vor der ersten verarbeiteten Base zu sehen, und ein starkes Stoppsignal ist bei ca. Base Nummer 440 zu erkennen. Die Sequenz wurde mit der A.L.F-Software verarbeitet und wurde nicht von Hand bearbeitet. Es wurden insgesamt 433 Basen bestimmt.

Fig. 3: DEXAS-Reaktion, durchgeführt an Einzelkopie-Genen. Figur 3A zeigt eine Sequenz des menschlichen Gens p53, während Figur 3B eine Sequenz des menschlichen Gens CCR-5 zeigt (Details siehe Text). Die Sequenz wurde mit der A.L.F-Software verarbeitet und wurde nicht von Hand bearbeitet. Beim p53-Gen wurden insgesamt 305 Basen bestimmt, während beim CCR-5-Gen 343 Basen bestimmt wurden.

Fig. 4: Zweifarb-DEXAS-Reaktion mit unterschiedlichen Oligonucleotid-Verhältnissen. Die Reaktionen wurden jeweils mit 250 ng genomischer menschlicher DNA und einer Gesamtmenge von 12 pmol Primer durchgeführt. MtDNA1 war mit FITC markiert (linke Reihe), und MtDNA2 war mit Cy5 markiert (rechte Reihe). Die Verhältnisse von FITC-MtDNA1 zu Cy5-MtDNA2 wurden zwischen 2:1 (obere Tafel), 1:1 (mittlere Tafel) und 1:2 (untere Tafel) variiert. Das größte Signal/Rausch-Verhältnis für die beiden Primer wird bei Anwendung eines Verhältnisses von 2:1 erreicht. Gezeigt sind die Rohdaten der Instrumente A.L.F. und A.L.F. Express. Die Zuordnung der Basensignale von oben nach unten ist C, A, G, bzw. T.

Fig. 5: Es wurde eine DEXAS durchgeführt, wobei gleichzeitig ein Fluorescein-markierter "T3"-Primer und ein Cy5-markierter "Universal"-Primer verwendet wurde. Die Figur zeigt die Sequenz, die mit dem Cy5-markierten Primer erhalten wurde. Die beiden Primer wurden in einer Einzelreaktion mit einer Bakterienkolonie verwendet. Es wurden jeweils 4 µl auf einem A.L.F. oder A.L.F. Express analysiert. Die Reak-

tion mit dem T3-Primer ergab 407 Basen, und die Reaktion mit dem Universal-Primer ergab 668 Basen.

Fig. 6: Das Insert eines Plasmids wurde von beiden Seiten in einer Reaktion unter Verwendung eines FITC-markierten T3-Primers und eines gegenüberliegenden Cy5-markierten Universal-Primers sequenziert. Durch die gleichzeitige Verwendung zweier unterschiedlich markierter Oligonucleotide in einer DEXAS-Reaktion konnte das Insert mit 548 Basen sequenziert werden, ohne daß mehrdeutige Positionen verblieben. Die Primer befanden sich in einem Abstand von 670 bp zueinander.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

Die Erfindung wird anhand der folgenden nichteinschränken- den Beispiele ausführlicher beschrieben.

Beispiel 1

Matrizenherstellung

Die genomische menschliche Gesamt-DNA wurde aus 2 ml-Blut- proben unter Verwendung eines Schnellreinigungskits (Cam- bridge Molecular Technologies Ltd., Cambridge, UK) herge- stellt. Die gereinigte DNA wurde in ddH₂O auf eine Konzen- tration von 175 ng pro µl verdünnt.

Sequenzierungsreagenzien und -bedingungen

Die unmarkierten und FITC-markierten Oligonucleotide wurden mit einem ABI DNA/RNA-Synthesizer, Modell 392, syntheti- siert. Die Cy5-markierten Oligonucleotide wurden von Phar- macia Biotech Company (Freiburg) erhalten. Zur Sequenzie-

zung der Mitochondrien-Kontrollregion (mtDNA), des p53-Gens (p53) und des CCR-5-Gens (CCR-5) wurden jeweils die folgenden Oligonucleotide verwendet:

SEQ ID NR. 1:

(mtDNA1-L16026): 5'-GAT TCT AAT TTA AAC TAT TCT CTG TTC-3';

SEQ ID NR. 2:

(mtDNA2-H16498): 5'-TTA TGA CCC TGA AGT AGG AAC CAG ATG-3';

SEQ ID NR. 3:

(p53-1/exon-7): 5'-GGA GGC ACT TGC CAC CCT GCA CAC TGG-3';

SEQ ID NR. 4:

(53-2/intron-8): 5'-CTC CTC CAC CGC TTC TTG TTC TGC TTG-3'

SEQ ID NR. 5:

(CCR5-1): 5'-GGC TGG TCC TGC CGC TGC TTG TCA T-3';

SEQ ID NR. 6:

(CCR5-2): 5'-CTG CTC CCC AGT GGA TCG GGT GTA AAC-3'.

