



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 30 310 T3** 2009.12.17

(12) **Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 141 409 B2**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 30 310.9**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US99/29585**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 967 297.5**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/036152**
(86) PCT-Anmeldetag: **13.12.1999**
(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **22.06.2000**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **10.10.2001**
(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **08.03.2006**
(97) Veröffentlichungstag
des geänderten Patents beim EPA: **27.05.2009**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **17.12.2009**

(51) Int Cl.⁸: **C12Q 1/68** (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
B01J 19/00 (2006.01)

Patentschrift wurde im Einspruchsverfahren geändert

(30) Unionspriorität:

112078 P	14.12.1998	US
115496 P	11.01.1999	US

(73) Patentinhaber:

Pacific Biosciences of California, Inc. (n. d. Ges. d. Staates Delaware), Menlo Park, Calif., US

(74) Vertreter:

Vossius & Partner, 81675 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

WILLIAMS, G., John, Lincoln, NE 68516, US

(54) Bezeichnung: **KIT UND METHODE ZUR NUKLEINSÄURESEQUENZIERUNG EINZELNER MOLEKÜLE DURCH POLYMERASE SYNTHESE**

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

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Diese Erfindung betrifft ein verbessertes Verfahren zur Sequenzierung und Genotypisierung von Nukleinsäure in einer Einzelmolekülkonfiguration. Das Verfahren beinhaltet die Einzelmoleküldetektion von fluoreszenzmarkierten Pyrophosphat[PPi]-Resten, welche bei der Erzeugung eines Polymerase-Verlängerungsprodukts von Nukleotidtriphosphaten [NTPs] freigesetzt werden.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] WO 98/44152 (Glaxo Group Limited) betrifft ein Verfahren zur Nukleinsäuresequenzierung, durch welches verschiedene einzelsträngige Nukleinsäuren an den jeweiligen Orten auf einem Substrat bereitgestellt werden. Geeignete Primer, eine Polymerase und Nukleotide einschließlich markierte Nukleotide werden bereitgestellt. Die Sequenzierung wird durch die Detektion von Markierungen in den resultierenden Primerverlängerungen erreicht.

[0003] US 4,863,849 (Melamede) betrifft ein Verfahren zur Sequenzierung einer Nukleinsäure beinhaltend ein Reaktionsgemisch aus einem Template, einem Primer, einer Polymerase und einem aktivierten Nucleosid-5'-Triphosphat. Die Sequenzbestimmung folgt aus der Detektion des Einbaus des aktivierten Nucleosids in den Primerstrang.

[0004] WO 90/01069 (Segev Diagnostics Inc.) betrifft Verfahren zur Amplifikation und Detektion von erwünschten Nukleinsäuresequenzen, welche in einem Gemisch aus Nukleinsäuren zu finden sind.

[0005] Bisherige nicht-elektrophoretische Sequenzierungs- und Genotypisierungsverfahren machten sich die kontinuierliche Detektion der PPi-Freisetzung aus eingebauten Nucleotiden nicht zunutze. Im Stand der Technik der PPi-Sequenzierung (www.pyrosequencing.com) wird jedes Nucleotid, Adenosin-5'-Phosphat "A", Cytidin-5'-Phosphat "C", Guanosin-5'-Phosphat, Uridin-5'-Phosphat "U" und Thymin-5'-Phosphat "T", separat zu einem Reaktionsgemisch hinzugegeben, welches die Zielnukleinsäure und eine Polymerase enthält. Das aktuelle Nucleotid wird entfernt, bevor das nächste zugegeben wird. Der Einbau eines Nucleotids wird begleitet von der Freisetzung von PPi aus dem NTP, nachgewiesen mittels eines sekundären Assays für PPi. Ein sekundärer Assay ist erforderlich, da der PPi-Rest des NTP nicht markiert ist. Pro Zyklus kann nur ein Nucleotid getestet werden; wären alle 4 NTPs gleichzeitig anwesend, würde die Polymerisationsreaktion unkontrolliert fortgesetzt werden und es könnte keine Sequenzinformation erhalten werden. Die gelesene Länge wird durch den Verlust der Synchronisation unter den Zielnukleinsäuremolekülen in der Probe begrenzt.

[0006] Andere nicht-elektrophoretische Verfahren, so wie die schrittweise Ligation und Spaltung von Sonden auf an Mikrokügelchen befestigten DNA-Fragmenten, erfordern die Synchronisation der DNA-Moleküle, welche unweigerlich mit jedem Zyklus schwächer wird.

[0007] Das vorliegende Verfahren löst diese Probleme und hat Vorteile gegenüber anderen Sequenzierungsverfahren. Schrittweises Hinzufügen von Nucleotiden ist nicht notwendig, da alle vier Nucleotide gleichzeitig zugegeben werden. Sequenzinformation wird kontinuierlich erzeugt, da die Polymerasen kontinuierlich alle vier Nucleotide in wachsende Nucleinsäure[NA]ketten einbauen. Es gibt keinen Synchronisationsverlust, da einzelne Moleküle separat beobachtet werden. Die Analyse der einzelnen Moleküle ermöglicht auch die Verwendung von Nucleinsäurefragmenten, welche direkt aus Organismen entnommen werden. Mit dem vorliegenden Verfahren ist es nicht mehr erforderlich, Nucleinsäuren unter Verwendung von Klonierungs- oder Amplifikationsprozessen zur Sequenzierung vorzubereiten, wenngleich derart vorbereitete Nucleinsäuren noch immer sequenziert werden können. Zusätzlich gibt es die Möglichkeit, viele verschiedene Nucleinsäuren gleichzeitig auf einer einzigen Oberfläche zu sequenzieren und zu genotypisieren.

KURZE BESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0008] [Fig. 1](#) ist die chemische Struktur von Quenching-Resten, welche mittels eines Linkers mit Uracil verbunden sind.

[0009] [Fig. 2](#) beschreibt einen Farbstoff, welcher an das Gammaphosphat eines Nucleotids gekoppelt ist, welches ebenfalls einen Quenching-Rest trägt.

[0010] [Fig. 3](#) ist eine Übersicht über einen Syntheseweg zur Erzeugung von Nukleotiden mit Fluorophoren auf dem Gammaphosphat und dem Quenching-Rest auf der Base.

[0011] [Fig. 4](#) ist eine Übersicht des Systems zur Polymerasensynthesesequenzierung von Zielnukleinsäure.

[0012] [Fig. 5](#) ist eine schematische Darstellung des Verfahrens, worin eine DNA-Polymerase auf einem festen Träger immobilisiert wird und die Zielnukleinsäure DNA ist.

[0013] [Fig. 6](#) ist eine schematische Darstellung des Verfahrens, worin RNA-Polymerase auf einem festen Träger immobilisiert wird und die Zielnukleinsäure doppelsträngige DNA ist.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0014] Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zur Gentyptisierung oder Sequenzierung einer Zielnukleinsäure wie in den Ansprüchen 1 bis 16 spezifiziert.

[0015] Zur Gentyptisierung kann die Zielnukleinsäure ein Einzelnukleotidpolymorphismus sein. Unter solchen Umständen muss nur noch eine Lösung mit einer einzigen Art von NTP zugegeben werden. Zur Sequenzierung umfasst die Detektion eine sequentielle Detektion von verschiedenen Arten von NTP, um die Sequenz der Zielnukleinsäure bereitzustellen. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das dNTP mit einem Fluorophor auf dem Gammaphosphat und einem Quenching-Rest markiert. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform fließt die Lösung, welche mit dem festen Träger in Kontakt kommt, an der immobilisierten Polymerase oder Zielnukleinsäure vorbei. Die Polymerasen können DNA-abhängige oder RNA-abhängige DNA-Polymerasen oder DNA-abhängige RNA-Polymerasen sein. Die NTPs können Ribonukleotidtriphosphate [rNTPs] oder Desoxynukleotidtriphosphate [dNTPs] sein, abhängig von der Zielnukleinsäure und der verwendeten Polymerase.

[0016] Die vorliegende Erfindung beinhaltet des weiteren ein Kit zur Gentyptisierung oder Sequenzierung einer Zielnukleinsäure, wie in den Ansprüchen 17 bis 27 spezifiziert. Das System umfasst die gleichen Ausführungsformen wie oben für die Verfahren angegeben. Im Falle, dass das System fließende Lösungen umfasst, kann die Kraft für den Fluss mechanisch oder elektro-osmotisch unter Verwendung von Elektroden erzeugt werden.

[0017] Des weiteren offenbart die vorliegende Anmeldung einen festen Träger mit einer Oberfläche, wobei an der Oberfläche ein Nukleinsäure-Polymerasen-Array befestigt ist, worin die Mitglieder des Arrays aus einzelnen Molekülen von Polymerase bestehen. Die Arraymitglieder werden gegebenenfalls adressiert, so dass die Orte definiert werden und zwischen den Stellen komparative Informationen generiert und von dem optischen Lesegerät aufgenommen werden können. An dem festen Träger kann DNA-abhängige DNA-Polymerase oder eine DNA-abhängige RNA-Polymerase oder eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (reverse Transkriptase) befestigt sein. Bevorzugt liegen die immobilisierten Reste in einer Einzelmolekülkonfiguration vor.

DEFINITIONEN

[0018] "Adressierbar" im Zusammenhang mit einem Array bezieht sich auf Mitglieder des Arrays, welche in diskreten und definierten Bereichen liegen.

[0019] "Array" bezeichnet einen festen Träger mit mehr als einer Stelle oder mehr als einem Ort, woran entweder eine Zielnukleinsäure oder eine Nukleinsäurepolymerase gebunden ist.

[0020] "Komplementiert einen Bereich der Zielnukleinsäure stromabwärts des zu sequenzierenden Bereichs" im Zusammenhang mit Sequenzierung oder Gentyptisierung bezeichnet die Tatsache, dass die Primer in einer 3'-Richtung durch eine Polymerase verlängert werden. Folglich bindet der Primer an eine Untersequenz des Targets, welche 3' (stromabwärts) von der zu bestimmenden Zielsequenz liegt, während das 3'-Ende des Primers verlängert wird.

[0021] "Gentyptisierung" ist eine Bestimmung des Allelgehalts einer Ziel-DNA, ohne dass dabei notwendigerweise der Sequenzgehalt der gesamten DNA bestimmt werden muss. Es handelt sich hierbei um einen Teilbereich der Sequenzierung. Beispielsweise ist die Identifizierung von Einzelnukleotidpolymorphismen durch Bestimmung der Einzelbasenunterschiede zwischen zwei bekannten Formen eines Allels eine Art der Sequenzierung, die es nicht erfordert, dass die gesamte Ziel-DNA sequenziert wird.

[0022] "Immobilisierung" bezeichnet die Befestigung einer Zielnukleinsäure oder Polymerase an einen festen Träger durch ein Mittel, welches deren Freisetzung in eine Reaktionslösung verhindert. Das Mittel kann eine kovalente Bindung, eine ionische Bindung oder eine hydrophobe Bindung sein.

[0023] "Optisches Lesegerät" bezeichnet eine Vorrichtung, welche Licht, das von dem markierten dNTP emittiert wird, detektieren und aufnehmen kann.

[0024] "Sequenzierung" bezeichnet die Bestimmung der Reihenfolge und Position von Basen in einer Nukleinsäure.

[0025] "Einzelmolekülkonfiguration" bezeichnet ein Array von Molekülen auf einem festen Träger, worin die Mitglieder des Arrays als ein Einzelmolekül an einem definierten Ort vorliegen. Die Mitglieder können identisch oder verschieden sein.

[0026] "Basenart" im Zusammenhang mit Nukleotidtriphosphaten [NTPs] bezeichnet Nukleotide, welche als ein Substrat für die Polymerase erkannt werden können. Typische Basen schließen ein Adenin-, Cytosin-, Guanin-, Uracil- oder Thyminbasen, wobei die Art sich auf die Subpopulation von Nukleotiden bezieht, welche diese Base innerhalb einer Population von NTPs mit verschiedenen Basen aufweisen. Andere seltenere Basen oder Analoga können substituiert werden, so wie Xanthin oder Hypoxanthin oder methyliertes Cytosin.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG

1. Einführung.

[0027] Die vorliegende Erfindung liefert ein neuartiges Kit und ein neuartiges Verfahren zur Genotypisierung und Sequenzierung einer Nukleinsäure. Das hierin beschriebene Verfahren verwendet einzelne fluorogene NTP-Moleküle, welche eines nach dem anderen identifiziert werden, während einer RNA- oder DNA-abhängige Polymerase deren jeweiliges NTP in die Verlängerungsprodukte einbaut. Die NTPs weisen zwei Addukte auf: einen am Gammaphosphat befestigten Fluoreszenzfarbstoff und einen entweder an der Base oder dem Zucker oder dem Farbstoff befestigten Fluoreszenz-Quencher. Wird der Quencher an der Base oder dem Zucker befestigt, wird das NTP beim Einbau in das Verlängerungsprodukt hydrolysiert und der befreite Pyrophosphat-Farbstoffrest wird fluoreszierend. Der nunmehr ungequenchte freie Farbstoff wird fluoreszierend und sein Auftreten wird unter einem Mikroskop in Video-Geschwindigkeit bildhaft dargestellt.

[0028] Ein fließender Strom spült den Farbstoff vom Elternmolekül weg. Alle vier NTPs sind gleichzeitig anwesend. Während die Polymerase sich weiter entlang der Zielnukleinsäure bewegt, wird die Nukleotidsequenz aus der Reihenfolge der freigesetzten Farbstoffe abgelesen.

