(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication : **2 558 262**
(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : **85 00597**

(51) Int Cl⁴ : G 01 N 33/483.

(12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION A1

(22) **Date de dépôt :** 16 janvier 1985.

(30) **Priorité :** US, 16 janvier 1984, n° 570, 973 et 2 janvier 1985, n° 689,013.

(43) **Date de la mise à disposition du public de la demande :** BOPI « Brevets » n° 29 du 19 juillet 1985.

(60) **Références à d'autres documents nationaux apparentés :**

(71) **Demandeur(s) :** *CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY.* — US.

(72) **Inventeur(s) :** Leroy E. Hood, Michael W. Hunkapiller, Lloyd M. Smith et Tim J. Hunkapiller.

(73) **Titulaire(s) :**

(74) **Mandataire(s) :** Cabinet Lavoix.

(54) Procédé et système pour l'analyse par électrophorèse de fragments d'ADN obtenus par séquençage.

(57) L'invention concerne un procédé pour l'analyse par électrophorèse de fragments d'ADN produits dans des opérations de séquençage d'ADN, dans lequel on utilise un jeu de quatre chromophores ou fluorophores pour marquer les fragments d'ADN produits par la chimie de séquençage, ce qui permet la détection et la caractérisation des fragments lorsqu'ils sont résolus par électrophorèse sur un gel.

L'invention concerne également un système pour l'analyse des fragments d'ADN comprenant : une source de fragments d'ADN marqués avec un chromophore ou un fluorophore; des zones pour contenir le gel pour l'électrophorèse; un dispositif pour l'introduction des fragments d'ADN marqués dans ladite zone; et un dispositif photométrique pour contrôler les fragments d'ADN marqués lorsqu'ils se déplacent à travers le gel.

FR 2 558 262 - A1

Le développement de méthodes fiables pour l'analyse des séquences d'ADN (acide désoxyribonucléique) et d'ARN (acide ribonucléique) a été l'une des clés du succès de la technique de l'ADN recombinant et du génie génétique. Lorsqu'il est utilisé avec les autres techniques de la biologie moléculaire moderne, le séquençage d'un acide nucléique permet la dissection et l'analyse des génomes animaux, végétaux et viraux dans des gènes discrets avec une structure chimique définie. Puisque la fonction d'une molécule biologique est déterminée par sa structure, la définition de la structure d'un gène est cruciale pour la manipulation éventuelle de cette unité de base d'information héréditaire, de manière utile. Dès que des gènes peuvent être isolés et caractérisés, ils peuvent être modifiés pour produire des changements désirés dans leurs structures, ce qui permet la production de produits de gènes - des protéines - avec des propriétés différentes de celles possédées par les protéines originales. Les microorganismes dans lesquels les gènes naturels ou synthétiques sont placés, peuvent être utilisés comme "usines" chimiques pour produire de grandes quantités de protéines humaines rares telles que l'interféron, l'hormone de croissance et l'insuline. Les végétaux peuvent recevoir l'information génétique leur permettant de survivre dans des conditions d'environnement difficiles ou de produire leur propre fertilisant.

Le développement des méthodes modernes de séquençage des acides nucléiques a impliqué des développe-

ments parallèles dans diverses techniques. L'un d'entre eux est la mise au point de procédés simples et fiables pour le clonage de cordons d'ADN, de dimensions faibles à moyennes, dans des plasmides bactériens, des bactériophages et de petits virus animaux. Ceci permet la production d'ADN pur en quantités suffisantes pour son analyse chimique. Un autre de ces développements est l'approche de la perfection pour des procédés d'électrophorèse sur gel, utilisables pour la séparation par résolution d'oligonucléotides à partir de leur dimension. Mais le principal développement est l'introduction de procédés de production d'ensembles de dimensions adaptées de fragments d'ADN cloné, purifié, qui contiennent, dans leur collection de longueurs, l'information nécessaire pour définir la séquence des nucléotides comprenant les molécules d'ADN parentes. Deux procédés distincts de production de ces ensembles de fragments sont d'usage général, l'un est développé par Sanger (Sanger F., Nicklen S. et Coulson A.R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5453 (1977) et Smith A.J.H., Methods in Enzymology 65, 56-580 (1980)), l'autre par Maxam et Gilbert (Maxam A.M. et Gilbert W., Methods in Enzymology 65, 499- 559 (1980)).

Le procédé développé par Sanger est appelé le procédé de terminaison de chaîne didésoxy. Dans la variation la plus usuelle de ce procédé, on clone un segment d'ADN dans un ADN phagique monocaténaire tel que M13. Ces ADN phagiques peuvent servir de copies pour la synthèse amorcée du cordon complémentaire par le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I. L'amorceur est soit un oligonucléotide synthétique, soit un fragment de restriction isolé à partir de l'ADN recombinant parental qui s'hybride spécifiquement avec une région du vecteur M13 près de l'extrémité 3' de l'insert cloné. Dans chacune des 4 réactions de séquençage, la synthèse amorcée est effectuée en présence d'une quantité suffisante d'analogue didésoxy de l'un des 4 désoxynucléotides

possibles, de sorte que les chaînes s'allongeant sont terminées au hasard par l'incorporation de ces nucléotides "fermés". La concentration relative des formes didésoxy à désoxy est ajustée pour fournir une étendue d'éventualités de terminaison correspondant à toutes les longueurs de chaîne possibles qui peuvent être résolues par électrophorèse sur gel. Les produits de chacune des 4 réactions de synthèse amorcée sont alors séparés sur des tracés individuels de gels de polyacrylamide par électrophorèse. Des marqueurs radioactifs incorporés dans les chaînes s'allongeant sont utilisés pour développer une image autoradiographique du type d'ADN dans chaque tracé électrophorétique. La séquence des désoxynucléotides dans l'ADN cloné est déterminée à partir d'un examen du type des bandes dans les 4 trajectoires.

