



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 694 33 487 T2** 2004.11.25

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 723 598 B1**

(51) Int Cl.⁷: **C12Q 1/68**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 33 487.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US94/10945**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **94 931 775.4**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 95/09248**

(86) PCT-Anmeldetag: **27.09.1994**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **06.04.1995**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **31.07.1996**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **14.01.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **25.11.2004**

(30) Unionspriorität:

127420 **27.09.1993** **US**

303058 **08.09.1994** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU,
MC, NL, PT, SE**

(73) Patentinhaber:

Arch Development Corp., Chicago, Ill., US

(72) Erfinder:

DRMANAC, Radoje, Woodridge, US

(74) Vertreter:

BOEHMERT & BOEHMERT, 80336 München

(54) Bezeichnung: **METHODEN UND ZUSAMMENSETZUNGEN ZUR EFFIZIENTEN NUKLEINSAEURESEQUENZIERUNG**

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.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung ist eine "Continuation-in-part" der gleichzeitig anhängigen U. S. Anmeldung mit der Seriennr. 08/303,058, die am 8. September 1994 eingereicht wurde; welche eine "Continuation-in-part" der U. S. Patentanmeldung mit der Seriennr. 08/127,420 ist, die am 27. September 1993 eingereicht wurde; der gesamte Text und die Figuren dieser Offenbarung sind hierin spezifisch ohne Verzicht durch Verweis aufgenommen. Die US-Regierung besitzt gemäß den Fördermitteln des Energieministeriums LDRD 03235 und der Vertragsnr. W-31-109-ENG-38 zwischen den U. S. Energieministeriums und der University of Chicago, die für das Argonne National Laboratory auftritt Rechte an der vorliegenden Erfindung.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

1. Bereich der Erfindung

[0002] Die vorliegende Erfindung betrifft im Allgemeinen den Bereich der Molekularbiologie. Die Erfindung stellt insbesondere neue Verfahren und Zusammensetzungen zur Verfügung, um eine hocheffiziente Sequenzierungen von Nukleinsäuremolekülen zu ermöglichen. Die Verfahren der Erfindung sind für die Sequenzierung langer Nukleinsäuremoleküle, die Chromosomen und RNA, umfassen ohne Klonierungs- oder Subklonierungsschritte geeignet.

2. Beschreibung des bekannten Stands der Technik

[0003] Die Nukleinsäuresequenzierung bildet heutzutage einen wesentlichen Bestandteil des wissenschaftlichen Fortschritts. Die Bestimmung der Sequenz d. h. der Primärstruktur von Nukleinsäuremolekülen und Sequenzen ist im Hinblick auf einzelne Projekte von Bedeutung, die eine Vielzahl bestimmter Zielbereiche untersuchen. Die Informationen die aus der Sequenzierung erlangt werden wirken sich auf die Wissenschaft, die Medizin, dem Ackerbau und alle Bereiche der Biotechnologie aus. Die Nukleinsäuresequenzierung ist natürlich essentiell für das humane Genomprojekt und andere große Unternehmungen deren Ziel es ist unser Verständnis der Evolution und der Funktion von Organismen zu stärken und eine Einsicht in die Gründe für verschiedene Krankheitsstadien zur Verfügung zu stellen.

[0004] Die Nützlichkeit der Nukleinsäuresequenzierung ist offensichtlich. Beispielsweise findet das humane Genomprojekt (HGP), eine multinationale Anstrengung, die der Sequenzierung des gesamten menschlichen Genoms gewidmet ist, an verschiedenen Zentren statt. Im allgemeinen ist der Fortschritt in diesem Bereich jedoch sowohl langsam als auch kostspielig. Die Nukleinsäuresequenz wird normalerweise auf Polyacrylamid-Gelen bestimmt, die DNA-Fragmente im Bereich von 1 bis 500 bp auftrennen, die sich in der Länge um jeweils ein Nukleotid unterscheiden. Die tatsächliche Bestimmung der Sequenz, d. h. die Reihenfolge der einzelnen A, G, C und T Nukleotide kann auf zweierlei Wege erreicht werden. Erstens unter Verwendung des Maxam und Gilbert-Verfahrens des chemischen Abbaus des DNA-Fragments an spezifischen Nukleotiden (Maxam & Gilbert, 1977) oder zweitens unter Verwendung des Dideoxy-Kettenabbruchsequenzierungsverfahrens, das von Sanger und Kollegen beschrieben wurde (Sanger et al., 1977). Beide Verfahren sind zeitaufwendig und arbeitsintensiv.

[0005] In neuerer Zeit sind andere Verfahren der Nukleinsäuresequenzierung vorgeschlagen wurden, die keinen Elektrophoreseschritt einsetzen, diese Verfahren können zusammen als Sequenzierung durch Hybridisierung oder durch SDH bezeichnet werden (Drmanac et al., 1991; Cantor et al., 1992; Drmanac & Crkvenjakov, U. S. Patent 5,202,231). Die Entwicklung einiger dieser Verfahren hat zu den neuen Sequenzierungswerkzeugen des Festträgertyps geführt, die als Sequenzierungschips bekannt sind. Die Nützlichkeit von SDH wird im allgemeinen durch die Tatsache verdeutlicht, daß U. S. Patente für diese Technologie erteilt worden sind. Obwohl SDH das Potential für die Erhöhung der Geschwindigkeit besitzt mit der Nukleinsäuren sequenziert werden können leiden alle SDH-Verfahren jedoch immer noch unter mehreren Nachteilen.

[0006] SDH kann auf zwei grundsätzlich unterschiedlichen Wegen durchgeführt werden, die häufig als Format 1 und Format 2 bezeichnet werden. (Cantor et al., 1992). Beim Format 1 werden Oligonukleotide unbekannter Sequenz im allgemeinen Nukleotide mit einer Länge von 100-1000 Nukleotiden auf einem festen Träger oder einem Filter angeordnet, so daß die unbekanntenen Proben selbst immobilisiert sind Strezoska et al., 1991; Drmanac & Crkvenjakov, U.S. Patent 5,202,231). Kopien dieser Anordnung werden dann durch Hybridisierung mit Gruppen markierter Sonden mit einer Länge von etwa 6 bis 8 Resten befragt. Beim Format 2 wird ein Sequenzierungschip aus einer Anordnung von Oligonukleotiden mit bekannten Sequenzen mit einer Länge von etwa 6 bis 8 Resten gebildet (Southern, WO 89/10977; Khrapko et al., 1991; Southern et al., 1992). Die

Nukleinsäuren unbekannter Sequenz werden dann markiert und es wird ihnen erlaubt mit den immobilisierten Oligos zu hybridisieren.

[0007] Unglücklicher Weise haben diese beiden SDH-Formate mehrere Einschränkungen insbesondere die Notwendigkeit vorangehender DNA-Klonierungsschritte. Beim Format 1 umfassen andere bedeutende Probleme das Befestigen der verschiedenen Nukleinsäurestücke, die sequenziert werden sollen, an der Oberfläche des festen Trägers oder das Zubereiten einer großen Menge längerer Sonden. Beim Format 2 umfassen die Hauptprobleme das Markieren der Nukleinsäure unbekannter Sequenz, das hohe Signal zu Rauschverhältnis, die sich im allgemeinen ergeben, und die Tatsache, daß nur kurze Sequenzen bestimmt werden können. Weitere Probleme des Formats 2 umfassen die Bildung einer Sekundärstruktur die den Zugang zu einigen Zielen verhindert und die verschiedenen Bedingungen, die für Sonden mit verschiedenem GC-Gehalt notwendig sind. Daher würde der Stand der Technik fraglos von einem neuen Verfahren für die Nukleinsäuresequenzierung profitieren und insbesondere von einem, daß das ermüdende Verfahren der Klonierung- und/oder der Subklonierung vermeidet.

[0008] EP-A-0711362 das AT, BE CH, DE, DK, ES, FR, GB, IT, LI, NL, SE bestimmt ist unter Art. 54 (3) EPÜ zitiert worden. Dieses Dokument des Stand der Technik offenbart ein Reagenz, das einen Rest eines Analyten umfaßt, der mindestens zwei Reste eines Analyten umfaßt, die mit einem Markierungsrest verbunden sind, der ein oder mehrere Reportergruppen umfaßt, die für den Nachweis durch Massenspektrometrie angepaßt sind. Eine Vielzahl dieser Reagenzien kann in dem Testverfahren verwendet werden.

Zusammenfassung der Erfindung

[0009] Die vorliegende Erfindung versucht diese und andere Nachteile die dem Stand der Technik innewohnen dadurch auszuräumen, daß sie neue Verfahrenszusammensetzung für die Sequenzierung von Nukleinsäure zur Verfügung stellt. Die hierin beschriebenen neuen Verfahren sind im allgemeinen von den Erfindern Format 3 genannt worden und stellen eine deutliche Verbesserung gegenüber den bestehenden Format 1- und Format 2-SDH Verfahren da. Bei der Format 3-Sequenzierung, die durch die Erfindung zur Verfügung gestellt wird, werden Nukleinsäuresequenzen mittels Hybridisierung mit zwei Gruppen kleiner Oligonukleotidsonden bekannter Sequenzen wie in den angefügten Ansprüchen definiert, bestimmt. Die Verfahren der Erfindung erlauben es, eine hoch unterscheidende Sequenzierung extrem großer Nukleinsäuremoleküle, die chromosomales Material oder RNA umfassen, ohne vorherige Klonierung, Subklonierung oder Vervielfältigung. Des weiteren erfordern die vorliegenden Verfahren keine Große Anzahl von Sonden, die komplexe Synthese langer Sonden oder die Markierung eines komplexen Gemisches von Nukleinsäuresegmenten.

[0010] Um die Sequenz von Nukleinsäuren gemäß den Verfahren der vorliegenden Erfindung zu bestimmen würde man im allgemeinen Sequenzen der Nukleinsäuren durch Hybridisierung mit komplementären Sequenzen von zwei Gruppen kleiner Oligonukleotidsonden (Oligos) definierter Länge und bekannter Sequenz, die die meisten Kombinationen der Sequenzen für die Probelänge abdecken, bestimmen. Man würde dann die identifizierten Sequenzen analysieren, um Bereiche der identifizierten Sequenzen zu bestimmen, die überlappen und die gesamte Nukleinsäuresequenz aus solchen überlappenden Sequenzen wieder zusammensetzen oder aufbauen.

[0011] Die Sequenzierungsverfahren können unter Verwendung einer sequentiellen Hybridisierung mit komplementären Sequenzen aus diesen zwei Gruppen kleiner Oligos durchgeführt werden. Alternativ kann ein Modus, der als "zyklierend" beschrieben werden kann eingesetzt werden in dem zwei Gruppen kleiner Oligos mit den unbekannt Sequenzen gleichzeitig hybridisiert werden. Der Begriff "zyklierend" wird als der unterscheidende Teil der Technik verwendet und kommt vom Ansteigen der Temperatur um die Hybride "zu schmelzen" die nicht komplementär sind. Solche zyklierenden Techniken werden üblicher Weise in anderen Bereichen der Molekularbiologie wie bei der PCR eingesetzt und werden vom Fachmann ohne weiteres im Lichte der vorliegenden Offenbarung verstanden werden.

[0012] Die Erfindung ist auf die Sequenzierung von Nukleinsäuremolekülen sehr großer Länge anwendbar. Praktischerweise wird das Nukleinsäuremolekül, das sequenziert werden soll im allgemeinen fragmentiert sein, um Nukleinsäurefragmente kleiner oder mittelgroßer Länge zur Verfügung zu stellen, mit denen ohne weiteres umgegangen werden kann. Der Begriff Nukleinsäurefragment wie hier verwendet bezeichnet im allgemeinen ein Nukleinsäuremolekül mit einer Länge von etwa 10 Basenpaaren (bp) und etwa 100 bp. Als die am meisten bevorzugten Verfahren der Erfindung werden die erwogen, bei denen die Nukleinsäuremoleküle, die sequenziert werden sollen, behandelt werden, um Nukleinsäurefragmente mittlerer Länge zur Verfügung zu stellen, d. h. von zwischen etwa 10 bp und etwa 40 bp. Es sollte jedoch betont werden, daß die vorliegende

Erfindung kein Verfahren für die komplette Sequenzierung kleiner Nukleinsäurefragmente ist, vielmehr ist es ein Verfahren zur Sequenzierung von Nukleinsäuremolekülen an sich, welche das Bestimmen von Teilen der Sequenz innerhalb des Moleküls umfaßt unabhängig davon ob dies unter Verwendung des gesamten Moleküls getan wird oder der Einfachheit halber ob dies dadurch erreicht wird, daß das Molekül zuerst in Teilstücke kleinerer Größen von etwa 4 bis etwa 1000 Basen zerteilt wird.

[0013] Die Sequenzen der Nukleinsäuremoleküle werden durch Hybridisierung mit kleinen Oligonukleotidsonden bekannter Sequenz bestimmt. Im Hinblick auf den Verweis auf "kleine Oligonukleotidsonden" bedeutet der Begriff "klein" Sonden mit einer Länge weniger als 10 bp und vorzugsweise Sonden mit einer Länge von etwa 4 bp und etwa 9 bp. In einer beispielhaften Sequenzierungsausführungsform werden Proben mit einer Länge von 6 bp als besonders nützlich erwogen. Damit diese Oligonukleotidgruppen alle Sequenzkombinationen für die gewählte Sondenlänge abdecken wird ihre Anzahl durch 4^F wiedergegeben werden, wobei F die Länge der Sonde ist. Beispielsweise würde die Gruppe für ein 4-mer 256 Sonden umfassen; für ein 5-mer würde die Gruppe 1024 Sonden umfassen; für ein 6-mer 4096 Sonden, für ein 7-mer 16384 Sonden und so weiter. Die Synthese von Oligos dieser Länge ist im Stand der Technik reine Routine und kann durch automatisierte Synthese erreicht werden.

[0014] In den Verfahren der vorliegenden Erfindung wird eine Gruppe der kleinen Oligonukleotidsonden mit bekannter Sequenz, die als die erste Gruppe bezeichnet werden kann, an einem festen Träger befestigt sein d. h. in einer solchen Weise an einem Träger befestigt sein, daß sie zur Teilnahme an Hybridisierungsreaktionen zur Verfügung stehen. Die andere Gruppe der kleinen Oligonukleotidsonden bekannter Sequenz, die als die zweite Gruppe bezeichnet werden kann, werden Sonden sein, die in Lösungen vorliegen und die mit einer nachweisbaren Markierung markiert sind. Die Gruppen der Oligos können Sonden der gleichen oder unterschiedlicher Länge umfassen.

[0015] Das Verfahren der sequentiellen Hybridisierung bedeutet das Nukleinsäuremoleküle oder Fragmente unbekannter Sequenz mit verschiedenen Gruppen der Oligonukleotidproben bekannter Sequenzen zu verschiedenen Zeiten hybridisiert werden kann (**Fig. 1**). Die Nukleinsäuremoleküle oder Fragmente werden im allgemeinen denaturiert sein was die Hybridisierung erlaubt und zu der ersten immobilisierten Gruppe der Sonden unter unterscheidenden Hybridisierungsbedingungen hinzugefügt werden, um sicher zu stellen das nur Fragmente mit komplementären Sequenzen hybridisieren. Die Fragmente mit nicht komplementären Sequenzen werden entfernt und die nächste Runde des unterscheidenden Hybridisierung wird dann durch das Hinzufügen der zweiten markierten Gruppe der Sonden in Lösung zu der bereits gebildeten Kombination von Fragmenten und Sonden durchgeführt. Die markierten Sonden, die angrenzend zu einer der fixierten Sonde hybridisieren, werden an dem Träger befestigt bleiben und können nachgewiesen werden was nicht der Fall ist wenn es einen Abstand zwischen der fixierten und der markierten Sonde gibt (**Fig. 1**).

[0016] Das Verfahren der gleichzeitigen Hybridisierung bedeutet das Nukleinsäuremoleküle unbekannter Sequenz mit den verschiedenen Gruppen der Oligonukleotidsonden bekannter Sequenz gleichzeitig in Berührung gebracht werden können. Die Hybridisierung wird unter unterscheidenden Hybridisierungsbedingungen auftreten. Fragmente mit nicht-komplementären Sequenzen werden dann "geschmolzen" d. h. durch eine Erhöhung der Temperatur entfernt und die nächste Runde der unterscheidenden Hybridisierung wird dann durchgeführt, wodurch es allen komplementären zweiten Sonden erlaubt wird, zu hybridisieren. Markierte Sonden, die angrenzend an fixierte Sonden hybridisieren, werden dann in derselben Weise nachgewiesen.

[0017] Die Nukleinsäuresequenzen die "komplementär" sind, sind die, die dazu in der Lage sind Basenpaarungen gemäß den normalen Watson-Crick Komplementaritätsregeln zu bilden und Abwandlungen dieser Regeln finden auf modifizierte Basen Anwendung. Das bedeutet, daß die größeren Purine oder modifizierten Purine immer mit dem kleineren Pyrimidinen eine Basenpaarung eingehen werden, um nur bekannte Kombinationen zu bilden. Diese umfassen die Standardpaare von Guanin gepaart mit Cytosin (G:C) und Adenin gepaart mit entweder Thymin (A:T) im Falle von DNA oder Adenin gepaart mit Uracil (A:U) im Falle von RNA. Die Verwendung modifizierter Basen oder sogenannter universeller Basen (M. Nichols et al., 1994) wird auch erwogen.

[0018] Wie hierin verwendet bedeutet der Begriff "komplementäre Sequenzen" Nukleinsäuresequenzen, die im wesentlichen über ihre gesamte Länge komplementär sind und die nur sehr wenige Basenfehlpaarungen aufweisen. Beispielsweise können Nukleinsäuresequenzen mit einer Länge von 6 Basen als komplementär bezeichnet werden, wenn sie an 5 von 6 Positionen hybridisieren mit nur einer Fehlpaarung. Selbstverständlich sind Nukleinsäuresequenzen, die "vollständig komplementär" sind, Nukleinsäuresequenzen, die vollständig über ihre gesamte Länge komplementär sind und die keine Fehlpaarung aufweisen.

[0019] Nach der Identifizierung verschiedener individueller Sequenzen, die Teil des Nukleinsäurefragments sind, durch die Hybridisierung mit den Oligos bekannter Sequenz werden diese individuellen Sequenzen als nächstes analysiert, um Bereiche der Sequenzen zu bestimmen, die überlappen. Beispielsweise werden Teile der Sequenzen in den das 5'-Ende dasselbe wie das 3'-Ende einer anderen Sequenz ist oder umgekehrt, identifiziert. Die komplette Sequenz des Nukleinsäuremoleküls oder Fragments kann dann abgegrenzt werden d. h. es kann aus den so bestimmten überlappenden Sequenzen rekonstruiert werden.

[0020] Das Verfahren der Identifizierung überlappender Sequenzen und der Rekonstruktion der kompletten Sequenz wird im allgemeinen durch eine Computeranalyse erreicht werden. Beispielsweise wird wenn eine markierte Probe 5'-TTTTTT-3' mit dem Punkt hybridisiert, der die fixierte Sonde 5'-AAAAAA-3' enthält, eine 12-mer Sequenz innerhalb des Nukleinsäuremoleküls definiert nämlich 5'-AAAAATTTTT-3' (SEQ ID NR: 1), d. h. die Sequenz der zwei hybridisierten Sonden wird kombiniert, um eine vorher unbekannte Sequenz zu offenbaren. Die nächste Frage, die beantwortet werden muß, ist welches Nukleotid als nächstes auf die bestimmte 5'-AAAAATTTTT-3' (SEQ ID NR: 1) Sequenz folgt. Es gibt vier Möglichkeiten die durch die fixierte Sonde 5'-AAAAAT-3' und die markierte Sonden 5'-TTTTTA-3' für A; 5'-TTTTTT-3' für T; 5'-TTTTTC-3' für C und 5'-TTTTTG-3' für G dargestellt werden. Wenn beispielsweise die Sonde 5'-TTTTTC-3' positiv ist und die anderen drei negativ sind dann wird die zusammengesetzte Sequenz auf 5'-AAAAATTTTTTC-3' (SEQ ID NR 2) verlängert. Im nächsten Schritt bestimmt ein Algorithmus welche der markierten Sonden TTTTCA, TTTTCT, TTTTCC oder TTTTCG positiv an dem Punkt ist, der die markierte Sonde AAAATT enthält. Das Verfahren wird wiederholt bis alle positiven (F+P) Oligonukleotidsequenzen verwendet worden sind oder bis sie als Falschpositive bestimmt worden sind.

[0021] Die vorliegende Erfindung stellt daher einen sehr effizienten Weg der Sequenzierung von Nukleinsäurefragmenten und Moleküle großer Länge zur Verfügung. Große Nukleinsäuremoleküle wie hierin definiert sind die Moleküle, die vor der Sequenzierung fragmentiert werden müssen. Sie werden im allgemeinen wenigstens eine Länge von 45 oder 50 Basenpaaren aufweisen und werden meistens länger sein. Tatsächlich können die Verfahren der Erfindung verwendet werden, um Nukleinsäuremoleküle nahezu ohne Längenobergrenze zu sequenzieren, so daß Sequenzen mit etwa 100 bp, einer Kilobase (kb), 100 kb, einer Megabase (Mb), und 50 Mb oder mehr sequenziert werden können bis zu und umfassend gesamte Chromosomen, wie humane Chromosomen, die im allgemeinen etwa eine Länge von 100 Mb aufweisen. Eine solche große Zahl ist ohne weiteres im Umfang der vorliegenden Erfindung und die Sequenzierung dieser Anzahl von Basen wird zwei Gruppen von 8-Meren oder 9-Meren (so daß $F + P \sim 16-18$) erfordern. Die zu sequenzierenden Nukleinsäuren können DNA wie cDNA, genomische DNA, mikropräparierte Chromosomenbanden, Cosmid-DNA- oder YAC-Einschübe sein, oder können RNA, die mRNA, rRNA, tRNA oder snRNA umfaßt, sein.