Die Numerierung der mtDNA-Primer bezieht sich nach Anderson et al. (Nature 290, 457-465 (1981)) auf das 3'-Ende, und L und H beziehen sich auf den L-Strang bzw. den H-Strang. Die DEXAS-Reaktion wurde entweder mit ThermoSequenaseTM-Reagenzien (Tabor, S. und Richardson, C.C., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 6339-6343 (1995)) (Amersham, UK) oder mit dem folgenden 10 × Puffer durchgeführt: 500 mM Tris-HCl (pH 9,2), 160 mM (NH₄)₂SO₄, 35 mM MgCl₂ (ScienTech Corp., St. Louis, MO). Es wurden drei verschiedene Nucleotid-Mischungen im Hinblick auf die Terminierung bewertet: (i) 1:333, 1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 1 mM dTTP, wobei die A-, C-, G- und T-Reaktionen jeweils 3 µM des entsprechenden Didesoxynucleotids enthielten; (ii) 1:666, ebenfalls enthaltend jeweils 1 mM des jeweiligen Desoxynucleotids, aber 1,5 µM des entsprechenden Didesoxynucleotids; (iii) 1:1000, ebenfalls enthaltend jeweils 1 mM des jeweiligen Desoxynucleotids, aber 1,0 µM des entsprechenden Didesoxynucleotids. Alle Terminationsmischungen wurden hergestellt unter Verwendung von 50 mM Tris-HCl (pH 9,2), 16 mM (NH₄)₂SO₄, 5 mM MgCl₂.

Für jede Sequenzierungsreaktion wurde eine Vormischung aus 1 µl (Einheiten nicht definiert) Taquenase™ (ScienTech Corp., St. Louis, MO) und 1 Einheit thermisch stabiler Pyrophosphatase (NEB, Beverly, MA) hergestellt. Im Falle der ThermoSequenase-Reaktionen wurden die Reaktionen wie vom Hersteller empfohlen vorbereitet. In den übrigen Fällen wurde eine 20 µl-Mischung aus Primer (2 pmol bis 12 pmol), DNA (15 ng bis 1,5 µg), Sequenzierpuffer (2 µl des 10 × Puffers, siehe oben) und Enzym hergestellt, und ein 5 µl-Aliquot davon wurde zu 2 µl der Terminationsmischung gegeben. Die Sequenzierungsreaktionen wurden in einem Thermocycler mit heizbarer Abdeckung durchgeführt (MJ Research, Watertown, MA). Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 5 µl Formamid (20 mM EDTA (pH 7,4) und 6 mg/ml Dextranblau) gestoppt, worauf sich eine 4minütige Denaturierung bei 95°C anschloß.

Die Sequenzierungsreaktionen wurden bei Verwendung von FITC-markierten Primern auf einem A.L.F. analysiert, und bei Verwendung von Cy5-markierten Primern auf einem A.L.F. Express (beide Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden). Es wurden jeweils HydroLink Long Ranger™-Gele (FMC, Rockland, ME) und 30 cm-Glasplatten verwendet. Die Gelbedingungen entsprachen den Empfehlungen des Herstellers.

Beispiel 2

DEXAS von Mitochondrien-DNA-Sequenzen

Es wurden zwei Oligonucleotide synthetisiert, beide mit einer Länge von 27 Nucleotiden, die eine 521 Basenpaar-Region der Humanmitochondrien-Kontrollregion überspannen. Die 27mere wurden eingesetzt, um unspezifisches Assoziieren der Primer an falsche Startpositionen zu minimieren und zu ermöglichen, daß die Reaktionstemperatur bei allen Synthese-

schritten über 62°C gehalten werden kann. Eines der beiden Oligonucleotide war am 5'-Ende mit Fluorescein markiert (mtDNA1), während das andere (mtDNA2) unmarkiert war. Es wurden 4 pmol eines jeden Primers mit ThermoSequenaseTM-Reagens (Amersham, UK) gemischt, das Enzym (DNA-Polymerase und thermisch stabile Pyrophosphatase), Reaktionspuffer und eine Mischung aus Desoxynucleotiden und Didesoxynucleotiden enthielt. Einzelne Aliquote dieser Mischung wurden mit unterschiedlichen Mengen menschlicher DNA (500 ng, 250 ng, 125 ng, 62 ng, 0 ng) versetzt. In ein Röhrchen wurden 500 ng Matrizen-DNA gegeben, jedoch kein unmarkierter Primer. Die Reaktionen wurden 3 min lang bei 95°C inkubiert, um vollständige Denaturierung der Matrizen-DNA zu ermöglichen. Danach wurden 35 Zyklen mit jeweils 30 s bei 68°C und 40 s bei 95°C durchgeführt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von Formamid und 4minütiges Erhitzen auf 95°C gestoppt und denaturiert, ehe sie auf ein A.L.F-Sequenzierungsgel aufgebracht wurden.