Le procédé développé par Maxam et Gilbert utilise un traitement chimique d'ADN purifié pour produire des ensembles de dimensions adaptées de fragments d'ADN analogues à ceux produits par le procédé de Sanger. Ce mode opératoire permet de séquencer un ADN mono- ou bi-caténaire, marqué avec un phosphate radioactif à l'extrémité 3' ou 5'. Dans quatre jeux de réaction, on induit une coupure sur l'une ou sur deux des quatre bases de nucléotides, par un traitement chimique. La coupure implique un processus en trois stades : modification de la base, élimination de la base modifiée à partir de son sucre et scission de la chaîne sur ce sucre. Les conditions de réaction sont ajustées de manière que la majorité des fragments marqués à leurs extrémités, engendrés, soit dans une gamme de dimension (typiquement de 1 à 400 nucléotides) qui puisse être résolue par électrophorèse sur gel. L'électrophorèse, l'autoradiographie et l'analyse des tracés sont effectuées essentiellement comme dans le procédé de Sanger. (Bien que la fragmentation chimique engendre nécessairement deux fragments d'ADN chaque fois qu'elle se produit, seul le fragment contenant le

marqueur terminal est détecté sur l'autoradiogramme).

Ces deux procédés de séquençage d'ADN sont très utilisés et chacun comporte plusieurs variations. Pour chacun d'entre eux, la longueur de la séquence qui peut être obtenue à partir d'un simple jeu de réactions, est surtout limitée par la résolution des gels de polyacrylamide utilisés pour l'électrophorèse. Typiquement, de 200 à 400 bases peuvent être lues à partir d'un simple jeu de tracés de gel. Bien que satisfaisants, ces deux procédés comportent de sérieux inconvénients, des problèmes associés principalement au mode opératoire de l'électrophorèse. Un des problèmes résulte de la nécessité d'avoir à utiliser un radiomarqueur comme traceur pour l'emplacement des bandes d'ADN dans les gels. Il faut tenir compte de la courte période de demi-vie du phosphore 32 et par conséquent de l'instabilité des réactifs de marquage radioactif, et des problèmes posés par l'élimination et la manipulation des produits radioactifs. Plus important encore, la nature de l'autoradiographie (l'image sur film d'une bande de gel radioactif est plus large que la bande elle-même) et la comparaison des positions des bandes entre les quatre tracés différents de gels (qui peuvent ou ne peuvent pas se comporter de manière uniforme quant aux mobilités des bandes) peuvent limiter la résolution observée des bandes et donc la longueur de la séquence qui peut être lue à partir des gels. De plus, les irrégularités de tracé à tracé peuvent rendre difficiles le balayage des autoradiogrammes - l'oeil humain peut actuellement mieux compenser ces irrégularités que ne le font les ordinateurs. Cette exigence d'une "lecture" manuelle des autoradiogrammes demande du temps, est pénible et sujette à erreurs. En outre, il n'est pas possible de lire les tracés des gels pendant le cours de l'électrophorèse, afin d'être capable de terminer l'électrophorèse lorsque la résolution devient insuffisante pour séparer les bandes adjointes, mais on doit terminer

l'électrophorèse à un moment déterminé et attendre le développement de l'autoradiogramme avant de pouvoir lire la séquence.

L'invention concerne ces problèmes et d'autres associés à l'opération d'électrophorèse dans les procédés de séquençage d'ADN et elle est considérée comme représentant un progrès significatif dans la technique.

En résumé, l'invention fournit un nouveau procédé pour l'analyse par électrophorèse des fragments d'ADN produits dans des opérations de séquençage d'ADN, dans lequel on utilise un jeu de 4 chromophores ou fluorophores pour marquer les fragments d'ADN produits par la chimie de séquençage et permettre la détection et la caractérisation des fragments lorsqu'ils sont résolus par électrophorèse sur gel. La détection implique l'emploi d'un photomètre à absorption ou fluorescent, capable de contrôler les bandes marquées se déplaçant à travers le gel.

L'invention comprend également un nouveau système pour l'analyse des fragments d'ADN, constitué de :

une source de fragments d'ADN marqués avec un chromophore ou un agent fluorescent, ces fragments étant marqués différemment,

une zone pour contenir un gel pour électrophorèse,

un dispositif pour l'introduction des fragments d'ADN marqués dans ladite zone, et

un dispositif photométrique pour contrôler ou détecter les fragments d'ADN marqués lorsqu'ils se déplacent dans et sont séparés par le gel.

L'invention a pour objet de fournir un nouveau procédé pour l'analyse de la séquence d'ADN.

L'invention a également pour objet de fournir un nouveau système pour l'analyse des fragments d'ADN.

Plus précisément, l'invention a pour objet de

fournir un procédé perfectionné pour l'analyse de la séquence d'ADN.