2. Zielnukleinsäurequellen.

[0029] Die Zielnukleinsäure ist nicht ausschlaggebend und kann aus einer Reihe von Standardquellen stammen. Sie kann mRNA, ribosomale RNA, genomische DNA oder cDNA sein. Stammt das Target aus einer biologischen Quelle, so gibt es eine Reihe von bekannten Verfahren zur Extraktion von Nukleinsäure, gegebenenfalls bis zu einer Konzentration amplifiziert, die zweckmäßig für die Genotypisierung oder Sequenzarbeit ist. Nukleinsäure kann aus jeder lebenden Zelle einer Person, eines Tieres oder einer Pflanze erhalten werden. Menschen, pathogene Mikroben und Viren sind besonders interessante Quellen.

[0030] Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäuren sind ebenfalls bekannt. Vorzugsweise wird die Amplifikation mittels einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt (US-Pat. Nrs. 4,683,202, 4,683,195 und 4,889,818; Gyllenstein et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 7652-7656; Ochman et al., 1988, Genetics 120: 621-623; Loh et al., 1989, Science 243: 217-220; Innis et al., 1990, PCR Protocols, Academic Press, Inc., San Diego, Calif.). Andere im Stand der Technik bekannte Amplifikationsverfahren können verwendet werden, einschließlich, aber nicht beschränkt auf, die Ligase-Kettenreaktion (siehe EP 320,308) Verwendung von Q-beta-Replikase oder in Kricka et al., 1995, Molecular Probing, Blotting, and Sequencing, Kap. 1 und Tabelle IX, Academic Press, New York, aufgeführte Verfahren.

3. Immobilisierung

[0031] Die in der vorliegenden Erfindung verwendeten Einzelmolekülarrays umfassen einen Träger, eine bioreaktive oder bioadhäsive Schicht und eine bioresistente Schicht. Der Träger kann aus Glas, Quarz, Kunst-

stoff oder jedem anderen zweckmäßigerweise nicht reaktiven Material, das kein signifikantes Rauschen oder keinen signifikanten Hintergrund für die Fluoreszenzdetektionsverfahren erzeugt, bestehen. Die bioadhäsive Schicht kann ein ionisch adsorbierendes Material sein, so wie Gold, Nickel oder Kupfer (Montemagno und Bachand (1999) Constructing nanomechanical devices powered by biomolecular motors. *Nanotechnology* 10: 225–231), proteinadsorbierende Kunststoffe so wie Polystyrol (US-Pat. Nr. 5,858,801) oder ein kovalenter Reaktant so wie eine Thiolgruppe. Um ein gemustertes Array aus der bioadhäsiven Schicht zu erzeugen kann ein auf den Träger aufgetragenes elektronensensitives Polymer, so wie Polymethylmethacrylat (PMMA), unter Verwendung eines Elektronenstrahls gefolgt von Entwicklung, um das sensibilisierte Polymer zu entfernen, in jedem beliebigen Muster geätzt werden. Die Löcher im Polymer werden dann mit einem Metall, so wie Nickel, beschichtet und das Polymer wird mit einem Lösungsmittel entfernt, wobei ein Muster von Metallstiften auf dem Substrat zurückbleibt. Dieses Elektronenstrahl-Lithographieverfahren bietet eine sehr hohe räumliche Auflösung und geringe Größendimensionen, was erforderlich ist, um nur ein Molekül an jedem Punkt in dem gemusterten Array immobilisieren zu können. Ein zweites Mittel zur Herstellung von hochauflösenden gemusterten Arrays ist die Rasterkraftmikroskopie. Ein drittes Mittel ist die Röntgenlithographie.

[0032] Die biologischen Werkstoffe können an dem bioadhäsiven Muster befestigt werden, indem ein Polyhistidin-Tag, der an metallische bioadhäsive Muster bindet, auf dem biologischen Werkstoff bereitgestellt wird. Andere konventionelle Mittel zur Befestigung verwenden homobifunktionale und heterobifunktionale Crosslinking-Reagenzien. Homobifunktionale Reagenzien tragen zwei identische funktionale Gruppen, wohingegen heterobifunktionale Reagenzien zwei unterschiedliche funktionale Gruppen enthalten, um die biologischen Werkstoffe an den Bioklebstoff zu koppeln. Die große Mehrzahl der heterobifunktionalen Crosslinking-Agenzien enthält eine primäre aminreaktive Gruppe und eine thiolreaktive Gruppe. Kovalente Crosslinking-Agenzien werden ausgewählt aus Reagenzien, welche in der Lage sind Disulfid(-S-S), Glykol(-CH(OH)-CH(OH)-), Azo(-N=N-), Sulfon(-S(=O)₂-), Ester(-C(=O)-O-) oder Amid(-C(=O)-N-)brücken zu bilden.

[0033] Auf die bioadhäsive Schicht kann entweder vor oder nach der Befestigung des biologischen Werkstoffs an die bioadhäsive Schicht eine bioresistente Schicht platziert oder überlagert werden. Die bioresistente Schicht ist aus jedem beliebigen Material, das den biologischen Werkstoff nicht bindet. Beispiele schließen ein Rinderserumalbumin, Gelatine, Lysozym, Octoxynol, Polysorbat 20 (Polyethensorbitanmonolaurat) und Polyethylenoxid enthaltende Block-Copolymere und oberflächenaktive Substanzen (US-Pat. Nr. 5,858,801). Die Ablagerung der Schichten erfolgt durch konventionelle Mittel, einschließlich der Ablagerung durch Aufsprühen, Eintauchen und Aufdampfen (Metalle).

4. Markierung der NTPs

A. Befestigung eines γ -Phosphatfluorophors

[0034] Die Verfahren der vorliegenden Erfindung umfassen die Detektion und Identifizierung von individuellen fluorogenen dNTP-Molekülen, während eine Polymerase sie in ein einzelnes Nukleinsäuremolekül einbaut. In gewissen Aspekten wird ein Fluoreszenzfarbstoff am γ -Phosphat befestigt und ein Quencher wird an der Nukleobase befestigt. An sich liefert die vorliegende Erfindung eine Nukleotidtriphosphat (NTP)-Sonde umfassend: ein NTP, welches ein γ -Phosphat mit einem daran befestigten Fluorophorrest aufweist; ein Quencher-Rest, der ausreichend proximal zum Fluorophorrest liegt, um Fluoreszenz des Fluorophorrestes zu verhindern; wobei der Fluorophorrest in gequenchter Form vorliegt mit einer mindestens 5-fachen Quenching-Effizienz, bevorzugt einer mindestens 10-fachen Quenching-Effizienz, wenn das γ -Phosphat am NTP befestigt ist, und in ungequenchter Form, wenn das γ -Phosphat vom NTP abgetrennt ist.

[0035] In einem bevorzugten Aspekt ist die NTP-Sonde eine dNTP-Sonde mit einem am γ -Phosphatrest befestigten Fluoreszenzfarbstoff und einem an der Nukleobase befestigten Quencher. Geeignete Nukleobasen schließen ein, sind jedoch nicht beschränkt auf, Adenin, Guanin, Cytosin, Uracil, Thymin, Deazaadenin und Deazaguanosin. Die gequenchten dNTPs sind nicht fluoreszierend, wenn das γ -Phosphat am NTP befestigt ist, und werden danach fluoreszierend, wenn das γ -Phosphat nicht am NTP befestigt ist.

B. Fluoreszenz-Quenching

[0036] Bei der Einzelmoleküldetektion ist eine hohe Quenching-Effizienz von Vorteil, da sie den Fluoreszenzhintergrund reduziert und somit die Verwendung höherer Nukleotidkonzentrationen gestattet. Es gibt einige Quenching-Mechanismen (siehe beispielsweise G. G. Guilbault, *Practical Fluorescence*, Marcel Dekker, New York, 1973). In bestimmten Fällen hängt das Quenching von der spektralen Überschneidung zwischen Fluorophor und Quencher ab und es funktioniert auf große Entfernung ("fluorescence resonance energy transfer",

FRET). In anderen Fällen interagieren Fluorophor und Quencher zwischen molekularen Orbits und es ist ein Kontakt zwischen Fluorophor und Quencher erforderlich, beispielsweise Elektronentransfermechanismen. In weiteren anderen Fällen kann ein Grundzustand-Komplex-Quenching-Mechanismus auftreten. Alle derartigen Quenching-Mechanismen sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung.

[0037] In bestimmten Aspekten sind die Fluorophorreste fluoreszierende organische Farbstoffe, die zur Befestigung, direkt oder über einen Linker, an γ -Phosphat derivatisiert sind. Bevorzugt sind Quencher-Reste ebenfalls organische Farbstoffe, die fluoreszierend sein können oder auch nicht in Abhängigkeit von der spezifischen Ausführungsform der Erfindung. Beispielsweise sind in einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung das Fluorophor und der Quencher beide fluoreszierend. In dieser Ausführungsform kann ein Transfermechanismus fluoreszierender Energie verwendet werden, wobei das erste Fluorophor (beispielsweise Fluorescein) angeregt wird und die Emission von dem zweiten Fluorophor (beispielsweise Rhodamin) gelesen wird. In diesen Systemen wird das Dequenching durch Hydrolyse des am γ -Phosphat befestigten Fluorophors erreicht.

[0038] In einer weiteren Ausführungsform funktionieren Fluorophor und Quencher durch einen Elektronentransfermechanismus. In diesem Aspekt absorbiert ein nicht-fluoreszierender Quencher, beispielsweise DABCYL oder Dinitrophenyl (siehe [Fig. 1](#)) Energie von einem angeregten Fluorophor, gibt jedoch die Energie nicht in Form von Strahlung ab. Diese Quencher können als chromogene Moleküle bezeichnet werden.

[0039] In der Literatur lassen sich sehr viele praktische Anleitungen zur Bereitstellung einer erschöpfenden Liste von fluoreszierenden und chromogenen Molekülen und deren relevanten optischen Eigenschaften finden (siehe beispielsweise Berlan, Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules, 2. Auflage (Academic Press, New York, 1971); Griffiths, Colour and Constitution of Organic Molecules (Academic Press, New York, 1976); Bishop, Ed., Indicators (Pergamon Press, Oxford, 1972); Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (Molecular Probes, Eugene, 1992) Pringsheim, Fluorescence and Phosphorescence (Interscience Publishers, New York, 1949); und dergleichen. Des Weiteren gibt es in der Literatur umfangreiche Anleitungen zur Derivatisierung von Fluorophor- und Quencher-molekülen zur kovalenten Befestigung mittels gebräuchlicher reaktiver Gruppen, die zu einem Nukleotid hinzugefügt werden können, wie durch die folgenden Referenzquellen veranschaulicht: Haugland (supra); Ullman et al., U.S. Pat. Nr. 3,996,345; Khanna et al., U.S. Pat. Nr. 4,351,760.

[0040] Geeignete Donatoren und Akzeptoren, die gemäß dem Prinzip des Fluoreszenzenergietransfers (FET) funktionieren, schließen ein, sind jedoch nicht beschränkt auf: 4-Acetamido-4'-Isothiocyanatstilben-2,2'-Disulfonsäure; Acridin und Derivate davon: Acridin, Acridinisothiocyanat; 5-(2'-Aminoethyl) Aminonaphthalin-1-Sulfonsäure (EDANS); 4-Amino-N-[3-Vinylsulfonyl]-Phenyl]-Naphthalimid-3,5-Disulfonat; N-(4-Anilin-1-Naphthyl)-Maleimid; Anthranilamid; BODIPY; Brilliantgelb; Cumarin und Derivate davon: Cumarin, 7-Amino-4-Methylcumarin (AMC, Coumarin 120), 7-Amino-4-Trifluormethylculuarin (Coumarin 151); Cyaninfarbstoffe; Cyanosin; 4',6-Diaminidin-2-Phenylindol (DAPI); 5',5''-Dibrompyrogallol-Sulfonaphthalein (Brompyrogallolrot); 7-Diethylamin-3-(4'-Isothiocyanatophenyl)-4-Methylcumarin; Diethylentriamin-Pentaacetat; 4,4'-Diisothiocyanatdihydrostilben-2,2'-Disulfonsäure; 4,4'-Diisothiocyanatstilben-2,2'-Disulfonsäure; 5-[Dimethylamino]naphthalen-1-Sulfonylchlorid (DNS, Dansylchlorid); 4-Dimethylaminophenylazophenyl-4'-Isothiocyanat (DABITC); Eosin und Derivate davon: Eosin, Eosinisothiocyanat, Erythrosin und Derivate davon: Erythrosin B, Erythrosinisothiocyanat; Ethidium; Fluorescein und Derivate davon: 5-Carboxyfluorescein (FAM), 5-(4,6-Dichlortriazin-2-yl)-Aminofluorescein (DTAF), 2',7'-Dimethoxy-4'5'-Dichlor-6-Carboxyfluorescein (JOE), Fluorescein, Fluoresceinisothiocyanat, QFITC, (XRITC); Fluorescamin; IR144; IR1446; Malachitgrün-Isothiocyanat; 4-Methylumbelliferonorthocresolphthalein; Nitrotyrosin; Pararosnilin; Phenolrot; B-Phycoerythrin; o-Phthaldialdehyd; Pyren und Derivate davon: Pyren, Pyrenbutyrat, Succinimidyl-1-Pyren; Butyrat-Quantendots; reaktives Rot 4 (Cibacron™ Brilliantrot 3B-A) Rhodamin und Derivate davon: 6-Carboxy-X-Rhodamine (ROX), 6-Carboxyrhodamin (R6G), Lissamin-Rhodamin-B-Sulfonylchlorid-Rhodamin (Rhod), Rhodamin B, Rhodamin 123, Rhodamin-X-Isothiocyanat, Sulforhodamin B, Sulforhodamin 101, Sulfonylchlorid-Derivat von Sulforhodamin 101 (Texasrot); N,N,N',N'-Tetramethyl-6-Carboxyrhodamin (TAMRA); Tetramethylrhodamin; Tetramethylrhodaminisothiocyanat (TRITC); Riboflavin; Rosolsäure; Terbiumchelaterivate; Cy 3; Cy 5; Cy 5,5; Cy 7; IRD 700; IRD 800; La Jolla-Blau; Phthalcyanin; und Naphthalcyanin.