In dem Fall, in dem keine DNA zugesetzt worden war, ließ sich auch keine Sequenz nachweisen. Wurde nur der markierte Primer und kein unmarkierter Primer zugesetzt, war keine Sequenz nachweisbar. Allerdings wurden Sequenzkurven in den Fällen erhalten, in denen 62 ng oder mehr Matrize eingesetzt worden waren. Bei den Reaktionen, in denen 250 ng und 500 ng eingesetzt worden waren, war die A.L.F-Software in der Lage, mehr als 400 Basen zu bestimmen.

Unter Verwendung einer konstanten Menge Matrizen-DNA von 500 ng und einer Gesamtmenge der beiden Primer von 12 pmol wurden die Verhältnisse von markiertem Primer zu unmarkiertem Primer jeweils zwischen 3:1, 2:1, 1:1, 1:2 und 1:3 variiert. Die Reaktion, bei der die Primer in äquimolaren Mengen vorhanden waren, ergab schwache Signale, wogegen alle anderen Verhältnisse - unabhängig davon, ob der markierte oder der unmarkierte Primer im Überschuß vorlag -

gute Ergebnisse lieferten. Die Verhältnisse 2:1 und 1:2 lieferten die besten Ergebnisse. Überraschend und unerwartet war, daß beide nichtäquimolaren Verhältnisse vorteilhaft sind. Mit 8 pmol des Primers mtDNA1 und 4 pmol des Primers mtDNA2 bestimmen wir gegenwärtig routinemäßig 450 Basenpaare der Mitochondrien-Kontrollregion.

Das Verhältnis von Desoxynucleotiden (dNTPs) zu Didesoxynucleotiden (ddNTPs) kann bei der DEXAS-Reaktion variiert werden. Ein höherer Anteil an dNTPs ermöglicht wohl eine erhöhte Matrizenerzeugung bei jedem Zyklus, während ein höherer Anteil an ddNTPs zu einer verstärkten Terminierung der Verlängerungsprodukte führt, ehe die Startposition des zweiten unmarkierten Primers erreicht ist. Letztere Produkte tragen zur Sequenzreaktion bei, nicht aber zur weiteren Matrizenamplifikation. Um zu bestimmen, in welchem Ausmaß das Verhältnis von ddNTPs zu dNTPs die Reaktion beeinflusst, wurden ddNTPs mit dNTPs in Verhältnissen von 1:333, 1:666 und 1:1000 gemischt und in eine DEXAS-Reaktion eingesetzt, die 8 pmol eines FITC-markierten Primers (mtDNA1), 4 pmol eines unmarkierten Primers (mtDNA2) und 300 ng menschliche DNA enthielt. Die Reaktionsbedingungen waren wie vorstehend beschrieben. Die Ergebnisse zeigen, daß ein Verhältnis von 1:666 (ddNTPs/dNTPs) die stärkeren Signale liefert.

Beispiel 3

DEXAS von Einzelkopien menschlicher DNA-Sequenzen

Zur Abschätzung der Anwendbarkeit der DEXAS auf Einzelkopie-DNA-Sequenzen wurden Primer synthetisiert, die ein 507 Basenpaar-Segment von Intron 7 und Exon 8 des menschlichen Gens p53 flankieren. Es wurden DEXAS-Reaktionen vorbereitet, die jeweils 8 pmol eines FITC-markierten Sequenzierungsprimers (p53-1), 4 pmol eines unmarkierten Primers

(p53-2) und 3,5 µg, 1,75 µg, 875 ng und 430 ng menschliche DNA enthielten. Die Reaktionen wurden 3 Minuten lang bei 95°C denaturiert, und es wurden 40 Zyklen durchgeführt, umfassend 30 s bei 62°C und 40 s bei 95°C. Die Ergebnisse zeigen eine klar lesbare Sequenz. Zur Verbesserung der Ergebnisse wurden verschiedene Abwandlungen der Vorschrift ausgewertet. Die Annealing-Temperatur wurde erhöht, und die Menge an Sequenzierungsprimer wurde verringert. Zudem wurde die Anzahl der Zyklen auf 47 erhöht, und es wurden verschiedene Primer-Verhältnisse und Matrizen-Konzentrationen ausgewertet. Die besten Ergebnisse wurden mit 8 pmol FITC-markiertem Primer und 4 pmol unmarkiertem Primer und Zyklen-temperaturen von 30 Sekunden bei 68°C und 30 Sekunden bei 95°C erhalten. Diese Bedingungen ergaben zwischen 260 und 320 Basen der Sequenz mit 1 bis 5 Mehrdeutigkeiten pro Reaktion in fünf Experimenten (Fig. 3A). Bei Verwendung von etwa 1 µg oder mehr Matrize wurden die Sequenzsignale mit der A.L.F-Software unter automatisierter Verarbeitung abgelesen.

