

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
26. Juni 2003 (26.06.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/052136 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12Q 1/68**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/14489

(22) Internationales Anmeldedatum:
18. Dezember 2002 (18.12.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 62 535.9 19. Dezember 2001 (19.12.2001) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **GNOTHIS HOLDING SA** [CH/CH]; CH-1015 Ecublens (CH).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **RIGLER, Rudolf** [AT/CH]; 115, rue du Centre, CH-1025 St-Sulpice (CH).
VOGEL, Horst [DE/CH]; 2, ch. du Closalet, CH-1028 Préverenges (CH).

(74) Anwälte: **WEICKMANN, Franz, Albert** usw.; Postfach 860 820, 81635 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: SEQUENCING ON PERFORATED MEMBRANES

(54) Bezeichnung: SEQUENZIERUNG ÜBER LOCHMEMBRANEN

(57) Abstract: The invention relates to a method and a device for sequencing nucleic acid molecules on a perforated membrane. The inventive method and device can be especially used in multiplex sequencing.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Sequenzierung von Nukleinsäuremolekülen über eine Lochmembran. Insbesondere kann die Erfindung zur Multiplex-Sequenzierung eingesetzt werden.



WO 03/052136 A2

Sequenzierung über Lochmembranen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Sequenzierung
5 von Nukleinsäuremolekülen über eine Lochmembran. Insbesondere kann die Erfindung zur Multiplex-Sequenzierung eingesetzt werden.

Die Sequenzierung des aus ca. 3×10^9 Basen bestehenden humanen
Genoms oder des Genoms anderer Organismen sowie die Bestimmung und
10 der Vergleich individueller Sequenzvarianten erfordert die Bereitstellung von Sequenziermethoden, die einerseits schnell sind und andererseits
routinemäßig und mit geringen Kosten eingesetzt werden können. Es
wurden in den letzten Jahren große Anstrengungen unternommen, um
gängige Sequenziermethoden, z.B. die enzymatische Kettenabbruch-
15 methode nach Sanger et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977) 5463),
zu beschleunigen, insbesondere durch Automatisierung (Adams et
al., Automated DNA Sequencing and Analysis (1994), New York,
Academic Press). Derzeit können maximal bis zu 500 000 Basen pro Tag
mit einem Sequenziergerät bestimmt werden. Dennoch sind konventionelle
20 Sequenzierverfahren für bestimmte Anwendungen nicht oder nur sehr
bedingt geeignet.

Während der letzten Jahre sind neue Ansätze zur Überwindung der
Beschränkungen konventioneller Sequenzierverfahren entwickelt worden,
25 u.a. die Sequenzierung durch Rastertunnelmikroskopie (Lindsay und Phillip,
Gen. Anal. Tech. Appl. 8 (1991), 8-13), durch hochparallelisierte
Kapillarelektrophorese (Huang et al., Anal. Chem. 64 (1992), 2149-2154;
Kambara und Takahashi, Nature 361 (1993), 565-566), durch
Oligonukleotidhybridisierung (Drmanac et al., Genomics 4 (1989), 114-
30 128; Khrapko et al., FEBS Let. 256 (1989), 118-122; Maskos und
Southern, Nucleic Acids Res. 20 (1992), 1675-1678 und 1679-1684)
sowie durch Matrix-unterstützte Laser-Desorptions/Ionisierungs-

- 2 -

Massenspektroskopie (Hillenkamp et al., Anal. Chem. 63 (1991), 1193A-1203A).

Ein weiterer Ansatz ist die Einzelmolekülsequenzierung (Dörre et al.,
5 Bioimaging 5 (1997), 139-152), bei der die Sequenz von Nukleinsäuren
durch fortschreitenden enzymatischen Abbau von fluoreszenzmarkierten
einzelsträngigen DNA-Molekülen und Nachweis der sequenziell
freigesetzten Monomermoleküle in einem Mikrostrukturkanal erfolgt. Der
Vorteil dieses Verfahrens besteht darin, dass nur ein einziges Molekül der
10 Zielnukleinsäure für die Durchführung einer Sequenzbestimmung ausreicht.

Obwohl durch Anwendung der oben genannten Methoden bereits
erhebliche Fortschritte erzielt wurden, besteht ein großes Bedürfnis nach
weiteren Verbesserungen. Die der vorliegenden Erfindung zugrunde
15 liegende Aufgabe bestand somit darin, ein Verfahren zur Sequenzierung
von Nukleinsäuren bereitzustellen, das eine weitere Verbesserung
gegenüber dem Stand der Technik darstellt und das eine parallele
Bestimmung einzelner Nukleinsäuremoleküle in einem Multiplexformat
ermöglicht.