[0022] Die Verfahren des Bestimmens der Sequenz eines langen Nukleinsäuremoleküls beinhalten einfach das Identifizieren von Sequenzen der Länge $F + P$ in dem Molekül und das Kombinieren der Sequenzen unter Verwendung eines geeigneten Algorithmus. Praktisch gesprochen würde man am wahrscheinlichsten zuerst das Nukleinsäuremolekül, das sequenziert werden soll, fragmentieren, um kleinere Fragmente wie Nukleinsäurefragmente mittlerer Länge zu erzeugen. Man würde dann Sequenzen einer Länge $F + P$ durch Hybridisierung z. B. sequentielle Hybridisierung der Fragmente an komplementären Sequenzen aus den zwei Gruppen der kleinen Oligonukleotidsonden bekannter Sequenz wie oben beschrieben bestimmen. In dieser Weise kann die gesamte Nukleinsäuresequenz extrem großer Moleküle aus überlappenden Sequenzen der Länge $F + P$ rekonstruiert werden.

[0023] Unabhängig davon ob die Nukleinsäure, die sequenziert werden soll, selbst ein Fragment mittlerer Länge ist oder ob sie zuerst behandelt wird, um Fragmente einer solchen Länge zu erzeugen, ist das Verfahren zur Identifizierung solcher Nukleinsäurefragmente durch Hybridisierung mit zwei Gruppen kleiner Oligonukleotidsonden bekannter Sequenz für die hierin offenbarten Sequenzierungsverfahren elementar. Diese Verfahren umfassen im allgemeinen die folgenden Schritte:

- (a) In-Kontakt-bringen einer Zielnukleinsäure mit einer Gruppe (einer) immobilisierten(r) Oligonukleotidsonde(n) und mindestens einer markierten Oligonukleotidsonde aus einer Gruppe markierter Oligonukleotidsonden unter Hybridisierungsbedingungen, die wirksam sind, die Hybridisierung zwischen: (i) komplementären Sequenzen der Zielnukleinsäure und der immobilisierten Sonden und (ii) komplementären Sequenzen der Zielnukleinsäure und der markierten Sonde(n), zu erlauben;
- (b) kovalentes Verbinden der immobilisierten Sonde(n) und der markierten Sonde(n), die angrenzend an dasselbe Zielnukleinsäuremolekül hybridisieren.
- (c) Nachweisen der Markierung der markierten Oligonukleotidsonde(n), die kovalenten mit der(n) immobilisierten Sonde(n) verbunden ist(sind); und
- (d) Nachweisen mindestens einer Nukleotidsequenz in der Zielnukleinsäure durch Schritte, die das Verbinden

den der Nukleotidsequenzen der nachgewiesenen Oligonukleotidsonde(n) mit den Nukleotidsequenzen der jeweils verbundenen immobilisierten Oligonukleotidsonde(n) umfassen,

dadurch charakterisiert, daß der Schritt des Nachweises den Nachweis der Markierung umfaßt, während sie an den Hybridisierungskomplex gebunden ist, welcher zwischen der(n) angrenzend hybridisierten, immobilisierten Sonde(n) und der(n) markierten Sonde(n) gebildet wird(werden).

[0024] Die Hybridisierungs- oder "Waschbedingungen" die gewählt werden können, um entweder eine oder beide Hybridisierungsschritte durchzuführen, können gemäß der jeweils gewählten Sequenzierungsausführungsform verändert werden. Beispielsweise können beide Hybridisierungsbedingungen so entworfen werden, es den Oligonukleotidsonden zu erlauben an ein gegebenes Nukleinsäurefragment zu hybridisieren, wenn sie komplementäre Sequenzen enthalten, d. h. im wesentlichen übereinstimmende Sequenzen, wie die Sequenzen, die an fünf von sechs Positionen hybridisieren. Der Hybridisierungsschritt würde vorzugsweise unter Verwendung einer einfachen Robotervorrichtung durchgeführt, wie sie im gegenwärtigen Sequenzierungsverfahren routinemäßig verwendet wird.

[0025] Alternativ können die Hybridisierungsbedingungen entworfen werden, um nur den Oligonukleotidsonden und Fragmenten die Hybridisierung zu erlauben, die vollständig komplementäre Sequenzen aufweisen. Diese stärker unterscheidenden oder "stringenteren" Bedingungen können für die beiden unterschiedlichen Schritte des sequentiellen Hybridisierungsverfahrens oder für einen der Schritte allein verwendet werden. In solchen Fällen würde es den Oligonukleotidsonden, unabhängig davon, ob immobilisierten oder markierten Sonden, nur dann erlaubt werden an ein gegebenes Nukleinsäurefragment zu hybridisieren, wenn diese vollständig komplementäre Sequenzen mit dem Fragment teilen.

[0026] Die gewählten Hybridisierungsbedingungen werden im allgemeinen den Grad der Komplexität vorgeben, der erforderlich ist, um die erhaltenen Daten zu analysieren. Gleichermaßen werden die Computerprogramme, die erhältlich sind, um alle erzeugten Daten zu analysieren die Hybridisierungsbedingungen bestimmen, die in einem gegebenen Labor verwendet werden müssen. Beispielsweise würden in den am meisten unterscheidenden Verfahren beide Hybridisierungsschritte unter Bedingung durchgeführt werden die es nur den Oligos und Fragmenten, die vollständig komplementäre Sequenzen aufweisen, erlauben zu hybridisieren, durchgeführt werden. Da es keine fehlgepaarten Basen geben wird beinhaltet dieses Verfahren die am wenigsten komplexen Computeranalysen und ist aus diesem Grund gegenwärtig für die Ausführung der Erfindung das bevorzugte Verfahren. Die Verwendung von weniger unterscheidenden Bedingungen für einen oder beide Hybridisierungsschritte fällt jedoch auch in den Umfang der vorliegenden Erfindung.

[0027] Geeignete Hybridisierungsbedingungen für die Verwendung in einem oder beiden Schritten können routinemäßig durch Optimierungsverfahren oder "Pilotstudien" bestimmt werden. Verschiedene Sorten der Pilotstudien werden routinemäßig vom Fachmann der Nukleinsäuresequenzierung bei der Etablierung von Arbeitsverfahren und bei der Anpassung von Verfahren für die Verwendung in einem gegebenen Laboratorium durchgeführt. Beispielsweise können Bedingungen wie die Temperatur, die Konzentration jeder der Komponenten; die Länge der Zeit der Schritte; die verwendeten Puffer und deren pH und Ionenstärke variiert werden und dadurch optimiert werden. Das Nukleinsäuresequenzierungsverfahren der Erfindung beinhaltet einen unterscheidenden Schritt, um nachgeordnete Hybridisierungskomplex auszuwählen, die unmittelbar angrenzende immobilisierte und markierte Sonden umfassen, im Unterschied zu denen, die nicht unmittelbar angrenzend sind und die durch eine, zwei und mehr Basen getrennt sind. Eine Vielzahl von Verfahren ist für die Entfernung von Sonden, die nicht unmittelbar angrenzend zu einer befestigten Sonde hybridisiert sind, erhältlich, d.h. die nicht Rücken an Rücken hybridisiert sind, von denen jedes nur die unmittelbar angrenzenden nachfolgenden Komplexe aufrechterhält.

[0028] Gemäß der vorliegenden Erfindung werden die unmittelbar angrenzenden immobilisierten und markierten Sonden ligiert, d.h. kovalent miteinander verbunden bevor die Waschschriffe durchgeführt werde, um alle nicht ligierten Sonden zu entfernen. Die Ligation kann durch die Behandlung mit einer Lösung, die ein chemisches Ligationsmittel wie z. B. wasserlösliches Carbodiimid oder Cyanogenbromid enthält, durchgeführt werden. Bevorzugter wird ein Ligaseenzym wie die T₄-DNA Ligase aus dem T₄-Bakteriophagen, die kommerziell von vielen Quellen (z. B. Biolabs) erhältlich ist, eingesetzt werden. In jedem Fall wäre man dann in der Lage die nicht unmittelbar angrenzenden markierten Sonden durch stringenteren Waschbedingungen, die nicht die kovalent verbundenen markierten und fixierten Sonden beeinflussen kann, zu entfernen.

[0029] Die verbleibenden angrenzenden sekundären Komplexe würden dann über die Beobachtung des Ortes der Markierung der markierten Sonden, die innerhalb des Komplexes vorhanden sind, beobachtet. Die Oli-

gonukleotidsonden können mit einer chemisch nachweisbaren Markierung wie einem fluoreszierenden Farbstoff markiert sein oder angemessen modifiziert sein, um durch eine chemolumineszente Entwicklungsprozedur oder durch eine radioaktive Markierung wie ^{35}S , ^3H , ^{32}P oder ^{33}P nachgewiesen zu werden, wobei ^{33}P gegenwärtig bevorzugt ist. Die Sonden können auch mit nicht-radioaktiven Isotopen markiert sein und durch Massenspektrometrie nachgewiesen werden.

[0030] Gegenwärtig ist das am meisten bevorzugte Verfahren, das für die Ausführung der vorliegenden Erfindung erwogen wird das Durchführen der Hybridisierungsschritte unter Bedingungen die entworfen wurden um nur den Oligonukleotidsonden und Fragmenten die Hybridisierung zu erlauben die vollständig komplementäre Sequenzen aufweisen und das es nur den Sonden erlaubt hybridisiert zu bleiben, die unmittelbar aneinander angrenzend sind. Dieses Verfahren erfordert anschließend die am wenigsten komplexe Computeranalyse.

[0031] Wenn das Nukleinsäuremolekül unbekannter Sequenz länger als etwa 45 oder 50 by ist beinhaltet ein wirksames Verfahren für die Bestimmung seiner Sequenz im allgemeinen die Behandlung des Moleküls, um Nukleinsäurefragmente von mittlerer Länge zu erzeugen und das Bestimmen der Sequenzen von diesen Fragmenten. Das Nukleinsäuremolekül unabhängig davon ob es DNA oder RNA ist, kann durch eine Vielzahl von Verfahren, die beispielsweise das Schneiden mit Restriktionsenzymverdau, das Scheren durch physikalische Mittel wie Ultraschallbehandlung, die NaOH-Behandlung oder das Niederdruckscheren umfassen, fragmentiert werden.

[0032] In bestimmten Ausführungsformen, die z. B. kleine Oligonukleotidsonden mit einer Länge zwischen etwa 4 bp und etwa 9 bp beinhalten, kann man darauf abzielen Nukleinsäurefragmente mit einer Länge von 10 bp und etwa 40 bp zu erzeugen. Selbstverständlich würde Sonden größerer Länge allgemein bei der Sequenzierung von Nukleinsäurefragmenten größerer Länge verwendet werden und umgekehrt. In bestimmten bevorzugten Ausführungsformen werden die verwendeten kleinen Oligonukleotidsonden eine Länge von etwa 6 bp aufweisen und die Nukleinsäurefragmente, die sequenziert werden sollen, werden im allgemeinen eine Länge von etwa 20 bp aufweisen. Wenn gewünscht können die Fragmente der Größe nach aufgetrennt werden, um die mit einer geeigneten Länge zu erhalten z. B. können die Fragmente auf einem Gel wie auf einem Agarosegel aufgetrennt werden und die mit ungefähr der gewünschten Länge können ausgeschnitten werden.

[0033] Das Verfahren zur Identifizierung der Sequenz eines Nukleinsäuremoleküls kann auch unter der Benutzung der folgenden Begriffe verdeutlicht werden. Anfänglich würde man zufällig eine Menge der zu sequenzierenden Nukleinsäure fragmentieren, um ein Gemisch von Nukleinsäurefragmenten der Länge T zur Verfügung zu stellen. Man würde dann eine Anordnung immobilisierter Oligonukleotidsonden bekannter Sequenz und der Länge F und eine Gruppe markierter Oligonukleotidsonden in Lösung mit bekannter Sequenz und der Länge P zubereiten, wobei $F + P \leq T$ sind und vorzugsweise wobei $T \approx 3 F$ ist.

[0034] Man würde dann die Anordnung der immobilisierten Oligonukleotidsonden mit dem Gemisch der Nukleinsäurefragmente unter Hybridisierungsbedingungen in Kontakt bringen, die wirksam sind um die Bildung von primären Komplexen hybridisierter komplementärer Sequenzen der Länge F und nicht hybridisierter Fragmentsequenzen der Länge $T - F$ zu erlauben. Vorzugsweise würden die hybridisierten Sequenzen der Länge F nur vollständig komplementäre Sequenzen umfassen.

[0035] Die primären Komplexe würden dann mit der Gruppe der markierten Oligonukleotidsonden unter Hybridisierungsbedingungen in Kontakt gebracht, die dazu in der Lage sind die Bildung sekundärer Komplexe mit hybridisierten komplementären Sequenzen mit der Länge F und angrenzend hybridisierten komplementären Sequenzen der Länge P zu erlauben. In bevorzugten Ausführungsformen würde es nur den markierten Sonden erlaubt werden zu hybridisieren, die vollständig komplementäre Sequenzen aufweisen, und würde es nur den Sonden erlaubt werden hybridisiert zu bleiben, die unmittelbar an die immobilisierte Sonde angrenzend hybridisiert sind. In der am meisten bevorzugten Ausführungsform würden die immobilisierten und markierten Oligonukleotidsonden auch in dieser Phase ligiert werden.

[0036] Als nächstes würde man die sekundären Komplexe durch den Nachweis der Gegenwart der Markierung nachweisen und die Sequenzen der Länge $F + P$ der Nukleinsäurefragmente in den sekundären Komplexen durch die Kombination der bekannten Sequenzen der hybridisierten immobilisierten und den markierten Proben identifizieren. Sequenzabschnitte der Länge $F + P$ die überlappen würden dann identifiziert werden wodurch es erlaubt werden würde die gesamte Nukleinsäuresequenz des Moleküls aus den bestimmten überlappenden Sequenzen zu rekonstruieren oder zusammensetzen.

[0037] In den Verfahren der Erfindung können die Oligonukleotide der ersten Gruppe an einem festen Träger

durch ein beliebiges dem Fachmann bekanntes Verfahren befestigt, d.h. immobilisiert sein. Beispielsweise kann die Befestigung über die adressierbare Laser-aktivierte Photoentschätzung stattfinden (Fodor et al., 1991; Pease et al., 1994). Ein allgemein bevorzugtes Verfahren ist die Befestigung der Oligos über die Phosphatgruppe unter Verwendung von Reagenzien wie Nukleosidphosphoramidit oder Nukleosidwasserstoffphosphorat wie durch Southern & Maskos beschrieben (PCT Patentanmeldung WO 90/03382, hierin durch Verweis aufgenommen) und unter Verwendung von Glas-, Nylon- oder Teflonträgern. Ein anderes bevorzugtes Verfahren ist das der Licht-erzeugten Synthese die auch Pease et al. (1994; hierin durch Verweis aufgenommen) beschrieben wurde. Man kann auch Träger-gebundene Oligonukleotidanordnungen, wie sie beispielsweise durch Affymetrix und Beckman zum Kauf angeboten werden, erwerben.

[0038] Die immobilisierten Oligonukleotide können in eine Anordnung gebracht werden die alle Sonden oder Untergruppen der Sonden mit einer bestimmten Länge (vorzugsweise etwa 4 – 10 Basen) und noch bevorzugter in mehrfach Anordnungen immobilisierter Oligonukleotide, um sogenannte "Sequenzierungschips" zu bilden. Ein Beispiel eines Chips ist der, bei dem hydrophobe Bereiche verwendet werden, um unterscheidbare räumliche Bereiche zu erzeugen. Die Sequenzierungschips können für verschiedene Anwendungen wie für die Kartierung, die partielle Sequenzierung, die Sequenzierung von Zielregionen für diagnostische Zwecke, die mRNA-Sequenzierung und die Genom-Sequenzierung in großen Maßstab entworfen werden. Für jede Anwendung kann ein spezifischer Chip mit verschiedenen großen Sonden oder mit einer unvollständigen Gruppe von Sonden entworfen werden.

[0039] In einer beispielhaften Ausführungsform wären beide Gruppen der Oligonukleotidsonden Sonden mit einer Länge von 6 Basen d. h. 6-meren. In diesem Fall enthält jede Oligogruppe 4096 verschiedene Sonden. Die erste Sondengruppe ist vorzugsweise in einer Anordnung auf einem Mikrochip befestigt; am zweckmäßigsten ist sie in 64 Reihen und 64 Spalten angeordnet. Die zweite Gruppe mit 4096 Oligos würde mit einer nachweisbaren Markierung markiert werden und in einer Gruppe unterschiedlicher Röhrchen verteilt werden. In diesem Beispiel würden 4096 Chips in einer großen Anordnung oder mehreren Anordnungen verbunden werden. Nach der Hybridisierung der Nukleinsäurefragmente würde eine kleine Menge der markierten Oligonukleotidproben zu jedem Mikrochip für den zweiten Hybridisierungsschritt hinzugegeben werden, wobei nur eines der 4096 Nukleotide zu jedem Mikrochip hinzugegeben werden würde.

[0040] Weitere Ausführungsformen der Erfindung umfassen Kits für die Verwendung bei der Nukleinsäuresequenzierung. Solche Kits werden im allgemeinen einen festen Träger umfassen an dem eine Reihe von Oligonukleotidsonden bekannter Sequenzen befestigt sind wie in **Fig. 2a**, **Fig. 2b** und **Fig. 2c** gezeigt, wobei die Oligonukleotide in der Lage sind an Hybridisierungsreaktionen teilzunehmen und eine Gruppe von Behältern, die Lösungen markierter Oligonukleotidsonden bekannter Sequenzen umfassen. Zusammensetzungen wie die in **Fig. 4** gezeigten werden auch erwogen. Dies stellt die Verwendung der universellen Base entweder als Befestigungsverfahren oder am Endpunkt dar, um der Hybridisierung der Fragmente eine weitere Dimension hinzuzufügen.

[0041] In den Kits können die befestigten Oligonukleotidsonden und die in Lösung eine Länge von zwischen etwa 4 bp und etwa 9 bp aufweisen wobei die mit einer Länge von 6 bp bevorzugt sind. Die Oligonukleotide können mit chemisch nachweisbaren oder mit radioaktiven Markierungen markiert sein wobei ³²P-markierte Sonden im allgemeinen bevorzugt sind und ³³P-markierte Sonden sogar noch bevorzugter sind. Die Kits können auch chemische oder andere Ligierungsmittel wie ein DNA-Ligaseenzym umfassen. Eine Vielzahl anderer zusätzlicher Zusammensetzungen und Materialien kann in den Kits umfaßt werden wie 96-Spitzen- oder 96-Nadelvorrichtungen, Puffer, Reagenzien für das Schneiden langer Nukleinsäuremoleküle und Hilfsmittel für die Größenselektion der DNA-Fragmente. Die Kits können sogar markierte RNA-Sonden umfassen, so daß die Sonden durch RNase-Behandlung entfernt werden können und die Sequenzierungschips wiederverwendet werden können.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0042] **Fig. 1:** Grundlegende Schritte des Hybridisierungsverfahrens.

[0043] Schritt 1: Die unmarkierte zu sequenzierende Ziel-DNA (T) wird unter unterscheidenden Bedingungen an eine Anordnung befestigter Oligonukleotidsonden hybridisiert. Punkte mit Sonde Fx und Fy sind dargestellt. Die komplementären Sequenzen für Fx und Fy sind an verschiedenen Positionen von T. Schritt 2: Markierte Sonden, Pi (eine Sonde pro Chip) werden mit der Anordnung hybridisiert. Gezeigt ist eine Sonde, die ein komplementäres Ziel auf T besitzt das angrenzend zu Fx aber nicht zu Fy ist. Schritt 3: Durch Anwenden von unterscheidenden Bedingungen oder Reagenzien werden Komplexe ohne angrenzende Sonden selektiv ge-

schmolzen. Ein besonderes Beispiel ist die Ligation einer markierten Sonde an eine fixierte Sonde wenn die markierte Sonde "Rücken an Rücken" mit der befestigten Sonde hybridisiert. Positive Signale werden nur im Fall von angrenzenden Sonden nachgewiesen wie bei Fx und Pi und in einem besonderen Beispiel nur im Falle ligierter Sonden.

[0044] Fig. 2A, Fig. 2B und Fig. 2C geben Bestandteile des beispielhaften Sequenzierungskits wieder.

[0045] Fig. 2A Sequenzierungschips, die eine Anordnung von 4^P identischen Bereichen darstellen, die jeweils identische (oder verschiedene) Anordnungen von Oligonukleotiden enthalten. Bereiche können durch physische Barrieren oder durch hydrophobe Streifen getrennt werden. Es wird erwogen, daß sich 4000–16000 Oligochips in der Anordnung befinden.

[0046] Fig. 2B ist eine Vergrößerung eines Chipabschnitts der 4^F -Punkte umfaßt, wobei jeder eine bestimmte Oligonukleotidsonde (4000–16000) die auf dieser Fläche synthetisiert oder aufgebracht wurde, aufweist. Die Punkte können nur wenige Mikron klein sein und die Größe der Bereiche beträgt etwa 1 mm bis etwa 10 mm.

[0047] Fig. 2C stellt eine Gruppe von Röhrcchen dar oder eine oder mehrere Mehrfachvertiefungsplatten mit einer angemessenen Anzahl von Vertiefungen (in diesem Fall 4^P -Vertiefungen). Jede Vertiefung enthält eine Menge eines spezifisch markierten Oligonukleotids. Weitere Mengen der Sonden könne unmarkiert aufbewahrt werden, wenn die Markierung nicht während der Synthese vorgenommen wird, in diesem Fall wird ein Sequenzierungskit notwendige Bestandteile für die Sondenmarkierung umfassen. Die Linien, die Röhrcchen/Vertiefung mit den Chipbereichen verbinden, stellen einen Schritt in der Sequenzierungsprozedur dar, bei dem eine Menge der markierten Probe auf einen Chipbereich übertragen wird. Das Übertragen kann durch pipettieren (Ein- oder Mehrkanal) oder durch eine Nadelanordnung, die Flüssigkeit durch Oberflächenspannung transferiert, durchgeführt. Die Übertragungswerkzeuge können auch in dem Sequenzierungskit umfaßt sein.