D'autres buts et avantages apparaîtront à la lecture de la description ci-après, qui se réfère aux figures des dessins annexés, représentant respectivement :

figure 1, une illustration d'un des moyens de marquer l'extrémité d'un fragment d'ADN avec un marqueur fluorescent. Pst I et la T4 ADN ligase sont des enzymes ordinairement utilisées dans l'étude de l'ADN recombinant ;

figure 2, un diagramme d'ensemble d'un séquenceur d'ADN automatisé, avec système d'électrophorèse sur gel;

figure 3, un schéma d'une configuration optique dans l'unité de détection. P, source lumineuse ; L1, lentille de l'objectif ; L2, lentille du collimateur ; F1, filtre arrêtant les UV ; F2, filtre arrêtant la chaleur ; F3, filtre d'excitation de passage de la bande ; F4, filtre d'émission d'un long passage ; DM, miroir dichroïque ; C, gel de polyacrylamide ; PMT, tube photomultiplicateur ;

figure 4, un schéma d'une autre configuration optique dans l'unité de détection. F1 à F4 sont des filtres de passage des bandes, centrés au maximum d'émission des différents colorants. P1 à P4 sont des tubes photomultiplicateurs. La lumière d'excitation a une longueur d'onde qui n'est pas transmise par aucun des filtres F1 à F4 ;

figure 5, une comparaison du type de données produites par un séquençage d'ADN de la séquence illustrée sur la figure 1 ;

figure 6, un diagramme d'ensemble d'un séquenceur d'ADN préféré selon l'invention.

Conception des amorceurs marqués utilisables avec le procédé Sanger.

Dans les procédés antérieurs de séquençage d'ADN, comprenant ceux basés sur le procédé de terminaison de chaîne didésoxy de Sanger, on utilise un simple marqueur radioactif,

le phosphore 32, pour identifier toutes les bandes sur les gels. Ceci implique que les ensembles de fragments produits dans les 4 réactions de synthèse soient traités sur des tracés de gels séparés et entraîne des problèmes associés à la comparaison des mobilités des bandes dans les différents tracés. Ce problème est résolu dans l'invention en utilisant un jeu de 4 chromophore ou fluorophores avec des maximas d'absorption ou de fluorescence différents, respectivement. Chacun de ces marqueurs est couplé chimiquement à l'amorceur utilisé pour initier la synthèse des chaînes de fragments. Chaque amorceur marqué est à son tour apparié avec l'un des didésoxynucléotides et utilisé dans la réaction de synthèse amorcée avec le fragment de Klenow d'ADN polymérase.

Les amorceurs doivent avoir les caractéristiques suivantes. 1) Ils doivent avoir un groupe 3' hydroxyle pour permettre une extension de la chaîne par la polymérase. 2) Ils doivent être complémentaires d'une région unique 3' de l'insert cloné. 3) Ils doivent être suffisamment longs pour s'hybrider en formant un duplex unique, stable. 4) Le chromophore ou le fluorophore ne doit pas interférer avec l'hybridation ou empêcher l'extension à l'extrémité 3' par la polymérase.

Les conditions 1, 2 et 3 ci-dessus sont remplies par plusieurs amorceurs oligonucléotidiques synthétiques qui sont généralement utilisés pour un séquençage de type Sanger utilisant des vecteurs M13. Un tel amorceur est le 12 mer 5'TCA CGA CGT TGT 3' dans lequel A, C, G et T représentent les 4 différents constituants nucléocidiques de l'ADN : A, adénosine ; C, cytosine ; G, guanosine ; T, thymidine.

La chimie pour le couplage des marqueurs chromophores ou fluorophores est décrite dans la demande de brevet US N° 565 010, déposée le 20 Décembre 1983. La technique utilisée consiste à introduire un groupe amino aliphatique à

l'extrémité 5' comme dernière addition dans la synthèse de l'amorceur d'oligonucléotide. Ce groupe amino réactif peut alors être facilement couplé avec une grande variété de chromophores et/ou de fluorophores amino-réactifs. Ce moyen permet aux amorceurs marqués de remplir la condition 4 ci-dessus.

Les 4 colorants utilisés doivent avoir des coefficients d'extinction élevés et/ou des rendements quantiques pour la fluorescence raisonnablement élevés. Ils doivent avoir des maxima d'absorption et/ou des maxima d'émission bien résolus. Comme représentants d'un jeu de 4 de ces colorants amino-réactifs, on citera : la fluorescéine isothiocyanate (FITC, $\lambda^{Ex}_{max} = 495$, $\lambda^{Em}_{max} = 520$, $\varepsilon_{495} \approx 8 \times 10^4$), l'éosine isothiocyanate (EITC, $\lambda^{Ex}_{max} = 522$, $\lambda^{Em}_{max} = 543$, $\varepsilon_{522} \approx 8 \times 10^4$), le tétraméthyl rhodamine isothiocyanate (TMRITC, $\lambda^{Ex}_{max} = 550$, $\lambda^{Em}_{max} = 578$, $\varepsilon_{550} \approx 4 \times 10^4$), et le rhodamine isothiocyanate substitué (XTITC, $\lambda^{Ex}_{max} = 580$, $\lambda^{Em}_{max} = 604$, $\varepsilon_{580} \approx 8 \times 10^4$) dans lesquels λ représente la longueur d'onde en nanomètres, Ex est l'excitation, Em est l'émission, max désigne le maximum et ε est le coefficient d'extinction molaire.

Ces colorants sont fixés sur l'amorceur M13 et le produit conjugué soumis à une électrophorèse sur un gel à 20 % de polyacrylamide. Les amorceurs marqués sont visibles à la fois par leur absorption et leur fluorescence dans le gel. Les quatre amorceurs marqués ont des mobilités électrophorétiques identiques. Les amorceurs conjugués avec un colorant conservent leur aptitude à s'hybrider spécifiquement avec l'ADN, tel que démontré par leur aptitude à remplacer l'oligonucléotide non dérivé, normalement utilisé dans les réactions de séquençage.

<u>Marquage d'une extrémité d'ADN pour être utilisé dans le procédé Maxam/Gilbert</u>.