20

Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Sequenzierung von
Nukleinsäuren, umfassend die Schritte:

- (a) Bereitstellen eines zu sequenzierenden Nukleinsäuremoleküls, das
mehrere Fluoreszenzmarkierungsgruppen enthält,
- 25 (b) Bereitstellen einer Membranstruktur, durch die mindestens ein Kanal
hindurchführt, der einen zum Durchtritt einzelner
Nukleinsäuremoleküle geeigneter Durchmesser aufweist, wobei ein
Enzym, das ein Abspalten einzelner Nukleotidbausteine von einem
Nukleinsäuremolekül katalysiert, auf der Membranstruktur
30 immobilisiert ist,
- (c) Leiten des zu sequenzierenden Nukleinsäuremoleküls in bzw. durch
den Kanal unter Bedingungen, dass ein fortschreitendes Abspalten

- 3 -

einzelner Nukleotidbausteine von dem Nukleinsäuremolekül erfolgt und

- (d) Bestimmen der Basenfolge des Nukleinsäuremoleküls durch Fluoreszenzmessung.

5

Das erfindungsgemäße Verfahren ist eine trägergestützte Sequenziermethode, bei der ein freies, zu sequenzierendes Nukleinsäuremolekül in und vorzugsweise durch einen Kanal in einer Membranstruktur geleitet wird, und während des Leitens durch den
10 Kanal bzw. vorzugsweise während des Austritts aus dem Kanal mit einem Enzym in Kontakt gebracht wird, welches das Abspalten einzelner Nukleotidbausteine von dem Nukleinsäuremolekül katalysiert. Das Enzym ist auf der Membranstruktur, vorzugsweise im Bereich der Austrittsöffnungen aus dem Kanal immobilisiert. Bevorzugt enthält die
15 Membranstruktur eine Vielzahl von Kanälen und kann somit zur gleichzeitigen Bestimmung der Basenfolge mehrerer Nukleinsäuremoleküle verwendet werden.

Die Membranstruktur kann von beliebiger Gestalt und Zusammensetzung
20 sein, sofern sie zur Immobilisierung von Enzymen und zur Ausbildung von Nanokanälen zum Durchtritt der zu sequenzierenden Nukleinsäuremoleküle geeignet ist. Beispiele für geeignete Materialien sind Glas, Kunststoff, Metalle oder Halbmetalle, wie etwa Silicium, Metalloxide, wie Siliciumoxid, Quarz etc. Desweiteren sind auch Verbundmaterialien, beispielsweise aus
25 zwei oder mehr der zuvor genannten Materialien, geeignet.

Die Enzymmoleküle werden nach bekannten Methoden auf der Membranstruktur, insbesondere im Bereich der Austrittsöffnungen der Kanäle immobilisiert. Die Bindung der Enzymmoleküle an die Membran kann
30 durch kovalente oder nicht-kovalente Wechselwirkungen erfolgen. Beispielsweise kann die Bindung der Enzymmoleküle an die Membranstruktur durch hochaffine Wechselwirkungen zwischen den

- 4 -

Partnern eines spezifischen Bindepaares, z.B. Biotin/Streptavidin oder Avidin, Hapten/Anti-Hapten-Antikörper, Zucker/Lectin etc. vermittelt werden. So können biotinylierte Enzymmoleküle an Streptavidin-beschichtete Membranstrukturen gekoppelt werden. Alternativ können die
5 Enzymmoleküle auch adsorptiv an die Membranstruktur gebunden werden. So kann eine Bindung von durch Einbau von Alkanthiolgruppen-modifizierten Enzymmolekülen an metallische Träger, z.B. Goldträger, erfolgen. Noch eine weitere Alternative ist die kovalente Immobilisierung, wobei die Bindung der Enzymmoleküle über geeignete (hetero)-
10 bifunktionelle Kopplungsreagenzien vermittelt werden kann.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird vorzugsweise als Multiplex-Verfahren zur Sequenzierung mehrerer Nukleinsäuremoleküle durchgeführt. Dazu wird günstigerweise eine Membranstruktur verwendet, die mehrere
15 Kanäle enthält. Der mittlere Durchmesser der Kanäle liegt vorzugsweise im Bereich von 10-100 nm, um den Durchtritt von jeweils einzelnen zu sequenzierenden Nukleinsäuremolekülen zu ermöglichen. Bevorzugt werden mindestens 10, mehr bevorzugt mindestens 20, besonders bevorzugt mindestens 100 und am meisten bevorzugt 1 000 oder mehr
20 Nukleinsäuremoleküle parallel sequenziert.