[0048] Fig. 3A, Fig. 3B und Fig. 3C. Die Hybridisierung von DNA-Fragmenten, die durch Zufallsschneiden einer Menge des DNA-Moleküls hergestellt wurden. In Fig. 3A ist das DNA-Fragment T1 derart, daß es die vollständigen Ziele für sowohl die befestigten und die nicht befestigten Sonden enthält. Fig. 3B gibt den Fall wieder bei dem das DNA-Fragment T2 nicht angemessen geschnitten ist. In Fig. 3C ist genug Platz, damit die Probe P hybridisieren kann aber die angrenzende Sequenz ist dazu nicht komplementär. In beiden Fällen B und C wird das Signal aufgrund der Sättigung der Moleküle der befestigten Sonde F verringert sein. Die gleichzeitige Hybridisierung mit DNA-Fragmenten und markierten Sonden und das Zyklieren des Hybridisierungsverfahrens sind einige mögliche Wege um die Ausbeute richtiger angrenzender Hybridisierungen zu erhöhen.

[0049] Fig. 4. Verwendung der universellen Base als Linker oder in der terminalen Position für die Hybridisierung. Die universellen Basen (M-Base, Nichols et al., 1994) oder alle vier Basen können bei der Sondensynthese hinzugefügt werden. Dies ist eine Möglichkeit, um die Länge der Sonden und dadurch die Stabilität der Duplexe zu erhöhen ohne die Anzahl der Sonden zu erhöhen. Auch stellt die Verwendung universeller Basen am freien Ende der Sonden einen Abstandshalter zur Verfügung, der es erlaubt die Sequenz in einem anderen Leseraster zu lesen.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

[0050] Die Bestimmung der Sequenzen von Nukleinsäuremolekülen ist von grundsätzlichem Nutzen in allen Bereichen der Grundlagen- und der angewandten biologischen Forschung (Drmanac und Crkvenjakov, 1990). Die vorliegende Erfindung stellt neue und effiziente Verfahren für die Verwendung bei der Sequenzierung oder Analyse von Nukleinsäuremolekülen zur Verfügung. Eine beabsichtigte Verwendung dieser Methode ist zusammen mit anderen Sequenzierungstechniken bei der Arbeit an dem human Genomprojekt (HGP).

[0051] Gegenwärtig sind zwei Verfahren zur Sequenzierung durch Hybridisierung, SDH, bekannt. In dem ersten Format 1 werden unbekannte genomische DNAs oder Oligonukleotide mit einer Länge von 100–2000 Nukleotiden auf einem festen Substrat angeordnet. Diese DNAs werden dann durch Hybridisierung mit einer Gruppe markierter Sonden, die im allgemeinen 6- bis 8-Mere sind, befragt. Bei der umgekehrten Technik dem Format 2 werden Oligomere mit 6- bis 8 Nukleotiden auf einem festen Träger immobilisiert und es wird ihnen erlaubt sich an Teile klonierter und markierter DNA anzulagern.

[0052] In jeder An der SDH-Analyse müssen viele Schritte umfaßt sein, um bei einer bestimmten Sequenz anzukommen. Bestimmte Probleme gegenwärtiger SDH-Verfahren sind die, die mit der Synthese großer Zahlen von Sonden und den Schwierigkeiten der wirksamen unterscheidenden Hybridisierung assoziiert sind. Eine

vollständige Paarungs-Fehlpaarungsunterscheidung ist aus zwei Hauptgründen schwierig. Zuerst ist die Fehlpaarung am Ende von Sonden die länger als 10 Basen sind sehr wenig unterscheidend und zweitens erzeugt das komplexe Gemisch der markierten DNA-Segmente, die sich ergeben wenn lange DNA-Fragmente analysiert werden, einen hohen Hintergrund.

[0053] Die vorliegende Erfindung stellt eine wirksame unterscheidende Hybridisierung ohne eine große Sondenanzahl oder Sonden mit einer erhöhten Länge zur Verfügung und beseitigt auch viele der Markierungs- und Klonierungsschritte die besondere Nachteile jedes der bekannten SDH-Verfahren sind. Die offenbarten hoch-effizienten Nukleinsäureverfahren die als Format 3-Sequenzierung bezeichnet werden beruhen auf der Hybridisierung mit zwei Gruppen kleiner Oligonukleotidsonden bekannter Sequenzen und verdoppelt damit zumindest die Sequenz die bestimmt werden kann. Diese Verfahren erlauben es extrem große Nukleinsäuremoleküle, die Chromosomen umfassen, zu sequenzieren und sie lösen verschiedene andere SDH-Probleme wie beispielsweise die Befestigung oder Markierung vieler Nukleinsäurefragmente. Die Erfindung ist extrem leistungsfähig, da sie auch verwendet werden kann um RNA und selbst nicht vervielfältigte RNA-Proben zu sequenzieren.

[0054] Anschließend an die vorliegende Erfindung wie sie in Drmanac (1994) offenbart wurde, wurde eine andere Abwandlung von SDH beschrieben, die als positionelle SDH bezeichnet wurde (PSDH) (Broude et al., 1994). PSDH ist im Grunde genommen eine Variante der Format 2-SDH (in der Oligonukleotide bekannter Sequenzen immobilisiert werden, um an Nukleinsäuren unbekannter Sequenz zu hybridisieren die zuvor markiert worden sind). In PSDH sind die immobilisierten Sonden statt einfach einzelsträngigen Sonden Duplexe die einzelsträngige 3'-Überhänge enthalten. Die biotinylierten Duplexsonden werden auf Streptavidin-beschichteten magnetischen Kügelchen immobilisiert, um eine Sorte der immobilisierten Sonde zu bilden und dann mit ³²P-markierten Zielnukleinsäuren gemischt, um sequenziert zu werden. T4 DNA-Ligase wird dann hinzugefügt, um alle hybridisierte Ziel-DNA an das kürzere Ende der Duplexsonde zu ligieren.

[0055] Obwohl es einen interessanten Ansatz darstellt, stellt die PSDH (wie durch Broude et al., 1994 berichtet) keine deutliche Verbesserung gegenüber der bestehenden SDH-Technologie dar. Beispielsweise verlängert PSDH anders als die Format 3-Methode der vorliegenden Erfindung die Länge der Sequenz, die in einer Runde des Verfahrens bestimmt werden kann, nicht. PSDH behält auch die beschwerliche Anforderungen der Markierung der unbekanntes Ziel-DNA bei, die nicht für das Format 3 erforderlich ist. Im allgemeinen wird PSDH für die Verwendung in vergleichenden Studien oder bei der Kartierung statt für die de novo Genom-Sequenzierung vorgeschlagen. Sie unterscheidet sich daher deutlich vom Format 3 welches obwohl umfassend auf alle Bereiche der Sequenzierung anwendbar ein sehr leistungsfähiges Werkzeug für die Verwendung bei der Sequenzierung selbst der größten Genome ist.

[0056] Die zu sequenzierenden Nukleinsäuren können zuerst fragmentiert werden. Dies kann durch alle Mittel erreicht werden, die beispielsweise das Schneiden durch Restriktionsenzymverdau insbesondere mit Cvi Ii wie durch Fitzgerald et al. (1992) beschrieben; das Scheren durch physikalische Mittel wie durch die Ultraschallbehandlung; durch NaOH-Behandlung und ähnliches umfassen. Wenn gewünscht können Fragmente einer geeigneten Länge wie zwischen etwa 10 bp und etwa 40 bp aus einem Gel ausgeschnitten werden. Die gesamte Nukleinsäuresequenz des Ausgangsmoleküls wie eines humanen Chromosoms würde durch die Definition der in dem Ausgangsmolekül vorhandenen F + P Sequenzen und das Zusammensetzen von Teilen überlappender F + P Sequenzen bestimmt werden. Dies erfordert daher nicht den Zwischenschritt der Bestimmung der Fragmentsequenzen vielmehr wird die Sequenz des Gesamtmoleküls aus den ermittelten F + P-Sequenzen zusammengebaut.

[0057] Zum Zwecke der folgenden Diskussion wird im allgemeinen angenommen werden, daß die Nukleinsäuren, die sequenziert werden, aus vier Basen bestehen. Diese sind A, G, C, T für DNA und A, G, C und U für RNA. Es kann jedoch in bestimmten Ausführungsformen vorteilhaft sein, modifizierte Basen in den kleinen Oligonukleotidsonden zu verwenden. Um die Erfindung auszuführen würde man im allgemeinen zuerst eine Zahl kleiner Oligonukleotidsonden definierter Länge zubereiten, die alle Sequenzkombinationen für eine Sonde dieser Länge abdecken. Diese Zahl wird durch 4^N (4 hoch N) wiedergegeben wobei die Länge der Sonde als groß N bezeichnet wird. Beispielsweise gibt es 4096 mögliche Sequenzen für eine 6-mer Sonde ($4^6=4096$).

[0058] Eine Gruppe solcher Sonden der Länge F (4^F) würde in einer quadratischen Anordnung auf einen Mikrochip befestigt werden der im Bereich von 1 mm^2 oder 1 cm^2 sein kann. Im vorliegenden Beispiel würden diese in 64 Reihen und 64 Spalten angeordnet werden. Selbstverständlich würde man sicherstellen, daß die Oligosonden befestigt werden oder in anderer Weise an der Mikrochipoberfläche immobilisiert werden, so daß sie in der Lage sind an Hybridisierungsreaktionen teilzunehmen. Eine weitere Gruppe Oligos der Länge P der

Zahl 4^P würde auch synthetisiert werden. Die Oligos in dieser "P-Gruppe" würden mit einer nachweisbaren Markierung markiert werden und würden in eine Gruppe von Röhrchen verteilt werden (**Fig. 2A**, **Fig. 2B** und **Fig. 2C**).

[0059] 4^P der Chips würden bei einer großen Anordnung (oder mehreren Anordnungen von etwa 10 – 100 cm^2 für eine geeignete Größe) kombiniert werden wobei P zu der Länge der Oligonukleotide in der zweiten Oligomergruppe korrespondiert (**Fig. 2A**, **Fig. 2B** und **Fig. 2C**). Wiederum als geeignetes Beispiel wird P so gewählt das es sechs ist ($P = 6$).

[0060] Die zu sequenzierenden Nucleinsäuren würden fragmentiert werden, um kleinere Nucleinsäurefragmente unbekannter Sequenz zu ergeben. Die durchschnittliche Länge dieser Fragmente, die als T bezeichnet wird, sollte im allgemeinen größer sein als die kombinierte Länge von F und P und kann in etwa das Dreifache der Länge von F betragen (d.h. $F + P \leq T$ und $T \approx 3F$). In dem vorliegenden Beispiel würde man darauf abzielen Nucleinsäurefragmente mit einer Länge von ungefähr 20 Basenpaaren zu erzeugen. Diese Fragmente würden denaturiert werden und zu der großen Anordnungen unter Bedingungen hinzugefügt werden, die die Hybridisierung an komplementäre Sequenzen ermöglichen.

[0061] In der einfachsten und gegenwärtig bevorzugten Form der Erfindung werden die Hybridisierungsbedingungen so gewählt, daß sie das Auftreten deutlicher Hybridisierungen nur dann erlauben wenn sechs aufeinanderfolgende Nucleotide in einem Nucleinsäurefragment komplementär zu allen Nucleotiden einer F-Oligonukleotidsonde waren. Solche Hybridisierungsbedingungen würden durch routinemäßige Optimierungspilotstudien bestimmt werden, in dem Bedingungen wie die Temperatur, die Konzentration der verschiedenen Komponenten, die Länge der Zeit der Schritte und die verwendeten Puffer umfassend den pH des Puffers variiert würden.

[0062] In diesem Stadium würde jeder Mikrochip bestimmte Hybridisierungskomplexe umfassen. Diese lägen in Form eines Sonden:Fragmentkomplexes vor, in dem die gesamte Sequenz der Sonde an das Fragment hybridisiert ist, aber in dem das Fragment, das länger ist, einige nicht-hybridisierten Sequenzen aufweist, die einen "Schwanz" oder "Schwänze" des Komplexes bilden. In diesem Beispiel hätten komplementäre hybridisierende Sequenzen eine Länge F und die nicht hybridisierenden Sequenzen eine Gesamtlänge $T - F$. Der komplementäre Teil der Sequenz kann an oder in Richtung auf das entsprechende Ende liegen, so daß ein einzelner längerer nicht-hybridisierender Schwanz gebildet wird. Alternativ kann der komplementäre Teil des Fragments in Richtung auf das entgegengesetzte Ende hin liegen, so daß zwei nicht hybridisierte Schwänze gebildet werden (**Fig. 3A**, **Fig. 3B** und **Fig. 3C**).

[0063] Nach dem Waschen, um die nicht komplementären Nucleinsäurefragmente die nicht hybridisiert sind zu entfernen würde eine kleine Menge der markierten Oligonukleotide der Gruppe P zu jedem Mikrochip für die Hybridisierung an die Nucleinsäurefragmentschwänze unbekannter Sequenz, die aus den Sonden:Fragmentkomplexen hervorgehen, gegeben werden. Nur eines jeder der 4^P Nucleotide würden zu jedem Mikrochip hinzugegeben. Wiederum ist es gegenwärtig bevorzugt Hybridisierungsbedingungen zu verwenden, die das Auftreten eines deutlichen Bindens nur erlauben, wenn alle Nucleotide der markierten Sonde komplementär zu den sechs nachfolgenden Nucleotiden des Nucleinsäurefragmentschwanzes sind. Die Hybridisierungsbedingungen würden durch Pilotstudien, wie oben beschrieben, bestimmt in den Komponenten wie die Temperatur, die Konzentration, die Zeit, die Puffer und ähnliche optimiert werden.

[0064] In diesem Stadium würde jeder Mikrochip dann "sekundäre hybridisierte Komplexe" enthalten. Diese lägen in Form eines Sonde:Fragment:Sonde-Komplexes vor, in dem die gesamte Sequenz jeder Sonde an das Fragment hybridisiert wäre und in dem das Fragment wahrscheinlich einige nicht hybridisierte Sequenzen aufweist. In diesen sekundären nicht hybridisierten Komplexen kann die immobilisierte Sonde und die markierte Sonde so hybridisiert werden, daß die zwei Sonden unmittelbar angrenzend oder "Rücken an Rücken" liegen. Da jedoch die Fragmente im allgemeinen länger sein werden als die Summe der Längen der Sonden, kann die immobilisierte Sonde und die markierte Sonde an das Fragment nicht angrenzender Position, die durch eine oder mehr Basen getrennt sind, hybridisiert sein.

[0065] Die großen Anordnungen würden dann in einem Verfahren behandelt werden, um nicht hybridisierte markierte Sonden zu entfernen. In bevorzugten Ausführungsformen würde das eingesetzte Verfahren nicht nur nicht-hybridisierte markierte Sonden sondern auch die nicht-angrenzenden hybridisierten Sonden von der Anordnung entfernt. Das Verfahren würde unterscheidende Bedingungen verwenden, um es zu erlauben die sekundären Hybridisierungskomplexe, die angrenzende immobilisierte und markierte Sonden umfassen, von den sekundären Hybridisierungskomplexen zu unterscheiden, in denen das Nucleinsäurefragment an zwei Sonden

hybridisiert ist die aber nicht angrenzend sind. Das ist ein wichtiger Aspekt der Erfindung, da er die letztendliche Darstellung eines Abschnittes einer Fragmentsequenz erlaubt der zu den kombinierten Sequenzen der immobilisierten Sonde und der markierten Sonde korrespondiert.

[0066] Der verwendete Unterscheidungsprozeß, um nicht hybridisierte und nicht angrenzend hybridisierte Sonden von der Anordnung zu entfernen, während er angrenzend hybridisierte Sonden angelagert beläßt, umfaßt, daß alle angrenzenden Sonden kovalent verbunden werden z. B. durch Behandlung mit einer Lösung, die ein chemisches Ligierungsmittel oder bevorzugter ein Ligaseenzym wie die T₄ DNA-Ligase (Landegren et al. 1988; Wu & Wallace 1989) enthält.

[0067] In jedem Fall würde die gesamte Anordnung stringenten Waschbedingungen unterworfen, so daß nur die Markierung, die mit der Anordnung assoziiert bleiben, in der Form von Sonden-Fragment-Sondenkomplexen mit angrenzend hybridisierten Teilen der Länge F + P (d. h. 12 Nukleotide im vorliegenden Beispiel) vorliegen würden. Durch die Verwendung dieser Zwei-Schritt-Hybridisierungsreaktion ist eine sehr große Unterscheidung auf Grund der drei oder vier berücksichtigten Unterscheidungsverfahren möglich: Unterscheidende Hybridisierung des Fragments T an die F-Basen lange Sonde; Unterscheidende Hybridisierung der P-Basen langen Sonde an Fragment T; Unterscheidende Stabilität des vollübereinstimmenden Hybrids (F + T + P) im Vergleich zu P-Hybriden oder selbst zu fehlgepaarten Hybriden, die nicht aneinandergrenzende F + P Sonden enthalten; und unterscheidende Ligation der zwei Endbasen von F und P.

[0068] Man würde dann die sogenannten angrenzenden sekundären Komplexe durch das Beobachten des Ortes der zurückbleibenden Markierung auf der Anordnung nachweisen. Aus der Position der Markierung kann eine F + P (z.B. 12) Nukleotide lange Sequenz des Fragments durch die Kombination der bekannten Sequenzen der mobilisierten und der markierten Sonden bestimmt werden. Die vollständigen Nukleinsäuresequenzen des Ausgangsmoleküls, wie eines humanen Chromosoms, kann dann aus den so bestimmten überlappenden F + P Sequenzen konstruiert oder zusammengesetzt werden.

[0069] Wenn bei dem Sequenzierungsverfahren eine Ligation verwendet wird kann der übliche Oligonukleotidchip nicht erneut verwendet werden. Der Erfinder geht davon aus, daß dies nicht einschränkend ist da eine Vielzahl von Verfahren für die Wiederverwertung erhältlich sind. Beispielsweise kann man eine spezifisch spaltbare Bindung zwischen den Sonden erzeugen und dann diese Bindung nach dem Nachweis spalten. Alternativ kann man Ribonukleotide für die zweite Sonde, die Sonde P, verwenden oder man kann ein Ribonukleotid für die Verbindungsbase in der Sonde P verwenden, so daß diese Sonde anschließend durch eine RNase oder eine Uracil-DNA-Glycosylat Behandlung entfernt werden kann (Craig et al. 1989). Andere erwogene Verfahren sind die Bildung von Bindungen durch chemische Ligation, die selektiv gespalten werden kann (Dolinnaya et al., 1988).

[0070] Weitere Variationen und Verbesserungen dieser Sequenzierungsmethode werden auch erwogen und fallen in den Umfang der vorliegenden Erfindung. Dies umfaßt die Verwendung modifizierter Oligonukleotide, um die Spezifität oder Effizienz der Verfahren zu erhöhen gleich den die durch Hoheisel & Lehrach (1990) beschrieben worden. Zyklisierende Hybridisierungen können auch verwendet werden, um das Hybridisierungssignal zu verstärken wie es bei der PCR-Technologie verwendet wird. In diesen Fällen würde man Zyklen mit verschiedenen Temperaturen verwenden, um bestimmte Sonden wieder zu hybridisieren. Die Erfindung stellt auch das Bestimmen von Verschiebungen im Leseraster durch die Verwendung äquimolarer Mengen von Sonden, die eine andere Base an der Endposition aufweisen, zur Verfügung. Beispielsweise unter Verwendung äquimolarer 7-Mere in denen die ersten sechs Basen dieselbe definierte Sequenz aufweisen und die letzte Position alternativ A, T, C, oder G sein können.

[0071] Die folgenden Beispiele werden aufgenommen, um bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung darzustellen. Es sollte vom Fachmann erkannt werden, daß die Techniken in den folgenden Beispielen, Techniken darstellen, für die der Erfinder entdeckt hat, daß sie in der Ausführung der Erfindung gut funktionieren und die daher als bevorzugte Weise ihrer Ausführung angesehen werden können. Der Fachmann sollte jedoch im Lichte der vorliegenden Offenbarung erkennen, daß in den spezifisch offenbarten Ausführungsformen viele Veränderungen durchgeführt werden können.

BEISPIEL I

HERSTELLUNG VON TRÄGER-GEBUNDENEN OLIGONUKLEOTIDEN

[0072] Oligonukleotide, d.h. kleine Nukleinsäuresegmente können ohne weiteres beispielsweise über die di-

rekte Synthese des Oligonukleotids durch chemische Mittel wie es üblicher Weise unter Verwendung automatisierter Oligonukleotidsynthesizer durchgeführt wird, zubereitet werden.

[0073] Träger-gebundene Oligonukleotide können durch jedes dem Fachmann bekannte Verfahren unter Verwendung jedes geeigneten Trägers wie Glas, Polysterol oder Teflon zubereitet werden. Eine Strategie besteht in dem exakten Aufpunkten von Oligonukleotiden, die durch Standardsynthesevorrichtungen synthetisiert werden. Die Immobilisierung kann durch die passive Adsorption (Inouye & Hondo, 1990); unter Verwendung von UV-Licht (Nagata et al., 1985; Dahlen et al., 1987; Morriey & Collins, 1989) oder durch die kovalente Bindung Basenmodifizierter DNA (Keller et al., 1988; 1989) erreicht werden; alle Literaturzitate werden hierin spezifisch aufgenommen.

[0074] Eine weitere Strategie die eingesetzt werden kann ist die Verwendung der starken Biotin-Streptavidin Interaktion zur Verknüpfung. Beispielsweise beschreiben Broude et al. (1994) die Verwendung biotinylierter Sonden, obwohl dies Duplexsonden sind, die auf Streptavidin-beschichteten magnetischen Kügelchen immobilisiert sind. Streptavidin-beschichtete Kügelchen können von Dynal, Oslo gekauft werden. Natürlich ist dieselbe Verknüpfungsschemie auch auf die Beschichtung jeder Oberfläche mit Streptavidin anwendbar. Die biotinylierten Sonden können von verschiedenen Quellen wie z. B. von Operon Technologies (Alameda, CA) gekauft werden.

[0075] Die Nunc Laboratories (Naperville, IL) verkaufen auch geeignetes Material das verwendet werden kann. Die Nunc Laboratories haben ein Verfahren entwickelt durch das DNA kovalent an die Mikrovertiefungsfläche gekoppelt werden kann, das CovaLink NH genannt wird.