Zur weiteren Abschätzung der Anwendbarkeit der DEXAS auf Einzelkopie-Gene wurden Primer synthetisiert, die ein 382 Basenpaar-Segment des CCR-5 Gens flankieren. Es wurden 3 pmol CCR5-1, 6 pmol des FITC-markierten Primers CCR5-2, 0,5 bis 1,0 µg Matrizen-DNA und 45 Zyklen DEXAS angewandt. Bei den an 40 Proben durchgeführten Sequenzreaktionen schwankten die abgelesenen Längen zwischen 230 bp und 351 bp (im Durchschnitt 294 bp). Eine typische Reaktion ist in Fig. 3B gezeigt.

Beispiel 4:**Gleichzeitige Sequenzierung beider DNA-Stränge**

Es wurde gezeigt, daß es möglich ist, beide komplementären DNA-Stränge einer Plasmid-DNA in nur einer Reaktion mit zwei unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Primern zu sequenzieren (Wiemann, S., et al., *Analytical Biochemistry* 224, 117-121 (1995)). Die Anwendbarkeit dieses DEXAS-Ansatzes wurde unter Verwendung eines FITC-markierten Primers (mtDNA1), eines Cy5-markierten Primers (mtDNA2) und 500 ng menschlicher DNA als Matrize analysiert. Unter Beibehaltung der obigen Reaktionsbedingungen wurden die Primer-Verhältnisse variiert (FITC-mtDNA1/Cy5-mtDNA2 wie 3:1, 2:1, 1:1, 1:2 und 1:3). Nach der Zyklusreaktion und Denaturierung wurden 5 µl der Reaktion auf ein A.L.F- oder A.L.F.-Express-Instrument aufgegeben. Wie bei den vorausgehenden Experimenten wurden bei Verwendung äquimolarer Mengen Primer erheblich schlechtere Ergebnisse erhalten als bei den Reaktionen, bei denen nichtäquimolare Mengen eingesetzt wurden (Fig. 4). Ein Verhältnis von 2:1 bei einer Gesamtmenge von 12 pmol ergab das beste Signal/Rausch-Verhältnis. Bei diesen Reaktionen wurden 450 Basen auf beiden Strängen abgelesen, ohne daß sich mehrdeutige Positionen ergaben. Die Beobachtung, daß eine höhere Menge an FITC-markiertem Primer als an Cy5-markiertem Primer vorteilhaft ist, geht wahrscheinlich darauf zurück, daß Cy5 ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis als FITC aufweist. In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, daß sich der Zweifarbansatz auch auf Einzelkopie-Gene anwenden läßt.

23.07.02

EP-Anmeldung Nr.: 97 122 380.5

Patentansprüche
für die Vertragsstaaten DE, FR und GB

1. Verfahren zur direkten Sequenzierung eines DNA-Moleküls aus einer komplexen Mischung von Nucleinsäuren, wobei sowohl gekürzte DNA-Moleküle als auch solche voller Länge zwischen zwei Positionen am DNA-Molekül gleichzeitig in einer thermozyklischen Reaktion synthetisiert werden, die zu Beginn ein DNA-Molekül, einen ersten Primer, einen zweiten Primer, einen Reaktionspuffer, eine thermisch stabile DNA-Polymerase, Desoxynucleotide oder Derivate derselben und ein Didesoxynucleotid oder ein anderes terminierendes Nucleotid umfaßt, wobei das Verhältnis der dNTPs zu den ddNTPs bzw. dem anderen terminierenden Nucleotid zwischen mehr als 500:1 und 1000:1 ist und wobei die thermisch stabile DNA-Polymerase im Vergleich zur Wildtyp-Taq-Polymerase ein vermindertes Unterscheidungsvermögen für die vier ddNTPs aufweist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Verhältnis der Primer etwa 2:1 ist.
3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, wobei das Verfahren in einem Schritt in nur einem Behälter, Gefäß oder Röhrchen durchgeführt wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der Primer eine Länge von wenigstens 25 Nucleotiden aufweist.
5. Verfahren nach jedem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der erste Primer markiert ist.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei erster Primer und zweiter Primer unterschiedlich markiert sind.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die thermozyklische Reaktion des weiteren eine thermisch stabile Pyrophosphatase enthält.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Annealing- und Syntheseschritte der thermozyklischen Reaktion bei einer Temperatur von wenigstens etwa 62°C durchgeführt werden.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei das DNA-Molekül genomische DNA ist.
10. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die genomische DNA eine Länge von mehr als oder gleiche 2 kb aufweist.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die Quelle für die zu sequenzierenden Nucleinsäure-Moleküle eine Quelle ist, die ausgewählt ist aus Körperflüssigkeiten wie etwa Sperma, Urin, Blut oder Blutproben, Haaren, einzelnen Zellen oder Fraktionen derselben, Geweben oder Fraktionen derselben und Gewebekulturen.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei die thermisch stabile Polymerase eine Taq-DNA-Polymerase mit einer Tabor-Richardson-Mutation ist, der auch die 5'-3'-Exonuclease-Aktivität fehlt, oder ein funktionelles Derivat derselben.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei die thermisch stabile Polymerase Taq-DNA-Polymerase (-exo5'-3')(F667Y) oder ein funktionelles Derivat derselben ist.

14. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Bestimmung einer Sequenz einer Nucleinsäure.
15. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur direkten Sequenzierung eukaryontischer genomischer DNA.
16. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur direkten Sequenzierung menschlicher Chromosomen- oder Mitochondrien-DNA.
17. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur direkten Sequenzierung ungereinigter Plasmid-DNA aus Bakterien-Kolonien.
18. Ausgangsreaktionsmischung zur direkten Sequenzierung eines Nucleinsäure-Moleküls aus einer komplexen Mischung von Nucleinsäuren, enthaltend einen Reaktionspuffer, Desoxynucleotide oder Derivate derselben und ein Didesoxynucleotid oder ein anderes terminierendes Nucleotid, wobei das Verhältnis der dNTPs zu den ddNTPs bzw. dem anderen terminierenden Nucleotid zwischen mehr als 500:1 und 1000:1 ist, ein Nucleinsäure-Molekül, einen ersten Primer, einen zweiten Primer und eine thermisch stabile Polymerase, die im Vergleich zur Wildtyp-Taq-DNA-Polymerase ein vermindertes Unterscheidungsvermögen für die ddNTPs aufweist.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Boehringer Mannheim GmbH
- (B) STRASSE: Sandhoferstr. 116
- (C) STADT: Mannheim
- (E) LAND: DE
- (F) POSTLEITZAHL: 68305
- (G) Telephon: 06217595482
- (H) TELEFAX: 06217594457

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Verfahren zur direkten exponentiellen Amplifikation und Sequenzierung von DNA-Molekülen und dessen Anwendung

(iii) ANZAHL SEQUENZEN: 6

(iv) COMPUTERLESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Diskette
- (B) COMPUTER: IBM PC-kompatibel
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPO)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR. 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: weitere Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonucleotid"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 1:

GATTCTAATT TAAACTATTC TCTGTTC

27

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR. 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 27 Basenpaare

(B) ART: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: weitere Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonucleotid"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 2:

TTATGACCCT GAAGTAGGAA CCAGATG

27

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR. 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 27 Basenpaare

(B) ART: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: weitere Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonucleotid"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 3:

GGAGGCACTT GCCACCCTGC AACTGG 27

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR. 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 27 Basenpaare

(B) ART: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: weitere Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonucleotid"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 4:

CTCCTCCACC GCTTCTTGTT CTGCTTG

27

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR. 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 25 Basenpaare

(B) ART: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: weitere Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonucleotid"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 5:

GGCTGGTCCT GCCGCTGCTT GTCAT

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR. 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 27 Basenpaare

(B) ART: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: einfach

- 25 -

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: weitere Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonucleotid"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR. 6:

CTGCTCCCCA GTGGATCGGG TGTA AAC

27

Fig. 1

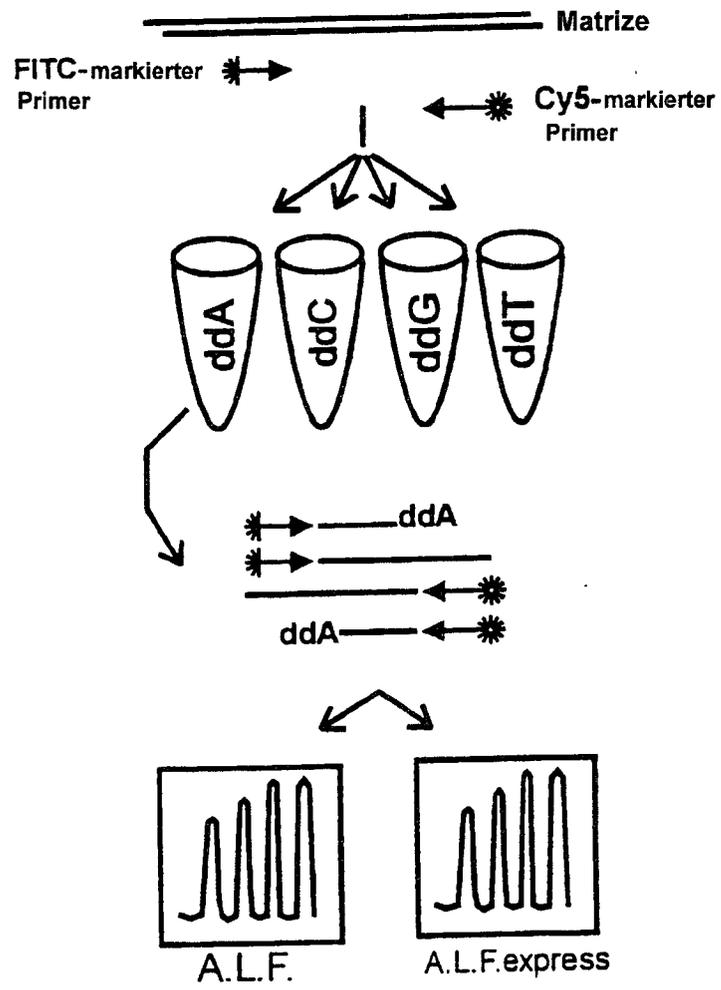


Fig. 3 A

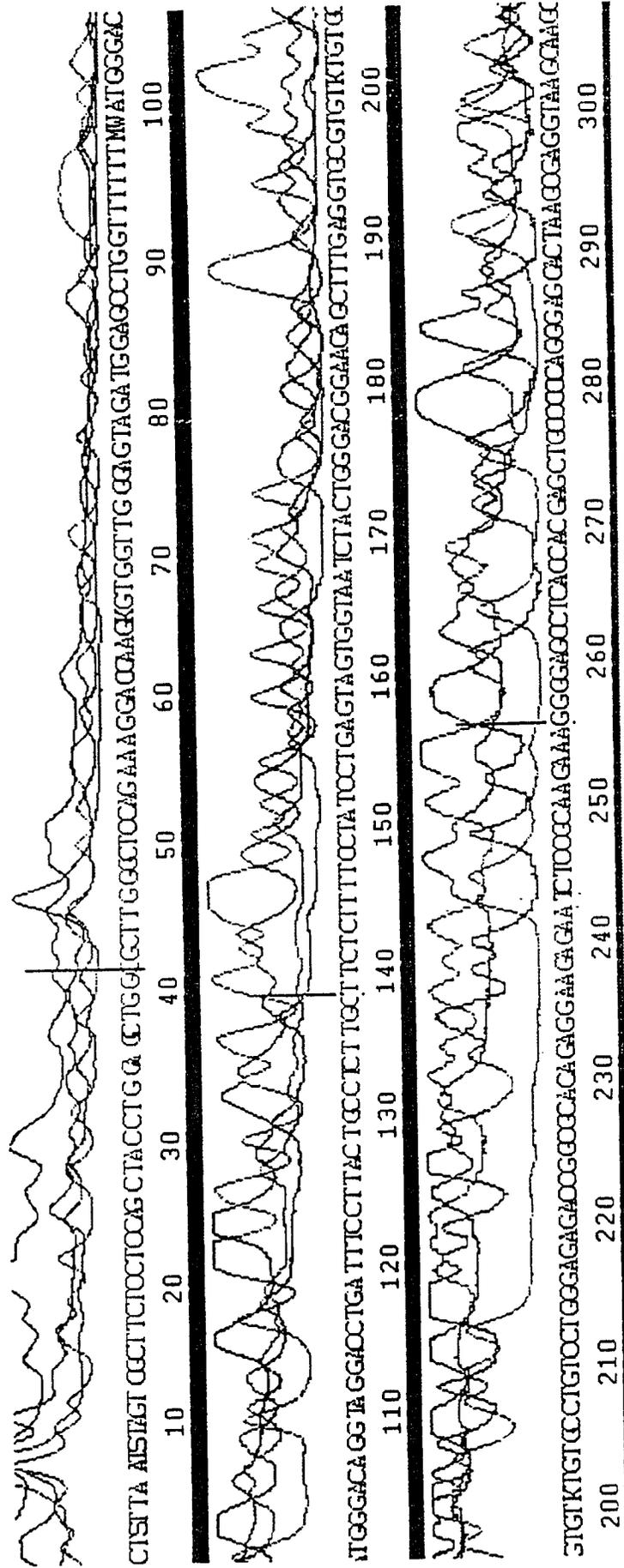
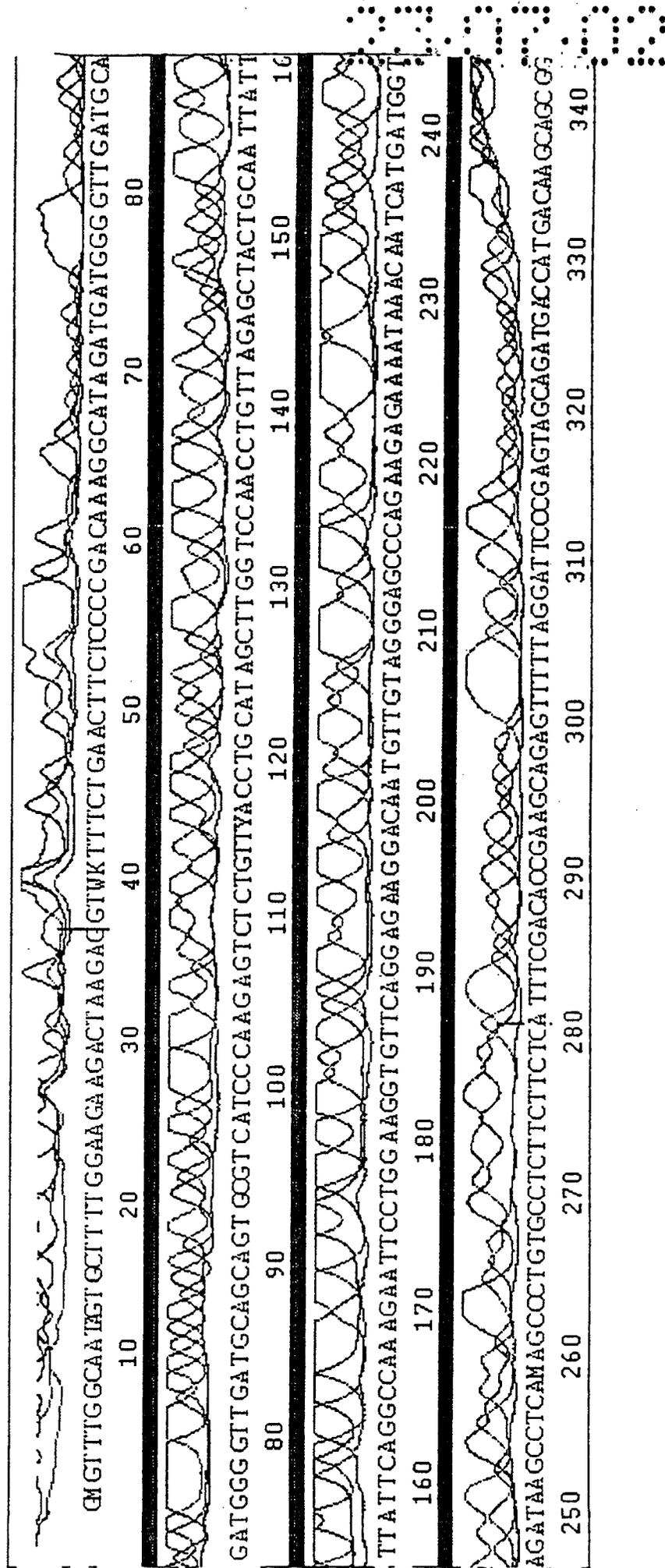