[0041] Bevorzugte Fluorophor-Quencher-Paare schließen ein, sind jedoch nicht beschränkt auf, Xanthenfarbstoffe, einschließlich Fluoresceine, und Rhodaminfarbstoffe. Viele geeignete Formen dieser Verbindungen sind überall im Handel erhältlich mit Substituenten an ihren Phenylresten, welche als Bindungsstelle oder als Bindungsfunktionalität zur Befestigung an das γ -Phosphat oder die Nukleobase verwendet werden können. Eine weitere Gruppe fluoreszierender Verbindungen sind die Naphthylamine, welche eine Aminogruppe an der

Alpha- oder der Beta-Position aufweisen. Solche Naphthylamin-Verbindungen sind: 1-Dimethylaminonaphthyl-5-Sulfonat, 1-Anilin-8-Naphthalinsulfonat und 2-p-Toluidinyl-6-Naphthalinsulfonat. Andere Farbstoffe schließen ein: 3-Phenyl-7-Isocyanatcumarin, Acridine, so wie 9-Isothiocyantacridin und Acridinorange; N-(p-(2-Benzoxazolyl)-Phenyl)-Maleimid; Benzoxadiazole, Stilbene, Pyrene und dergleichen.

[0042] Vorzugsweise sind das Fluorophor/Quencher-Paar aus Fluorescein- und Rhodaminfarbstoffen ausgewählt. Diese Farbstoffe und geeignete Linking-Methoden zur Befestigung an Nukleotide sind in vielen Referenzquellen beschrieben (siehe Khanna et al. (oben zitiert); Marshall, *Histochemical J.*, 7: 299–303 (1975); Menchen et al., US-Patent Nr. 5,188,934; Menchen et al., Europäische Patentanmeldung Nr. 87310256.0; und US-Patent Nr. 5,366,860, erteilt für Bergot et al.).

[0043] In einer bevorzugten Ausführungsform wird der Quencher 4-(4'-Dimethylaminophenylazo)-Benzoesäure (DABCYL) verwendet. Der Quencher DABCYL (siehe [Fig. 1](#)) wird im allgemeinen in fluorogenen Sonden verwendet, um DNA-Hybridisierung (molekulare Beacons) oder Proteaseaktivität nachzuweisen. DABCYL quencht Fluoreszenz aus einer großen Vielfalt von Farbstoffen, welche zwischen 475 nm und 805 nm emittieren, wobei die gemessene Effizienz von 90 bis 99.9% reicht (siehe S. Tyagi et al., *Nat. Biotechnol.* 16, 49 (1998); und G. T. Wang et al., *Tetrahedron Lett.* 31, 6493 (1990)). Ohne an eine bestimmte Theorie gebunden zu sein, wird angenommen, dass der Quenchingmechanismus von DABCYL wahrscheinlich eher einen Elektronentransfer als einen Fluoreszenzresonanzenergietransfer umfasst, da er unabhängig von der Wellenlänge ist. In einer gleichermaßen bevorzugten Ausführungsform werden die Quencher Dinitrophenyl (DNP) oder Trinitrophenyl (TNP) verwendet.

[0044] Die Quenching-Effizienz, wie sie in jedem spezifischen Experiment gemessen wird, hängt von der Reinheit des Farbstoff-Quencher-Paares (kontaminierender freier Farbstoff oder gespaltene Moleküle fluoreszieren); der elektronischen Kopplung und der physikalischen Distanz zwischen Farbstoff und Quencher (näher ist üblicherweise vorteilhafter) und der Lebensdauer des Farbstoffs im angeregten Zustand (je größer die Lebensdauer, desto größer die Chancen für Elektronentransfer) ab.

[0045] Es ist bekannt, dass in bestimmten Ausführungsformen bestimmte sichtbare und nahezu infrarote Farbstoffe ausreichend fluoreszierend und photostabil sind, um als Einzelmoleküle detektiert zu werden. In diesem Aspekt können der sichtbare Farbstoff BODIPY R6G (525/545) und ein größerer Farbstoff, LI-COR's nahezu infraroter Farbstoff IRD-38 (780/810) mit Einzelmolekülempfindlichkeit detektiert werden und werden dazu verwendet, die vorliegende Erfindung zu praktizieren.

[0046] Es gibt viele Linking-Reste und -Methoden zur Befestigung von Fluorophor- oder Quencher-Resten an Nukleotide, wie durch die folgenden Referenzquellen veranschaulicht wird: Eckstein, editor, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach* (IRL Press, Oxford, 1991); Zuckerman et al., *Nucleic Acids Research*, 15: 5305–5321 (1987) (3'-Thiolgruppe an Oligonukleotid); Sharma et al., *Nucleic Acids Research*, 19: 3019 (1991) (3'-Sulphydryl); Giusti et al., *PCR Methods and Applications*, 2: 223–227 (1993) und Fung et al., US-Pat. Nr. 4,757,141 (5'-Phosphoaminogruppe über Aminolink™. II, erhältlich von Applied Biosystems, Foster City, Calif) Stabinsky, US-Pat. Nr. 4,739,044 (3'-Aminoalkylphosphorylgruppe); Agrawal et al., *Tetrahedron Letters*, 31: 1543–1546 (1990) (Befestigung über Phosphoramidatkopplungen); Sproat et al., *Nucleic Acids Research*, 15: 4837 (1987) (5'-Mercaptogruppe); Nelson et al., *Nucleic Acids Research*, 17: 7187–7194 (1989) (3'-Aminogruppe); und dergleichen.

[0047] Unter Bezugnahme auf [Fig. 2](#) sind die bevorzugten Linker zu einigen Basen von verschiedenen dNTP-Strukturen der vorliegenden Erfindung gezeigt. Wiederum ist DABCYL ein wellenlängenunabhängiger Fluoreszenzquencher mit einer Quenching-Effizienz in dem für die vorliegenden Verfahren erforderlichen Bereich. Besseres Quenching gestattet höhere dNTP-Konzentrationen und schnellere Umschlagsraten. In bestimmten Aspekten ist der Quencher an die gleichen Nukleobasenstellen gekoppelt, die typischerweise zur Befestigung von Farbstoffen verwendet werden (siehe [Fig. 1](#)). Während die Polymerase entlang der DNA fortschreitet, wird der Quencher bei jeder eingebauten Base verbleiben. In bestimmten Aspekten ist der Quencher unter Verwendung des in [Fig. 1](#) gezeigten C5-Linkers kovalent an einem dNTP befestigt. In bestimmten Ausführungsformen ist der Quencherrest über einen Linker am Fluorophorrest befestigt. In bestimmten anderen Ausführungsformen kann der Quencher am Zucker der dNTPs befestigt sein.

[0048] Im allgemeinen kann Nukleosidmarkierung dadurch erreicht werden, dass man eine große Anzahl von bekannten Nukleosidmarkierungstechniken unter Verwendung von bekannten Kopplungen, koppelnden Gruppen und assoziierten komplementären Funktionalitäten verwendet. Die den Quencherrest und das Nukleosid koppelnde Kopplung sollte mit relevanten Polymerasen kompatibel sein und die Fluoreszenz des Fluorophor-

restes nicht quenchen.

[0049] Bevorzugt sind die Quencher kovalent an den 5-Kohlenstoff von Pyrimidinbasen und den 7-Kohlenstoff von 7-Deazapurinbasen gekoppelt. Es wurde von etlichen geeigneten Verfahren zur Basenmarkierung berichtet, die mit der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, beispielsweise Gibson et al., *Nucleic Acids Research*, 15: 6455–6467 (1987); Gebeyehu et al., *Nucleic Acids Research*, 15: 4513–4535 (1987); Haralambidis et al., *Nucleic Acids Research*, 15: 4856–4876 (1987); Nelson et al., *Nucleosides and Nucleotides*, 5 (3) 233–241 (1986); Bergstrom, et al., *JACS*, 111, 374–375 (1989); US-Pat. Nrs. 4,855,225, 5,231,191 und 5,449,767. Vorzugsweise sind die Kopplungen Acetylen-Amido- oder Alken-Amido-Kopplungen, wobei die Kopplung zwischen dem Quencher und der Nukleotidbase dadurch gebildet wird, dass man einen aktivierten N-Hydroxysuccinimid(NHS)-Ester des Farbstoffs mit einer Alkynylamin- oder Alkenylamin-derivatisierten Base eines Nukleotids zur Reaktion bringt. Mehr bevorzugt sind die resultierenden Kopplungen in [Fig. 2](#) gezeigt.

[0050] Die Synthese von Alkynylamin-derivatisierten Nucleosiden wird beschrieben von Hobbs et al. in der Europäischen Patentanmeldung Nr. 87305844.0 und Hobbs et al., *J. Org. Chem.*, 54: 3420 (1989). Wie hierin beschrieben, werden die Alkynylamin-derivatisierten Nucleotide gebildet, indem man das geeignete Halodesoxynucleosid (normalerweise 5-Jodpyrimidin und 7-Jod-7-Deazapurindesoxynucleoside) und Cu (I) in einen Kolben gibt, mit Argon spült, um die Luft zu entfernen, trockenes DMF und danach Alkynylamin, Triethylamin und Pd(0) hinzugibt. Das Reaktionsgemisch kann für einige Stunden gerührt werden oder so lange bis eine Dünnschichtchromatographie den Verbrauch des Halodesoxynucleosids anzeigt.

[0051] Wie im US-Patent Nr. 5,047,519, welches am 10. September 1991 für Hobbs et al. erteilt wurde, haben die Alkynylaminolinker die Struktur:



worin R¹ ein substituierter oder nicht substituierter diradikaler Rest von 1 bis 20 Atomen ist. Nuc ist ein Purin oder eine Pyrimidinbase. R¹ kann geradkettiges Alkyl sein, C₁-C₂₀, gegebenenfalls innerhalb der Kette Doppelbindungen, Dreifachbindungen, Arylgruppen oder Heteroatome so wie N, O oder S enthaltend. Die Heteroatome können Teile von solchen funktionalen Gruppen sein wie Ether, Thioether, Ester, Amine oder Amide. Bevorzugt ist R¹ geradkettiges Alkyl, C₁-C₂₀; am meisten bevorzugt ist R¹ CH₂. Substituenten auf R¹ können C₁-C₆-Alkyl-, Aryl-, Ester-, Ether-, Amin-, Amid- oder Chlorgruppen einschließen. R² und R³ sind unabhängig voneinander H, Alkyl, C₁-C₄ oder eine schützende Gruppe so wie Acyl, Alkoxy-carbonyl, ein Fluorophor, ein Quencher oder Sulfonyl. Vorzugsweise ist R² H und R³ ist ein Quencher. Der Alkynylaminolinker ist vorzugsweise an der 5-Position der Pyrimidinnucleotide und der 7-Position der Purinnucleotide befestigt.

[0052] In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein Quencher-Sulfo-NHS-Derivat, beispielsweise DABCYL-Sulfo-NHS, bereit, indem man DABCYL mit N-Hydroxysulfosuccinimid und N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid in einer Stickstoffatmosphäre zur Reaktion bringt (siehe [Fig. 1](#)). Das DABCYL-Sulfo-NHS-Derivat wird mit einem Aminoallyl-dNTP, beispielsweise Aminoallyl-dUTP, zur Reaktion gebracht, um DABCYL-dUTP zu erhalten. Unter Verwendung von DABCYL-dUTP und Cystamindihydrochlorid kann ein DABCYL-dUTP-Thiolderivat erzeugt werden. Danach kann ein NTP mit einem angehängten γ-Phosphat-Fluorophor hergestellt werden, indem man beispielsweise das DABCYL-dUTP-Thiol mit BODIPY-TR-Jodacetamid (im Handel erhältlich von Molecular Probes D-6011) zur Reaktion bringt, um DABCYL-dUTP-BODIPY-TR herzustellen.

C. Quenching-Effizienz

[0053] Die vorliegende Erfindung liefert NTP-Moleküle mit einem γ-Phosphat mit einem daran befestigten Fluorophorrest. Der Fluorophorrest liegt in gequenchter Form mit einer mindestens 5-fachen Quenching-Effizienz vor, wenn das γ-Phosphat am NTP befestigt ist, und er ist ungequencht, d. h. er ist fluoreszierend, wenn das γ-Phosphat vom NTP gelöst ist. Der Fluorophorrest liegt vorzugsweise in gequenchter Form mit einer mindestens etwa 3-fachen bis etwa 100-fachen Quenching-Effizienz vor. In einer bevorzugteren Ausführungsform liegt der Fluorophorrest in gequenchter Form mit einer mindestens etwa 100-fachen bis etwa einer 1000-fachen Quenching-Effizienz vor.

[0054] Die Quenching-Effizienz der NTPs der vorliegenden Erfindung ist ein leicht zu bestimmender Routineparameter. Wie dem Fachmann offensichtlich sein wird, kann die Quenching-Effizienz in einem Fluorometer, das gegebenenfalls über Laser-Anregung verfügt, gemessen werden. Ähnlich der früheren Diskussion der Stern-Volmer-Gleichung, gleicht die Quenching-Effizienz

$$F_0 - F / F_0$$

worin F_0 die Fluoreszenz des NTP ohne Quenching und F die gequenchte Fluoreszenz ist. Da es keinen sicheren Weg gibt, jegliche Fluoreszenz in einer Probe von gequenchtem NTP zu eliminieren, können die ungequenchten Messungen, F_0 , in einer separaten Probe, welche nur Farbstoff enthält, und die gequenchten Messungen, F , mit der gleichen Konzentration von gequenchtem dNTP vorgenommen werden.