[0076] CovaLink NH ist eine Polysteroloberfläche die mit sekundären Aminogruppen (> NH) die als Brückenköpfe für weitere kovalente Verknüpfungen dienen, beschichtet ist. Die CovaLink Module können von Nunc Laboratories gekauft werden. Die DNA-Moleküle können an CovaLink ausschließlich an dem 5'-Ende durch Phosphoramidatbindung gebunden werden, was die Immobilisierung von mehr als 1 pmol DNA erlaubt (Rasmussen et al., 1991).

[0077] Die Verwendung von CovaLink NH-Streifen für die kovalente Bindung von DNA-Molekülen an dem 5'-Ende ist beschrieben worden (Rasmussen et al., 1991). In dieser Technologie wird eine Phosphoramidatbindung verwendet (Chu et al., 1983). Dies ist vorteilhaft da die Immobilisierung unter Verwendung nur einer einzelnen kovalenten Bindung bevorzugt ist. Die Phosphoramidatbindung verbindet die DNA mit den sekundären Aminogruppen des Cova-Link NH, die am Ende von Abstandshalterarmen, die über einen 2 nm langen Abstandshalterarm kovalent auf die Polysteroloberfläche aufgebracht sind, positioniert sind. Um ein Oligonukleotid durch eine Phosphoramidatbindung an CovaLink NH zu verknüpfen, muß das Oligonukleotidende eine 5'-Endphosphatgruppe aufweisen. Es ist daher vielleicht sogar für Biotin möglich kovalent an CovaLink gebunden zu werden und dann kann Streptavidin verwendet werden, um die Sonden zu binden.

[0078] Genauer gesagt umfaßt das Verknüpfungsverfahren das Auflösen der DNA in Wasser (7,5 ng/µl) und das Denaturieren für 10 Minuten bei 95°C und das Kühlen auf Eis für 10 Minuten. Eiskaltes 0,1 M 1-Methylimidazol, pH 7,0 (1-Melm₇) wird dann bis zu einer Endkonzentration von 10 mM 1-Melm₇ hinzugefügt. Eine ssDNA-Lösung wird dann auf die auf Eis stehenden CovaLink NH Streifen (75 µl/Vertiefung) verteilt.

[0079] Carbodiimid 0,2 M 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) aufgelöst in 10 mM 1-Melm₇ wird frisch zubereitet und mit 25 µl pro Vertiefung hinzugefügt. Die Streifen werden für 5 Stunden bei 50°C inkubiert. Nach der Inkubation werden die Streifen z.B. mit Nunc-Immuno Wash gewaschen; zuerst werden die Vertiefungen 3 mal gewaschen dann werden sie mit Waschlösung für 5 Minuten befeuchtet und schließlich 3 mal gewaschen wobei die Waschlösung 0,4 N NaOH, 0,25% SDS erhitzt auf 50°C ist).

[0080] Es wird erwogen das ein weiteres geeignetes Verfahren für die Verwendung in der vorliegenden Erfindung das ist, daß in der PCT Patentanmeldung WO 90/03382 (Southern & Maskos), das hierin durch Verweis aufgenommen wird, beschrieben ist. Dieses Verfahren zur Zubereitung eines Oligonukleotids, das einen Träger gebunden ist, beinhaltet das Befestigen eines Nukleosid 3'-Reagenz durch eine Phosphatgruppe mittels einer kovalenten Phosphordiesterverknüpfung an aliphatische Hydroxylgruppen, die von dem Träger getragen werden. Das Oligonukleotid wird dann auf dem getragenen Nukleosid synthetisiert und die Schutzgruppen von der synthetischen Oligonukleotidkette unter Standardbedingungen, die nicht die Oligonukleotide von dem Träger abspalten, entfernt. Geeignete Reagenzien umfassen Nukleosidphosphoramidit und Nukleosidwasserstoffphosphorat.

[0081] Im größeren Detail: Um dieses Verfahren zu verwenden wird ein Träger wie eine Glasplatte durch Kontakt mit einem Gemisch aus einem Xylen, einem Glycidoxypropyltrimethoxysilan und einer Spur von Diisopropylethylamin bei 90°C über Nacht derivatisiert. Sie wird dann gründlich mit Methanol, Ether gewaschen und luftgetrocknet. Der derivatisierte Träger wird dann unter Rühren in Hexaethylenglycol, das eine katalytische Menge konzentrierter Schwefelsäure enthält, über Nacht in einer Atmosphäre aus Argon bei 80°C erhitzt, um einen Alkylhydroxyl-derivatisierten Träger zu ergeben. Nach dem Waschen mit Methanol und Ether wird der Träger unter Vakuum getrocknet und unter Argon bei -20°C aufbewahrt.

[0082] Die Oligonukleotidsynthese wird dann per Hand unter Standardbedingungen unter Verwendung der derivatisierten Glasplatte als soliden Träger durchgeführt. Das erste Nukleotid wird ein 3'-Wasserstoffphosphat sein, daß in der Form des Triethylamoniumsalzes verwendet wird. Dieses Verfahren führt zu trägergebundenen Oligonukleotiden hoher Reinheit.

[0083] Eine Ein-Chip-Strategie für die Zubereitung einer DNA-Sondenordnung kann verwendet werden. Beispielsweise kann adressierbare laseraktivierte Photoentschätzung in der chemischen Synthese von Oligonukleotiden direkt auf einer Glasoberfläche wie durch Fodor et al. (1991) beschrieben, das hierin durch Verweis aufgenommen wird, verwendet werden. Die Sonden können auch auf Nylonträgern, wie durch Van Ness et al. (1991) beschrieben immobilisiert werden; oder unter Verwendung des Verfahrens von Duncan & Cavalier (1988) mit Teflon verknüpft werden; wobei alle Literaturzitate hierin besonders aufgenommen sind.

[0084] Fodor et al. (1991) beschreiben die Licht-gesteuerte Synthese von Dinukleotiden, die auf die räumlich gesteuerte Synthese komplexer Verbindungen für die Verwendung in der Mikrofabrikation von Vorrichtung anwendbar ist. Dies beruht auf einem Verfahren das Licht verwendet, um die gleichzeitige Synthese chemischer Verbindung auf einem festen Träger zu steuern. Das Muster der Aussetzung gegenüber Licht oder anderen Energieformen durch eine Maske oder andere räumlich adressierbare Mittel bestimmt welche Regionen des Trägers für die chemische Kopplung aktiviert sind. Die Aktivierung durch Licht ergibt sich aus der Entfernung photolabiler Schutzgruppen in ausgewählten Bereichen. Nach dem Entschützen wird eine erste Verbindung, die eine photolabile Schutzgruppe trägt gegenüber der gesamten Oberfläche ausgesetzt aber die Reaktion findet nur in den Regionen statt, die in dem vorangehenden Schritt durch Licht angesteuert wurden. Das Substrat wird dann durch eine zweite Maske beleuchtet, die andere Bereiche für die Reaktion mit einem zweiten geschützten Baustein aktiviert. Das Muster der Masken, die in dieser Beleuchtung verwendet werden, und die Abfolge der Reaktanten bestimmen die Endprodukte und ihren Ort. Ein hohes Maß der Miniaturisierung ist durch das Fodor-Verfahren möglich da die Dichte der Synthesestellen nur durch die physikalischen Begrenzungen der räumlichen Ansteuerung limitiert ist d. h. die Brechung des Lichts. Jede Verbindung ist zugänglich und ihre Position ist genau bekannt. Daher wäre ein Oligochip der in dieser Weise hergestellt worden ist bereit für die Verwendung in der SDH.

[0085] Fodor et al. (1991) beschreiben die Licht-aktivierte Bildung von Dinukleotiden wie folgt. 5-Nitroveratrylthymidin wurde aus 3'-O-Thymidinazetat synthetisiert. Nach dem Entschützen mit Base wurde das 5'-Nitroveratrylthymidin an einem aminierten Substrat durch eine Verknüpfung mit der 3'-Hydroxylgruppe befestigt. Die Nitroveratryl-Schutzgruppen wurden durch Bestrahlung durch eine 500 µm Schachbrettmaske entfernt. Das Substrat wurde dann mit Phosphoramidit-aktivierten 2'-Desoxycytidin behandelt. Um die Reaktion fluorimetrisch zu verfolgen wurde das Desoxycytidin mit einem FMOC-geschützten Aminohexylverknüpfer, der an dem exozyklischen Amin befestigt war, modifiziert. Nach dem Entfernen der FMOC-Schutzgruppe durch Basen wurden die Regionen, die das Dinukleotid enthielten, durch Behandlung des Substrats mit FITC fluoreszent markiert. Daher können gemäß dieses Verfahrens Träger-gebundene Oligonukleotide synthetisiert werden.

[0086] Die Verknüpfung eines Oligonukleotids an einen Nylonträger wie durch Van Ness et al. (1991) beschrieben, erfordert die Aktivierung der Nylonoberfläche durch Alkylierung und die selektive Aktivierung des 5'-Amin der Oligonukleotide mit Cyanurchlorid wie folgt. Eine Nylonoberfläche wird unter Verwendung von Triethylxoniumtetrafluorborat ethyliert, um aminreaktive Imidatester auf der Oberfläche des Nylons zu bilden. 1-Methyl-2-pyrrolidon wird als Lösungsmittel verwendet. Die Nylonoberfläche wird nicht poliert, um die größte mögliche Oberfläche zu erreichen.

[0087] Die aktivierte Oberfläche wird dann mit Poly(ethylenimin)(M_r ~ 10K-70K) reagiert, um eine Polymerbeschichtung zu bilden, die eine ausgedehnte Aminoberfläche für die Befestigung von Oligos bereit stellt. Ein Oligonukleotid(e) mit Aminschwanz reagieren mit einem Überschuß Cyanurchlorid selektiv ausschließlich an dem Aminschwanz, um ein 4,6-Chlor-1,3,5-triazinyl-Oligonukleotid(e) in quantitative Ausbeute zu ergeben.

[0088] Der Ersatz des Chlorrestes des Cyanurchlorids durch die Aminogruppe verringert die Reaktivität der

verbleibenden Chlorgruppen deutlich. Dies führt zu einer erhöhten hydrolytischen Stabilität des(der) 4,6-Dichlor-1,3,5-triazinyloligonukleotids(e). Die für längere Zeiträume in gepufferten wässrigen Lösungen (pH 8,3, 4°C, 1 Woche) stabil sind und ohne weiteres isoliert und durch Größenausschlusschromatographie oder Ultrafiltration gereinigt werden können.

[0089] Die Reaktion ist für den Aminschwanz spezifisch ohne eine erkennbare Reaktion an den Nukleotidresten zu zeigen. Die PEI-überzogene Nylonoberfläche wird dann mit dem Cyanurchlorid-aktivierten Oligonukleotid reagiert. Hohe Konzentrationen der "Fänger"-Sequenz werden ohne weiteres auf der Oberfläche immobilisiert und dann werden die nicht reagierten Amine mit Succinsäureanhydrid im Endschritt des Derivatisierungsverfahrens bedeckt.

[0090] Ein besonderer Weg zur Herstellung trägergebundener Oligonukleotide ist die Verwendung der Licht-erzeugten Synthese die durch Pease et. al. beschrieben wurde (1994, hierin durch Verweis aufgenommen). Die Autoren verwenden aktuelle photolithographische Verfahren, um Anordnungen immobilisierter Oligonukleotidsonden (DNA-Chips) zu erzeugen. Diese Verfahren in den Licht verwendet wird, um die Synthese von Oligonukleotidsonden in hochdichten, miniaturisierten Anordnungen zu steuern, verwenden photolabile 5'-geschützte N-Acyldioxynukleosidphosphoramidite, eine Oberflächenverknüpfungsschemie und vielseitige kombinatorische Synthesestrategien. Eine Matrix aus 256 räumlich definierten Oligonukleotidsonden kann in dieser Weise erzeugt werden und dann in der vorteilhaften Format 3-Sequenzierung, wie hierin beschrieben verwendet werden.

[0091] Pease et. al. (1994) präsentierten eine Strategie, die für die Verwendung in der Licht-gesteuerten Oligonukleotidsynthese geeignet war. In diesem Verfahren wird die Oberfläche eines festen Trägers, der mit photolabilen Schutzgruppen modifiziert, ist durch eine photolithographische Maske beleuchtet, was zu reaktiven Hydroxylgruppen in den beleuchteten Regionen führt. Ein 3'-O-Phosphoramidit-aktiviertes Dioxynukleosid (geschützt an dem 5'-Hydroxyl mit einer photolabilen Gruppe) wird dann der Oberfläche angeboten und die Kopplung findet an den Stellen statt, die gegenüber dem Licht ausgesetzt waren. Auf das Abdecken und die Oxidation folgend wird das Substrat gewaschen und die Oberfläche wird durch eine zweite Maske beleuchtet, um weitere Hydroxylgruppen für die Kopplung freizugeben. Ein zweites 5'-geschütztes, 3'-O-Phosphoramidit-aktiviertes Dioxynukleosid wird der Oberfläche präsentiert. Die selektive Photoentschützung und die Kopplungszyklen werden wiederholt bis die gewünschte Produktgruppe erhalten wird. Da Photolithographie verwendet wird, kann das Verfahren miniaturisiert werden, um hochdichte Anordnungen von Oligonukleotidsonden zu erzeugen deren Sequenz an jeder Stelle bekannt ist.

[0092] Der synthetische Weg der Zubereitung der notwendigen 5'-O-(α -Methyl-6-nitropiperonyloxycarbonyl)-N-azyl-2'-dioxynukleosidphosphoramidite (MeNPoc-N-Azyl-2'-Dioxynukleosidphosphoramidit) beinhaltet als ersten Schritt ein N-Acyl-2'-dioxynukleosid das mit 1-(2-Nitro-4,5-methylendioxyphenyl)-ethyl-1-chlorformat reagiert, um ein 5'-McNPoc-N-Acyl-2'-Dioxynukleosid zu ergeben. Im zweiten Schritt reagiert das 3'-Hydroxyl mit den 2-Cyanoethyl-N-N'-diisopropylchlorphosphoramidit unter Verwendung von Standardverfahren, um die 5'-MeNPoc-N-acyl-2'-dioxynukleosid-3'-O-(2-cyanoethyl-N-N'-diisopropyl)-phosphoramidite zu ergeben. Die Photoschutzgruppe ist unter üblichen Bedingungen der Phosphoramiditsynthese stabil und kann mit wässriger Base entfernt werden. Diese Reagenzien können unter Argon bei 4°C über lange Zeiträume aufbewahrt werden.

[0093] Photolytische Halbwertszeiten von 28 s, 31 s, 27 s, bzw. 18 s für MeNPoc-dT, MeNPoc-dC^{ibu}, MeNPoc-dG^{PAC}, und MeNPoc-dA^{PAC} sind berichtet worden (Pease et al., 1994). Bei der lithographischen Synthese werden daher Beleuchtungszeiten von 4,5 min ($9 \times t_{1/2}$ MeNPoc-dC) empfohlen, um eine > 99% Entfernung der MeNPoc-Schutzgruppen sicher zu stellen.

[0094] Ein geeigneter synthetischer Träger ist einer, der aus einem 5,1 x 7,6 cm Glasträger besteht, der durch das Reinigen mit konzentrierter NaOH gefolgt durch ausgiebiges Waschen in Wasser, vorbereitet würde. Die Oberflächen würde dann für 2 Stunden mit einer Lösung aus 10% (Vol/Vol) bis-(2-Hydroxyethyl)-aminopropyltriethoxysilan (Petrarch Chemicals, Bristol, PA) in 95% Ethanol derivatisiert werden, gründlich mit Ethanol und Ether gewaschen werden, in vacuo bei 40°C getrocknet werden und für 15 Minuten auf 100°C erhitzt werden. In solchen Studien würde ein Syntheseverknüpfher durch die Reaktion des derivatisierten Substrats mit 4,4'-Dimethoxytrithyl (DMT)-hexaethyloxy-O-cyanoethylphosphoramidit befestigt werden.

[0095] Zusammenfassend: Um die Synthese einer Oligonukleotidsonde zu beginnen, würde das geeignete Dioxynukleosidphosphoramiditderivat an einem synthetischen Träger durch einen Verknüpfher befestigt werden. Bereiche des Trägers werden dann für die Synthese durch Beleuchtung durch eine z. B. 800 x 12800 μ m

Blende einer photolithographischen Maske aktiviert. Weitere Phosphoramiditsyntheseyklen können durchgeführt werden (mit DMT-geschützten Deoxynukleosiden), um jede gewünschte Sequenz zu erzeugen, wie jede 4-, 5-, 6-7-, 8-, 9- oder selbst 10-Mer Sequenz. Nach der Entfernung der Phosphat- und der exozyklischen Aminschutzgruppen mit konzentrierter NH_4OH für 4 Stunden wird der Träger dann in einer durch einen Wassermantel thermostatisch kontrollierten Hybridisierungskammer bereit für die Verwendung befestigt.

[0096] Natürlich könnte man ohne weiteres einen DNA-Chip wie einen der oben beschriebenen Licht-aktivierten Chips von einer kommerziellen Quelle erstehen. In dieser Hinsicht kann man Affymetrix aus Santa Clara, CA 95051 und Beckman kontaktieren.

BEISPIEL II

MODIFIZIERTE OLIGONUKLEOTIDE FÜR DIE VERWENDUNG IN SONDEN

[0097] Modifizierte Oligonukleotide können während der gesamten Verfahren der vorliegenden Erfindung verwendet werden, um die Spezifität oder Effizienz der Hybridisierung zu erhöhen. Ein Weg dies zu erreichen besteht im Ersatz natürlicher Nukleotide durch eine Basenmodifikation. Beispielsweise können Pyrimidine mit einem Halogen an der C⁵-Position verwendet werden. Für dieses wird vermutet, daß es die Duplexstabilität durch die Beeinflussung der Basenschichtung verbessert. 2,6-Diaminopurine können auch verwendet werden, um eine dritte Wasserstoffbindung bei einer Basenpaarung mit Thymin zu ergeben, wodurch die DNA-Duplexe thermisch stabilisiert werden. Es ist für die Verwendung von 2,6-Diaminopurin ermittelt worden, daß es zu einer beachtenswerten Verbesserung der Duplexstabilität kurzer Oligomere führt. Seine Aufnahme wird daher vorgeschlagen, um stringenter Bedingungen für die Primeranlagerung zu erlauben, wodurch die Spezifität der Duplexbildung verbessert wird und Hintergrundprobleme unterdrückt werden oder die Verwendung kurzer Oligomere erlaubt wird.

[0098] Die Synthese der Triphosphatversionen dieser modifizierten Nukleotide wird durch Hoheisel & Lehrach (1990, hierin durch Verweis aufgenommen) offenbart. In Kürze: 5-Chlor-2'-deoxyuridin und 2,6-Diaminopurine 2'-deoxynukleosid werden z.B. von Sigma erstanden. Die Phosphorylierung wird wie folgt ausgeführt: 50 mg trocknes 2-NH₂-dAdo wird in 500 µl trockenem Triethylphosphat durch Rühren unter Argon aufgenommen. 25 µl POCl_3 wird hinzugefügt und das Gemisch wird bei -20°C inkubiert. In der Zwischenzeit wird 1 mmol Pyrophosphorsäure in 0,95 ml tri-n-Butylamin und 2 ml Ethanol aufgelöst und in einem Rotationsverdampfer getrocknet. Anschließend wird es zwei mal durch verdampfen aus 5 ml Pyridin mit 70 µl tri-n-Butylamin, das auch vor dem zweiten mal hinzugefügt wird, getrocknet. Schließlich wird es in 2 ml Dimethylformamid aufgelöst.

[0099] Nach 90 Minuten bei -23°C wird das Phosphorylierungsgemisch verdampft, um Überschuss POCl_3 zu entfernen und das tri-n-Butylammoniumpyrophosphat wird in Dimethylformamid hinzugefügt. Die Inkubation findet für 1,5 Minuten bei Raumtemperatur statt. Die Reaktion wird durch das Hinzufügen von 5 ml 0,2 M Triethylammoniumcarbonat (pH 7,6) abgestoppt und für 4 Stunden auf Eis gehalten. Für S-Cl-dUrd wären die Bedingungen identisch aber 50 µl POCl_3 würden hinzugefügt und die Phosphorylierung würde bei Raumtemperatur für 4 Stunden ausgeführt.

[0100] Nach der Hydrolyse wird das Gemisch verdampft, der pH auf 7,5 eingestellt und mit 1 Volumen Diethylether extrahiert. Die Trennung der Produkte findet z. B. auf einer (2,5 × 20 cm) Q-Sepharosesäule unter Verwendung eines linearen Gradienten von 0,15 M bis 0,8 M Triethylammoniumbicarbonat statt. Gefroren aufbewahrt sind die Nukleotide über lange Zeiträume stabil.

[0101] Man kann auch das nicht-unterscheidende Basenanalogue oder die universelle Base wie sie durch Nichols et al. (1994) entworfen wurde, verwenden. Dieses neue Analogue 1-(2'-Deoxy-(3-D-ribofuranosyl)-3-nitropyrrol (als M bezeichnet) wurde für die Verwendung in Oligonukleotidsonden und Primern für die Lösung des Designproblems erzeugt, das sich als Ergebnis der Degeneration des genetischen Codes ergibt, oder wenn nur bruchstückhafte Peptidsequenzdaten erhältlich sind. Dieses Analogue maximiert das Stapeln während es die Wasserstoffbindungsinteraktion ohne sterische Störung der DNA-Duplex minimiert.

[0102] Das M-Nukleosidanalogue ist entworfen worden, um die Staplungswechselwirkung unter Verwendung aprotischer polarer Substituenten, die mit heteroaromatischen Ringen verknüpft sind, zu erhöhen wodurch Intra- und Interstrang Stapelungsinteraktionen verstärkt werden, um die Rolle der Wasserstoffbrücken bei der Basenpaarungsspezifität zu verringern. Nichols et al. (1994) bevorzugte 3-Nitropyrrol-2'-deoxyribonukleosid auf Grund seiner strukturellen und elektronischen Ähnlichkeit zu p-Nitroanilin deren Derivate zu den kleinsten bekannten Interkalatoren doppelsträngiger DNA gehören.