Die zu sequenzierenden Nukleinsäuremoleküle haben eine Länge von vorzugsweise mindestens 100 Nukleotiden, besonders bevorzugt mindestens 200 Nukleotiden. Grundsätzlich können die
25 Nukleinsäuremoleküle eine beliebige Länge aufweisen, z.B. mehrere KB oder sogar noch länger. Die maximale Länge wird lediglich durch die Lebensdauer des immobilisierten Enzyms bestimmt. Die Nukleinsäuremoleküle, z.B. DNA-Moleküle oder RNA-Moleküle, enthalten mehrere Fluoreszenzmarkierungsgruppen, wobei vorzugsweise mindestens
30 50 %, besonders bevorzugt mindestens 70 % und am meisten bevorzugt im Wesentlichen alle, z.B. mindestens 90 %, der Nukleotidbausteine von einem Basentyp eine Fluoreszenzmarkierungsgruppe tragen. Derart

- 5 -

markierte Nukleinsäuren können durch enzymatische Primerextension an einer Nukleinsäurematrize unter Verwendung einer geeigneten Polymerase, z.B. einer DNA-Polymerase wie etwa Taq-Polymerase, einer thermostabilen DNA-Polymerase von *Thermococcus gorgonarius* oder anderen
5 thermostabilen Organismen (Hopfner et al., PNAS USA 96 (1999), 3600-3605) oder einer mutierten Taq-Polymerase (Patel und Loeb, PNAS USA 97 (2000), 5095-5100) unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Nukleotidbausteine erzeugt werden.

10 Die markierten Nukleinsäuremoleküle können auch durch Amplifikationsreaktionen, z.B. PCR, hergestellt werden. So entstehen bei einer asymmetrischen PCR Amplifikationsprodukte, bei denen nur einziger Strang Fluoreszenzmarkierungen enthält. Derartige asymmetrische Amplifikationsprodukte können in doppelsträngiger Form sequenziert
15 werden. Durch symmetrische PCR werden Nukleinsäurefragmente hergestellt, bei denen beide Stränge fluoreszenzmarkiert sind. Diese beiden fluoreszenzmarkierten Stränge können separiert und getrennt in einzelsträngiger Form in die Sequenziervorrichtung eingebracht werden, so dass die Sequenz eines oder beider Komplementärstränge separat bestimmt
20 werden kann. Alternativ kann einer der beiden Stränge am 3'-Ende derart modifiziert werden, z.B. durch Einbau einer PNA-Klammer, sodass eine Abspaltung von Monomerbausteinen nicht mehr möglich ist. In diesem Fall ist eine Doppelstrangsequenzierung möglich.

25 Vorzugsweise tragen im Wesentlichen alle Nukleotidbausteine von mindestens zwei Basentypen, beispielsweise zwei, drei oder vier Basentypen, eine Fluoreszenzmarkierung, wobei jeder Basentyp günstigerweise eine unterschiedliche Fluoreszenzmarkierungsgruppe trägt. Wenn die Nukleinsäuremoleküle nicht vollständig markiert sind, so kann
30 durch parallele Sequenzierung von mehreren Molekülen dennoch die Sequenz vollständig bestimmt werden.

- 6 -

Die Nukleinsäurematrize, deren Sequenz bestimmt werden soll, kann beispielsweise aus DNA-Matrizen, wie genomischen DNA-Fragmenten, cDNA-Molekülen, Plasmiden etc., aber auch aus RNA-Matrizen, wie mRNA-Molekülen, ausgewählt werden.

5

Die Fluoreszenzmarkierungsgruppen können aus bekannten zur Markierung von Biopolymeren, z.B. Nukleinsäuren, verwendeten Fluoreszenzmarkierungsgruppen, wie etwa Fluorescein, Rhodamin, Phycoerythrin, Cy3, Cy5 oder Derivaten davon etc., ausgewählt werden.

10

Das erfindungsgemäße Verfahren beruht vorzugsweise darauf, dass in Nukleinsäurestränge eingebaute Fluoreszenzmarkierungsgruppen Wechselwirkungen mit benachbarten Gruppen, beispielsweise mit chemischen Gruppen der Nukleinsäuren, insbesondere Nukleobasen wie etwa G, oder/und benachbarten Fluoreszenzmarkierungsgruppen, eingehen, die zu einer Änderung der Fluoreszenz, insbesondere der Fluoreszenzintensität gegenüber den Fluoreszenzmarkierungsgruppen in "isolierter" Form aufgrund von Quench- oder/und Energietransfer-Vorgängen führen. Durch das Abspalten einzelner Nukleotidbausteine verändert sich die Gesamtfluoreszenz, z.B. die Fluoreszenzintensität eines Nukleinsäurestranges abhängig von der Abspaltung einzelner Nukleotidbausteine, d.h. abhängig von der Zeit. Diese zeitliche Änderung der Fluoreszenz kann parallel für eine Vielzahl von Nukleinsäuremolekülen erfasst und mit der Basenfolge der einzelnen Nukleinsäurestränge korreliert werden. Vorzugsweise werden solche Fluoreszenzmarkierungsgruppen verwendet, die, wenn sie in den Nukleinsäurestrang eingebaut sind, zumindest teilweise gequencht sind, so dass nach Abspaltung des die Markierungsgruppe enthaltenden Nukleotidbausteins oder eines benachbarten Bausteins, der ein Quenchen verursacht, die Fluoreszenzintensität erhöht wird.