[0055] Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung weisen eine mindestens 3-fache Quenching-Effizienz auf. Ein voll fluoreszierender Farbstoff hat einen F_0 -Wert von 1, wohingegen ein zu 90% gequenchter Farbstoff einen F -Wert von 0,100 hat. Eine zu 90% gequenchte Verbindung hat eine Quenching-Effizienz von 0,9 oder ist 10-fach gequench. Daher ist F für Verbindungen der vorliegenden Erfindung wie folgt gekennzeichnet: $0,670 \leq F \leq 0,999$, d. h. die Verbindung weist etwa 3-fache bis etwa 1000-fache Quenching-Effizienzen auf. Vorzugsweise ist die Quenching-Effizienz einer Verbindung gemäß der vorliegenden Erfindung etwa mindestens 5-fach bis etwa 1000-fach, und mehr bevorzugt ist die Quenching-Effizienz etwa mindestens 10-fach bis etwa 1000-fach.

[0056] In der vorliegenden Erfindung hängt die Detektion von Pyrophosphat von der Erzeugung eines Fluoreszenzsignals durch Dequenching, oder Aktivierung, eines gequenchten Fluoreszenzfarbstoffs als Antwort auf Pyrophosphat ab. Effizientes Quenching bietet eine geringere Hintergrundfluoreszenz und verbessert den Störabstand beim Dequenching durch Pyrophosphat. Unvollständiges Quenching führt zu einem Niedriglevel-Fluoreszenzhintergrund von jedem Farbstoffmolekül. Zusätzliche Hintergrundfluoreszenz wird von einigen der Farbstoffmoleküle beigesteuert, welche aufgrund versehentlichen (d. h. pyrophosphatunabhängigen) Dequenchings, beispielsweise durch Brechen einer Bindung, welche den Farbstoff mit dem Quencherrest verbindet, vollständig fluoreszierend sind. Folglich setzt sich die Hintergrundfluoreszenz aus zwei Komponenten zusammen: einer Niedriglevel-Fluoreszenz von allen Farbstoffmolekülen, hierin bezeichnet als "gestreuter Fluoreszenzhintergrund", und Fluoreszenz mit voller Stärke von einigen Molekülen, hierin bezeichnet als "lokalisierter Fluoreszenzhintergrund".

[0057] In Fällen, in denen ein multiples Markierungsschema verwendet wird, kann eine Wellenlänge verwendet werden, die dem Mittelwert der Absorptionsmaxima der verschiedenen in Frage kommenden Markierungen nahe kommt. Alternativ können multiple Anregungen durchgeführt werden, wobei jede Anregung eine zum Absorptionsmaximum einer spezifischen Markierung korrespondierende Wellenlänge verwendet. Tabelle 1 führt Beispiele von verschiedenen Arten von Fluorophoren und deren korrespondierender Absorptionsmaxima auf.

TABELLE 1

In Frage kommende Fluorophore	Absorption/Emission
Rho123	507/529
R6G	528/551
BODIPY 576/589	576/589
BODIPY TR	588/616
NilBlau	627/660
BODIPY 650/665	650/665
Sulfo-IRD700	680/705
NN382	778/806
Tetramethylrhodamin	550
Rhodamin X	575
Cy3 TM	550
Cy5 TM	650
Cy7 TM	750

5. Verschiedene Reaktionsreagenzien.

[0058] Die zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung ausgewählte Polymerase ist nicht von entscheidender Bedeutung. Bevorzugte Polymerasen sind dazu in der Lage, Markierungen sowohl auf der Nukleobase als

auch auf dem Gammaphosphat zu tolerieren. Die Polymerase sollte eine Treue (Einbaugenauigkeit) von mindestens 99% und eine Prozessivität (Anzahl der eingebauten Nukleotide bevor sich das Enzym von der DNA löst) von mindestens 20 Nukleotiden aufweisen, wobei eine höhere Prozessivität bevorzugt ist. Beispiele schließen ein: T7-DNA-Polymerase, T5-DNA-Polymerase, HIV-reverse Transkriptase, E. coli-DNA pol I, T4-DNA-Polymerase, T7-RNA-Polymerase, Taq-DNA-Polymerase und E. coli-RNA-Polymerase. Hinsichtlich der Exonuklease fehlerhafte Versionen dieser Polymerasen sind bevorzugt. Die Primer (DNA-Polymerase) oder Promotoren (RNA-Polymerase) werden synthetisch hergestellt unter Verwendung von gebräuchlicher Nukleinsäuresynthesetechnologie. Die komplementären Stränge der Sonden werden üblicherweise auf einem automatischen DNA-Synthesizer synthetisiert, beispielsweise einem Applied Biosystems, Inc. (Foster City, Calif.) Modell 392 oder 394 DNA/RNA-Synthesizer, unter Verwendung standardisierter Chemien, so wie Phosphoramiditchemie, wie beispielsweise offenbart in den folgenden Referenzquellen: Beaucage und Iyer, Tetrahedron, 48: 2223–2311 (1992); Molko et al., US-Pat. Nr. 4,980,460; Koster et al., US-Pat. Nr. 4,725,677; Caruthers et al., US-Pat. Nrs. 4,415,732; 4,458,066 und 4,973,679 und dergleichen. Alternative Chemien, welche beispielsweise zu nicht-natürlichen Rückgratgruppen führen, so wie Phosphorthioat, Phosphoramidat und dergleichen, können ebenfalls verwendet werden, vorausgesetzt die daraus resultierenden Oligonukleotide sind mit der Polymerase kompatibel. Sie können im Handel bei einer Vielzahl von Firmen, die sich auf gebrauchsfertige Oligonukleotide spezialisiert haben, so wie Operon Inc. (Alameda, California, USA) bestellt werden.

[0059] Primer in Kombination mit Polymerasen werden verwendet, um Ziel-DNA zu sequenzieren. Die Primerlänge wird so gewählt, dass Hybridisierung an komplementäre Template-DNA gewährleistet ist. Die Primer werden im allgemeinen eine Länge von mindestens 10 bp, üblicherweise mindestens zwischen 15 und 30 bp, aufweisen. Die Primer sind dazu bestimmt, an bekannte interne Stellen auf der Ziel-DNA des Subjekts zu hybridisieren. Alternativ können die Primer an synthetische Oligonukleotidadapter binden, welche mittels einer Ligase mit den Enden der Ziel-DNA verbunden sind. Werden Promotoren verwendet, so können diese in ähnlicher Weise innerhalb der Ziel-DNA liegen oder als Adapter mit den Enden ligiert sein.

6. Reaktionsbedingungen.

[0060] Das Reaktionsgemisch zur Sequenzierung umfasst ein wässriges Puffermedium, welches für die spezifische Polymerase optimiert ist. Im allgemeinen schließt der Puffer eine Quelle einwertiger Ionen, eine Quelle zweiwertiger Kationen und ein Pufferagens ein. Es kann jegliche passende Quelle einwertiger Ionen, so wie KCl, K-Acetat, NH_4 -Acetat, K-Glutamat, NH_4Cl , Ammoniumsulfat und dergleichen angewendet werden, bei der die Menge der im Puffer anwesenden einwertigen Ionenquelle typischerweise in einer Menge anwesend ist, welche ausreicht, für eine Leitfähigkeit im Bereich von etwa 500 bis 20.000, üblicherweise von etwa 1000 bis 10.000 und noch häufiger von etwa 3.000 bis 6.000 Mikromhos zu sorgen.

[0061] Das zweiwertige Kation kann Magnesium, Mangan, Zink und dergleichen sein, wobei das Kation typischerweise Magnesium sein wird. Es kann jegliche passende Quelle von Magnesiumkationen verwendet werden, einschließend MgCl_2 , Mg-Acetat und dergleichen. Die Menge von im Puffer anwesendem Mg-Ion kann von 0,5 bis 20 mM reichen, wird aber bevorzugt von etwa 1 bis 12 mM, mehr bevorzugt von 2 bis 10 mM reichen und beträgt idealerweise etwa 5 mM.

[0062] Repräsentative Pufferagenzien oder -salze, welche im Puffer anwesend sein können, schließen ein: Tris, Tricin, HEPES, MOPS und dergleichen, wobei die Menge an Pufferagens typischerweise in einem Bereich zwischen 5 und 150 mM, üblicherweise zwischen etwa 10 und 100 mM und noch gebräuchlicher zwischen 20 und 50 mM liegen wird, wobei in bestimmten bevorzugten Ausführungsformen das Pufferagens in einer Menge anwesend sein wird, welche ausreicht, um einen pH-Bereich von etwa 6,0 bis 9,5 bereitzustellen, wobei am meisten bevorzugt der pH-Wert 7,6 bei 25°C ist. Andere Agenzien, welche im Puffermedium anwesend sein können, schließen Komplexbildner wie EDTA, EGTA und dergleichen ein.

7. Probenunterbringung.

[0063] Der feste Träger wird gegebenenfalls in einer Flusskammer mit einem Einlass und einem Auslass zur Erneuerung von Reaktanten, welche an den immobilisierten Resten vorbeifließen, untergebracht. Die Flusskammer kann aus Kunststoff oder Glas bestehen und sollte in der Ebene, die vom Mikroskop oder dem optischen Lesegerät anvisiert wird, entweder offen oder transparent sein. Elektro-osmotischer Fluss erfordert eine feste Ladung an dem festen Träger und einen Spannungsgradienten (Strom), welcher zwischen zwei an gegenüberliegenden Enden des festen Trägers platzierten Elektroden passiert. Die Flusskammer kann zur separaten Sequenzierung in multiple Kanäle aufgeteilt sein. Beispiele von Mikroflusskammern existieren. Beispielsweise beschreiben Fu et al. (Nat. Biotechnol. (1999) 17: 1109) einen miniaturisierten fluoreszenzaktivierten

Zellsortierer mit Kanälen von $3 \text{ um} \times 4 \text{ }\mu\text{m}$, welcher sich zur Sortierung des elektro-osmotischen Flusses bedient.

B. Detektion der Fluorophore.

[0064] Die vorliegende Erfindung erfordert das Imaging von Einzelmolekülen in einer Lösung. Es gibt eine Vielzahl von bekannten Wegen, dieses Ziel zu erreichen. Allgemeine Schriften, die diese Technologie beschreiben, sind erhältlich. Diese schließen ein: Rasche et al., eds., 1996, Single molecule optical detection, imaging, and spectroscopy, Weinheim: VCM, und Plakhotnik, et al., Single-molecule spectroscopy, Ann. Rev. Phys. Chem. 48: 181–212. Im allgemeinen umfassen die Verfahren die Detektion von laseraktivierter Fluoreszenz unter Verwendung eines mit einer Kamera ausgestatteten Mikroskops. Dies wird manchmal als Hochleistungsphotonendetektionssystem bezeichnet. Nie, et al., 1994, Probing individual molecules with confocal fluorescence microscopy, Science 266: 1018–1019. Die Detektion von Einzelmolekülen umfasst die Begrenzung der Detektion auf ein Blickfeld, in welchem ein statistischer Grund zu der Annahme besteht, dass dort nur ein Molekül ist (homogene Assays) oder auf ein Blickfeld, in welchem es nur einen tatsächlichen Befestigungspunkt gibt (heterogene Assays). Die Einzelmolekülfluoreszenzdetektion der vorliegenden Erfindung kann unter Verwendung von optischen Anordnungen einschließlich Nahfeld-Rastermikroskopie, Fernfeld-Konfokalmikroskopie, Weitwinkel-Auflichtmikroskopie und Total-Internal-Reflection(TIRF)-Mikroskopie praktiziert werden. Zur zweidimensionalen Imaging-Fluoreszenzdetektion handelt es sich bei dem Mikroskop typischerweise um ein Total-Internal-Reflection-Mikroskop. Vale et al., 1996, Direct Observation of single kinesin molecules moving along microtubules, Nature 380: 451, Xu und Yeung 1997, Direct Measurement of Single Molecule Diffusion and Photodecomposition in Free Solution, Science 275: 1106–1109.

[0065] Geeignete Photonendetektoren schließen ein, sind jedoch nicht beschränkt auf, Fotodioden und Intensified-CCD-Kameras. In einer bevorzugten Ausführungsform wird eine Intensified-Charge-Couple-Device(ICCD)-Kamera verwendet. Die Verwendung einer ICCD-Kamera zur Abbildung von individuellen fluoreszierenden Farbstoffmolekülen in einer Flüssigkeit nahe der Oberfläche des Glaträgers ist aus mehreren Gründen vorteilhaft. Mit einer ICCD-optischen Anordnung ist es möglich, eine Bildersequenz (Film) von Fluorophoren zu erhalten. In bestimmten Aspekten wird mit jedem der NTPs der vorliegenden Erfindung ein eindeutiges Fluorophor assoziiert und daher kann ein Vierfarbeninstrument mit vier Kameras und vier Anregungslasern verwendet werden. Folglich ist es möglich, diese optische Anordnung zur Sequenzierung von DNA zu verwenden. Zusätzlich können viele verschiedene auf einem Mikroskopträger verteilte DNA-Moleküle gleichzeitig abgebildet und sequenziert werden. Darüber hinaus ist es unter Verwendung von Abbildungsanalyse-Algorithmen möglich, den Weg einzelner Farbstoffe zu verfolgen und diese von der konstanten Hintergrundfluoreszenz und von "versehentlich dequenchten" Farbstoffen, welche sich von einem stromaufwärts gelegenen Ursprung in das Blickfeld bewegen, zu unterscheiden.

[0066] In bestimmten Aspekten ist die bevorzugte Geometrie zur ICCD-Detektion von Einzelmolekülen die Total-internal-reflectance-fluorescence(TIRF)-Mikroskopie. Bei TIRF reflektiert ein Laserstrahl vollständig von einer Glas-Wasser-Grenzfläche. Das optische Feld endet nicht abrupt an der reflektierenden Grenzfläche, sondern seine Intensität nimmt exponentiell mit zunehmender Distanz ab. Das dünne "evaneszente" optische Feld an der Grenzfläche liefert einen geringen Hintergrund und ermöglicht die Detektion von Einzelmolekülen mit Störabstandsverhältnissen von 12:1 im sichtbaren Wellenlängenbereich (siehe M. Tokunaga et al., Biochem. and Biophys. Res. Comm. 235, 47 (1997) und P. Ambrose, Cytometry, 36, 244 (1999)).