Dans le procédé de séquençage d'ADN de Maxam/

Gilbert, l'extrémité du fragment d'ADN dont on veut déterminer la séquence doit être marquée. Ceci est réalisé de manière classique par voie enzymatique en utilisant des nucléotides radioactifs. Pour utiliser le procédé de Maxam/Gilbert avec le schéma de détection par les colorants décrits dans cette invention, le fragment d'ADN doit être marqué avec des colorants. Un moyen de réaliser le marquage est représenté sur la figure 1. Certaines endonucléases de restriction engendrent ce qui est connu comme une saillie 3', en tant que produit de scission d'ADN. Ces enzymes engendrent une "extrémité cohésive", une courte extension d'ADN mono-caténaire à l'extrémité d'un fragment d'ADN bi-caténaire. Cette région formera une structure annulaire avec une extension complémentaire d'ADN, qui peut être réunie de manière covalente à l'ADN duplex avec l'enzyme ligase. De cette façon, une des chaînes est liée de manière covalente à une unité détectable. Cette unité peut être un colorant, un groupe amino ou un groupe amino protégé (qui pourrait être déprotégé et réagir avec un colorant après les réactions chimiques).

Réactions de séquençage.

Les réactions de séquençage didésoxy sont effectuées d'une manière standard, Smith A.J.H., Methods in Enzymology 65, 56-580 -1980), si ce n'est que l'échelle peut être augmentée si nécessaire pour fournir une intensité de signal adéquate dans chaque bande pour la détection. Les réactions sont conduites en utilisant un amorceur coloré différent pour chacune des réactions, par exemple FITC pour la réaction "A", EITC pour la réaction "C", TMRITC pour la réaction "G" et XRITC pour la réaction "T". Aucun nucléoside triphosphate radio-marqué n'a besoin d'être inclus dans la réaction de séquençage.

Les réactions de séquençage selon Maxam/Gilbert sont effectuées de manière usuelle, Gill S.F., Aldrichimica

Acta 16(3), 59-61 (1983), si ce n'est que le marqueur de l'extrémité est soit un des 4 colorants, soit un groupe amino libre ou protégé qui peut réagir ensuite avec le colorant.

Electrophorèse sur gel.

On combine des parties aliquotes des réactions de séquençage et on les charge dans une colonne 10 de polyacrylamide à 5 %, à partir du réservoir supérieur 12, tel que représenté sur la figure 2. Les quantités relatives des 4 différentes réactions dans le mélange sont ajustées empiriquement pour donner à peu près la même intensité de signal de fluorescence ou d'absorption pour chacun des produits conjugués ADN/colorant. Ceci permet de compenser les différences des coefficients d'extinction des colorants, des rendements quantiques de fluorescence des colorants, des sensibilités de détection et autres. On applique une tension élevée sur la colonne 10 de manière à soumettre les fragments d'ADN marqués à une électrophorèse à travers le gel. Les segments d'ADN marqués dont la longueur diffère d'un simple nucléotide sont séparés par électrophorèse dans cette matrice de gel. Dans le fond ou près du fond de la colonne de gel 10, les bandes d'ADN sont résolues les unes et les autres et traversent le détecteur 14 (décrit avec plus de détail dans le paragraphe suivant). Le détecteur 14 détecte les bandes fluorescentes ou chromophores d'ADN dans le gel et détermine leur couleur et par conséquent à quel nucléotide elles correspondent. Cette information donne la séquence d'ADN.

Détection.

Il existe différentes manières de détecter les molécules marquées qui ont été séparées selon leur longueur au moyen de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Quatre modes illustratifs sont décrits ci-après. Ce sont i) la détection de la fluorescence excitée par une lumière

de différente longueur d'onde pour les différents colorants, ii) la détection de la fluorescence excitée par une lumière de même longueur d'onde pour les différents colorants, iii) l'élution des molécules à partir du gel et la détection par chimiluminescence, et iv) la détection par l'absorption de la lumière par les molécules. Dans les modes i) et ii), le détecteur de fluorescence doit remplir les conditions suivantes. a) Le faisceau lumineux d'excitation ne doit pas avoir une hauteur pratiquement supérieure à la hauteur de la bande. Celle-ci est normalement comprise entre 0,1 et 0,5 mm. L'utilisation d'un faisceau d'excitation si étroit permet d'obtenir une résolution maximale des bandes. b) La longueur d'onde d'excitation peut être modifiée pour correspondre aux maxima d'absorption de chacun des différents colorants ou peut être une bande lumineuse étroite, de haute intensité qui excite les quatre fluorophores et ne recouvre aucune des émissions de fluorescence. c) La configuration optique doit minimiser le flux de lumière d'excitation diffuse et réfléchie vers le photodétecteur 14. Les filtres optiques pour arrêter la lumière d'excitation diffuse et réfléchie varient en même temps que la longueur d'onde d'excitation. d) Le photodétecteur 14 doit avoir un niveau de bruit assez faible et une bonne réponse spectrale, avec une efficacité quantique sur toute la gamme d'émission des colorants (de 500 à 600 nm pour les colorants indiqués ci-dessus. e) Le système optique pour la collection de la fluorescence émise doit avoir une ouverture numérique élevée. Ceci maximalise le signal de fluorescence. De plus, la profondeur de champ des optiques de collection doit comprendre toute la largeur de la matrice de la colonne.