15

20

25

30

- 7 -

Die Sequenzierungsreaktion des erfindungsgemäßen Verfahrens umfasst das fortschreitende Abspalten einzelner Nukleotidbausteine von den durch den Kanal geleiteten Nukleinsäuremolekülen durch immobilisierte Enzyme. Vorzugsweise erfolgt eine enzymatische Abspaltung unter Verwendung
5 einer Exonuklease, wobei Einzelstrang- bzw. Doppelstrang-Exonukleasen, die in 5'→3'-Richtung oder 3'→5'-Richtung abbauen - je nach Art der Immobilisierung der Nukleinsäurestränge auf dem Träger - eingesetzt werden können. Besonders bevorzugt werden als Exonukleasen T7 DNA-Polymerase, E.coli Exonuklease I oder E.coli Exonuklease III verwendet.

10

Während der fortschreitenden Abspaltung einzelner Nukleotidbausteine kann eine Änderung der Fluoreszenzintensität des immobilisierten Nukleinsäurestrangs oder/und des abgespaltenen Nukleotidbausteins aufgrund von Quench- oder Energietransfervorgängen gemessen werden.

15 Diese zeitliche Änderung der Fluoreszenzintensität ist von der Basenfolge des untersuchten Nukleinsäurestrangs abhängig und kann daher mit der Sequenz korreliert werden. Zur vollständigen Sequenzbestimmung eines Nukleinsäurestrangs werden üblicherweise mehrere - an unterschiedlichen Basen, z.B. A, G, C und T bzw. Kombinationen von zwei verschiedenen
20 Basen, - markierte Nukleinsäurestränge vorzugsweise durch enzymatische Primerextension, wie zuvor beschrieben, erzeugt und nacheinander durch einen Kanal oder/und durch unterschiedliche Kanäle der Membranstruktur geleitet. Gegebenenfalls kann an den zu untersuchenden Nukleinsäurestrang noch ein "Sequenzidentifikator", d.h. eine markierte
25 Nukleinsäure bekannter Sequenz, angefügt werden, z.B. durch enzymatische Reaktion mit Ligase oder/und Terminaler Transferase, so dass zu Beginn der Sequenzierung zunächst ein bekanntes Fluoreszenzmuster und anschließend erst das der unbekannten, zu untersuchenden Sequenz entsprechende Fluoreszenzmuster erhalten wird. Insgesamt können auf
30 einem Träger vorzugsweise mindestens 10 und bis zu mehr als 1 000 Nukleinsäurestränge parallel sequenziert werden.

- 8 -

Die zu sequenzierenden Nukleinsäuremoleküle können beispielsweise durch einen hydrodynamischen oder/und elektroosmotischen Fluss durch die Kanäle der Membranstruktur geleitet werden. Besonders bevorzugt umfasst das Leiten der zu sequenzierenden Nukleinsäuremoleküle das Anlegen eines elektrischen Feldes über die Membran, wobei aufgrund der negativen Ladung der Nukleinsäuremoleküle unter physiologischen Bedingungen eine Wanderung von - nach + erfolgt.