[0067] Die Durchdringung des Feldes jenseits des Glases hängt von der Wellenlänge und dem Einfallswinkel des Laserstrahls ab. Tiefere Durchdringung wird erreicht durch längere Wellenlängen und durch kleinere Winkel zur Oberfläche, normal innerhalb des Limits eines Grenzwinkels. In typischen Assays werden Fluorophore innerhalb von 200 nm von der Oberfläche detektiert, was der Konturlänge von ungefähr 600 DNA-Basenpaaren entspricht. Vorzugsweise wird eine prismenartige TIRF-Geometrie zum Einzelmolekül-Imaging verwendet, wie von Xu und Yeung beschrieben (siehe X-H. N. Xu et al., Science, 281, 1650 (1998)). Einzelmoleküldetektion kann durch die Verwendung von Flusszytometrie erreicht werden, wobei fließende Proben durch einen fokussierten Laser mit einem räumlichen Filter, der zur Bestimmung eines kleinen Volumens verwendet wird, hindurchfließen. US-Pat. Nr. 4,979,824 beschreibt eine Vorrichtung für diesen Zweck. US-Pat. Nr. 4,793,705 beschreibt und beansprucht detailliert ein Detektionssystem zur Identifizierung von Einzelmolekülen in einem Durchflussstrang der Partikeln in einer Durchflusszelle. Das '705-Patent beschreibt des weiteren Verfahren zur Anordnung einer Vielzahl von Laser, Filtern und Detektoren zur Detektion verschiedener fluoreszierender nukleinsäurebasenspezifischer Markierungen. US-Pat. Nr. 4,962,037 beschreibt auch ein Verfahren zur Detektion eines geordneten Strangs von markierten Nukleotiden zum Erhalt von DNA- und RNA-Sequenzen unter Verwendung einer Nuklease zur Spaltung der Basen anstatt einer Polymerase zur Synthese, wie hierin be-

schrieben. Einzelmoleküldetektion auf festen Trägern ist in Ishikawa, et al. (1994) Single-molecule detection by laser-induced fluorescence technique with a position-sensitive photon-counting apparatus, Jan. J. Appl. Phys. 33: 1571–1576, beschrieben. Ishikawa beschreibt eine typische Vorrichtung beinhaltend ein an einem Fluoreszenzmikroskop befestigtes photonenzählendes Kamerasystem. Lee et al. (1994), Laser-induced fluorescence detection of a single molecule in a capillary, Anal. Chem., 66: 4142–4149 beschreibt eine Vorrichtung zur Detektion von Einzelmolekülen in einer Quarz-Kapillarröhre. Die Auswahl der Laser hängt von der Markierung und der Qualität des erforderlichen Lichts ab. Dioden-, Helium-Neon-, Argon-Ionen-, Argon-Krypton-Mischionen- und Nd:YAG-Laser sind nützlich in der vorliegenden Erfindung.

[0068] Die vorliegende Erfindung kann als ein System aus Komponenten betrachtet werden, welche dazu bestimmt sind, die Synthese einer Nukleinsäure zu detektieren, wenn PPI freigesetzt wird. **Fig. 4** bietet eine Übersicht über dieses System, welches in Beispiel 2 detailliert beschrieben ist. **Fig. 5** zeigt eine typische Anordnung der auf der Oberfläche des festen Trägers (**15**) immobilisierten Polymerase (**14**) mit einer Ziel-DNA (**13**), welche durch den Einbau eines gamma-markierten dNTPs (**17**) verlängert wird. Genauer gesagt ist die Ziel-DNA an einen Primer hybridisiert, welcher das durch die gebundene DNA-abhängige DNA-Polymerase erzeugte Verlängerungsprodukt sein wird. **Fig. 6** zeigt eine durchgehende Sequenz von doppelsträngigen DNA-Molekülen (**18**) unter Verwendung einer auf einem festen Träger (**15**) immobilisierten doppelsträngigen DNA-abhängigen RNA-Polymerase (**19**), wobei das Verlängerungsprodukt als eine neue RNA (**20**) von den markierten rNTPs (**21**) transkribiert wird. Genauer gesagt bindet ein doppelsträngiges DNA-Template durch Sequenzerkennung einer Polymerasen-Promotor-Sequenz an die RNA-Polymerase. Die Sequenz wird gelesen während die DNA sich durch das Enzym bewegt, wobei eine naszierende RNA entsteht. Nachdem die RNA und DNA freigesetzt sind, ist das Enzym bereit, das nächste vorbeikommende DNA-Molekül zu sequenzieren. Diese Schemata gewährleisten, dass die aktive Stelle im evaneszenten Lichtfeld an der Oberfläche bleibt, so dass jeder Farbstoff, der von einem gequenchten dNTP freigesetzt wird, beleuchtet wird. Das Fixieren der Polymerase anstatt der Zielnukleinsäure (Template) ist zweckmäßig, da es für einen kontinuierlichen Sequenzierungsprozess sorgt, worin ein immobilisiertes Enzym viele verschiedene DNA-Moleküle sequenziert.

[0069] Wenngleich die vorliegende Erfindung mittels Illustrationen und Beispielen zum Zwecke der Klarheit und Verständlichkeit hinreichend detailliert beschrieben wurde, wird es für den durchschnittlichen Fachmann angesichts der Ausführungen der vorliegenden Erfindung durchaus offensichtlich sein, dass gewisse Veränderungen und Modifikationen an der vorliegenden Erfindung vorgenommen werden können, ohne dadurch von den angehängten Ansprüchen abzuweichen.

BEISPIELE

[0070] Die nachfolgenden Beispiele werden lediglich aus Gründen der Anschaulichkeit gegeben und stellen keinerlei Einschränkung dar. Der Fachmann wird ohne weiteres eine Vielzahl von nicht ausschlaggebenden Parametern erkennen, welche verändert oder modifiziert werden könnten, um dennoch die im wesentlichen gleichen Ergebnisse zu liefern.

BEISPIEL 1: POLYMERASEN-ARRAY

[0071] Dieses Beispiel zeigt die Herstellung eines Arrays aus Nickel-Nanodots und die Befestigung einer Polymerase an jedem Dot. Die erforderlichen Apparaturen schließen ein: einen Spinner (PWM 202 E-beam resist spinner, Headway Research Inc.), einen Verdampfer (SC4500 thermal e-gun evaporator, CVC Products Inc.) und ein Rasterelektronenmikroskop (Leo 982 mit Nabity Mustergenerator, Leo Electron Microscopy Inc.).

[0072] Reinigen eines 25 mm Mikroskop-Deckglases auf dem Spinner durch abwechselndes Einsprühen mit Aceton und Isopropylalkohol (IPA) und Spinning des zuletzt aufgetragenen IPA-Films bis zur Trocknung. Beschichten des Deckglases im Spinner mit 0,5 ml PMMA (Poly-(Methyl-Methylacrylat), MW 496 kDa, 2% in Chlorbenzol), Backen auf einer Heizplatte bei 170°C für 10 min, Beschichten mit 0,5 ml PMMA (MW 950 kDa, 2% in Methylisobutylketon [MIBK]) und erneutes Backen. Auftragen der leitenden Schicht durch Verdampfen von 100 Å Gold auf den PMMA-Film im CVC SC4500. Verwendung des Elektronenmikroskops, um das Arraymuster in den PMMA-Film zu ätzen unter Verwendung eines Mustergenerators auf dem Leo 982, wie in einer CAD-Zeichnung spezifiziert (Design CAD, 50 nm-Spots, 10 µm Mitte-zu-Mitte-Abstand, 200 × 200 Dot-Array).

[0073] Entfernen der Goldschicht durch Aussetzen des Deckglases in Gold Etch (15–17% Natriumjodid) für 7 Sekunden, gefolgt von Spülen mit IPA und Wasser. Deponieren von Tantalum (50 Å) und Nickel (100 Å) auf dem Deckglas im CVC SC4500. Entfernen des PMMA in einer 1:1-Mischung von Aceton und Methylenchlorid für 10–15 min gefolgt von Ultraschall für einige Sekunden und Spülen mit IPA und Wasser.

[0074] Befestigen der Polymerase unmittelbar vor dem Gebrauch durch Aufbringen von 10 µl einer 15 nM-Lösung von polyhistidinmarkierter Klenow-DNA-Polymerase-Exo⁻ (bereitet unter Verwendung von TOPO Klonierungsvektor und ProBond Harz, Invitrogen Inc.) in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS; Harlow E., Lane D. 1988. *Antibodies A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory ISBN 0-87969-14-2) auf dem Deckglas; nach 20 min Waschen des Deckglases in PBS, dann unmittelbar verwenden.

BEISPIEL 2: ZWEIFARBEN-EINZELMOLEKÜL-IMAGING-MIKROSKOP

[0075] Das in [Fig. 4](#) beschriebene Mikroskop wird zur Detektion von Einzelmolekülereignissen auf der Oberfläche des in Beispiel 1 erhaltenen Deckglases verwendet. Das Mikroskop ist ausgestattet mit einem Multicolor-Mischgas-Laser (1), welcher Licht in einstellbaren Wellenlängen emittiert. Der Laserstrahl passiert zunächst einen Laserlinienfilter (10), um unerwünschte Wellenlängen herauszufiltern. Der unfokussierte Output erreicht ein rechtwinkliges Prisma aus Schmelzquarz (2), welches sich direkt unter dem Deckglas (3) befindet. Die Proben-(4)-moleküle befinden sich in einer Pufferlösung auf dem Deckglas. Das in das Prisma einfallende Laserlicht wird in einem derartigen Winkel gebrochen, dass der Grenzwinkel zwischen Schmelzquarz und der Pufferlösung überschritten wird. Das Licht wird somit innerhalb des Prismas vollständig reflektiert, was ein Total-Internal-Reflection(TIR)-Evaneszenzfeld (9) im Puffer hervorruft. Der relevante Bereich wird unter Verwendung eines Mikroskops (6) mit einer direkt in den Puffer eingetauchten Objektivlinse (5) abgebildet. Die Fluoreszenzemission am Mikroskop-Output passiert ein Multi-Wellenlängen-Sichtgerät (7), welches Bilder in verschiedenen Wellenlängen räumlich voneinander trennt. Dies gestattet die Diskriminierung von bei verschiedenen Wellenlängen stattfindenden Ereignissen.

[0076] Die Bilder werden auf den Array einer Intensified-CCD(ICCD)-Kamera (8) projiziert, von welchem aus sie digitalisiert und im Speicher (11) gespeichert werden. Algorithmen zur Bildanalyse (12) werden mit den im Speicher gespeicherten Bildern durchgeführt. Diese Algorithmen können Signal von Hintergrund unterscheiden, Moleküle verfolgen und andere signalverarbeitende Funktionen erfüllen. Speicherung und Signalverarbeitung können off-line in einem Computer erfolgen oder in spezialisierten von einem Mikroprozessor gesteuerten Digital-Signal-Processing(DSP)-Chips.

BEISPIEL 3: SYNTHESE VON DOPPELT MARKIERTEN NUKLEOTIDEN

Beispiel 3A: Die Synthese von DABCYL-dUTP-BODIPY-TR ([Fig. 3](#))

a. Aufbereitung von DABCYL-SulfoNHS

[0077] DABCYL (108 mg, 0,4 mmol; Aldrich 25,019-8 Methylrot) wurde aufgelöst in einer Mischung aus trockenem N,N-Dimethylformamid (10 mL; Aldrich 22,705-6) und trockenem Pyridin (96 mg, 1,2 mmol; Aldrich 27,097-0). N-Hydroxysulfosuccinimid (260 mg, 1,2 mmol; Pierce 24510) und N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (250 mg, 1,2 mmol; Pierce 20320) wurden zugegeben und die Mischung wurde bei 50°C für 2 Stunden in einer Stickstoffatmosphäre gerührt. Die Reaktion wurde von TLC (MKC18F Reversed Phase; Whatman 4803-110; entwickelt in 0,1 M Triethylammoniumacetat, pH 7, 80% Acetonitril) überwacht. Nach Verdünnung mit Ether wurde der Überstand abgegossen, das Produkt wurde mit Ether auf einem Filter gewaschen, getrocknet und in ausgetrocknetem Zustand bei -20°C gelagert.

b. Synthese von DABCYL-dUTP

[0078] Aminoallyl-dUTP (10 mg, 20 µmol; Sigma A 0410) wurde vermischt mit DABCYL-SulfoNHS (30 mg, 30 µmol; aus Schritt A) in 3 mL 0,1 M Natriumcarbonat, pH 8,3. Die Mischung wurde in Dunkelheit für 4 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktion wurde von TLC überwacht (wie in Schritt A). Das DABCYL-dUTP-Produkt wurde unter Verwendung eines linearen Gradienten von 0% bis 100% von Puffer B, gemischt in Puffer A, über 20 Minuten durch Reversphasen-HPLC aufgereinigt (Puffer A ist 0,1 M Triethylammoniumacetat in Wasser, pH 7, 4% Acetonitril; Puffer B ist derselbe wie Puffer A mit 80% Acetonitril).