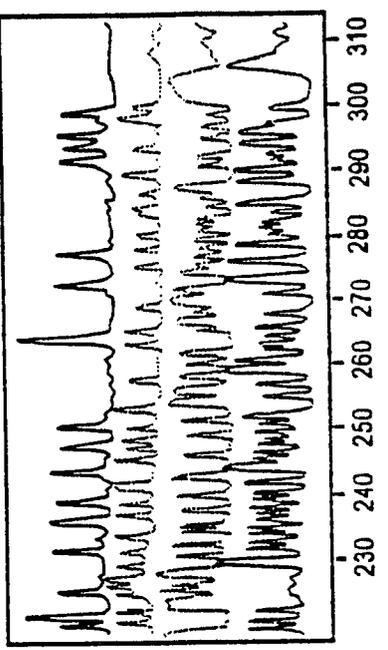
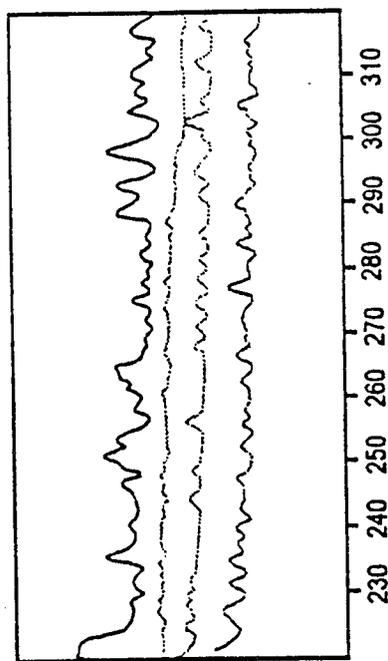
Fig. 3 B