Die Detektion umfasst vorzugsweise eine Mehrpunkt-Fluoreszenzanregung durch Laser, z.B. eine Punktmatrix von Laserpunkten, erzeugt durch eine Diffraktionsoptik oder einen Quanten-Well-Laser. Die durch Anregung erzeugte Fluoreszenzemission mehrerer Nukleinsäurestränge kann durch eine Detektormatrix erzeugt werden, die beispielsweise eine elektronische Detektormatrix, z.B. eine CCD-Kamera oder eine Avalanche-Fotodiodenmatrix, umfasst. Die Detektion kann derart erfolgen, dass Fluoreszenzanregung und Detektion an allen untersuchten Nukleinsäuresträngen parallel erfolgt. Alternativ dazu kann in mehreren Schritten jeweils ein Teil der Nukleinsäurestränge unter Verwendung einer Submatrix von Laserpunkten und Detektoren, vorzugsweise unter Verwendung einer Hochgeschwindigkeitsscannerprozedur, untersucht werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Träger zur Sequenzierung von Nukleinsäuren, umfassend eine Membranstruktur, durch die mindestens ein Kanal hindurchführt, wobei ein Enzym, das ein Abspalten einzelner Nukleotidbausteine von einem Nukleinsäuremolekül katalysiert, auf der Membranstruktur im Bereich des Kanals oder der Kanäle immobilisiert ist. Der Durchmesser des Kanals ist derart, dass ein Durchtritt einzelner Nukleinsäuremoleküle erfolgen kann. Vorzugsweise ist der Durchmesser zwischen 10 bis 100 nm. Vorzugsweise enthält die Membranstruktur mehrere Kanäle zur parallelen Sequenzierung von mehreren gleichen oder/und unterschiedlichen Nukleinsäuremolekülen.

- 9 -

Noch ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Vorrichtung zur Sequenzierung von Nukleinsäuren umfassend:

- (a) einen Träger, wie zuvor spezifiziert,
- (b) Mittel zum Leiten von zu sequenzierenden Nukleinsäuremolekülen
5 durch die Kanäle des Trägers und
- (c) Mittel zum gleichzeitigen Bestimmen der Basenfolge mehrerer Nukleinsäuremoleküle aufgrund der bei Abspaltung von Nukleotidbausteinen hervorgerufenen zeitabhängigen Änderung der Fluoreszenz der Nukleinsäuremoleküle oder/und der abgespaltenen
10 Nukleotidbausteine.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann beispielsweise für die Analyse von Genomen und Transkriptomen bzw. für differenzielle Analysen, z.B. Untersuchungen bezüglich des Unterschieds im Genom bzw. Transkriptom
15 einzelner Spezies oder Organismen innerhalb einer Spezies, eingesetzt werden.

Weiterhin soll die vorliegende Erfindung durch die nachfolgenden Figuren erläutert werden.

20

Figur 1 zeigt die schematische Darstellung einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens. Eine Membranstruktur (2) enthält einen Nanokanal (4) zum Durchtritt einzelner zu sequenzierender Nukleinsäuremoleküle (6). Die Wanderungsrichtung der Nukleinsäuremoleküle durch den Kanal ist mit einem Pfeil (A) angezeigt. Zur
25 Unterstützung der Wanderung kann über die Membran ein elektrisches Feld angelegt werden. Beim Durchtritt der zu sequenzierenden Nukleinsäuremoleküle (6) durch den Kanal (4) kommen sie mit auf der Membranstruktur (2) immobilisierten Exonukleasemolekülen (8) in Kontakt. Die Exonukleasemoleküle (8) sind insbesondere im Bereich der
30 Kanalöffnungen angeordnet. Durch die Exonukleasemoleküle (8) erfolgt eine Spaltung der durch den Kanal (4) hindurchtretenden

Nukleinsäuremoleküle (6), wobei Spaltstücke (z.B. 10) entstehen. Die Fluoreszenz der Nukleinsäuremoleküle (6) oder/und der Spaltstücke (10) wird durch Fluoreszenzanregung (z.B. durch den Pfeil B dargestellt) und Messung des emittierten Fluoreszenzlichts nachgewiesen.

5

Figur 2 zeigt eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens für die Multiplexsequenzierung. Die Membranstruktur (12) enthält eine Vielzahl von Kanälen (14 a, 14 b, 14 c), die zur parallelen Sequenzierung gleicher oder unterschiedlicher Nukleinsäuremoleküle (16 a, 16 b, 16 c) dienen können. An den Kanalöffnungen sind jeweils Exonukleasemoleküle (18 a, 18 b, 18 c) immobilisiert. Die Sequenzierung kann unter Verwendung einer Lichtquellenmatrix, z.B. mehrerer Laserstrahlen oder eines durch ein Diffraktionselement aufgespaltenen Laserstrahls, oder/und einer Detektormatrix erfolgen.

15

Figur 3 zeigt eine Aufsicht auf eine zur Multiplex-Sequenzierung geeignete Membranstruktur (22) mit mehreren Kanälen (24 a, 24 b, 24c). Zumindest im Bereich der Kanalöffnungen sind auf der Membranstruktur (22) Exonukleasemoleküle (28 a, 28 b, 28 c) immobilisiert. Bei Durchtritt der zu sequenzierenden Nukleinsäuremoleküle (nicht gezeigt) durch die Kanalöffnungen erfolgt eine Abspaltung von fluoreszenzmarkierten Nukleotidbausteinen. Durch die Freisetzung der Nukleotidbausteine erhöht sich aufgrund der Abnahme der Quenchung die Fluoreszenzintensität, so dass ein für jede Base charakteristischer Photonenfluss entsteht, der durch eine bestimmte Wellenlänge λ oder/und eine Lebenszeit τ charakterisiert ist und von einer Detektormatrix registriert werden kann.