Deux systèmes de détection de la fluorescence sont illustrés sur les figures 3 et 4. Le système représenté sur la figure 3 est compatible avec une excitation à simple longueur d'onde ou avec une excitation à multiple longueur

d'onde. Pour une excitation à simple longueur d'onde, le filtre F4 est l'un des 4 filtres de passage des bandes, centrés à la longueur d'onde d'émission du pic de chacun des colorants. Ce filtre est commuté toutes les quelques secondes pour permettre un contrôle continu de chacun des quatre fluorophores. Pour une excitation à multiple longueur d'onde, les éléments optiques F3 (filtre d'excitation), DM (miroir dichroïque) et F4 (filtre barrière) sont commutés ensemble. De cette manière, la lumière d'excitation et la lumière d'émission observée sont modifiées. Le système représenté sur la figure 4 est un bon arrangement pour le cas d'une excitation à simple longueur d'onde. Ce système présente l'avantage de ne nécessiter aucune pièce mobile et la fluorescence des quatre colorants peut être contrôlée simultanément et continuellement. Un troisième mode (iii ci-dessus) de détection consiste à éluer les molécules marquées dans le fond du gel, les combiner avec un agent pour une excitation de la chimiluminescence tel que la 1,2-dioxéthane-dione, Gill S.K., Aldrichimica Acta 16(3), 59-61 (1983) ; Mellbin G.J., Liq. Chrom. 6(9), 1603-1616 (1983), et d'envoyer le mélange directement dans un détecteur qui peut mesurer la lumière émise pour les quatre longueurs d'onde séparées (ce détecteur est semblable à celui illustré sur la figure 4, mais sans nécessiter une source de lumière d'excitation). Le signal de fond dans la chimiluminescence est beaucoup plus faible que dans la fluorescence, ce qui se traduit par des rapports signal/bruit plus élevés et une sensibilité accrue. Enfin, la détermination peut être obtenue par des mesures d'absorption de lumière (iv ci-dessus). Dans ce cas, un faisceau lumineux de longueur d'onde variable traverse le gel et on mesure la diminution de l'intensité du faisceau due à l'absorption de la lumière par les molécules marquées. En mesurant l'absorption de la lumière aux différentes longueurs d'onde correspondant au maximum d'absorption des

quatre colorants, il est possible de déterminer la molécule de colorant se trouvant dans la trajectoire de la lumière. Un inconvénient de ce type de mesure provient du fait que les mesures d'absorption sont de manière inhérente moins sensibles que les mesures de fluorescence.

Le système de détection décrit ci-dessus est relié à un ordinateur 16. Dans chaque intervalle de temps examiné, l'ordinateur 16 reçoit un signal proportionnel à l'intensité du signal mesurée chaque fois pour chacun des quatre marqueurs colorés. Cette information indique le nucléotide qui termine le fragment d'ADN de la longueur particulière dans la fenêtre d'observation à ce moment donné. La séquence temporelle des bandes colorées donne la séquence d'ADN. Sur la figure 5, on a représenté le type de données obtenues par des procédés classiques, ainsi que le type de données obtenues par les perfectionnements décrits dans l'invention.

L'exemple suivant a uniquement pour but d'illustrer l'invention.

Exemple.

La figure 6 représente un diagramme d'ensemble d'un séquenceur d'ADN utilisable avec un colorant chaque fois. Le faisceau (4880 Å) d'un laser à ion d'argon 100 traverse le tube de gel de polyacrylamide (échantillon) 102 au moyen d'un guide de faisceau 104. La fluorescence excitée par le faisceau est collectée en utilisant une lentille de faible distance focale 106, traverse un jeu approprié de filtres optiques 108 et 110 pour éliminer la lumière d'excitation diffuse et est détectée au moyen d'un tube photomultiplicateur (PMT) 112. Le signal est facilement détecté sur un enregistreur à bande. Les réactions de séquençage d'ADN sont effectuées en utilisant un amorceur d'oligonucléotide marqué à la fluorescéine. Les pics sur le diagramme correspondent aux fragments d'ADN marqués à la fluorescéine de

différentes longueurs, synthétisés dans les réactions de séquençage et séparés dans le tube de gel par électrophorèse. Chaque pic contient de 10^{-15} à 10^{-16} moles de fluorescéine, ce qui est approximativement égal à la quantité d'ADN obtenue par bande dans un gel de séquençage équivalent utilisant une détection par radioisotope. Ceci prouve que le marqueur fluorescent n'est pas séparé ou dégradé à partir de l'amorceur d'oligonucléotide dans les réactions de séquençage. Ceci démontre également que la sensibilité de la détection est tout à fait adéquate pour effectuer une analyse de séquence d'ADN par ce procédé.

L'invention ayant été décrite en détail, il est évident qu'on peut y apporter des modifications sans départir de son esprit, ni sortir de son cadre.

REVENDICATIONS

1. Procédé de séquençage d'ADN par la technique de terminaison de chaîne, caractérisé en ce que l'oligonucléotide amorceur est marqué avec un traceur coloré.

2. Procédé de séquençage d'ADN par la technique de terminaison de chaîne, caractérisé en ce que l'oligonucléotide amorceur est marqué avec un traceur fluorescent.

3. Procédé de séquençage par la technique de dégradation chimique, caractérisé en ce que les molécules d'ADN sont marquées avec un traceur coloré.

4. Procédé de séquençage d'ADN par la technique de dégradation chimique, caractérisé en ce que les molécules d'ADN sont marquées avec un traceur fluorescent.

5. Procédé de séquençage par la technique de terminaison de chaîne, caractérisé en ce que l'oligonucléotide amorceur utilisé dans chacune des quatre réactions de séquençage, A, C, G et T, comporte un traceur coloré différent fixé sur lui, et en ce que des parties aliquotes des réactions de séquençage ci-dessus sont combinées et soumises ensemble à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide et détectées après leur séparation sur le gel.