c. Synthese von DABCYL-dUTP-Thiol

[0079] DABCYL-dUTP (9 mg, 12 µmol; aus Schritt B) wurde aufgelöst in 1 mL 0,1 M MES, pH 5,7 (Sigma M 3023), und eingestellt auf pH 5,75. Cystamindihydrochlorid (10 mg, 44 µmol; Sigma C 8707) wurde aufgelöst in 2,5 mL 0,1 M MES, pH 5,7, und eingestellt auf pH 5,75. EDC (9 mg, 47 µmol; Pierce 22980) wurde aufgelöst in 0,5 mL 0,1 M MES, pH 5,7, und wurde unverzüglich der DABCYL-dUT-Lösung zugegeben. Nach 10 Minuten wurde die Cystaminlösung zugegeben und der pH-Wert wurde zwischen 5,5 und 5,8 gehalten während die Re-

aktion bei Raumtemperatur fortschritt. Nach zwei Stunden wurde der pH-Wert auf 7,0 eingestellt und die Probe wurde bei -20°C gelagert. Das Produkt wurde durch Reversphasen-HPLC aufgereinigt, wie in Schritt b.

d. Synthese von DABCYL-dUTP-BODIPY-TR

[0080] DABCYL-dUTP-Thiol (2,5 mg, 3 μmol ; aus Schritt C) wurde aufgelöst in 5,4 mL 5 mM TCEP (Pierce 20490), 30 mM Natriumphosphat, eingestellt auf pH 7,5. BODIPY-TR-Jodacetamid (5 mg, 7,4 μmol ; Molecular Probes D-6011) wurde aufgelöst in 2,6 mL N,N-Dimethylformamid und wurde zu der DABCYL-dUTP-Thiol-Lösung zugegeben. Nachdem es bei Raumtemperatur für 5 Stunden in Dunkelheit gestanden hatte, wurde das Produkt durch Reversphasen-HPLC aufgereinigt, wie in Schritt b.

e. Bestimmung der Quenching-Effizienz

[0081] Die Quenching-Effizienz von DABCYL-dUTP-BODIPY-TR wurde wie folgt bestimmt. Erstens wird die Fluoreszenz einer den Farbstoff BODIPY-TR enthaltenden Probe gemessen. Zweitens wird eine Probe gemessen, welche die gleiche Konzentration des Nukleotidtriphosphats mit einem γ -Phosphat mit einem daran befestigten Fluorophorrest, d. h. DABCYL-dUTP-BODIPY-TR, aufweist. Danach wird die Quenching-Effizienz berechnet, welche gleich ist wie $F_0 - F/F_0$, wobei F_0 die Fluoreszenz von BODIPY-TR allein und F die Fluoreszenz von DABCYL-dUTP-BODIPY-TR ist. Die Fluoreszenz-Quenching-Effizienz von DABCYL-dUTP-BODIPY-TR ist mindestens um das fünffache höher als von BODIPY-TR allein.

Beispiel 3B: Synthese von Rho-dUTP-BODIPY-TR und Rho-dCTP-BODIPY-TR

a. Synthese von Rho-dUTP

[0082] Aminoallyl-dUTP (20 μmol ; Sigma A 0410) wurde vermischt mit 5-Carboxyrhodamin 6G, Succinimidylester (30 μmol ; Molecular Probes C-6127) in 3 ml 0,1 M Natriumcarbonat, pH 8,3, 20% DMF. Die Mischung wurde in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktion wurde durch TLC (MKC 18F Reversed Phase; Whatman 4803-110; entwickelt in 0,1 M Triethylammoniumacetat, pH 7, 80% Acetonitril) überwacht. Das Rho-dUTP-Produkt wurde unter Verwendung eines linearen Gradienten von 0% to 100% von Puffer B, gemischt in Puffer A, über 20 Minuten durch Reversphasen-HPLC aufgereinigt (Puffer A ist 0,1 M Triethylammoniumacetat in Wasser, pH 7, 4% Acetonitril; Puffer B ist derselbe wie Puffer A mit 80% Acetonitril).

b. Synthese von Rho-dUTP-Thiol

[0083] Rho-dUTP (12 μmol ; aus Schritt a) wurde aufgelöst in 1 ml 0,1 M MES, pH 5,7 (Sigma M 3023), und eingestellt auf pH 5,75. Cystamindihydrochlorid (44 μmol ; Sigma C 8707) wurde aufgelöst in 2,5 ml 0,1 M MES, pH 5,7 und eingestellt auf pH 5,75. EDC (47 μmol ; Pierce 22980) wurde aufgelöst in 0,5 ml 0,1 M MES, pH 5,7, und wurde unverzüglich der Rho-dUTP-Lösung zugegeben. Nach 10 Minuten wurde die Cystaminlösung zugegeben und der pH-Wert wurde zwischen 5,5 und 5,8 gehalten während die Reaktion bei Raumtemperatur fortschritt. Nach zwei Stunden wurde der pH-Wert auf 7,0 eingestellt und die Probe wurde bei -20°C gelagert. Das Produkt wurde durch Reversphasen-HPLC aufgereinigt, wie in Schritt a beschrieben.

c. Synthese von Rho-dUTP-BODIPY-TR

[0084] Rho-dUTP-Thiol (3 μmol ; aus Schritt b) wurde aufgelöst in 5,4 ml 5 mM TCEP (Pierce 20490), 30 mM Natriumphosphat, eingestellt auf pH 7,5. BODIPY-TR-Jodacetamid (7,4 μmol ; Molecular Probes D-6011) wurde aufgelöst in 2,6 ml N,N-Dimethylformamid und wurde der Rho-dUTP-Thiol-Lösung zugegeben. Nachdem es bei Raumtemperatur für 5 Stunden im Dunkeln gestanden hatte, wurde das Produkt durch Reversphasen-HPLC aufgereinigt, wie in Schritt a.

d. Synthese von Rho-dCTP-BODIPY-TR

[0085] Markiertes dCTP wurde im wesentlichen synthetisiert wie für dUTP beschrieben, außer dass Aminoallyl-dCTP für das dUTP substituiert wurde. Aminoallyl-dCTP wurde gemäß US-Patent 5,476,928 synthetisiert, außer dass dCTP anstelle von dUTP verwendet wurde.

BEISPIEL 4: GENOTYPISIERUNG

[0086] Dieses Beispiel veranschaulicht einen sequenzbasierten Genotypisierungsassay bei einzelnen

DNA-Molekülen. Das Ziel ist die (Delta) F508-Deletion des Mukoviszidose-transmembrane-Leitfähigkeit-Regulatorgens (Welsh MJ, et al., 1993. J. Cell Science 1065: 235–239). Genomische DNA wird aus dem vollständigen Blut von CFTR-homozygoten Individuen isoliert (Wizard Genomic DNA Purification Kit Cat. Nr. A-1120, Promega Inc.). Amplifikation eines 54-Nukleotidsegments des CFTR-Gens durch PCR unter Verwendung der Primer 5'-CACCATTAAAGAAAATATCAT (Primer 1, SEQ ID NR: 1) und 5'-Biotinyl-CTGTATCTATATTCAT-CATAG (Primer 2, SEQ ID NR: 2).

[0087] Die gebrauchsfertigen Primer werden von einer kommerziellen Quelle bezogen (beispielsweise Operon Technologies, Alameda, CA, USA). Primer 1 hybridisiert an die der (Delta) F508-Deletion benachbarte CFTR-Sequenz; das erste Nukleotid 3' an Primer 1 ist Cytosin im normalen Allel oder Thymin in der Deletionsmutante (siehe Tabelle 2, unten; von Vaughan P, McCarthy T. 1998. Nuc Acids Res 26: 810–815). Amplifikationsbedingungen sind 200 ng genomischer DNA, jeweils 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP und dUTP, jeweils 0,2 µM eines jeden Primers, 2,0 mM MgCl₂, 1 Einheit Taq-DNA-Polymerase, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9 bei 25°C), 0,1% Triton X-100, in einem Endvolumen von 50 µl (30 Zyklen bei 94°C für 30 sec, 52°C für 30 sec, 72°C für 15 sec; Optimierung der Mg-Konzentration und der Cycling-Parameter kann erforderlich sein, je nach den spezifischen Merkmalen der verwendeten Thermocyclervorrichtung).

[0088] Aufreinigen des PCR-Produkts auf mit Streptavidin beschichteten magnetischen Kügelchen (DYNAPURE Dye Terminator Removal kit, Dynal A. S.) und erneute Amplifikation für 15 Zyklen unter den selben Bedingungen wie vorher, außer dass die genomische DNA durch 2 µl des aufgereinigten Amplifikationsprodukts ersetzt wird und Primer 1 weggelassen wird, um einen Überschuss des zum Primer komplementären einzelsträngigen DNA-Produkts zu erhalten. Entfernen der dNTPs aus dem amplifizierten Produkt ("Template-Primer") unter Verwendung von magnetischen Kügelchen, wie vorher.

[0089] Platzieren von 10 µl des Reaktionsgemischs (30 nM Template-Primer, 100 nM Primer 1, 1 nM Rho-dCTP-BTR (Beispiel 3), 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM MgCl₂, 7,5 mM Dithiothreitol) auf dem Polymerasen-Array auf dem Zweifarben-Einzelmolekül-Imaging-Mikroskop aus Beispiel 2 und Erhalten einer Bilderserie für 20 Minuten. In ähnlicher Weise, Analyse einer zweiten Probe, welche mit der ersten identisch ist, außer dass Rho-dCTP-BTR der ersten Probe durch Rho-dUTP-BTR (Beispiel 3) ersetzt wird. Analyse des Bildersatzes auf Einbauereignisse, wie angezeigt durch die Trennung der beiden gekoppelten Farbstoffe voneinander. Vergleich der Anzahl von unter Verwendung von dCTP (Probe 1) und dUTP (Probe 2) beobachteten Ereignissen zur Bestimmung ob das Test-CFTR-Gen das normale oder das Deletions-Allel ist.

Tabelle 2

Normales Allel

CACCATTAAAGAAAATATCATCUUUGGUGUUUCCUAUGAUGAAUAUAGAUACAG (SEQ ID NR: 3)

GUGGUAAUUUCUUUUAUAGUAGAAACCACAAAGGATACTACTTATATCTATGTC (SEQ ID NR: 3 Komplement)

Deletionsmutante

CACCATTAAAGAAAATATCATUGGUGUUUCCUAUGAUGAAUAUAGAUACAG (SEQ ID NR: 4)

GUGGUAAUUUCUUUUAUAGUAACCACAAAGGATACTACTTATATCTATGTC (SEQ ID NR: 4 Komplement)

[0090] Die Primer sind unterstrichen (Primer 1 links, Primer 2 rechts). Die drei deletierten Basenpaare sind in der normalen Sequenz fettgedruckt.

BEISPIEL 5: SEQUENZIERUNG

[0091] Die Sequenzierung erfolgt wie bei der Gentyptisierung (Beispiel 4), mit Lesen von mehr als einem Nu-

kleotid stromabwärts des Primers.

a) Synthese von BODIPY-TR-dUTP-Rhodamin

[0092] Es wird der Vorgehensweise aus Beispiel 3a gefolgt, um BODIPY-TR-dUTP herzustellen; der BODIPY-TR-X-STP-Ester (Molecular Probes B-10003) wird für das Rhodamin aus Beispiel 3a substituiert. Derivatisierung des BODIPY-TR-dUTP mit einem Thiol, wie in Beispiel 3b, und Konjugieren von Tetramethylrhodamin-5-Jodacetamidhydrojodid (Molecular Probes T6006) an das Thiol, wie in Beispiel 3c.

b) Sequenzierung

[0093] Es werden die gleichen wie in Beispiel 4 vorbereiteten Normal-Allel-DNA-Templates verwendet.

[0094] Platzieren von 10 µl des Reaktionsgemischs (30 nM Template-Primer, 100 nM Primer 1, 1 nM BODIPY-TR-dUTP-Rho (Beispiel 5a), 1 nM Rho-dCTP-BODIPY-TR (Beispiel 3d), 10 mM Tris HCl (pH 7,5), 5 mM MgCl₂, 7,5 mM Dithiothreitol) auf dem Polymerasen-Array auf dem Zweifarben-Einzelmolekül-Imaging-Mikroskop aus Beispiel 2 und Erhalten einer Bilderserie.

[0095] Einbau von dUTP wird an der Trennung der beiden Farbstoffe erkannt, wobei das Rhodamin freigesetzt wird. Einbau von dCTP wird durch Trennung der gleichen beiden Farbstoffe detektiert, doch wird anstelle des BODIPY das Rodamin freigesetzt.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Williams, John
Li-Cor, Inc.