20

25

Bei der in **Figur 4** gezeigten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird ein mehrschichtiger Träger verwendet. Dieser Träger umfasst eine aus mehreren Schichten (32, 34) aufgebaute Membranstruktur, umfassend eine erste Schicht (32) mit einem ersten Kanal (36), der einen zum Durchtritt mehrerer Nukleinsäuremoleküle

30

- 11 -

ausreichenden Durchmesser von z.B. 500 bis 2000 und insbesondere ca. 1000 nm aufweist. Nach Durchtritt durch den ersten Kanal (36) gelangen die zu sequenzierenden Nukleinsäuremoleküle an die zweite Schicht (34), die als Deckmembran über der ersten Schicht ausgebildet ist und einen
5 oder mehrere zweite Kanäle (38 a, 38 b) aufweist, die einen zum Durchtritt einzelner Nukleinsäuremoleküle geeigneten Durchmesser von z.B. 10 bis 100 nm aufweisen. Durch den ersten Kanal (36) können gleichzeitig mehrere gleiche oder unterschiedliche zu sequenzierende Nukleinsäuremoleküle auf die zweite Schicht (34) der Membranstruktur und
10 einzeln in die zweiten Kanäle (38 a, 38 b) geleitet und dann - wie zuvor erläutert - durch Abspaltung einzelner Nukleotidbausteine sequenziert werden.

Bei einer aus mehreren Schichten bestehenden Membranstuktur kann die
15 Sequenzierung auch über ein Evaneszenz-basierendes Verfahren erfolgen. Das aus einer Anregungslichtquelle, z.B. einem Laser, stammende Anregungslicht wird in eine optisch transparente Schicht der Membran eingestrahlt, die als Träger der evaneszenten Welle dient. Im Bereich der Kanäle werden Photonen ausgestreut, die die dort entstehenden
20 Spaltprodukte zur Fluoreszenz anregen können. Die Detektion erfolgt durch das im Wesentlichen senkrecht vom Träger abgestrahlte Fluoreszenzemissionslicht.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Sequenzierung von Nukleinsäuren, umfassend die Schritte:
- 5
- (a) Bereitstellen eines zu sequenzierenden Nukleinsäuremoleküls, das mehrere Fluoreszenzmarkierungsgruppen enthält,
- (b) Bereitstellen einer Membranstruktur, durch die mindestens ein Kanal hindurchführt, der einen zum Durchtritt einzelner Nukleinsäuremoleküle geeigneten Durchmesser aufweist, wobei ein Enzym, das ein Abspalten einzelner Nukleotidbausteine von einem Nukleinsäuremolekül katalysiert, auf der Membranstruktur immobilisiert ist,
- 10
- (c) Leiten des zu sequenzierenden Nukleinsäuremoleküls in bzw. durch den Kanal unter Bedingungen, dass ein fortschreitendes Abspalten einzelner Nukleotidbausteine von dem Nukleinsäuremolekül erfolgt und
- 15
- (d) Bestimmen der Basenfolge des Nukleinsäuremoleküls durch Fluoreszenzmessung.
- 20
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass das zu sequenzierende Nukleinsäuremolekül in einzelsträngiger Form vorliegt.
- 25
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass das zu sequenzierende Nukleinsäuremolekül in doppelsträngiger Form vorliegt, wobei markierte Nukleotidbausteine nur von einem einzigen Strang abgespalten werden können.
- 30

- 13 -

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Nukleinsäuremoleküle derart markiert sind, dass mindestens
50 % aller Nukleotidbausteine von einem Basentyp eine
5 Fluoreszenzmarkierungsgruppe tragen.
5. Verfahren nach Anspruch 4,
dadurch gekennzeichnet,
dass im Wesentlichen alle Nukleotidbausteine von einem Basentyp
10 eine Fluoreszenzmarkierungsgruppe tragen.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch gekennzeichnet,
dass man eine Membranstruktur verwendet, die aus Metallen,
15 Halbmetallen, Metalloxiden, Glas, Quarz, Kunststoffen oder
Verbundmaterialien besteht.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6,
dadurch gekennzeichnet,
20 dass der Kanal einen Durchmesser von 10-100 nm aufweist.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7,
dadurch gekennzeichnet,
dass man eine aus mehreren Schichten aufgebaute Membranstruktur
25 verwendet, umfassend eine erste Schicht mit einem ersten Kanal,
der einen zum Durchtritt mehrerer Nukleinsäuremoleküle
ausreichenden Durchmesser aufweist, und eine zweite Schicht mit
einem zweiten Kanal, der einen zum Durchtritt einzelner
Nukleinsäuremoleküle geeigneten Durchmesser aufweist.