[0103] Das Dimethoxytrityl-geschützte Phosphoramidit des Nucleosids M ist auch für die Aufnahme in Nucleotide, die als Primer für die Sequenzierung und für die Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendet werden, erhältlich. Nichols et al. (1994) zeigt das eine bedeutende Anzahl von Nucleotiden ohne Verlust der Primerspezifität durch M ersetzt werden kann.

[0104] Eine einzigartige Eigenschaft von M ist seine Fähigkeit lange Ketten zusammenhängender Nucleoside zu ersetzen und dennoch zu funktionellen Sequenzierungsprimern zu führen. Für Sequenzen mit 3, 6 und 9 M Substitutionen ist berichtet worden, daß diese lesbare Sequenzierungsleitern ergaben und daß PCRs mit drei verschiedenen M-enthaltenen Primern alle zur Vervielfältigung des richtigen Produkts (Nichols et al. 1994) führten.

[0105] Die Fähigkeit von 3-Nitropyrrol enthaltenen Oligonucleotiden als Primer zu funktionieren legt deutlich nahe, daß sich eine Duplexstruktur mit komplementären Strängen bilden muß. Für optische thermische Profile, die für die Oligonucleotidpaare $d(5'-C_2-T_5XT_5G_2-3')$ und $d(5'-C_2A_5YA_5G_2-3')$ (wobei X und Y A, C, G, T oder M sein können) erhalten wurden, wurde berichtet, daß sie zu dem normalen sigmoidalen Muster, das für den DNA-Doppel-zu-Einzelstrangübergang beobachtet wurde, passen. Für die T_m -Werte der Oligonucleotide, die X·M-Basenpaare (wobei X A, C, G oder T war und Y M war) enthielten, wurde berichtet, daß sie bei X·M in den 3°C-Bereich fallen (Nichols et al. 1994).

BEISPIEL III

ZUBEREITUNG VON SEQUENZIERUNGSCIPS UND -ANORDNUNGEN

[0106] Das vorliegende Beispiel beschreibt die physischen Ausführungsformen der Sequenzierungschips die von dem Erfinder erwogen werden.

[0107] Ein grundlegendes Beispiel ist die Verwendung von 6-Meren, die an 50 Mikron-Oberflächen befestigt sind, um einen Chip mit Dimensionen von 3 × 3 mm zu ergeben, der kombiniert werden kann um eine Anordnung von 20 × 20 cm zu ergeben: Ein weiteres Beispiel ist die Verwendung von 9-Mer Oligonucleotiden, die an einer 10 × 10 Mikron-Oberfläche befestigt sind, um einen 9-Mer Chip mit Dimensionen von 5 × 5 mm zu erzeugen. 4.000 Einheiten solcher Chips können verwendet werden, um eine 30 × 30 cm Anordnung zu erzeugen. **Fig. 2A**, **Fig. 2B** und **Fig. 2C** illustrieren noch ein weiteres Beispiel einer Anordnung in der 4000 bis 16.000 Oligochips in einer rechteckigen Anordnung angeordnet sind. Eine Platte oder eine Sammlung von Röhrcchen kann wie auch dargestellt mit der Anordnung als Teil des Sequenzierungskits verpackt werden.

[0108] Die Anordnungen können physisch voneinander durch hydrophobe Oberflächen abgetrennt werden. Ein möglicher Weg, um die hydrophobe Streifenabtrennung möglich zu machen ist die Verwendung einer Technologie wie das Iso-Grid Microbiology System das durch QA Laboratories, Toronto, Kanada, hergestellt wird.

[0109] Hydrophobe Raster Membranfilter (HRMF) werden in der analytischen Nahrungsmittelmikrobiologie seit etwa einem Jahrzehnt verwendet, wo sie die einzigartigen Vorzüge eines erweiterten numerischen Bereichs und des automatischen Zählens der Kolonien zeigen. Ein kommerziell erhältliches Raster ist ISO-GRID™ von QA Laboratories Ltd. (Toronto, Kanada), das aus einem Quadrat (60 × 60 cm) eines Polysulfonpolymers (Gelman Tuffryn HT-450, 0,45 µl Porengröße) besteht, auf das ein schwarzes hydrophobes Tintenraster bestehend aus 1600 (40 × 40) rechteckigen Zellen gedruckt ist. HRMF sind bisher mit bakteriellen Suspensionen durch Vakuumfiltration inokuliert worden und auf den jeweils ausgewählten unterscheidenden oder selektiven mit Medien inkubiert worden.

[0110] Da das mikrobielle Wachstum auf der Membran auf Rasterzellen bekannter Position und Größe beschränkt ist, wirkt das HRMF mehr als ein MPN-Apparat denn als übliche Platte oder als Membranfilter. Peterkin et al. (1987) berichtete das diese HRMF's verwendet werden können, um genomische Bibliotheken fortzupflanzen und zu lagern, wenn sie mit einem HRMF-Replikator verwendet werden. Ein solches Instrument repliziert das Wachstum der 1600 Zellen des ISO-GRIDS und ermöglicht es viele Kopien des Ausgangs-HRMF's herzustellen (Peterkin et al., 1987).

[0111] Sharp et al. (1989) verwendeten auch ISO-GRID HRMF von QA Laboratories und einen automatisierten HRMF-Zähler (MI-100 Interpreter) und einen RP-100 Replikator. Sie berichteten über eine Technik für das Erhalten und das Durchsuchen vieler mikrobieller Kulturen.

[0112] Peterkin und Kollegen beschrieben später ein Verfahren für das Durchsuchen von DNA-Sonden unter

Verwendung des hydrophoben Rastermembranfilters (Peterkin et al. 1989). Diese Autoren berichteten auch über Verfahren für die wirksame Kolonisierung direkt auf HRMF's. Bisher sind auf Grund der niedrigen DNA-Bindungs Kapazität des Polysulfonpolymers auf denen die HRMF's gedruckt sind schlechte Ergebnisse erhalten worden. Peterkin et al. (1989) berichteten jedoch, daß die Bindung der DNA auf der Oberfläche der Membran durch die Behandlung der replizierten und inkubierten HRMF's mit Polyethylenimin, einem Polykation vor dem Kontakt mit DNA verbessert wurde. Obwohl diese frühe Arbeit die zelluläre DNA-Befestigung verwendet und ein anderes Ziel als die vorliegende Erfindung hat kann die beschriebene Methode ohne weiteres für die Format 3-SBH angepaßt werden.

[0113] Um nützliche Sequenzen schnell zu identifizieren, verwendeten Peterkin et al. (1989) radioaktiv markierte Plasmid-DNA von verschiedenen Klonen und testeten deren Spezifität gegen die DNA auf vorbereiteten HRMF's. In dieser Weise wurde DNA aus rekombinanten Plasmiden rasch durch Koloniehybridisierung gegen 100 Organismen auf den HRMF-Replikaten, die leicht und reproduzierbar hergestellt werden können, durchsucht.

[0114] Zwei grundlegende Probleme mußten gelöst werden. Die Handhabung kleiner (2 bis 3 mm) Chips und die gleichzeitige Ausführung von Tausenden Reaktionen. Die Lösung der Erfindung bestehen darin, die Chips und die Sonden in den jeweiligen Anordnungen zu belassen. In einem Beispiel werden Chips die 250.000 9-Mere enthalten auf einem Siliziumwaver in der Form einer 8 x 8 mm Platte (15 µM/Oligonukleotid, Pease et al. 1994), die in 8 x 15 Format (96 Chips) angeordnet sind, mit einer mm Vertiefung zwischen ihnen synthetisiert. Die Sonden werden entweder durch eine Mehrkanalpipette oder über eine Nadelanordnung, eine Sonde zu einem Chip, hinzugefügt. Um alle 4000 6-Mere zu bewerten müssen 42 Chipanordnungen verwendet werden entweder unter Verwendung von verschiedenen oder durch die mehrmalige Wiederverwendung einer Gruppe von Chipanordnungen.

[0115] Im obigen Fall ist unter Verwendung der früheren Nomenklatur der Anmeldung $F = 9$; $P = 6$; und $F + P = 15$. Die Chips können Sonden der Formel B_xN_n aufweisen wobei x die Zahl der bestimmten Basen B ist; und n die Zahl der nicht-bestimmten Basen, so daß $X = 4$ bis 10 und $n = 1$ bis 4 ist. Um eine wirksame Hybridisierung zu erreichen und um die mögliche Einwirkung irgendwelcher Trägeroligonukleotide zu vermeiden, können die bestimmten Basen von nicht-bestimmten Basen umgeben sein, welche daher durch eine Formel wie $(N)_nB_x(N)_m$ wiedergegeben werden (**Fig. 4**).

BEISPIEL IV

ZUBEREITUNG VON NUKLEINSÄUREFRAGMENTEN

[0116] Die zu sequenzierenden Nukleinsäuren können von jeder geeigneten Quelle wie aus cDNAs, genomischer DNA, chromosomaler DNA, mikropräparierten Chromosomenbanden, Cosmid oder YAC-Einschüben und RNA, die mRNA ohne irgendwelche Vervielfältigungsschritte umfaßt, gewonnen werden. Beispielsweise beschreibt Sambrook et al. (1989) drei Protokolle für die Isolation von DNA mit hohem Molekulargewicht aus Säugetierzellen (S. 9.14–9.23).

[0117] Die Nukleinsäuren würden dann durch irgendeines der dem Fachmann bekannten Verfahren, die beispielsweise Restriktionsenzyme wie in 9.24–9.28 von Sambrook et al. (1989) beschrieben, Scheren durch Ultraschall und NaOH-Behandlung umfassen, fragmentiert.

[0118] Das Niederdruckscheren wie durch Schriefer et al. (1990, hierin durch Verweis aufgenommen) beschriebenen, ist auch geeignet. In diesem Verfahren werden DNA-Proben durch eine kleine französische Druckzelle mit einer Vielzahl von niedrigen bis mittleren Drucken hindurchgeführt. Eine Hebelvorrichtung erlaubt die kontrollierte Anwendung von niedrigen bis mittleren Drucken auf die Zelle. Die Ergebnisse dieser Studie deuten darauf hin, daß das Niederdruckscheren eine nützliche Alternative zu den akustischen und enzymatischen DNA-Fragmentierungsverfahren ist.

[0119] Es wird erwogen, daß ein besonders geeigneter Weg für die Fragmentierung von DNA darin besteht die Endonuklease CviJI mit einer Erkennungssequenz von zwei Basen, die durch Fitzgerald et al. (1992) beschrieben wurde, zu verwenden. Diese Autoren beschreiben einen Ansatz zur schnellen Fragmentierung und Fraktionierung von DNA in geeignete Größen für die sie vermuten, daß sie für die Schrotschuß-Klonierung und Sequenzierung geeignet sind. Der Erfinder stellt sich vor, daß dies auch für die Erzeugung von zufälligen aber relativ kleinen Fragmenten der DNA für die Verwendung in der vorliegenden Sequenzierungstechnologie nützlich ist.

[0120] Die Restriktionsendonuklease CviJI spaltet normalerweise die Erkennungssequenz PuGCPy zwischen dem G und C, um stumpfe Enden zurück zulassen. Untypische Reaktionsbedingungen, die die Spezifität dieses Enzyms verändern (CviJI**), führen zu einer quasi- zufälligen Verteilung von DNA-Fragmenten aus dem kleinen Molekül pUC19 (2688 Basenpaare). Fitzgerald et al. (1992) evaluierten die Zufälligkeit dieser Fragmentierungsstrategie quantitativ unter Verwendung des CviJI**-Verdau des pUC19 der durch ein schnelles Gelfiltrationsverfahren größenfraktioniert wurde und direkt ohne Endreparatur in eine lacZ minus M13 Klonierungsvector legiert wurde. Die Sequenzanalyse von 76 Klonen zeigte das CviJI** PyGCPy und PuGCPu zusätzlich zu PuGCPy-Stellen schneidet und das sich neue Sequenzdaten mit einer Rate ansammelten, die mit einer zufälligen Fragmentierung übereinstimmen.

[0121] Wie in der Literatur berichtet umfassen Vorteile dieses Ansatzes im Vergleich zu Sonifizierung und der Agarosegelfraktionierung, daß dafür: kleinere DNA-Mengen erfordert werden (0,2–0,5 µg anstelle von 2–5 µg); und weniger Schritte beteiligt sind (es werden keine Vorligation, Endreparatur, chemische Extraktion oder Agarosegelelektrophorese und Elution benötigt). Es wird vorgeschlagen, daß diese Vorteile auch bei der Zubereitung von DNA für die Sequenzierung durch das Format 3 nützlich sind.

[0122] Unabhängig von der Weise in der die Nukleinsäurefragmente erhalten oder zubereitet werden, ist es wichtig die DNA zu denaturieren, um einzelsträngige Stücke, die für die Hybridisierung zur Verfügung stehen, zu ergeben. Dies wird durch die Inkubation der DNA-Lösung für 2–5 Minuten bei 80–90°C erreicht. Die Lösung wird dann schnell auf 2°C gekühlt, um die Renaturierung der DNA-Fragmente zu verhindern, bevor sie mit dem Chip in Kontakt gebracht werden. Wie in Beispiel VI beschrieben, müssen auch die Phosphatgruppen von der genomischen DNA entfernt werden.

BEISPIEL V

ZUBEREITUNG MARKIERTER SONDEN

[0123] Die Oligonukleotidsonden können durch automatisierte Synthese, die für den Fachmann Routine ist, beispielsweise unter Verwendung eines Applied Biosystems Systems zubereitet werden. Alternativ können die Sonden unter Verwendung der Verfahren der Genosys Biotechnologies Inc. unter Verwendung von Stapeln poröser Teflonwafer zubereitet werden.

[0124] Die Oligonukleotidsonden können beispielsweise mit radioaktiven Markierungen (³⁵S, ³²P, ³³P und vorzugsweise ³³P) für Anordnungen mit 100–200 µm oder 100–400 µm Punkten; nicht-radioaktiven Isotopen (Jacobsen et al., 1990); oder Fluorophoren (Brumbaugh et al., 1988) markiert werden. Alle solche Markierungsverfahren sind im Stand der Technik Routine wie durch die relevanten Abschnitte in Sambrook et al. 1989 und durch weitere Zitate wie in Schubert et al. (1990), Murakami et al. (1991) und Cate et al. (1991), wobei alle Artikel hierin spezifisch durch Verweis aufgenommen werden, verdeutlicht wird.

[0125] In Hinblick auf die radioaktive Markierung sind die üblichen Verfahren die Endmarkierung unter Verwendung von T4-Polynukleotidkinase oder Markierung zu hoher spezifischer Aktivität unter Verwendung von Klenow- oder selbst T7-Polymerase. Diese sind im folgenden beschrieben.

[0126] Synthetische Oligonukleotide werden ohne Phosphatgruppe an ihren 5'-Termini synthetisiert und sind daher ohne weiteres durch den Transfer von γ -³²P oder γ -³³P aus [γ -³²P]ATP oder [γ -³³P]ATP unter Verwendung des Enzyms Bakteriophagen-T4-Polynukleotidkinase markierbar. Wenn die Reaktion effizient ausgeführt wird kann die spezifische Aktivität solcher Sonden so hoch wie die spezifische Aktivität von [γ -³²P]ATP oder [γ -³³P]ATP selbst sein. Die unten beschriebene Reaktion ist entworfen worden um 10 pmol eines Oligonukleotids zu einer hohen spezifischen Aktivität zu markieren. Die Markierung verschiedener Mengen des Oligonukleotids kann ohne weiteres durch die Vergrößerung oder Verringerung der Größe der Reaktion erreicht werden, wobei die Konzentrationen aller Bestandteile konstant gehalten werden.

[0127] Ein Reaktionsgemisch würde unter Verwendung von 1,0 µl des Oligonukleotids (10 pmol/µl), 2,0 µl des 10 × Bakteriophagen-T4-Polynukleotidkinasepuffers; 5,0 µl von [γ -³²P]ATP oder [γ -³³P]ATP (spezifische Akt. 5000 Ci/mmol; 10 mCi/ml in wäßriger Lösung) (10 pmol); und 11,4 µl Wasser entworfen werden. Acht (8) Einheiten (~1 µl) der Bakteriophagen-T4-Polynukleotidkinase wird zu dem Reaktionsgemisch hinzugefügt, gut gemischt und für 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird für 10 Minuten auf 68°C erwärmt, um die Bakteriophagen-T4-Polynukleotidkinase zu inaktivieren.

[0128] Der effiziente Transfer des ³²P oder ³³P auf das Oligonukleotid und seine spezifische Aktivität wird dann

bestimmt. Wenn die spezifische Aktivität der Probe annehmbar ist, wird sie gereinigt. Wenn die spezifische Aktivität zu niedrig ist werden weitere 8 Einheiten des Enzyms hinzugefügt und für weitere 30 Minuten bei 37°C inkubiert bevor die Reaktion für 10 Minuten auf 68°C erwärmt wird, um das Enzym zu inaktivieren.

[0129] Die Reinigung der radioaktiv markierten Oligonukleotide kann durch die Präzipitation mit Ethanol; die Präzipitation mit Cetylpyridinbromid; durch Chromatographie über Biogel P-60; oder durch Chromatographie auf einer Sep-Pak-C₁₈-Säule erreicht werden.

[0130] Sonden mit höheren spezifischen Aktivitäten können unter Verwendung des Klenow-Fragments der E. coli. DNA-Polymerase I erhalten werden, um einen DNA-Strang der komplementär zu dem synthetischen Oligonukleotid ist, zu synthetisieren. Ein kurzer Primer wird an einer Oligonukleotidvorlage hybridisiert, deren Sequenz das Komplement zu der gewünschten radioaktivmarkierten Sonde ist. Der Primer wird dann unter Verwendung des Klenow-Fragments der E. coli. DNA-Polymerase I verlängert, um $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dNTPs}$ oder $[\alpha\text{-}^{33}\text{P}]\text{dNTPs}$ in einer vorlagengesteuerten Weise zu verlängern. Nach der Reaktion werden Vorlage und Produkt durch Denaturierung abgetrennt, gefolgt von einer Elektrophorese auf einem Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen. Mit diesem Verfahren ist es möglich, wenn gewünscht, Oligonukleotidsonden zu erzeugen, die mehrere radioaktive Atome pro Oligonukleotidmolekül enthalten.

[0131] Um dieses Verfahren zu verwenden würde man in einem Mikrozentrifugenröhrchen die berechneten Mengen der $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dNTPs}$ oder der $[\alpha\text{-}^{33}\text{P}]\text{dNTPs}$, die notwendig sind, um die gewünschte spezifische Aktivität zu erreichen und die ausreichend sind, um die vollständige Synthese aller Vorlagenstränge zu ermöglichen, mischen. Die Konzentration der dNTPs sollte in jedem Stadium der Reaktion nicht weniger als 1 μM betragen. Dann werden zu den Röhrchen geeignete Mengen der Primer und Vorlagen-DNAs hinzugefügt, wobei der Primer in einem 3- bis 10-fachen molaren Überschuß im Bezug auf die Vorlage vorliegt.

[0132] 0,1 Volumen des 10 \times fach Klenow-Puffers würden dann hinzugefügt und gut gemischt werden. 2–4 Einheiten der Klenow-Fragment E. coli DNA-Polymerase I würden dann pro 5 μl Reaktionsvolumen hinzugefügt, gemischt und für 2–3 Stunden bei 4°C inkubiert. Wenn gewünscht kann der Fortschritt der Reaktion durch die Entfernung kleiner (0,1 μl) Teilmengen und das Messen des Teils der Radioaktivität, der durch 10% Trichlororessigsäure (TCA) präzipitierbar geworden ist, überwacht werden.

[0133] Die Reaktion würde dann mit einer gleichen Menge Gel-Ladepuffer verdünnt werden, für 30 Minuten auf 80°C erhitzt werden und dann würde die gesamte Probe auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel geladen werden. Auf die Elektrophorese folgend würde das Gel autoradiographiert werden, was es erlaubt die Probe zu lokalisieren und von dem Gel zu entfernen. Verschiedene Verfahren für die fluorophobe Markierung sind wie im Folgenden dargestellt auch erhältlich. Brumbaugh et al. (1988) beschreiben die Synthese von Fluoreszenzmarkierten Primern. Ein Deoxyuridinanalog mit einem primären Amin "Verknüpfungsarm" mit 12 Atomen, der an dem C-5 befestigt ist, wird synthetisiert. Die Synthese des Analogs besteht aus der Derivatisierung des 2'-Deoxyuridin durch organometallische Zwischenprodukte, um 5'-(Methylpropenoyl)-2'-deoxyuridin zu ergeben. Die Reaktion mit Dimethoxytritylchlorid erzeugt das korrespondierende 5'-Dimethoxytrityl-Addukt. Der Methylester wird hydrolysiert, aktiviert und mit einem geeigneten monoacylierten Alkyldiamin reagiert. Nach der Reinigung werden die sich ergebenden Verbindungsarmnukleoside zu Nukleosidanaloga, die für die chemische Oligonukleotidsynthese geeignet sind, umgewandelt.

[0134] Oligonukleotide, die ein oder zwei Linkerarmbasen enthalten, würden dann unter Verwendung einer modifizierten Phosphoriditchemie hergestellt werden. Zu einer Lösung von 50 mmol des Linkerarmoligonukleotids in 25 μl 500 mM Natriumdicarbonats (pH 9,4) werden 20 μl 300 mM FITC in Dimethylsulfoxid hinzugefügt. Das Gemisch wird bei Raumtemperatur für 6 Stunden bewegt. Das Oligonukleotid wird von freiem FITC durch Elution über eine 1 \times 30 cm Sephadex G-25-Säule mit 20 mM Amoniumacetat (pH 6) abgetrennt wobei die Fraktion des ersten UV-absorbierenden Spitzenwerts verbunden werden.

[0135] Im allgemeinen beinhaltet die Fluoreszenzmarkierung eines Oligonukleotids an seinen 5'-Ende anfänglich zwei Schritte. Zuerst wird ein N-geschütztes Aminoalkylphosphoramiditderivat während der automatisierten DNA-Synthese an das 5'-Ende eines Oligonukleotids hinzugefügt. Nach dem Entfernen aller Schutzgruppen wird der NHS-Ester eines geeigneten Fluoreszenzfarbstoffs über Nacht an die 5'-Aminogruppe gekoppelt, gefolgt von der Reinigung des markierten Oligonukleotids vom Überschuß des Farbstoffs unter Verwendung von Reverse Phase HPLC oder PAGE.