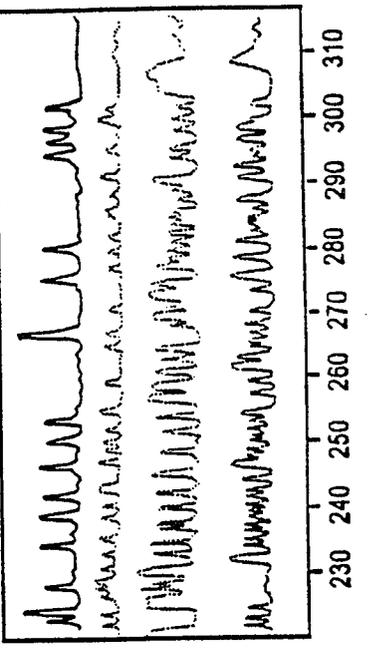
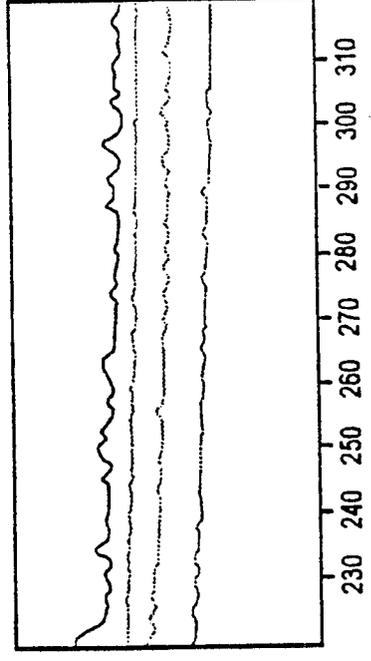
2000

Fig. 4 FITC

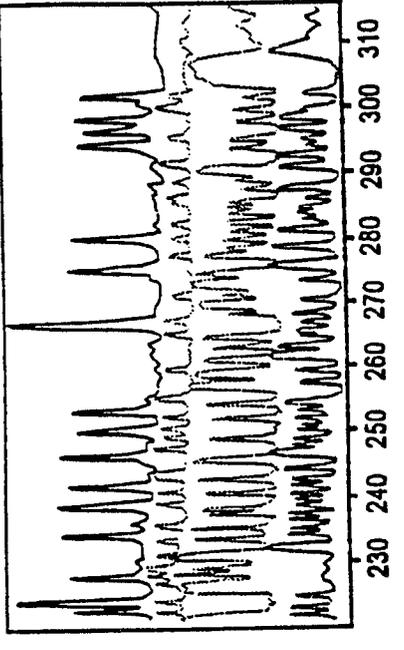
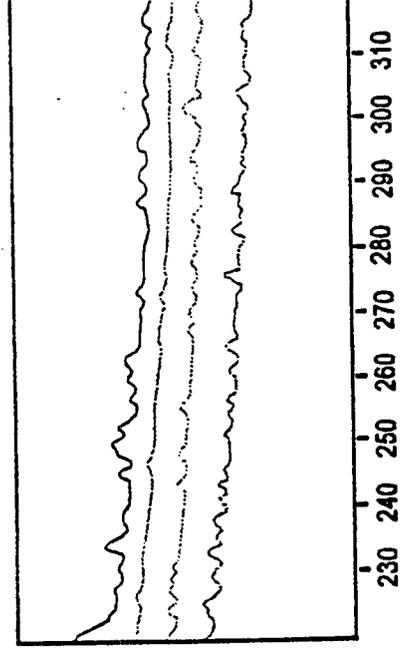
Cy5



2:1



1:1



1:2

Fig. 6, 2/2

FITC	CCCCCAGAAT ATCAACTAAC TTAACITTTT ATTATATATA CATRGACACAT TAAACGGTTC	273
Mehrdeutigkeiten		
Cy5	ATCGGACATA GCACATTTCA GTCAAACAAA TTCCCTATCAC CACGGATACC CCCCTCAGTT	540
FITC	ATCGGACATA GCACATTTCA GTCAAACAAA TTCCCTATCAC CACGGATACC CCCCTCAGTT	333
Mehrdeutigkeiten	KK	
Cy5	AGGTGTCCCT TATTCACCAT CCTCCGTGAA ATCAATATCC CGCACAAAGAG TGCTACTCTC	600
FITC	AGGTGTHKCT TATTCACCAT CCTCCGTGAA ATCAATATCC CGCACAAAGAG TGCTACTCTC	393
Mehrdeutigkeiten		
Cy5	CTCGCTCCGG GGGGCTAGAG CGGCCGCCAC CGGGTGGAG CTCCMGCTTT TGTNCCCCTTT	660
FITC	CTCGCTCCGG GGGG	407
Mehrdeutigkeiten		
Cy5	ATGAGGCTC	668