- 14 -

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8,
dadurch gekennzeichnet,
dass man eine Exonuklease als Enzym verwendet.
- 5 10. Verfahren nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
dass T7 DNA-Polymerase, E.coli Exonuklease I oder E.coli
Exonuklease III verwendet wird.
- 10 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Leiten des zu sequenzierenden Nukleinsäuremoleküls einen
hydrodynamischen oder/und einen elektroosmotischen Fluss durch
den Kanal umfasst.
- 15 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Leiten des zu sequenzierenden Nukleinsäuremoleküls das
Anlegen eines elektrischen Feldes über die Membran umfasst.
- 20 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Enzym im Bereich der Austrittsöffnung des Kanals auf der
Membranstruktur immobilisiert wird.
- 25 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Bestimmen der Basenfolge aufgrund der bei Abspaltung
von Nukleotidbausteinen hervorgerufenen zeitabhängigen Änderung
30 der Fluoreszenz des Nukleinsäuremoleküls oder/und der
abgespaltenen Nukleotidbausteine erfolgt.

- 15 -

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14,
dadurch gekennzeichnet,
dass mehrere zu sequenzierende Nukleinsäuremoleküle in jeweils
separate Kanäle der Membranstruktur geleitet werden und ein
gleichzeitiges Bestimmen der Basenfolge dieser mehreren
Nukleinsäuremoleküle erfolgt.
16. Verfahren nach Anspruch 15,
dadurch gekennzeichnet,
dass das gleichzeitige Bestimmen der Basenfolge mehrerer
Nukleinsäuremoleküle eine Mehrpunkt-Fluoreszenzanregung durch
Laser umfasst.
17. Verfahren nach Anspruch 15 oder 16
dadurch gekennzeichnet,
dass das gleichzeitige Bestimmen der Basenfolge mehrerer
Nukleinsäuremoleküle eine Detektion der Fluoreszenzemission
mehrerer Nukleinsäurestränge durch eine Detektionsmatrix umfasst.
18. Verfahren nach Anspruch 17,
dadurch gekennzeichnet,
dass eine CCD-Kamera oder eine Avalanche-Fotodiodenmatrix
verwendet wird.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 18,
dadurch gekennzeichnet,
dass Fluoreszenzanregung und -detektion an allen untersuchten
Nukleinsäuresträngen parallel erfolgt.

- 16 -

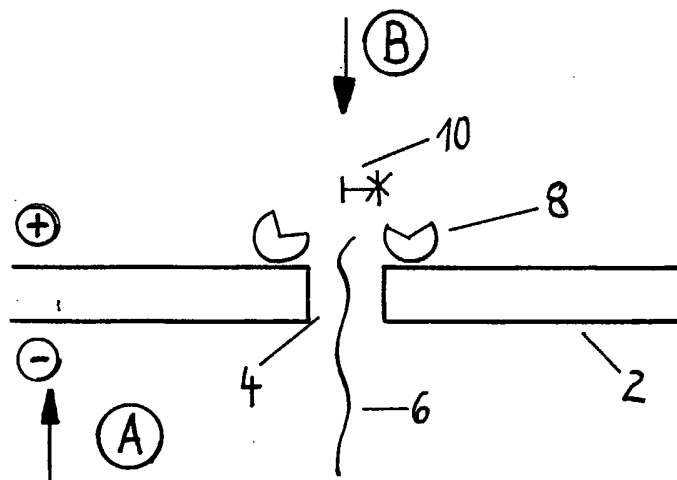
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 18,
dadurch gekennzeichnet,
dass Fluoreszenzanregung und -detektion in mehreren Schritten
jeweils an einen Teil der untersuchten Nukleinsäurestränge unter
5 Verwendung einer Submatrix von Laserpunkten und Detektoren
erfolgt.
21. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
10 dass die Fluoreszenzmarkierungsgruppen, wenn sie in die
Nukleinsäurestränge eingebaut sind, zumindest teilweise gequench
sind, und dass nach Abspaltung die Fluoreszenzintensität erhöht
wird.
- 15 22. Träger zur Sequenzierung von Nukleinsäuren, umfassend eine
Membranstruktur, durch die ein Kanal hindurchführt, der einen zum
Durchtritt einzelner Nukleinsäuremoleküle geeigneten Durchmesser
aufweist, wobei ein Enzym, das ein Abspalten einzelner
Nukleotidbausteine von einem Nukleinsäuremolekül katalysiert, auf
20 der Membranstruktur immobilisiert ist.
23. Träger nach Anspruch 22,
dadurch gekennzeichnet,
dass der Kanal einen Durchmesser von 10-100 nm aufweist.
- 25 24. Träger nach Anspruch 22 oder 23,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Membranstruktur mehrere Kanäle zur parallelen
Sequenzierung von mehreren Nukleinsäuren aufweist.