[0136] Schubert et al. (1990) beschrieben die Synthese eines Phosphoramidits, das es erlaubt während der automatisierten DNA-Synthese Oligonukleotide, die mit Fluorescein markiert sind, zu erzeugen. Der Fluores-

ceinmethylester wird mit 4-Chlor-(4,4'-dimethoxytrityl)-butanol-1 in Gegenwart von K_2CO_3 und KI in DMF 17 Stunden alkylert. Nach der Entfernung der Tritylgruppe mit 1 % TFA in Chloroform wird das Produkt durch Standardverfahren mit bis-(Diisopropylamino)methoxyphosphin phosphityliert. Die Phosphorylierung des oben erhaltenen Fluoresceinderivats führt in sinnvoller Ausbeute zu einem H-Phosphonat. Das sich ergebende Amidit (0,1 M Lösung in trockenem Azetonitril) wird für die automatisierte Synthese verschiedener Primer unter Verwendung von β -Cyanoethylphosphoramiditchemie und einer DNA-Synthesevorrichtung verwendet. Die Spaltung vom Träger und die Entschützung wird mit 25% wäßrigen Ammoniak für 36 Stunden bei Raumtemperatur ausgeführt. Das Rohprodukt wird durch PAGE gereinigt und der markierte Primer ist als fahlgrüne fluoreszierende Bande bei 310 nm sichtbar. Die Elution und die Entsalzung unter Verwendung von RP 18-Katuschen ergibt das gewünschte Produkt.

[0137] Die fluoreszierende Markierung am 5'-Ende der Sonde in dem Schubert-Verfahren wird im letzten Kopplungszyklus direkt während der DNA-Synthese erreicht. Die Kopplungsausbeuten sind so hoch wie bei normalen Phosphoramiditen. Nach der Entschützung und der Entfernung des Amoniums durch Lyophilisierung unter Verwendung eines Speed-Vacs oder durch Ethanol-Präzipitation können die Fluoreszenz-markierten Oligonukleotide direkt für die DNA-Sequenzierung in der Format 3 SDH verwendet werden.

[0138] Murakami et al. beschreiben auch die Zubereitung von Fluorescein-markierten Oligonukleotiden. Diese Synthese beruht auf einem Polymer-unterstützten Phosphoramidit und auf einem Wasserstoffphosphonat-Verfahren. Ethylendiamin oder Hexamethyldiamin wird als Linker verwendet. Sie wurden über eine Phosphoramidatverknüpfung eingeführt, die über die Oxidation eines Wasserstoffphosphonatzwischenprodukts in CCl_4 -Lösung gebildet wurde. Die modifizierten Oligonukleotide werden unter Verwendung einer primären Aminorientierungsreagenz, FITC, auf den Kügelchen einer Markierung unterzogen. Das sich ergebende modifizierte Oligonukleotid wird dann von den Kügelchen abgespalten und anschließend durch RPLC gereinigt.

[0139] Cate et al. (1991) beschreiben die Verwendung von Oligonukleotidsonden, die direkt an alkalische Phosphatase konjugiert sind in Kombination mit einem direkten chemilumineszenten Substrat (AMPPD), um den Sondennachweis zu erlauben. Die alkalische Phosphatase kann kovalent an eine modifizierte Base des Oligonukleotids gekoppelt werden. Nach der Hybridisierung kann das Oligo mit AMPDD inkubiert werden. Das alkalische Phosphataseenzym spaltet AMPDD auf, um eine Verbindung zu erzeugen, die Fluoreszenz ohne Anregung erzeugt, d. h. ein Laser ist nicht erforderlich. Es wird erwogen, daß unter Verwendung einer solchen Technologie ein starkes Signal erzeugt werden kann.

[0140] Markierte Sonden können ohne weiteres von einer Vielzahl kommerzieller Quellen umfassend GEN_sET erhalten werden anstatt synthetisiert zu werden.

BEISPIEL VI ENTFERNUNG DER PHOSPHATGRUPPEN

[0141] Sowohl die bakterielle alkalische Phosphatase (BAP) als auch die alkalische Phosphatase aus Kälbermagen (CIP= "calf intestinal alkaline phosphatae") katalysieren die Entfernung von 5'-Phosphatresten von DNA und RNA. Sie sind daher für die Entfernung von 5'-Phosphaten von DNA und/oder RNA, um die Ligation und unangemessene Hybridisierung zu verhindern, geeignet. Die Phosphatentfernung wie durch Sambrook et al. (1989) beschrieben würde nach dem Schneiden oder andernfalls dem Scheren der genomischen DNA durchgeführt werden.

[0142] Die BAP ist die aktivere der zwei alkalischen Phosphatasen aber sie ist auch viel widerstandsfähiger gegenüber Hitze und Detergenzien. Es ist daher schwierig BAP am Ende der Dephosphorylierungsreaktion vollständig zu inhibieren. Proteinase K wird verwendet, um CIP zu verdauen, die vollständig entfernt werden muß, wenn anschließende Ligationen effizient arbeiten sollen. Ein alternatives Verfahren ist die Inaktivierung der CIP durch Erhitzen auf 65°C für 1 Stunde oder 75°C für 10 Minuten in der Gegenwart von 5 mM EDTA (pH 8,0) und dann die Reinigung der dephosphorylierten DNA durch Extraktion mit Phenol:Chloroform.

BEISPIEL VII

DURCHFÜHRUNG DER SEQUENZIERUNG DURCH ZWEI-SCHRITT-HYBRIDISIERUNG

[0143] Es folgen bestimmte Beispiele, um die Ausführung der Sequenzierungsmethode, die von dem Erfinder erwogen wird, zu beschreiben. Zuerst würde der gesamte Chip mit einem Gemisch aus DNA, die so komplex wie 100 Millionen bp (ein humanes Chromosom) sein kann, hybridisiert. Richtlinien für die Durchführung der

Hybridisierung können in Publikation wie Drmanac et al. (1990); Khrapko et al. (1991); und Broude et al. (1994) gefunden werden. Diese Artikel lehren die Bereiche der Hybridisierungstemperaturen, Puffer und Waschschrirte, die bei der Verwendung in dem Anfangsschritt des Format 3 SDH angemessen sind.

[0144] Der Erfinder erwägt insbesondere, daß die Hybridisierung für bis zu mehrere Stunden bei hohen Salzkonzentrationen bei einer niedrigen Temperatur (-2°C bis 5°C) auf Grund der relativ niedrigen Konzentration der Ziel-DNA, die zur Verfügung gestellt werden kann, ausgeführt wird. Zu diesem Zweck wird SSC-Puffer anstelle von Natriumphosphatpuffer (Drmanac et al., 1990), der bei 10°C präzipitiert, verwendet. Das Waschen muß auf Grund des zweiten Schritts nicht ausgiebig sein (einige Minuten) und kann vollständig weggelassen werden, wenn die zyklierende Hybridisierung für die Sequenzierung hochkomplexer DNA-Proben verwendet wird. Der selbe Puffer wird für die Hybridisierung und die Waschschrirte verwendet, um dazu in der Lage zu sein, mit dem zweiten Hybridisierungsschritt mit markierten Sonden fortzufahren.

[0145] Nach geeignetem Waschen unter Verwendung einer einfachen robotergetriebenen Vorrichtung an jeder Anordnung z.B. eine 8×8 mm Anordnung (Beispiel III) würde eine markierte Probe z.B. ein 6-Mer hinzugefügt werden. Eine 96-Spitzen- oder 96-Nadelvorrichtung würde verwendet werden, um dies in 42 Handhabungen auszuführen. Wiederum könnte ein Bereich unterscheidender Bedingungen, wie sie bereits in der wissenschaftlichen Literatur beschrieben sind, eingesetzt werden.

[0146] Der Erfinder erwägt insbesondere die Verwendung unter den folgenden Bedingungen. Zuerst wird nach dem Hinzufügen der markierten Sonden und der Inkubation für mehrere Minuten (auf Grund der hohen Konzentration der hinzugefügten Oligonukleotide) nur bei niedrigen Temperaturen ($0-5^{\circ}\text{C}$) die Temperatur auf $3-10^{\circ}\text{C}$ erhöht abhängig von der F+P-Länge und dem Waschpuffer, der hinzugefügt wird. Zu dieser Zeit ist der Waschpuffer einer, der mit einer beliebigen Ligationsreaktion kompatibel ist (z.B. Salz im Konzentrationsbereich von 100 mM). Nach dem Hinzufügen von Ligase wird die Temperatur wieder auf $25-37^{\circ}\text{C}$ erhöht, um eine schnelle Ligation zu ermöglichen (weniger als 30 Minuten) und eine weitere Unterscheidung von vollständig zueinander passenden und fehlgepaarten Hybriden.

[0147] Die Verwendung kationischer Detergenzien wird auch für die Verwendung im Format SDH, wie durch Pontius & Berg (1991 hierin durch Verweis aufgenommen) beschrieben, erwogen. Diese Autoren beschreiben die Verwendung von zwei einfachen kationischen Detergenzien, Dedecyl- und Cetyltrimethylammoniumbromid (DTAB und CTAB) bei der DNA-Renaturierung.

[0148] DTAB und CTAB sind Varianten des quaternären Amintetramethylammoniumbromids (TMAB) in dem eine der Methylgruppe entweder durch eine 12-Kohlenstoff-(DTAB) oder durch eine 16-Kohlenstoffalkylgruppe (CTAB) ersetzt ist. TMAB ist das Bromsalz des Tetramethylammoniumions, das ein Reagenz ist, das in Nukleinsäurerenaturierungsexperimenten verwendet wird, um die G-C-Gehalts-abhängige Verzerrung der Schmelztemperatur zu verringern. DTAB und CTAB sind strukturell dem Natriumdodecylsulfat (SDS) ähnlich mit dem Ersatz des negativ geladenen Sulfats des SDS durch ein positiv geladenes quartäres Amin. Während SDS im allgemeinen in Hybridisierungspuffern verwendet wird, um unspezifische Bindungen zu verringern und Nukleasen zu inhibieren beeinflusst es nicht deutlich die Renaturierungsrate.

[0149] Wenn ein Ligationsverfahren verwendet wird kann das Enzym mit den markierten Sonden oder nach einem angemessenen Waschschrirte hinzugefügt werden, um den Hintergrund zu verringern.

[0150] Obwohl bisher nicht für die Verwendung in einem SBH-Verfahren vorgeschlagen ist die Ligasetechnologie im Feld der Molekularbiologie gut etabliert. Beispielsweise beschreiben Hood und Kollegen eine Ligase-vermittelte Gennachweistechnik (Landegren et al., 1988) dessen Verfahren ohne weiteres an die Verwendung in der Format III-SDH angepaßt werden kann. Landegren et al. beschreiben ein Testverfahren für die Gegenwart von gegebener DNA-Sequenzen beruhend auf der Fähigkeit zweier Oligonukleotide sich unmittelbar angrenzend aneinander auf einem komplementären Ziel-DNA-Molekül anzulagern. Die zwei Oligonukleotide werden dann kovalent durch die Wirkung einer DNA-Ligase verknüpft, unter der Voraussetzung, daß die Nukleotide an der Verknüpfungstelle korrekt basengepaart sind. Obwohl dies vorher nicht erwogen wurde, ergibt sich diese Situation nunmehr in der Format III-Sequenzierung. Wu & Wallace beschreiben auch die Verwendung von Bakteriophagen-T4 DNA-Ligase, um zwei angrenzende, kurze synthetische Oligonukleotide zu verbinden. Ihre Oligoligationsreaktionen wurden in 50 mM Tris HCl pH 7,6, 10 mM Magnesiumchlorid, 1 mM ATP, 1 mM DTT und 5% PEG ausgeführt. Die Ligationsreaktionen wurden für 5-10 Minuten auf 100°C erhitzt, gefolgt von dem Abkühlen auf 0°C vor dem Hinzufügen von T4-DNA-Ligase (1 Einheit; Bethesda Research Laboratory). Die meisten Ligationsreaktionen wurden bei 30°C ausgeführt und durch Erhitzen auf 100°C für 5 Minuten beendet.

[0151] Ein Endwaschschritt, der für den unterscheidenden Nachweis angrenzend hybridisierter oder ligierter Oligonukleotide der Länge (F + P) geeignet ist, wird dann durchgeführt. Dieser Waschschritt wird im Wasser für mehrere Minuten bei 40–60°C durchgeführt, um alle nicht-ligierten markierten Sonden und alle anderen Bestandteile auszuwaschen, um den Hintergrund maximal zu reduzieren. Auf Grund der kovalent gebundenen Oligonukleotide wird der Nachweis vereinfacht (es bestehen keine Zeit- und Niedertemperaturbeschränkungen).

[0152] Abhängig von der verwendeten Markierung wird die Abbildung des Chips mit verschiedenen Apparaten durchgeführt. Für radioaktive Markierungen kann die Phosphorlagerschirmtechnologie und ein Phosphorimager als Scanner verwendet werden (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). Die Chips werden in eine Kassette gelegt und mit einem Phosphor-haltigen Schirm abgedeckt. Nach 1–4 Stunden Belichtung wird der Schirm gescannt und die Bilddatei auf einer Computerfestplatte gespeichert. Für den Nachweis fluoreszierender Markierungen werden CCD-Kameras und epifluoreszente oder konfokale Mikroskopie verwendet. Für die Chips, die direkt auf den Pixeln einer CCD-Kamera erzeugt werden, kann der Nachweis wie durch Eggers et al. beschrieben durchgeführt werden (1994, hierin durch Verweis aufgenommen).

[0153] Ladungsgekoppelte Detektoren (CCD – "charge coupled device") dienen als aktive feste Träger, die quantitativ die Verteilung markierter Zielmoleküle in den auf Sonden-beruhenden Testverfahren nachweisen und abbilden. Diese Vorrichtungen verwenden die inhärenten Charakteristika der Mikroelektronik die hochparallele Testverfahren, einen ultrasensitiven Nachweis, einen hohen Durchsatz, eine integrierte Datensammlung und Verarbeitung verwenden. Eggers et al. (1994) beschreiben CCDs für die Verwendung mit auf Sonden-beruhenden Testverfahren wie das Format III SBH der vorliegenden Erfindung, die die quantitative Bewertung innerhalb von Sekunden auf Grund der großen Sensitivität und der eingesetzten direkten Verkopplung erlauben.

[0154] Der integrierte CCD-Nachweisansatz ermöglicht den Nachweis molekularer Bindungsereignisse auf Chips. Der Detektor erzeugt rasch ein zweidimensionales Muster, das nur die Probe charakterisiert. Bei der spezifischen Benutzung des auf CCD-beruhenden molekularen Detektors werden verschiedene biologische Sonden direkt auf den Pixeln eine CCD immobilisiert oder können an einem wegwerfbaren Objektträger, der auf der CCD-Oberfläche plaziert wird, befestigt werden. Die Probenmoleküle können mit radioisotopen, chemilumineszenten oder fluoreszenten Markierungen markiert werden.

[0155] Auf die Aussetzung der Probe gegenüber der auf einem CCD-beruhenden Sondenanordnung werden Photonen oder radioisotope Zerfallsprodukte an den Pixelpunkten, an denen die Probe gebunden ist im Falle des Formats III an zwei komplementäre Sonden, emittiert. Wiederum werden Elektronenlochpaare in Silizium erzeugt, wenn die geladenen Teilchen oder die Strahlung auf die CCD-Gate fallen. Die Elektronen werden dann zwischen angrenzenden CCD-Gate gesammelt und sequentiell auf einem Display-Modul ausgelesen. Die Zahl der erzeugten Photoelektronen an jedem Pixel ist der Zahl der molekularen Bindungsereignisse in seiner Nähe proportional. Dem gemäß kann die molekulare Bindung quantitative bestimmt werden (Eggers et al., 1994).

[0156] Wie kürzlich berichtet haben CCDs in erster Linie auf Grund der hohen Sensitivität der Vorrichtung über einen großen Wellenlängenbereich (von 1 bis 10000 Å) Vorteile gegenüber dem Festphasennachweis und Bildsensoren. Silizium spricht gegenüber elektromagnetischer Strahlung aus dem sichtbaren Spektrum bis zu weichen Röntgenstrahlen stark an. Für sichtbares Licht führt ein einzelnes Photon das auf das CCD-Gate trifft zu einem einzelnen Elektronenladungspaket unter dem Gate. Ein einzelnes weiches Röntgenstrahlbeta-partikel (typischer Weise im KeV- bis MeV-Bereich) erzeugt Tausende bis zu Zehntausende Elektronen. Zusätzlich zu der hohen Sensitivität bieten die von Eggers et al. (1994) beschriebenen CCDs einen großen Dynamikbereich (4 bis 5 Größenordnungen) da ein nachweisbares Ladungspaket von wenigen bis zu 10^5 Elektronen reichen kann. Die Nachweisantwort ist über einen großen dynamischen Bereich linear.

[0157] Durch das Plazieren der bildgebenden Anordnung in der Nähe zu der Probe wird die Sammeleffizienz um einen Faktor von mindestens 10 im Vergleich zu auf Linsen-beruhenden Verfahren, wie die, die in üblichen CCD-Kameras gefunden werden, verbessert. Das bedeutet die Probe (der Emitter) steht in nahem Kontakt zu dem Detektor (bildgebende Anordnung) und dies beseitigt übliche bildgebende Optiken wie Linsen und Spiegel.

[0158] Wenn Radioisotope als Reportergruppen an den Zielmolekülen befestigt werden, werden energetische Partikel detektiert. Mehrere Reportergruppen die Partikel verschiedener Energien emittieren sind erfolgreich mit mikroerzeugten Detektoren verwendet worden, die ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , ^{14}C und ^{125}I enthalten. Die höher ener-

getischen Partikel wie von ^{32}P stellen die höchste molekulare Nachweissensitivität zur Verfügung wobei die niederenergetischen Partikel wie die von ^{35}S eine bessere Auflösung zur Verfügung stellen. Somit kann die Wahl des Radioisotopenreporters wie erforderlich angepaßt werden. Sobald die jeweilige Radioisotopenmarkierung ausgewählt wurde kann die Nachweisleistung durch die Berechnung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses (SRV) wie bei Eggers et al. (1994) vorhergesagt werden.

[0159] Ein alternatives lumineszentes Nachweisverfahren beinhaltet die Verwendung von fluoreszenten oder chemilumineszenten Reportergruppen, die an den Zielmolekülen befestigt sind. Die fluoreszenten Markierungen können kovalent oder durch Wechselwirkung befestigt sein. Fluoreszente Farbstoffe wie Ethidiumbromid mit einer intensiven Absorptionsbande im nahen UV-Bereich (300–350 nm) und einer hauptsächlich im sichtbaren Bereich (500–650 nm) ist für die eingesetzten CCD-Vorrichtungen am meisten geeignet da die Quantenwirksamkeit bei der Anregungswellenlänge um mehrere Größenordnungen niedriger als bei der fluoreszenten Signalwellenlänge ist.

[0160] Vom Standpunkt des Nachweises der Lumineszenz aus, haben Polysilizium CCD-Gates die eingebaute Fähigkeit den Beitrag des Auflichts im UV-Bereich wegzufiltern, während sie jedoch gegenüber der sichtbaren Lumineszenz, die durch fluoreszente Reportergruppen erzeugt wird, sehr sensitiv sind. Eine solche inhärente große Abgrenzung gegenüber der UV-Anregungen ermöglicht es große SRV (größer als 100) mit den CCD, die wie in der hierin aufgenommenen Publikation von Eggers et al. (1994) ausgestaltet sind, zu erreichen.

[0161] Für die Sondenimmobilisierung auf dem Detektor können Hybridisierungsmatrizen auf billigen SiO_2 -Wavern hergestellt werden, die nach der Hybridisierung und dem Trocknen anschließend auf der Oberfläche der CCDs plaziert werden. Dieses Format ist ökonomisch leistungsfähig da die Hybridisierung der DNA auf billigen wegwerfbaren SiO_2 -Wavern durchgeführt wird, wodurch die Wiederverwendung des teureren CCD-Detektors ermöglicht wird. Alternativ können die Sonden direkt auf dem CCD immobilisiert werden, um eine dedizierte Sondenmatrix zu erzeugen.

[0162] Um die Sonden auf der SiO_2 -Beschichtung zu immobilisieren, wird eine gleichmäßige Epoxidlage mit der Filmoberfläche unter Verwendung eines Epoxy-Silan-Reagenzes und standardmäßiger SiO_2 -Modifikationschemie, verknüpft. Die Amin-modifizierten Oligonukleotidsonden werden dann an der SiO_2 -Oberfläche mittels sekundärer Aminbildung mit dem Epoxidring verknüpft. Die sich ergebende Verknüpfung stellt 17 rotierbare Verbindungen zur Trennung der 3'-Base des Oligonukleotids und der SiO_2 -Oberfläche zur Verfügung. Um eine vollständige Amindeprotonierung sicher zu stellen und die Bildung einer Sekundärstruktur während der Kopplung zu minimieren, wird die Reaktion in 0,1 M KOH durchgeführt und bei 37°C für 6 Stunden inkubiert.

[0163] In der Format III SBH werden im allgemeinen die Signale für jeden von einer Milliarde Punkte gezählt. Es wäre nicht notwendig alle Anordnungen z. B. 4000 5×5 mm gleichzeitig zu hybridisieren und die aufeinander folgenden Verwendungen einer kleineren Anzahl von Anordnungen ist möglich.