<120> System und Methode zur Nukleinsäuresequenzierung einzelner
Moleküle durch Polymerase Synthese

<130> 020031-000300PC

<140> WO PCT/US99/29585

<141> 1999-12-13

<150> US 60/112,078

<151> 1998-12-14

<150> US 60/115,496

<151> 1999-01-11

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der Künstlichen Sequenz: CFTR Gen PCR
Primer 1

<400> 1

caccat~~ta~~aaa gaaaatatca t

21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der Künstlichen Sequenz: CFTR Gen PCR
Primer 2

<220>

<221> modifizierte_Base

<222> (1)

<223> n = Biotinyl-Cytosin

<400> 2

ntgtatctat attcatcata g

21

<210> 3

<211> 54

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung von Kombiniertem DNA/RNA Molekül: CFTR Gen
normales Allel

<220>

<223> Beschreibung der Künstlichen Sequenz: CFTR Gen
normales Allel

<400> 3

caccattaa gaaaatatca tcuuggugu uuccaugau gaauauagau acag 54

<210> 4

<211> 51

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung von Kombiniertem RNA/DNA Molekül: CFTR Gen
Deletion mutiertes Allel

<220>

<223> Beschreibung der Künstlichen Sequenz: CFTR Gen
Deletion mutiertes Allel

<400> 4

caccattaa gaaaatatca tugguguuc cuaugauga uauagauaca g 51

Patentansprüche

1. Verfahren zur Genotypisierung oder Sequenzierung einer Zielnukleinsäure umfassend die Schritte:
 - (i) Immobilisierung einer Nukleinsäure-Polymerase oder der Zielnukleinsäure auf einem festen Träger, wobei die Oberfläche des festen Trägers eine Anordnung von Plätzen umfasst, wovon jeder ein einzelnes Molekül der Polymerase oder der Zielnukleinsäure trägt;
 - (ii) in-Kontaktbringen des festen Trägers mit einer Lösung, enthaltend:
 - (a) eine Zielnukleinsäure, wo die Polymerase immobilisiert ist oder eine Polymerase, wo die Zielnukleinsäure immobilisiert ist;
 - (b) eine Primer-Nukleinsäure, die einen Bereich der Zielnukleinsäure stromabwärts des zu sequenzierenden Bereiches komplementiert;
 - (c) Nukleotidtriphosphate (NTPs), wo jede Art von NTP am Gammaphosphat unterschiedlich mit einer Fluoreszenzmarkierung markiert wird, die unterschiedlich fluoresziert, wenn das Gammaphosphat nach Einbau des Nukleotids in das Polymeraseverlängerungsprodukt vom Nukleosid abgespalten wird, und wo die Markierungen ein eindeutiges Signal liefern, das nach Einbau des NTPs in das Polymeraseverlängerungsprodukt selektiv detektierbar ist;
 - (iii) Ermöglichen der Polymerase die Primer-Nukleinsäure sequenziell durch Einbauen der Nukleotide zu verlängern, um ein Komplement der Zielnukleinsäure zu erzeugen; und
 - (iv) Identifizierung der Nukleotide, eins nach dem anderen, während sie in das Polymeraseverlängerungsprodukt eingebaut werden, durch Detektion der Fluoreszenzmarkierung.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Lösung mindestens zwei verschiedene Arten von NTPs enthält.
3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Polymerasen als eine Anordnung von individuellen, einzelnen Molekülen auf einem festen Träger immobilisiert sind.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Zielnukleinsäure ein Einzelnukleotid-polymorphismus ist.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Detektion eine sequenzielle Detektion von verschiedenen Arten von NTP ist, um die Sequenz der Zielnukleinsäure zu bestimmen.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die NTPs mit einem Quencher-Rest markiert sind.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Lösung, die mit dem festen Träger in Kontakt gebracht wird, an der immobilisierten Polymerase oder Zielnukleinsäure vorbeifließt.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die NTPs dNTPs sind.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Zielnukleinsäure eine Desoxynukleotidsäure ist, die Polymerase entweder eine DNA-abhängige DNA-Polymerase oder eine RNA-abhängige DNA-Polymerase ist, und die NTPs dNTPs sind.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Zielnukleinsäure doppelsträngige DNA ist, die Polymerase RNA-Polymerase ist, und die NTPs rNTPs sind.
11. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Lösung ein einziges dNTP umfasst.
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Fluoreszenzmarkierung der NTPs unter Verwendung eines Systems oder einer Vorrichtung detektiert wird, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einem optischen Lesegerät, einem Hochleistungsphotonendetektionssystem, einer Fotodiode, einer Intensified Charge Couple Device-Kamera, einem Nahfeld-Rastermikroskop, einem Fernfeld-Konfokalmikroskop, einem Weitwinkel-Auflichtmikroskop und einem Total Internal Reflection-Fluoreszenzmikroskop.
13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei die Detektion das Verwenden einer Intensified Charge Couple Device-Kamera umfasst, um eine Reihe von Bildern der Fluorophore zu erfassen.
14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Detektion das Verwenden von Bildanalyse-Algorithmen umfasst, um den Weg einzelner Fluoreszenzmarkierungen zu verfolgen.
15. Verfahren nach Anspruch 12, wobei die Detektion das Verwenden eines Total Internal Reflection-Fluoreszenzmikroskops umfasst, um einen geringen Hintergrund zu liefern und die Detektion einzelner Moleküle zu ermöglichen.
16. Verfahren nach Anspruch 6, wobei der Quenching-Rest die Fluoreszenzmarkierung durch einen Mechanismus quencht, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Fluoreszenzresonanzenergietransfer, einem Elektronen-transfermechanismus und einem Grundzustand-Komplex Quenching-Mechanismus.
17. Ein Kit zur Genotypisierung oder Sequenzierung einer Zielnukleinsäure umfassend:
- (i) einen festen Träger, mit einer Oberfläche, die eine immobilisierte Nukleinsäure-Polymerase oder die Zielnukleinsäure trägt, wobei die Oberfläche des festen Trägers eine Anordnung von Plätzen umfasst, wovon jeder ein einzelnes Molekül der Polymerase oder der Zielnukleinsäure trägt;
 - (ii) eine Lösung zum in-Kontaktbringen mit der Oberfläche, beinhaltend:
 - (a) eine Zielnukleinsäure, wo die Polymerase immobilisiert ist oder eine Polymerase, wo die Zielnukleinsäure immobilisiert ist;
 - (b) Nukleotidtriphosphate (NTPs), wo jede Art von NTP am Gammaphosphat unterschiedlich mit einer Fluoreszenzmarkierung markiert wird, die unterschiedlich fluoresziert, wenn das Gammaphosphat nach Einbau des Nukleotids in das Polymeraseverlängerungsprodukt vom Nukleosid abgespalten wird, und wo die Markierungen ein eindeutiges Signal liefern, das nach Einbau des NTPs in das Polymeraseverlängerungsprodukt selektiv detektierbar ist;
 - (iii) ein System oder eine Vorrichtung zur Detektion der Fluoreszenzmarkierung der Nukleotide, wobei das System oder die Anordnung ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem optischen Lesegerät, einem Hochleistungsphotonendetektionssystem, einer Fotodiode, einer Intensified Charge Couple Device-Kamera, einem Nahfeld-Rastermikroskop, einem Fernfeld-Konfokalmikroskop, einem Weitwinkel-Auflichtmikroskop und einem Total Internal Reflection-Fluoreszenzmikroskop.
18. Ein Kit nach Anspruch 17, welches weiter eine Primer-Nukleinsäure umfasst, die einen Bereich der Zielnukleinsäure stromabwärts des zu sequenzierenden Bereiches komplementiert.
19. Ein Kit nach Anspruch 17 oder Anspruch 18, wobei die Lösung mindestens zwei verschiedene Arten von NTP umfasst.
20. Ein Kit nach einem der Ansprüche 17 bis 19, wobei die Oberfläche eine immobilisierte DNA-abhängige DNA-Polymerase trägt.

21. Ein Kit nach einem der Ansprüche 17 bis 20, wobei die Zielnukleinsäure DNA ist und wo die DNA einen Einzelnukleotidpolymorphismus von einer Wildtyp-DNA hat.
22. Ein Kit nach einem der Ansprüche 17 bis 21, wobei die NTPs dNTPs sind.
23. Ein Kit nach einem der Ansprüche 17 bis 22, wobei die Polymerase eine DNA-abhängige DNA-Polymerase ist, die Zielnukleinsäure DNA ist, und die NTPs dNTPs sind.
24. Ein Kit nach einem der Ansprüche 17 bis 22, wobei die Polymerase eine RNA-abhängige DNA-Polymerase ist, die Zielnukleinsäure RNA ist, und die NTPs dNTPs sind.
25. Ein Kit nach einem der Ansprüche 17 bis 21, wobei die Polymerase eine DNA-abhängige RNA-Polymerase ist, die Zielnukleinsäure doppelsträngige DNA ist, und die NTPs rNTPs sind.
26. Ein Kit nach Anspruch 17, wobei die Lösung ein einziges dNTP umfasst.
27. Ein Kit nach einem der Ansprüche 17 bis 26, welches weiter Elektroden umfasst, wo die Elektroden positioniert sind, um ein Spannungsgefälle über dem festen Träger zu erzeugen, das ausreicht, um den Fluss der Lösung, die mit der immobilisierten Polymerase oder Zielnukleinsäure in Kontakt gebracht wird, zu ermöglichen.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

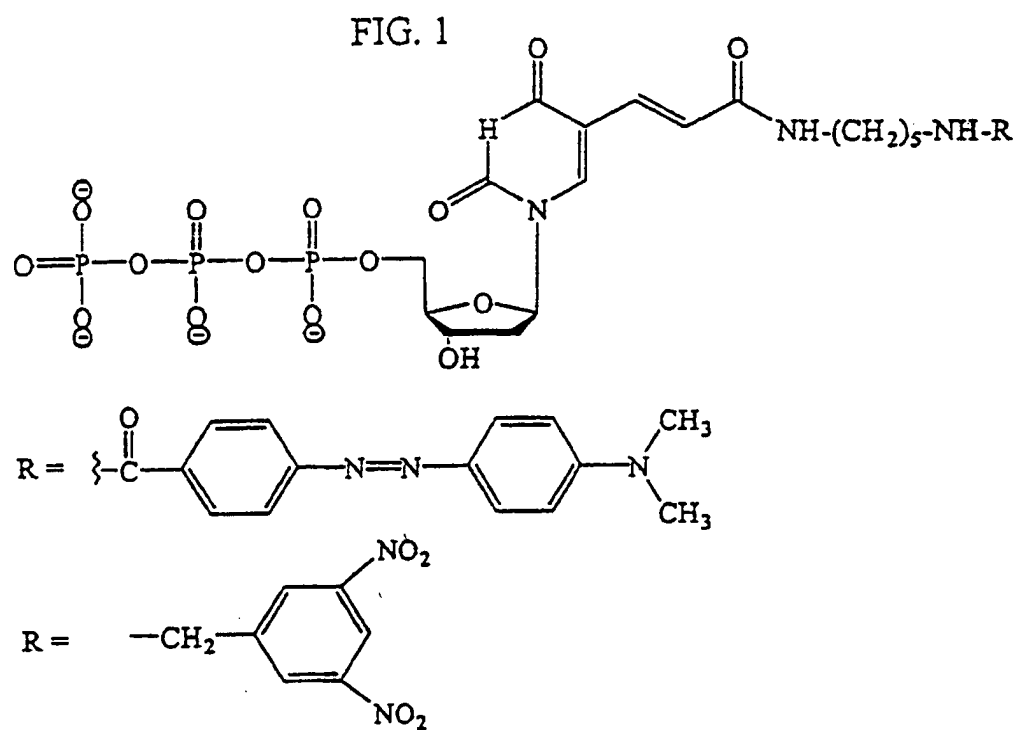
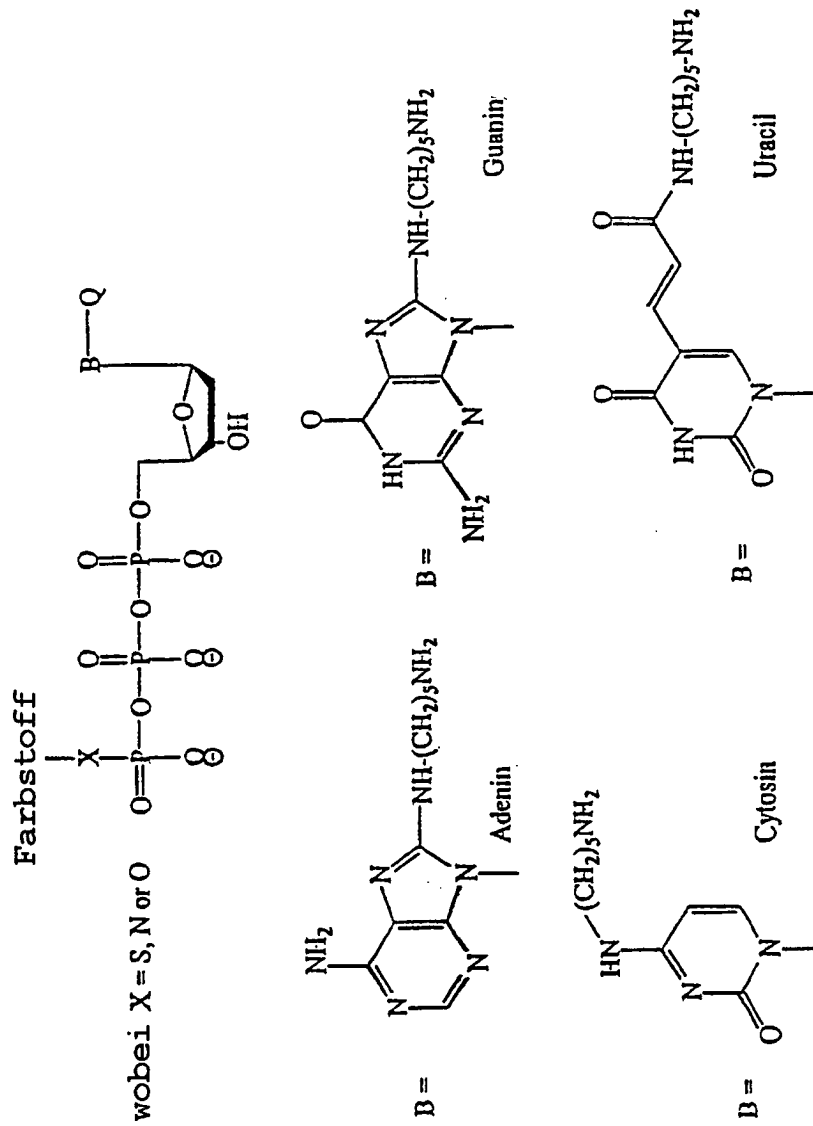