6. Procédé de séquençage par la technique de terminaison de chaîne, caractérisé en ce que l'oligonucléotide amorceur utilisé dans chacune des quatre réactions de séquençage A, C, G et T, comporte un traceur fluorescent différent fixé sur lui et en ce que des parties aliquotes des réactions de séquençage ci-dessus sont combinées et soumises ensemble à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide et détectées après leur séparation sur le gel.

7. Procédé de séquençage d'ADN par la technique de dégradation chimique, caractérisé en ce que les molécules d'ADN sont marquées avec différents traceurs colorés, et un ADN coloré différent est utilisé dans chacune des réactions de modification chimique, et des parties aliquotes des réac-

tions de séquençage ci-dessus sont combinées et soumises ensemble à une électrophorèse sur un gel de polyacrylamide et détectées après leur séparation du gel.

8. Procédé de séquençage d'ADN par la technique de dégradation chimique, caractérisé en ce que les molécules d'ADN sont marquées avec différents traceurs fluorescents, et un ADN fluorescent différent est utilisé dans chacune des réactions de modification chimique, et des parties aliquotes des réactions de séquençage ci-dessus sont combinées et soumises ensemble à une électrophorèse sur un gel de polyacrylamide et détectées après leur séparation du gel.

9. Procédé de séquençage d'ADN par la technique de dégradation chimique, caractérisé en ce que les molécules d'ADN sont marquées avec un groupe amino qui est couplé avec une molécule de colorant après les réactions de séquençage.

10. Procédé de séquençage d'ADN par la technique de dégradation chimique, caractérisé en ce que les molécules d'ADN sont marquées avec un groupe amino protégé qui est débloqué et couplé avec une molécule de colorant après les réactions de séquençage.

11. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que les produits de chacune des différentes réactions de séquençage sont couplés avec un colorant différent, des parties aliquotes de la réaction marquée avec un colorant sont combinées et soumises à une électrophorèse sur un gel de polyacrylamide et détectées après leur séparation sur le gel.

12. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que les produits de chacune des réactions différentes de séquençage sont couplées avec un colorant différent, des parties aliquotes de la réaction marquée avec un colorant sont combinées et soumises à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide et détectées après leur séparation sur le gel.

13. Nouveau système pour l'analyse des fragments d'ADN comprenant :

une source de fragments d'ADN marqués avec un chromophore ou un agent fluorescent ;

une zone pour contenir le gel pour l'électrophorèse,

un dispositif pour introduire les fragments d'ADN marqués dans ladite zone ; et

un dispositif photométrique pour contrôler les fragments d'ADN marqués lorsqu'ils se déplacent à travers le gel.

14. Nouveau système selon la revendication 13, dans lequel le dispositif photométrique est un photomètre à absorption.

15. Nouveau système selon la revendication 13, dans lequel le dispositif photométrique est un photomètre à fluorescence.

16. Nouveau système selon la revendication 13, dans lequel les fragments d'ADN sont marqués avec un groupe amino qui est couplé avec une molécule de colorant.

