

Title (en)
METHOD FOR DIRECT SEQUENCING OF NUCLEIC ACID CHAINS USING THE POLYMERASE CHAIN REACTION AND DEOXYNUCLEOSIDE THIOTRIPHOSPHATES.

Title (de)
VERFAHREN ZUR DIREKTEN SEQUENZIERUNG VON NUKLEINSÄUREKETTEN UNTER VERWENDUNG DER POLYMERASE-KETTEN-REAKTION UND DEOXYNUKLEOTIDTRIPHOSPHATEN.

Title (fr)
PROCEDE POUR LE SEQUENCAGE DIRECT DE CHAINES D'ACIDES NUCLEIQUES AU MOYEN DE LA REACTION EN CHAINE DE POLYMERASE ET DE THIOTRIPHOSPHATES DE DESOXYNUCLEOSIDES.

Publication
EP 0439537 A1 19910807 (DE)

Application
EP 89912409 A 19891024

Priority
• DE 3836201 A 19881024
• DE 3930312 A 19890911

Abstract (en)
[origin: WO9004649A1] A method for direct sequencing of nucleic acid chains by denaturation followed by amplification of the regions to be sequenced by repetition of a cycle includes a) a nucleic acid synthesis step in which the nucleic acid to be sequenced is replicated, as a matrix strand in the presence of the four deoxynucleoside triphosphates, by a polymerase, starting from oligonucleotide primers which are complementary to the 3' ends of the antiparallel strands of the nucleic acids to be sequenced; followed by b) a denaturation step. The ends of the resulting nucleic acids are marked during or after amplification. Sequencing of the marked nucleic acids is carried out by incorporating modified nucleotides at positions specific for a particular base, shortening the amplified nucleic acids to these respective positions and separating the resultant nucleic acid fragments by electrophoresis. The modified nucleotides are incorporated during amplification in four different cycles by using a deoxynucleoside-\$g(a)\$-thiotriphosphate together with each of the three other unmodified deoxynucleoside triphosphates instead of the four deoxynucleoside triphosphates.

Abstract (fr)
Un procédé pour le séquençage direct de chaînes d'acides nucléiques par dénaturation suivie de l'amplification des régions à séquençer par répétition d'un cycle comporte a) une étape de synthèse d'acides nucléiques, dans laquelle l'acide nucléique à séquençer est répliqué sous forme d'un brin matriciel, en présence des quatre triphosphates de désoxynucléosides, par une polymérase, à partir d'oligonucléotides amorces qui sont complémentaires des terminaisons 3' des brins anti-parallèles des acides nucléiques à séquençer; suivie b) d'une étape de dénaturation. Les terminaisons des acides nucléiques obtenus sont marquées pendant ou après l'amplification. Le séquençage des acides nucléiques marqués s'effectue par incorporation, à des positions spécifiques d'une base, de nucléotides modifiés, raccourcissement, jusqu'à ces positions, des acides nucléiques amplifiés et séparation par électrophorèse des fragments d'acides nucléiques résultants. Les nucléotides modifiés sont incorporés, lors de l'amplification en quatre cycles différents, grâce à l'emploi d'un thiotriphosphate alpha de désoxynucléoside conjointement avec les trois autres triphosphates de désoxynucléosides non modifiés, à la place des quatre triphosphates de désoxynucléosides.

IPC 1-7
C12Q 1/68

IPC 8 full level
C12Q 1/44 (2006.01); **C12Q 1/48** (2006.01); **C12Q 1/68** (2006.01)

CPC (source: EP)
C12Q 1/686 (2013.01); **C12Q 1/6869** (2013.01)

Citation (search report)
See references of WO 9004649A1

Designated contracting state (EPC)
AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

DOCDB simple family (publication)
WO 9004649 A1 19900503; DE 3930312 A1 19900426; EP 0439537 A1 19910807; JP H04501361 A 19920312

DOCDB simple family (application)
EP 8901269 W 19891024; DE 3930312 A 19890911; EP 89912409 A 19891024; JP 51150189 A 19891024