[0164] Zyklierende Hybridisierungen sind ein mögliches Verfahren zur Erhöhung des Hybridisierungssignals. In einem Zyklus werden die meisten der fixierten Sonden mit DNA-Fragmenten hybridisiert, die Schwanzsequenzen aufweisen, die zu den markierten Sonden nicht komplementär sind. Durch die Erhöhung der Temperatur werden diese Hybride geschmolzen werden (**Fig. 3**). Im nächsten Zyklus werden einige (~ 0,1 %) mit einem geeigneten DNA-Fragment hybridisiert und weitere markierte Sonden werden ligiert werden. In diesem Fall tritt für beide Sonden Gruppen ein diskriminierendes Schmelzen der DNA-Hybride mit Fehlpaarungen gleichzeitig auf. Bei der zyklierenden Hybridisierung werden alle Bestandteile bei 37°C für T4 oder bei einer höheren Temperatur für alle thermostabilen Ligasen hinzugefügt, bevor das Zyklieren beginnt. Dann wird die Temperatur auf 15–37°C verringert und der Chip wird für bis zu 10 Minuten inkubiert und dann wird die Temperatur für einige Minuten auf 37°C oder höher erhöht und dann wieder reduziert. Die Zyklen können bis zu 10 mal wiederholt werden. In einer Variante kann eine optimale höhere Temperatur (10–50°C) ohne das Zyklieren verwendet werden und eine längere Ligationsreaktion kann durchgeführt werden (1–3 Stunden).

[0165] Die hierin beschriebenen Verfahren erlauben die Herstellung komplexer Chips unter Verwendung von Standardsynthese und das präzise Auftupfen von Oligonukleotiden auf Grund der relativ kleinen Zahl der notwendigen Oligonukleotide. Beispielsweise können wenn alle 7-Mer Oligos synthetisiert werden (16384 Sonden) Listen mit 256 Millionen 14-Meren bestimmt werden.

[0166] Eine wichtige Variante des erfundenen Verfahrens ist die Verwendung von mehr als einer unterschiedlich markierten Sonde pro Grundanordnung. Dies kann mit zwei Zielen im Sinn ausgeführt werden, dem Multiplexen, um die Zahl der getrennt hybridisierten Anordnungen zu verringern oder um eine Liste von noch länge-

ren Oligosequenzen wie von 3×6 oder 3×7 zu bestimmen. In diesem Fall kann wenn zwei Markierungen verwendet werden die Spezifität der 3 aufeinanderfolgenden Oligonukleotide nahezu absolut sein, da positive Stellen genug Signal beider Markierungen aufweisen müssen.

[0167] Eine weitere zusätzliche Variante ist die Verwendung von Chips die BxNy-Sonden wobei y von 1 bis 4 beträgt, enthalten. Solche Chips erlauben das Lesen der Sequenz in verschiedenen Leserastern. Dies kann auch durch die Verwendung geeigneter Gruppen von markierten Sonden erreicht werden oder dadurch, daß sowohl F- und T-Sonden einige unbestimmte Endpositionen (d.h. einen bestimmten Umfang der terminalen Degeneration) aufweisen. Die universellen Basen können auch als Teil des Linkers eingesetzt werden, um Sonden definierter Sequenz mit dem festen Träger zu verknüpfen. Dies macht die Sonden für die Hybridisierung zugänglicher und macht das Konstrukt stabiler. Wenn eine Probe 5 Basen aufweist, kann man z. B. drei universelle Basen als Linker verwenden (**Fig. 4**).

BEISPIEL VIII ANALYSIEREN DER ERHALTENEN DATEN

[0168] Die Bild-Dateien werden durch ein Bildanalyseprogramm wie das DOTS-Programm (Drmanac et al., 1993) analysiert und mit den z.B. im SCORES-Programm enthaltenen statistischen Funktionen gestaffelt und evaluiert (Drmanac et al., 1994). Aus der Signalverteilung kann ein optimaler Schwellenwert für die Umwandlung eines Signal in einen +/- Ergebnis bestimmt werden.

[0169] Aus der Position der nachgewiesenen Markierung würden F+P-Nukleotidsequenzen der Fragmente durch die Kombination der bekannten Sequenzen der immobilisierten und markierten Sonden, die zu den markierten Positionen korrespondieren, bestimmt werden. Die vollständige Nukleinsäuresequenz oder Sequenzteilstücke des Ausgangsmoleküls wie eines humanen Chromosoms würden dann aus den überlappenden F+p-Sequenzen durch rechnerische Deduktion bestimmt werden.

[0170] Eine Option besteht darin Hybridisierungssignale z. B. Punktwerte in während des Sequenzzusammensetzungsprozesses +/- Ergebnis umzuwandeln. In diesem Fall wird das Zusammensetzen mit einer F + P-Sequenz mit einem sehr hohen Wert beginnen, beispielsweise mit der F+p-Sequenz AAAAAATTTTTT (SEQ ID NR:1). Punktwerte aller hier möglichen überlappenden Sonden AAAAAATTTTTTA (SEQ ID NR:3), AAAAAATTTTTTTT (SEQ ID NR:4), AAAAAATTTTTTTC (SEQ ID NR:5) und AAAAAATTTTTTTG (SEQ ID NR:6) und drei zusätzliche Sonden die am Anfang verschieden sind (TAAAAATTTTTT, SEQ ID NR:7; CAAAAATTTTTT, SEQ ID NR:8; GAAAAATTTTTT, SEQ ID NR:9) werden verglichen und drei Ergebnisse werden definiert: (i) nur die Ausgangssonde und eine der 4 überlappenden Sonden weisen Punktwerte auf die im Verhältnis zu den anderen sechs Sonden deutlich positiv sind in diesem Fall wird die AAAAAATTTTTT-Sequenz (SEQ ID NR:1) um ein Nukleotid nach rechts verlängert; (ii) keine Sonde mit Ausnahme der Ausgangssonde zeigt ein deutlich positiven Punktwert, das Zusammensetzen wird gestoppt, z.B. ist die AAAAAATTTTTT-Sequenz (SEQ ID NR:10) am Ende des DNA-Moleküls, das sequenziert wird; (iii) mehr als eine deutlich positive Sonde zwischen den überlappenden und/oder anderen drei Sonden wird gefunden; das Zusammenbauen wird auf Grund des Fehlers oder des Verzweigens gestoppt (Drmanac et al., 1989).

[0171] Das Verfahren der rechnerischen Deduktion würde Computerprogramme, die bestehende Algorithmen verwenden (z.B. siehe Pevzner, 1989; Drmanac et al. 1991; Labat und Drmanac, 1993; jedes durch Verweis herein aufgenommen), einsetzen.

[0172] Wenn zusätzlich zu F + P, F(Leerraum 1)P, F(Leerraum 2)P, F(Leerraum 3)P oder F(Leerraum 4)P bestimmt werden, werden Algorithmen verwendet werden, um alle Datensätze abzugleichen, um mögliche Fehler zu berichtigen oder um die Situation zu lösen bei der es ein Verzweigungsproblem gibt (siehe z.B. Drmanac et al., 1989; Bains et al., 1988; jedes herein durch Verweis aufgenommen).

BEISPIEL IX

WIEDERVERWENDUNG DER SEQUENZIERUNGSSCHIPS

[0173] Wenn die Ligation im Sequenzierungsverfahren eingesetzt wird, dann können die normalen Oligonukleotidchips nicht unmittelbar wiederverwendet werden. Der Erfinder erwägt, daß dies auf verschiedenen Wegen gelöst werden kann.

[0174] Man kann Ribonukleotide in einer zweiten Sonde, Sonde P, verwenden, so daß diese Sonde anschließend durch RNase-Behandlung entfernt werden kann. Die RNase-Behandlung kann RNase A eine Endoribo-

nuklease verwenden, die spezifisch einzelsträngige RNA 3' von Pyrimidinresten angreift und die Phosphatverknüpfung zu dem angrenzenden Nukleotid spaltet. Das Endprodukt sind Pyrimidin-3-Phosphate und Oligonukleotide mit terminalen Pyrimidin-3'-Phosphaten. RNase A arbeitet in Abwesenheit von Co-Faktoren und divalenten Kationen.

[0175] Um eine RNase zu nutzen würde man im allgemeinen den Chip in einem beliebigen RNase-enthaltenden Puffer wie durch Sambrook et al. (1989, hierin durch Verweis aufgenommen) beschrieben, inkubieren. Die Verwendung von 30–50 µl RNase-enthaltenden Puffers pro 8 × 8 mm oder 9 × 9 mm Anordnung bei 37°C für zwischen 10 und 60 Minuten ist angemessen. Man würde dann mit Hybridisierungspuffer waschen.

[0176] Obwohl nicht umfassend anwendbar könnte man auch die Uracilbase, wie durch Craig et al. (1989, hierin durch Verweis aufgenommen) beschrieben, in bestimmten Ausführungsformen verwenden. Die Zerstörung der ligierten Sondenkombination, um einen wiederverwendbaren Chip zu ergeben, würde durch Verdau mit dem E. coli. Reparaturenzym Uracil-DNA-Glycosilase erreicht werden, die Uracil aus DNA entfernt.

[0177] Man könnte auch eine spezifisch spaltbare Bindung zwischen der Sonde erzeugen und dann die Bindung nach dem Nachweis spalten. Beispielsweise kann dies durch chemische Ligation wie durch Shabarova et al. (1991) und Dolinnaya et al. (1988) beschrieben, erreicht werden, wobei beide Referenzen hierin spezifisch durch Verweis aufgenommen sind.

[0178] Shabarova et al. (1991) beschreibt die Kondensation von Oligodeoxyribonukleotiden mit Cyanogenbromid als Kondensierungsmittel. In ihrer chemischen Einschnitt-Ligationsreaktion werden die Oligonukleotide auf 97°C erhitzt, langsam auf 0°C abgekühlt, dann wird 1 µl 10 M BrCN in Acetonitril hinzugefügt.

[0179] Dolinnaya et al. (1988) zeigen wie Phosphoramidat und Pyrophosphatinternukleotidbindungen in DNA-Doppelstränge aufgenommen werden können. Sie verwenden auch ein chemisches Ligationsverfahren für die Modifikation des Zuckerphosphatrückgrats der DNA mit einem wasserlöslichen Carbodiimid (CDI) als Kopplungsmittel. Die selektive Spaltung einer Phosphoamidbindung bedarf des Kontakts mit 15% CH₃COOH für 5 Minuten bei 95°C. Die selektive Spaltung einer Pyrophosphatbindung bedarf des Kontakts mit einer Pyridin-Wasser-Mischung (9:1) und frisch destillierten (CF₃CO)₂O.

[0180] Während die Zusammensetzungen und Verfahren dieser Erfindung im Hinblick auf bevorzugte Ausführungsformen beschrieben worden sind, wird es für Fachleute offensichtlich sein, daß Variationen auf die Zusammensetzung, die Verfahren und in den Schritten oder der Abfolge der Schritten der hierin beschriebenen bevorzugten Ausführungsform angewendet werden können ohne von der in den Ansprüchen definierten Erfindung abzuweichen. Insbesondere wird es offensichtlich sein, daß bestimmte Mittel, die sowohl chemisch und physiologisch verwandt sind, für die hierin beschriebenen Mittel substituiert werden können, wobei die selben und ähnliche Ergebnisse erreicht werden würden. Alle solche ähnlichen Substitute oder Modifikation, die für den Fachmann erkennbar sind, werden als innerhalb der Erfindung wie sie durch die angefügten Ansprüche definiert sind, angesehen. Der gesamte beanspruchte Gegenstand und die Verfahren können hergestellt werden und ohne unnötiges Experimentieren ausgeführt werden.

LITERATURZITATE

- Bains et al., 1988, J. Theor. Biol., 135:303–307.
 Broude et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:3072–3076
 Brumbaugh et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85:5610–5614.
 Cantor et al., 1992, Genomics, 13, 1378.
 Cate et al., 1991, GATA, 8(3):102–106.
 Chu et al., 1983, Nucleic Acids Res., 11:6513–6529.
 Craig et al., 1989, Nucleic Acids Research, 17(12):4605.
 Dahlen et al., 1987, Mol. Cell. Probes 1:159–168.
 Dolinnaya et al., 1988, Nucleic Acids Research, 16(9):3721–3738.
 Drmanac & Crkvenjakow, 1990, Scientia Yugoslavica, 16, 97.
 Drmanac & Crkvenjakow, U. S. Patent 5,202,231.
 Drmanac et al., 1989, Genomics, 4:114–128.
 Drmanac et al., 1991, J. Biomol. Struct. & Dyn., 8:1085.
 Drmanac et al., 1991, In "Electrophoreses, Supercomputers and the Human Genome", S. 47- 59, World Scientific Publishing Co., Singapore.
 Drmanac et al., 1993a, Proceedings of 2nd International Conference on Bioformatics, Supercomputing, and

- Complex Genome Analysis, World Scientific Publishing Co. S. 121–134.
- Drmanac et al., 1993b, DNA Sequence Determination by Hybridization: A Strategy for Efficient Large-Scale Sequencing, *Science*, 260:1649–1652.
- Drmanac, 1994, Abstract Book for Genome Mapping and Sequencing; arranged by Richard Myers, David Porteous and Robert Waterstone, Cold Spring Harbor Laboratories, S. 60.
- Drmanac et al., 1994, Proceedings of the 3rd International Workshop of Transcribed Sequences, im Druck
- Duncan & Cavalier, 1988, *Analytical Biochemistry*, 169:104–108.
- Eggers et al., 1994, *BioTechniques*, 17(3):516–524.
- Fitzgerald et al., 1992, *Nucleic Acids Research*, 20(14):3753–62.
- Fodor et al., 1991, *Science*, 251:767–768.
- Hoheisel & Lehrach, 1990, *FEBS Lett.* 274(1,2):103–106.
- Inouye & Hondo, 1990, *J. Clin. Microb.*, 28:1469–1472.
- Jacobsen et al., 1990, *Genomics*, 8:001–007.
- Keller et al., 1988, *Anal. Biochem.*, 170:441–450.
- Keller et al., 1989, *Anal. Biochem.*, 177:27–32.
- Khrapko et al., 1991, *J. DNA Sequencing Mapping*, 1, 375.
- Labat and Drmanac, 1993, Proceeding of 2nd International Conference on Bioinformatics, Supercomputing, and Complex Genome Analysis, World Scientific Publishing Co. S. 555–565.
- Landegren et al., 1988, *Science* 241:1077–1080.
- Maxam & Gilbert, 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74, 560.
- Morriey & Collins, 1989, *Mol. Cell. Probes* 3:189–207.
- Murakami et al., 1991, *Nucleic Acids Research*, 19(15):4097–4102.
- Nagata et al., 1985, *FEBS Letters*, 183:379–382.
- Nichols et al., 1994, *Nature*, 369:492.
- Pease et al., 1994 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:5022–5026.
- Peterkin et al., 1987, *BioTechniques* 5(2):132–134.
- Peterkin et al., 1989, *Food Microbiology* 5(2):281–284.
- Berg, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88:8237–8241.
- Rasmussen et al., 1991, *Analytical Biochemistry*, 198:138–142.
- Sambrook et al., 1989, *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, et al., 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74, 5463.
- Schriefer et al., 1990, *Nucleic Acids Research*, 18(24):7455.
- Schubert et al., 1990, *Nucleic Acids Research*, 18(11):3427.
- Shabarova et al., 1991, *Nucleic Acids Research*, 19(15):4247–4251.
- Sharp et al., 1989 *Food Microbiology*, 6:261–265.
- Southern, PCT Patent Application WO 89/10977.
- Southern & Maskos, PCT Patent Application WO 90/03382.
- Southern et al., 1992, *Genomics*, 13, 1008.
- Strezoska et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88, 10089.
- Van Ness et al., 1991, *Nucleic Acids Research*, 19(12):3345.
- Wu & Wallace, 1989 *Gene*, 76:245–254.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATIONEN:

- (i) ANMELDER:
 NAME: ARCH DEVELOPEMENT CORPORATION
 STRAÙE: 1101 EAST 58TH STREET
 STADT: CHICAGO
 STAAT: ILLINOIS
 LAND: VEREINIGTE STAATEN VON AMERIKA
 POSTLEITZAHL: 60637
 TELEPHONNR.: (312) 702-1692
 TELEFAXNR.: (312) 702-0741
- (ii) ERFINDER: DRMANAC, RADOJE
- (iii) TITEL DER ERFINDUNG: VERFAHREN UND ZUSAMMENSETZUNG
 FÜR DIE EFFIZIENTE
 NUKLEINSÄURESEQUENZIERUNG
- (iv) ANZAHL DER SEQUENZEN:10
- (v) KORRESPONDENZADRESSE:
 (A) ADRESSAT: ARNOLD; WHITE & DURKEE
 (B) STRAÙE: P. O. BOX 4433
 (C) STADT: HOUSTON
 (D) STAAT: TX
 (E) LAND: USA
 (F) POSTLEITZAHL: 77210-4433
- (vi) COMPUTERLESBARE FORM:
 (A) MEDIUM TYP: FLOPPY DISK
 (B) COMPUTER: IBM PC COMPATIBEL
 (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 (D) SOFTWARE: PATENTIN RELEAE #1,0, VER. #1,25
- (vii) DATEN DER VORLIEGENDEN ANMELDUNG:
 (A) ANMELDENUMMER: HIERMIT EINGEREICHT
 (B) EINREICHDATEN: HIERMIT EINGEREICHT
 (C) KLASSIFIZIERUNG: UNBEKANNT
- (viii) DATEN VORHERGEHENDER ANMELDUNGEN:
 (A) ANMELDENUMMER: USSN 08/303,058
 (B) EINREICHDATEN: 08 SEPTEMBER 1994 (08.09.94)
 (C) KLASSIFIKATION: UNBEKANNT
 (A) ANMELDENUMMER: USSN 08/127,420
 (B) EINREICHDATEN: 27 SEPTEMBER 1993 (27.09.93)
 (C) KLASSIFIKATION: UNBEKANNT
- (ix) ANWALTS/AGENTINFORMATION:
 (A) NAME: PARKER, DAVID L.
 (B) REGISTRIERUNGSNUMMER: 32,165
 (C) REFERENZ/PROZESSLISTENNUMMER: ARCD146P--\PAR

- (x) TELEKOMMUNIKATIONSINFORMATION:
 - (A) TELEPHON: (512) 418-3000
 - (B) TELEFAX: (512) 474-7577

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:1:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 12 BASENPAARE
 - (B) TYP: NUKLEINSÄURE
 - (C) STRÄNGIGKEIT: EINZEL
 - (D) TOPOLOGIE: LINEAR
- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA
- (xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NR:1:

AAAAAATTTT TT

12

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:2:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 13 BASENPAARE
 - (B) TYP: NUKLEINSÄURE
 - (C) STRÄNGIGKEIT: EINZEL
 - (D) TOPOLOGIE: LINEAR
- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA
- (xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NR:2:

AAAAAATTTT TTC

13

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:3:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 12 BASENPAARE
 - (B) TYP: NUKLEINSÄURE
 - (C) STRÄNGIGKEIT: EINZEL
 - (D) TOPOLOGIE: LINEAR
- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA
- (xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NR:3:

AAAAATTTTT TA

12

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:4:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 12 BASENPAARE

- (B) TYP: NUKLEINSÄURE
- (C) STRÄNGIGKEIT: EINZEL
- (D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NR:4:

AAAAATTTTT TT

12

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:5:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 12 BASENPAARE
- (B) TYP: NUKLEINSÄURE
- (C) STRÄNGIGKEIT: EINZEL
- (D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) BESCHREIBUNG D-ER SEQUENZ: SEQ ID NR:5:

AAAAATTTTT TC

-

12

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:6:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 12 BASENPAARE
- (B) TYP: NUKLEINSÄURE
- (C) STRÄNGIGKEIT: EINZEL
- (D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NR:6:

AAAAATTTTT TG

12

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:7:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 12 BASENPAARE
- (B) TYP: NUKLEINSÄURE
- (C) STRÄNGIGKEIT: EINZEL
- (D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NR:7:

TAAAAATTTT TT

12

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:8:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 12 BASENPAARE
 - (B) TYP: NUKLEINSÄURE
 - (C) STRÄNGIGKEIT: EINZEL
 - (D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NR:8:

CAAAATTTT TT

12

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:9:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 12 BASENPAARE
 - (B) TYP: NUKLEINSÄURE
 - (C) STRÄNGIGKEIT: EINZEL
 - (D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NR:9:

GAAAAATTTT TT

12

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:10:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 11 BASENPAARE
 - (B) TYP: NUKLEINSÄURE
 - (C) STRÄNGIGKEIT: EINZEL
 - (D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NR:10:

AAAAAATTTT T

11

Patentansprüche

1. Verfahren zur Identifizierung einer Nukleotidsequenz in einer Zielnukleinsäure, umfassend die Schritte:
 - (a) Inkontaktbringen einer Zielnukleinsäure mit einer Gruppe (einer) immobilisierten(r) Oligonukleotidsonde(n) und mindestens einer markierten Oligonukleotidsonde aus einer Gruppe markierter Oligonukleotidsonden unter Hybridisierungsbedingungen, die wirksam sind, die Hybridisierung zwischen: (i) komplementären Sequenzen der Zielnukleinsäure und der immobilisierten Sonden und (ii) komplementären Sequenzen der Zielnukleinsäure und der markierten Sonde(n), zu erlauben;
 - (b) kovalentes Verbinden der immobilisierten Sonde(n) und der markierten Sonde(n), die angrenzend an das-

selbe Zielnukleinsäuremolekül hybridisieren;

(c) Nachweisen der Markierungen der markierten Oligonukleotidsonde(n), die kovalent mit der(n) immobilisierten Sonde(n) verbunden ist (sind); und

(d) Nachweisen mindestens einer Nukleotidsequenz in der Zielnukleinsäure durch Schritte, die das Verbinden der Nukleotidsequenzen der nachgewiesenen markierten Oligonukleotidsonde(n) mit den Nukleotidsequenzen der jeweilig verbundenen immobilisierten Oligonukleotidsonde(n) umfassen, dadurch charakterisiert, daß der Schritt des Nachweises den Nachweis der Markierung umfaßt, während sie an den Hybridisierungskomplex befestigt ist, welcher zwischen der (den) angrenzend hybridisierten immobilisierten Sonde(n) und markierten Sonde(n) gebildet wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem die mindestens eine Sonde mit einer Markierung markiert ist, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einer fluoreszierenden Markierung, einer chemilumineszenten Markierung, einem nicht-radioaktiven Isotop, einer radioaktiven Markierung und einem alkalischen Phosphataseenzym, als den Sondennachweis durch die Enzymwirkung auf ein Substrat der alkalischen Phosphatase erlaubt.