17. Nouveau système selon la revendication 16, dans lequel les fragments d'ADN ont des traceurs colorés différents.

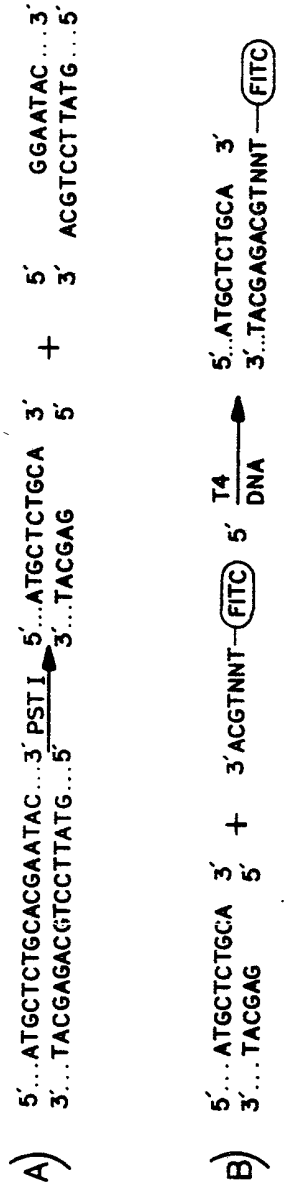


FIG. 1

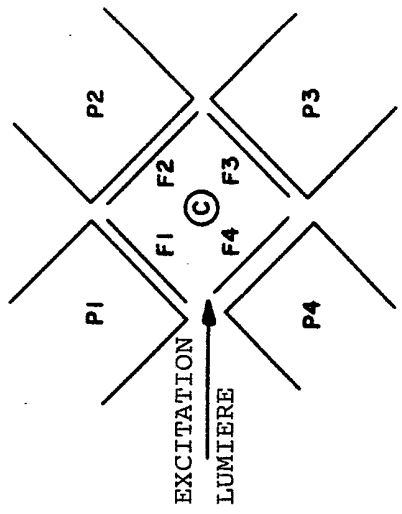


FIG. 4

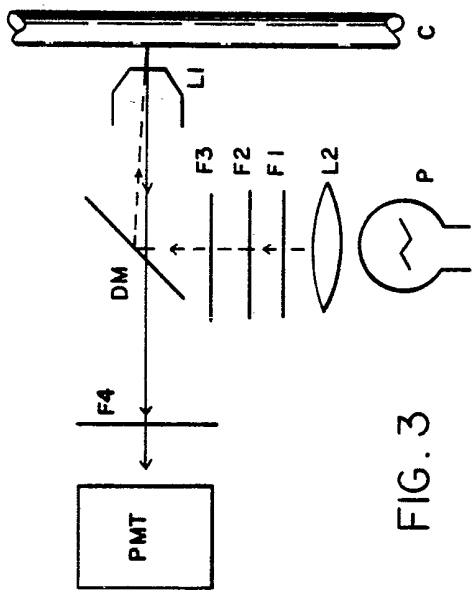


FIG. 3

FIG. 2

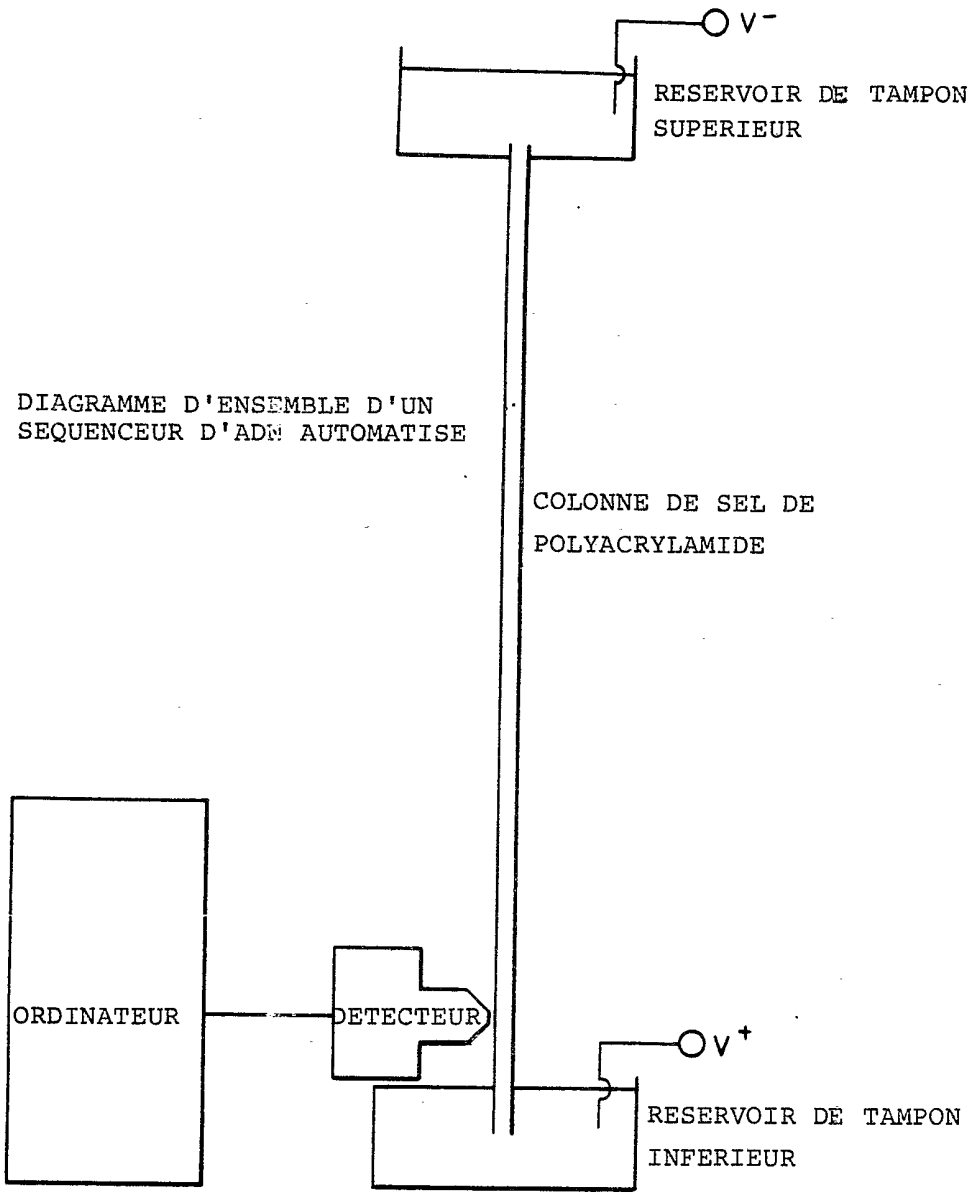
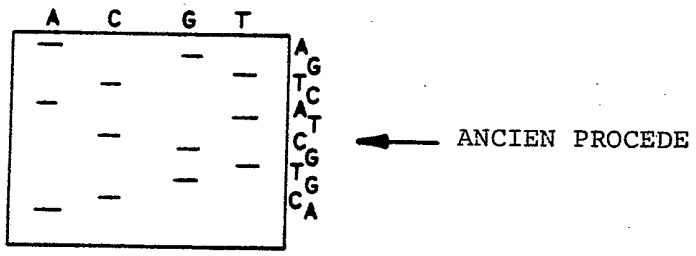

V-
RESERVOIR DE TAMPON SUPERIEUR
DIAGRAMME D'ENSEMBLE D'UN SEQUENCEUR D'ADN AUTOMATISE
COLONNE DE SEL DE POLYACRYLAMIDE
ORDINATEUR
DETECTEUR
V+
RESERVOIR DE TAMPON INFERIEUR

FIG. 5

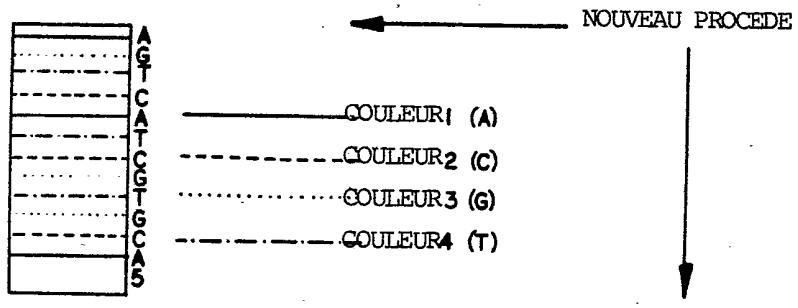
I) SEQUENCE HYPOTHETIQUE D'ADN

5' ACGTGCTACTGA 3'