FIG. 2



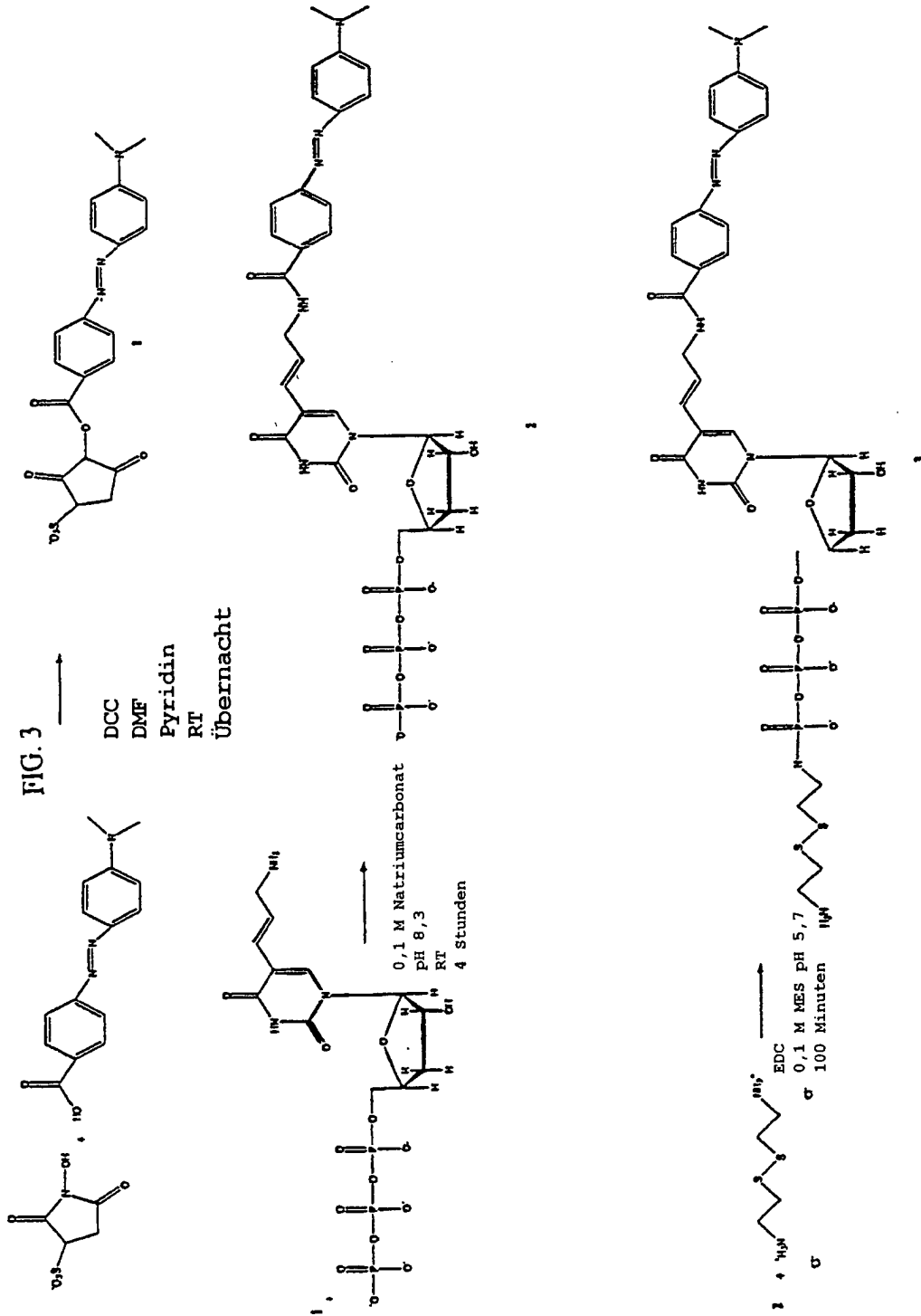
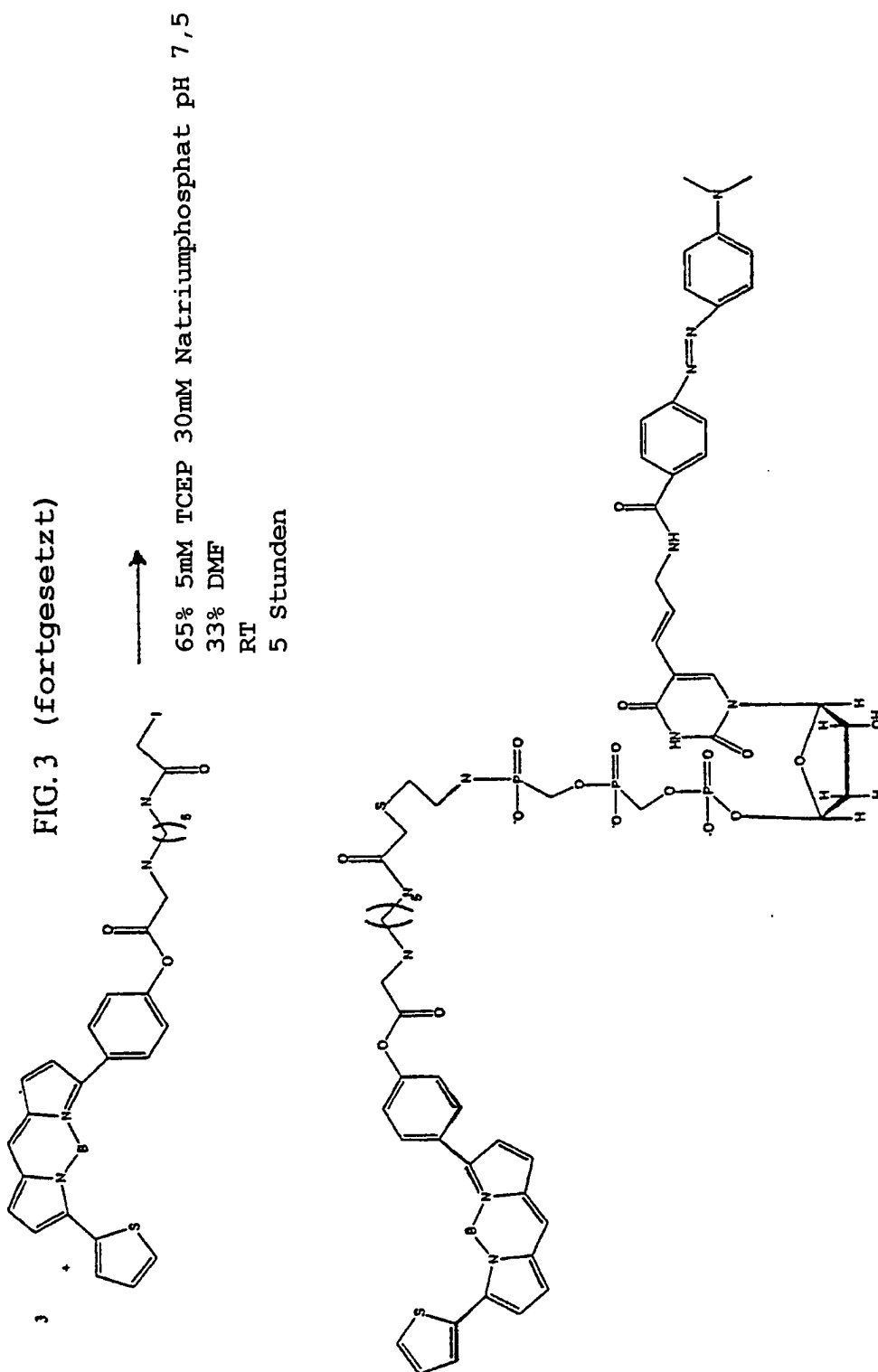


FIG. 3 (fortgesetzt)



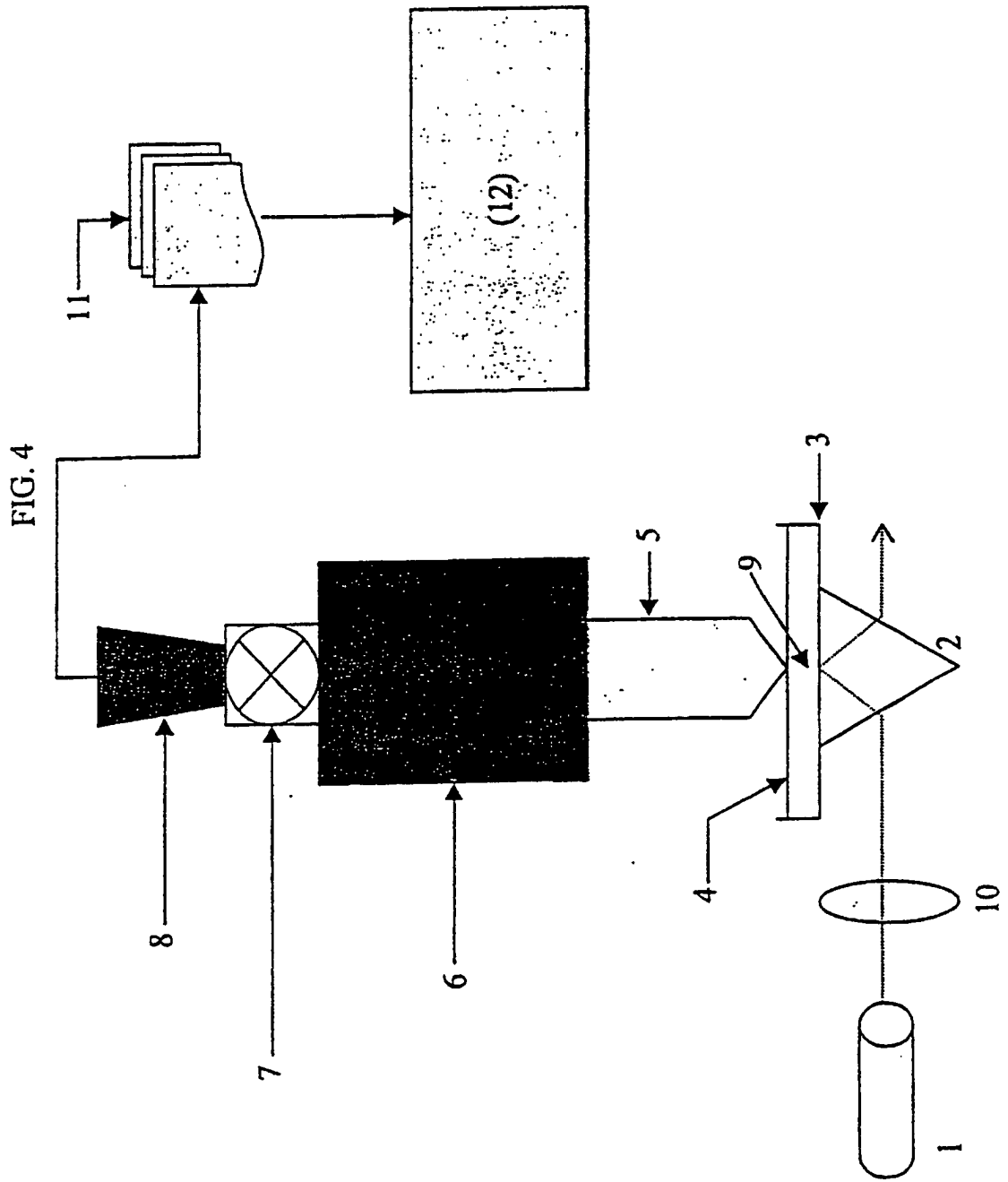


FIG. 5

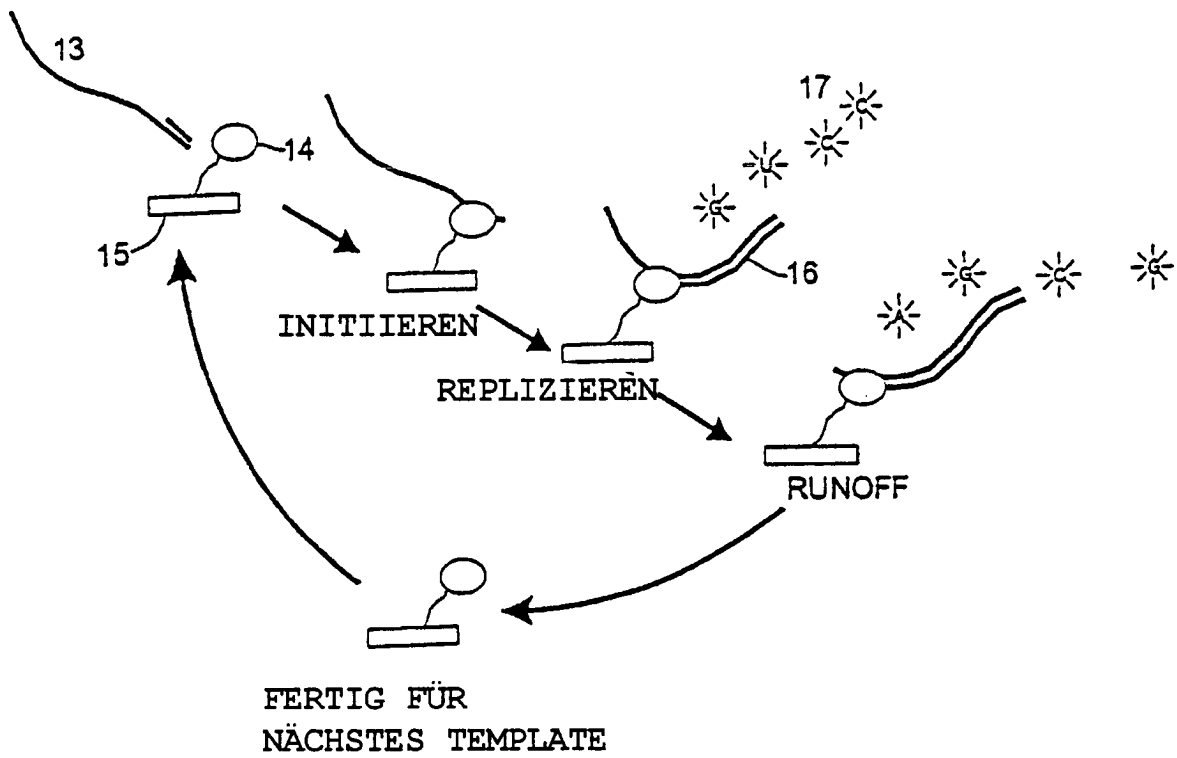


FIG. 6