3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das kovalente Verbinden der immobilisierten Sonde(n) und der markierten Sonde(n) das Inkontaktbringen der Sonden mit einem Ligierungsmittel umfaßt.

4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die markierte(n) Sonde(n) mit der Zielnukleinsäure zur gleichen Zeit wie mit dem Ligierungsmittel in Berührung gebracht wird(werden).

5. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, in dem nach dem Schritt (b) und vor dem Schritt (c) die markierten Sonden, die nicht kovalent mit einer immobilisierten Sonde verbunden sind, entfernt werden.

6. Verfahren nach Anspruch 5, in dem die markierten Sonden, die nicht mit einer immobilisierten Sonde kovalent verbunden sind, unter stringenten Waschbedingungen entfernt werden.

7. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, in dem eine Vielzahl immobilisierter Sonden auf demselben Träger immobilisiert sind.

8. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, in dem die immobilisierten Oligonukleotidsonden eine Vielzahl von Anordnungen umfassen, die in der Form eines Sequenzierungschips angeordnet sind.

9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei hydrophobe Bereiche zwischen den Anordnungen verwendet werden.

10. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, in dem im Schritt (a) die Zielnukleinsäure mit einer Gruppe markierter Oligonukleotidsonden in sequentieller Weise mit einer markierten Oligonukleotidsonde nach der anderen in Berührung gebracht wird.

11. Verfahren nach Anspruch 10, in dem im Schritt (a) markierte Oligonukleotidsonden der Gruppe, die verschiedene Nukleotidsequenzen aufweisen, mit derselben Markierung markiert werden.

12. Verfahren nach Anspruch 10, in dem im Schritt (a) mindestens zwei der markierten Oligonukleotidsonden der Gruppe, die verschiedene Nukleotidsequenzen aufweisen, mit verschiedenen Markierungen markiert werden.

13. Verfahren nach Anspruch 10, in dem im Schritt (a) die Zielnukleinsäure gleichzeitig mit der Gruppe der immobilisierten Sonden und den markierten Oligonukleotidsonden in Kontakt gebracht wird.

14. Verfahren nach Anspruch 10, in dem im Schritt (a) die Zielnukleinsäure zuerst mit der Gruppe der immobilisierten Sonden in Kontakt gebracht wird, um immobilisierte Sonden:Ziel-Komplexe zu bilden, und daraufhin mit der markierten Oligonukleotidsonde.

15. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, in dem in Schritt (a) die Zielnukleinsäure gleichzeitig mit mindestens zwei markierten Oligonukleotidsonden einer Gruppe markierter Oligonukleotidsonden in Kontakt gebracht wird, wobei die mindestens zwei markierten Oligonukleotidsonden mit verschiedenen unterscheidbaren Markierungen markiert sind und verschiedene Nukleotidsequenzen aufweisen, die durch die Eigenschaften der jeweiligen Markierungen erkennbar sind.

16. Verfahren nach Anspruch 15, in dem im Schritt (a) die Zielnukleinsäure gleichzeitig mit der Gruppe der immobilisierten Sonden und den mindestens zwei markierten Oligonukleotidsonden in Kontakt gebracht wird.
17. Verfahren nach Anspruch 15, in dem im Schritt (a) die Zielnukleinsäure zuerst mit der Gruppe der immobilisierten Sonden in Kontakt gebracht wird, um immobilisierte Sonden:Ziel-Komplexe zu bilden, und daraufhin mit den mindestens zwei markierten Oligonukleotidsonden.
18. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, in dem im Schritt (a) die Zielnukleinsäure gleichzeitig mit mindestens zwei markierten Oligonukleotidsonden einer Gruppe markierter Oligonukleotidsonden in Kontakt gebracht wird, wobei die mindestens zwei markierten Oligonukleotidsonden mit verschiedenen unterscheidbaren Markierungen markiert sind, und verschiedene Nukleotidsequenzen aufweisen, die durch die Eigenschaften ihrer jeweiligen Markierungen erkennbar sind und in Schritt (d) die Nukleotidsequenzen der immobilisierten und markierten Sonden durch das in situ Beobachten der Eigenschaften der Markierungen und ihrer jeweiligen Positionen innerhalb der Anordnung bestimmt wird.
19. Verfahren nach Anspruch 18, in dem im Schritt (a) die Zielnukleinsäure gleichzeitig mit der Anordnung der immobilisierten Sonden und den mindestens zwei markierten Oligonukleotidsonden in Kontakt gebracht wird.
20. Verfahren nach Anspruch 18, in dem im Schritt (a) die Zielnukleinsäure zuerst mit der Anordnung der immobilisierten Sonden in Kontakt gebracht wird, um immobilisierte Sonden:Ziel-Komplexe zu bilden, und daraufhin mit den mindestens zwei markierten Oligonukleotidsonden.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 20, in dem eine Nukleotidsequenz der Zielnukleinsäure aus überlappenden zusammengesetzten Nukleotidsequenzen von kovalent verbundenen immobilisierten und markierten Sonden zusammengesetzt wird.
22. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 20, in dem die gesamte Nukleotidsequenz der Zielnukleinsäure bestimmt wird.
23. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 20, in dem die Zielnukleinsäure kartiert wird.
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 20, in dem die Zielnukleinsäure partiell sequenziert wird.
25. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 20, in dem die immobilisierten Oligonukleotidsonden eine Länge F aufweisen und die markierten Oligonukleotidsonden eine Länge P aufweisen, wobei F und P jeweils unabhängig zwischen 4 und 9 Nukleotide aufweisen.
26. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 20 und 25, in dem die immobilisierte(n) Oligonukleotidsonde(n) und/oder die markierte(n) Sonde(n) zusätzlich eine universelle Base oder alle vier Basen an der Endposition davon aufweist(en).
27. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 20, in dem die Zielnukleinsäure vor dem Schritt (a) fragmentiert wird.
28. Verfahren nach Anspruch 27, in dem die Zielnukleinsäure durch Restriktionsenzymverdau, Ultraschallbehandlung, NaOH-Behandlung oder durch Scheren unter niedrigem Druck fragmentiert wird.
29. Verfahren nach Anspruch 27, in dem die Zielnukleinsäurefragmente eine Länge T aufweisen, die immobilisierten Oligonukleotidsonden eine Länge F aufweisen und die markierten Oligonukleotidsonden eine Länge P aufweisen, wobei T zwischen 10 und 100 Nukleotide aufweist und F und P jeweils unabhängig zwischen 4 und 9 Nukleotide aufweist.
30. Verfahren nach Anspruch 29, in dem T zwischen 10 und 40 Nukleotide aufweist.
31. Verfahren nach Anspruch 29, in dem T etwa 20 Nukleotide aufweist.
32. Verfahren nach Anspruch 29, in dem T etwa drei mal länger als F ist.
33. Verfahren nach einem der Ansprüche 29 bis 32, in dem F und P jeweils 6 Nukleotide aufweisen.

34. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, in dem die angrenzende hybridisierte(n), immobilisierte(n) und markierte(n) Sonde(n) miteinander kovalent durch enzymatische Ligation verbunden sind.
35. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, in dem die Hybridisierung in Zyklen ausgeführt wird.
36. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, in dem die Hybridisierungsbedingungen dabei wirksam sind, die Hybridisierung zwischen den Zielnukleinsäuren und nur den immobilisierten Sonden und markierten Sonden zuzulassen, die zu einem Teil des Ziels perfekt komplementär sind.
37. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, in dem die Hybridisierungsbedingungen dabei wirksam sind, die Hybridisierung nur zwischen den immobilisierten Sonden und markierten Sonden zuzulassen, die dazu in der Lage sind unmittelbar angrenzend an dasselbe Zielnukleinsäuremolekül zu hybridisieren.
38. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, in dem die Zielnukleinsäure klonierte DNA, chromosomale DNA oder eine mRNA ist.
39. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, in dem die immobilisierten Oligonukleotidsonden mittels der kovalenten Befestigung immobilisiert werden.
40. Verfahren nach Anspruch 39, in dem die immobilisierten Sonden durch eine Phosphodiesterverknüpfung immobilisiert werden.
41. Verfahren nach Anspruch 39, in dem die immobilisierten Sonden durch einen Linker immobilisiert werden.
42. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, in dem die immobilisierten Sonden auf Glas, Polystyrol oder Teflon immobilisiert werden.
43. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, in dem die Markierung ein radioaktives Isotop, nicht-radioaktives Isotop oder eine fluoreszierende oder eine chemilumineszierende ist.
44. Verfahren nach Anspruch 43, in dem die Markierung ein fluoreszierender Farbstoff ist.
45. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, in dem eine immobilisierte Sonde oder eine markierte Sonde, eine modifizierte Base oder eine universelle Base umfaßt.
46. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, in dem die immobilisierte Sondenanordnung nach der Hybridisierung wiederverwendbar ist.
47. Verfahren nach Anspruch 46, wobei die Oligonukleotide der markierten Sonde Ribonukleotide umfassen.
48. Verfahren nach Anspruch 47, wobei die kovalent verbundene markierte Sonde, die Ribonukleotide umfaßt, von der immobilisierten Sonde durch RNAase-Behandlung entfernt wird.
49. Verfahren nach Anspruch 46, wobei die kovalent verbundene markierte Sonde eine Uracilbase umfaßt.
50. Verfahren nach Anspruch 49, wobei die kovalent verbundene markierte Sonde, die eine Uracilbase umfaßt, von der immobilisierten Sonde durch Uracil-DNA-Glycosylase-Behandlung entfernt wird.
51. Verfahren nach Anspruch 46, wobei die markierte Sonde eine chemisch spaltbare Bindung umfaßt.
52. Kit für die Verwendung zum Nachweis einer Nukleotidsequenz in einer Zielnukleinsäure, das (a) einen festen Träger an den eine Anordnung immobilisierter Oligonukleotidsonden befestigt ist, (b) eine Gruppe von Lösungen markierter Oligonukleotidsonden und (c) ein Legierungsmittel umfaßt.
53. Kit nach Anspruch 52, wobei die immobilisierten Oligonukleotidsonden auf einem einzelnen Träger angeordnet sind.

54. Kit nach Anspruch 53 in dem die Anordnung der immobilisierten Oligonukleotidsonden eine Vielzahl von Anordnungen umfaßt, die in der Form eines Sequenzierungschips angeordnet sind.
55. Kit nach Anspruch 54, wobei hydrophobe Bereiche zwischen den Anordnungen verwendet werden.
56. Kit nach einem der Ansprüche 52 bis 55, in dem mindestens zwei markierte Oligonukleotidsonden mit derselben Markierung markiert sind.
57. Kit nach einem der Ansprüche 52 bis 55, in dem mindestens zwei markierte Oligonukleotidsonden mit verschiedenen Markierungen markiert sind.
58. Kit nach einem der Ansprüche 52 bis 57, in dem die immobilisierten Oligonukleotidsonden eine Länge F aufweisen und die markierten Oligonukleotidsonden eine Länge P aufweisen, wobei F und P jeweils unabhängig zwischen 4 und 9 Nukleotide aufweisen.
59. Kit nach einem der Ansprüche 52 bis 58, in dem die immobilisierten Oligonukleotidsonden und/oder die markierte(n) Oligonukleotidsonde(n) des weiteren eine universelle Base oder alle vier Basen an der Endposition davon umfassen.
60. Kit nach einem der Ansprüche 52 bis 59, in dem die immobilisierten Oligonukleotidsonden und die markierten Oligonukleotide jeweils 6 Nukleotide aufweisen.
61. Kit nach einem der Ansprüche 52 bis 59, in dem die immobilisierten Oligonukleotidsonden eine Länge F aufweisen und das Zielnukleinsäurefragment eine Länge T aufweist und T dreimal länger als F ist.
62. Ein Kit nach einem der Ansprüche 52 bis 61, in dem das Ligierungsmittel ein Ligationsenzym ist.
63. Kit nach einem der Ansprüche 52 bis 62, wobei die immobilisierten Sonden über eine Phosphodiester-verknüpfung immobilisiert sind.
64. Kit nach einem der Ansprüche 52 bis 63, wobei die immobilisierten Sonden über einen Linker immobilisiert sind.
65. Kit nach einem der Ansprüche 52 bis 64, wobei die immobilisierten Sonden auf Glas, Polystyrol oder Teflon immobilisiert sind.
66. Kit nach einem der Ansprüche 52 bis 65, wobei die Markierung ein radioaktives Isotop, nicht-radioaktives Isotop, eine chemilumineszierende oder eine fluoreszierende ist.
67. Kit nach einem der Ansprüche 52 bis 65, wobei die Markierung ein fluoreszierender Farbstoff ist.
68. Kit nach einem der Ansprüche 52 bis 67, wobei die immobilisierte Sonde oder eine markierte Sonde eine modifizierte Base oder eine universelle Base umfaßt.
69. Kit nach einem der Ansprüche 52 bis 68, wobei die Oligonukleotide der markierten Sonde Ribonukleotide umfassen.
70. Kit nach einem der Ansprüche 52 bis 68, wobei die Oligonukleotide der markierten Sonde eine Uracilbase umfassen.
71. Kit nach einem der Ansprüche 52 – 61 und 63 – 70, wobei die erste Gruppe der Oligonukleotidsonden biotinyliert und auf einem Streptavidin-beschichteten Träger immobilisiert sind.
72. Verwendung zweier Gruppen bekannter Oligonukleotidsonden in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 – 51.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

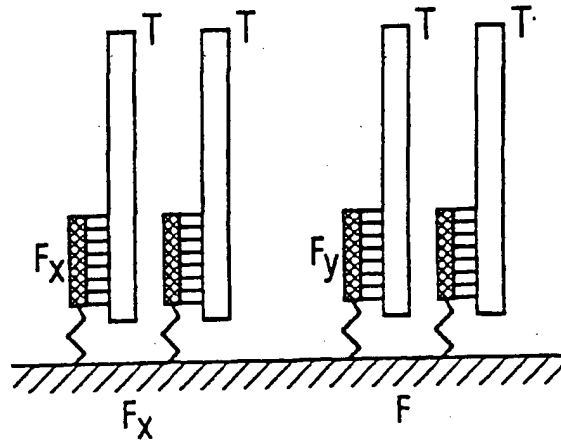


FIG. 1A

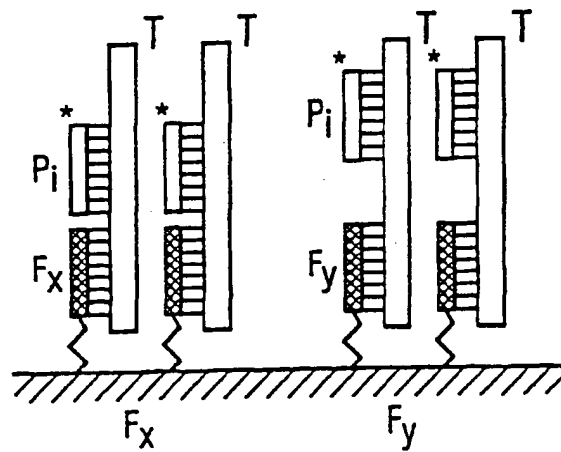


FIG. 1B

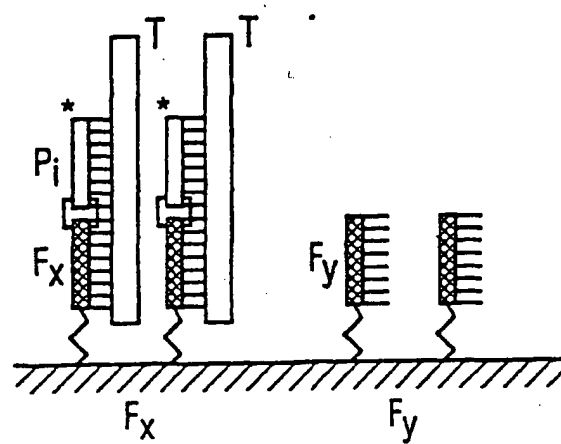


FIG. 1C

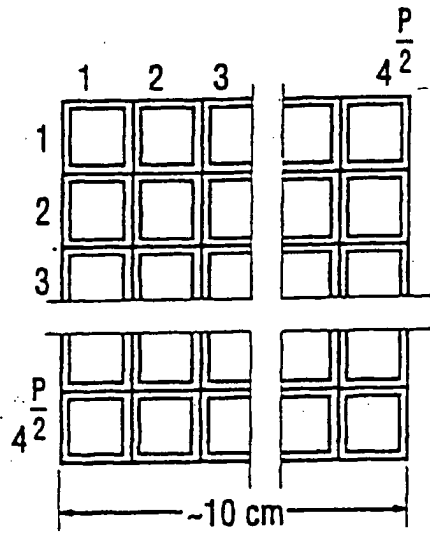


FIG. 2A

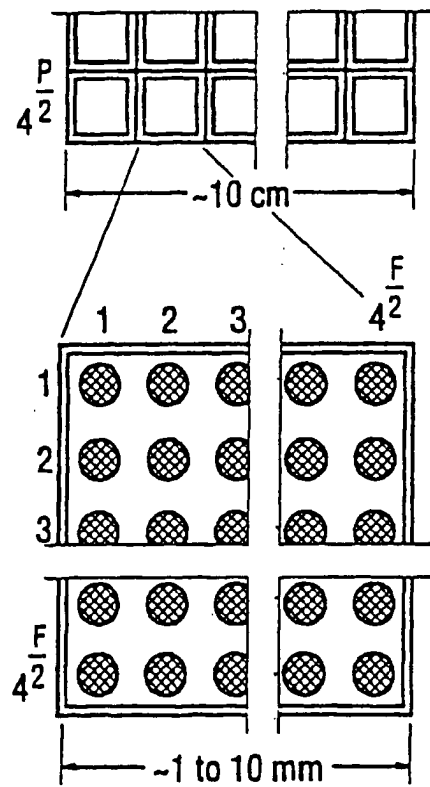


FIG. 2B

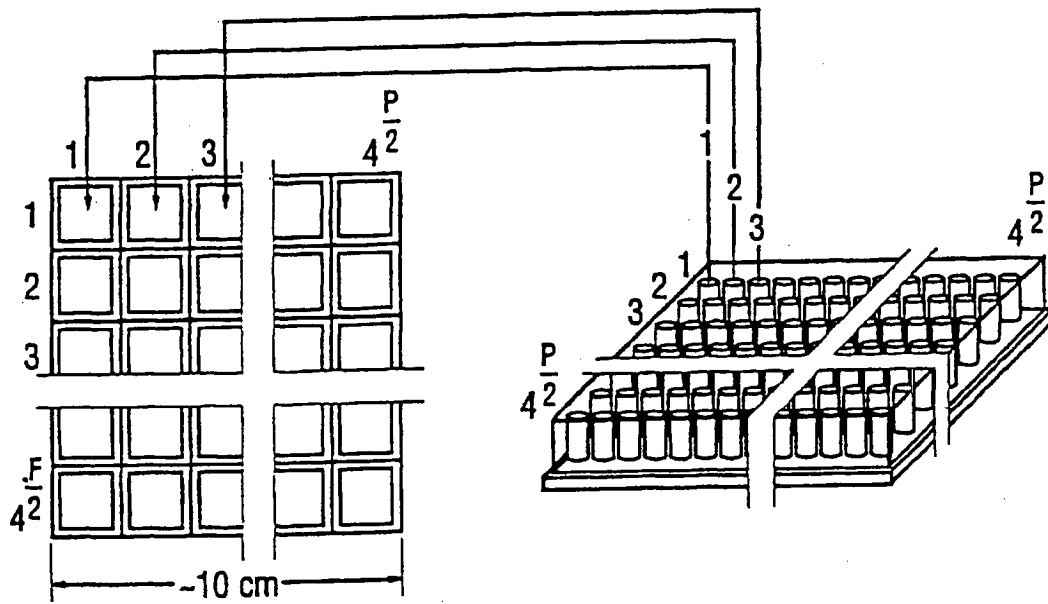


FIG. 2C

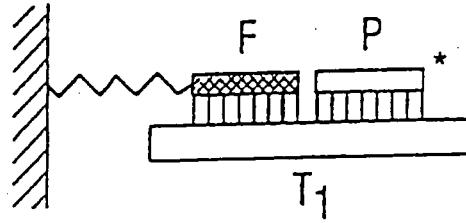


FIG. 3A

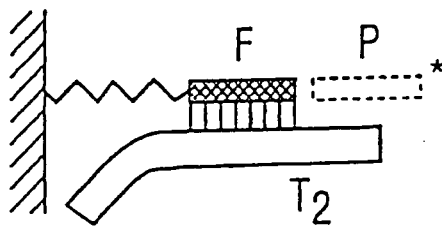


FIG. 3B

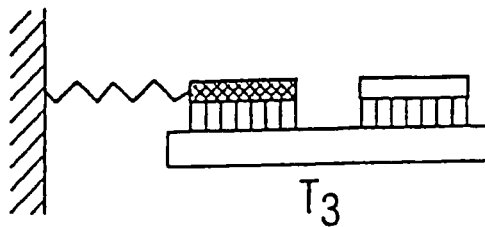


FIG. 3C

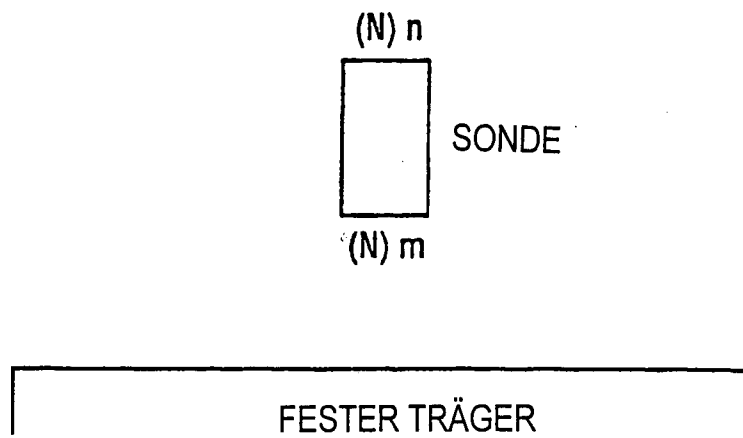


FIG. 4