- 17 -

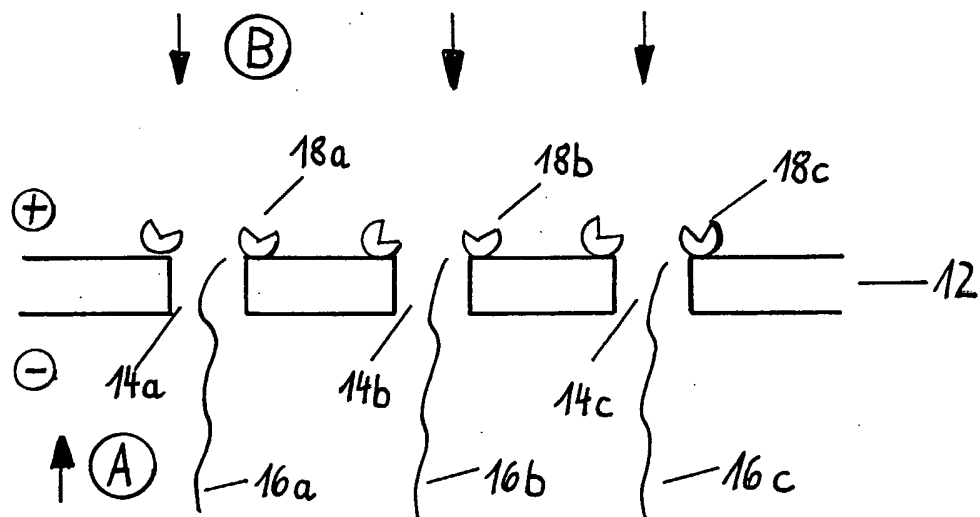
25. Vorrichtung zur Sequenzierung von Nukleinsäuren, umfassend
- (a) einen Träger nach einem der Ansprüche 22 bis 24,
 - (b) Mittel zum Leiten von zu sequenzierenden Nukleinsäuremolekülen durch die Kanäle des Trägers und
 - (c) Mittel zum gleichzeitigen Bestimmen der Basenfolge mehrerer Nukleinsäuremoleküle aufgrund der bei Abspaltung von Nukleotidbausteinen hervorgerufenen zeitabhängigen Änderung der Fluoreszenz der Nukleinsäuremoleküle oder/und der abgespaltenen Nukleotidbausteine.
26. Verwendung des Trägers nach einem der Ansprüche 22 bis 24 oder der Vorrichtung nach Anspruch 25 in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 21.

-1/2-

Figur 1

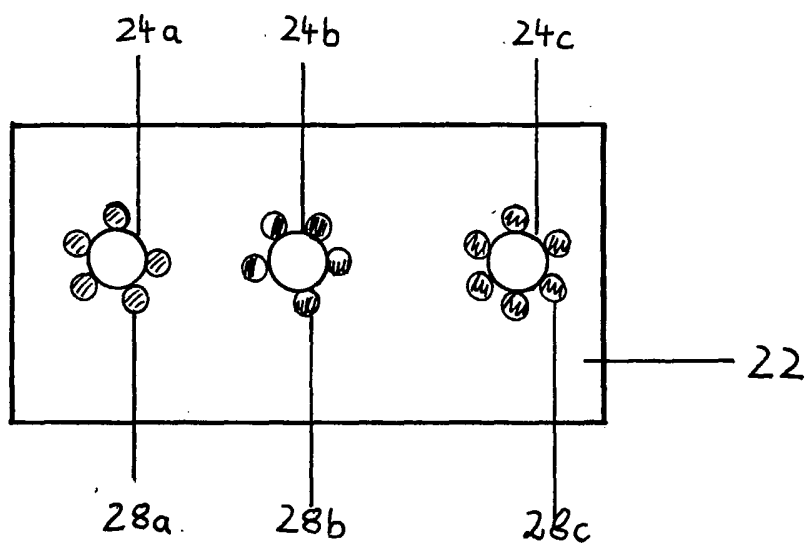


Figur 2



-2/2-

Figur 3



Figur 4