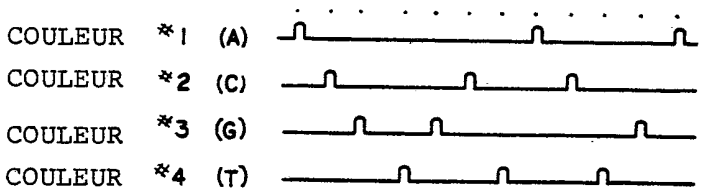
II) AUTORADIOGRAMME IDEALISE DE PLAQUE DE SEL POLYAMIDE, PRODUIT DANS UN SEQUENCAGE PAR TERMINAISON DE CHAÎNE SELON LA TECHNIQUE ANTERIEURE.



III) DIAGRAMME IDEALISE DE BANDES D'ADN COLORE POUR UN SEL D'ACRYLAMIDE EN TUBE, PRODUIT SELON L'INVENTION.



IV) RESULTAT IDEALISE DE LA DETECTION DE BANDES COLOREES SUR LE SEL EN TUBE CI_DESSUS



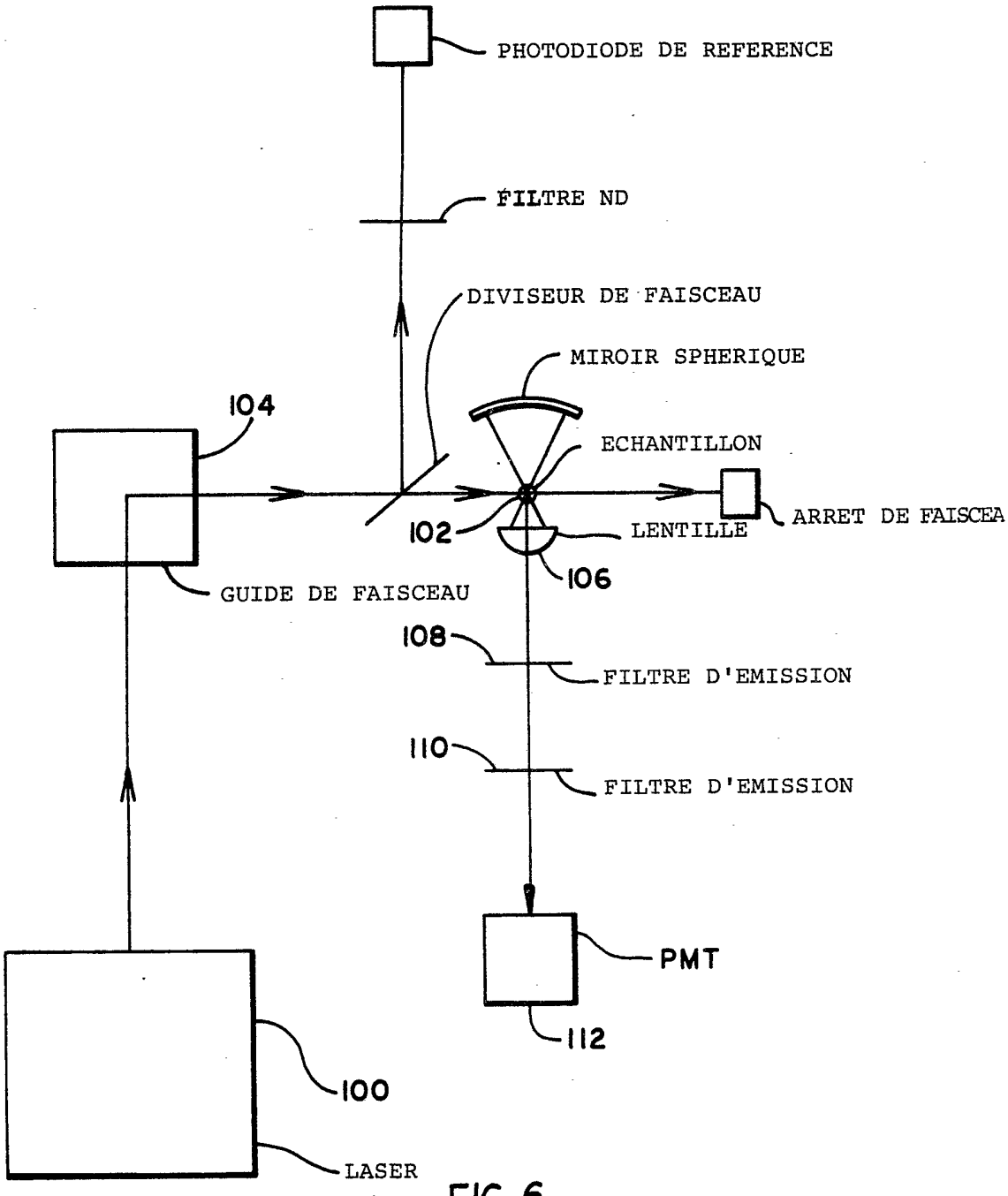

PHOTODIODE DE REFERENCE
FILTRE ND
DIVISEUR DE FAISCEAU
MIROIR SPHERIQUE
104
ECHANTILLON
ARRET DE FAISCEA
102
LENTILLE
106
GUIDE DE FAISCEAU
108
FILTRE D'EMISSION
110
FILTRE D'EMISSION
PMT
112
100
LASER

FIG.6