



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 228 906 A1

4(51) G 01 N 33/50

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP G 01 N / 265 997 4	(22)	06.08.84	(44)	23.10.85
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, 1086 Berlin, Otto-Nuschke-Straße 22/23, DD
(72)	Rosenthal, André, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Hunger, Hans-Dieter, Dr. rer. nat., DD

(54) Verfahren zur Festphasen-Sequenzierung von Nucleinsäurefragmenten

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Festphasen-Sequenzierung von Nucleinsäurefragmenten. Sie hat die Aufgabe, ein Sequenzierungsverfahren zu entwickeln, das die gleichzeitige Sequenzierung großer Stückzahlen von langen und kurzen Nucleinsäurefragmenten ermöglicht und automatisierbar ist. Erfindungsgemäß wird ein mechanisch stabiler Flächenträger mit Anionenaustauscheigenschaften verwendet, an den radioaktiv markierte Nucleinsäurefragmente immobilisiert werden. Das immobilisierte Fragment oder mehrere immobilisierte Fragmente werden gleichzeitig mit oder ohne Reagenzüberschuß chemisch modifiziert und nach Waschen einzeln mit Piperidin umgesetzt, wobei gleichzeitig die Elution der Fragmente vom Träger erfolgt. Neben der Elution mit chemischen Mitteln wird auch die Elution mit ionischen und elektromagnetischen Mitteln verwendet. Anwendungsgebiet der Erfindung ist die Molekularbiologie und die Gentechnik.

DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

(19) **DD** (11) **228 906 A1**

4(51) G 01 N 33/50

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP G 01 N / 265 997 4 (22) 06.08.84 (44) 23.10.85

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1086 Berlin, Otto-Nuschke-Straße 22/23, DD

(72) Rosenthal, André, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Hunger, Hans-Dieter, Dr. rer. nat., DD

(54) **Verfahren zur Festphasen-Sequenzierung von Nucleinsäurefragmenten**

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Festphasen-Sequenzierung von Nucleinsäurefragmenten. Sie hat die Aufgabe, ein Sequenzierungsverfahren zu entwickeln, das die gleichzeitige Sequenzierung großer Stückzahlen von langen und kurzen Nucleinsäurefragmenten ermöglicht und automatisierbar ist. Erfindungsgemäß wird ein mechanisch stabiler Flächenträger mit Anionenaustauscheigenschaften verwendet, an den radioaktiv markierte Nucleinsäurefragmente immobilisiert werden. Das immobilisierte Fragment oder mehrere immobilisierte Fragmente werden gleichzeitig mit oder ohne Reagenzüberschuß chemisch modifiziert und nach Waschen einzeln mit Piperidin umgesetzt, wobei gleichzeitig die Elution der Fragmente vom Träger erfolgt. Neben der Elution mit chemischen Mitteln wird auch die Elution mit ionischen und elektromagnetischen Mitteln verwendet. Anwendungsgebiet der Erfindung ist die Molekularbiologie und die Gentechnik.

ISSN 0433-6461

17 Seiten

Zur PS Nr. *228.906*.....

ist eine Zweitschrift erschienen.

(Teilweise bestätigt gem. § 18 Abs. 1 d. Änd.Ges.z.Pat.Ges.)

Verfahren zur Festphasen-Sequenzierung von Nucleinsäurefragmenten

Anwendungsgebiet der Erfindung

Anwendungsgebiet der Erfindung ist die Sequenzanalyse von Nucleinsäurefragmenten (DNA und RNA) in der Molekularbiologie und Gentechnik bzw. die Sequenzanalyse von Oligodesoxy- und Oligoribonucleotiden nach chemischer Synthese dieser Abschnitte.

Charakterisierung der bekannten technischen Lösungen

Im Dez. 1983 wurde von zwei sowjetischen Autoren (S.A. Chuvpilo und V.V. Kravchenko: Bioorg. Khim 9(12) (1983) 1634-1637) erstmalig ein Festphasenverfahren allerdings nur zur Sequenzierung langer DNA-Abschnitte und unter Nutzung eines kommerziell erhältlichen DEAE-Papieres (DE 81 der Firma Whatman) beschrieben. Es besteht aus den Schritten: 1) Immobilisierung des 5'- oder 3'-markierten DNA-Fragmentes an den Träger; 2) Waschen; 3) chemische Modifikationsreaktionen ohne Reagenzüberschuß (d.h. nicht in einem Reaktionsgefäß) nach Maxam und Gilbert (A.M. Maxam und W. Gilbert: Methods in Enzymol. 65 (1980) 499-560); 4) Waschen; 5) Piperidin-Reaktion unter Standardbedingungen (nur 20 % Verlust der radioaktiven Fragmente); 6) Waschen; 7) 2 x Elution der Fragmente vom Träger mit 1 M NaCl bei 60°C; 8) Ethanol-Precipitation zur Ausfällung des Materials und 2 x Waschen mit 90 % Ethanol.

Nachteilig in diesem Verfahren sind:

- Die sehr schlechte mechanische Stabilität des DE 81 Papieres erschwert sehr die Manipulierung mit dem Träger in wässrigen

- Puffern (vor allem bei höheren Temperaturen). Es kommt zum schnellen Zerreißen, Auflösen und Abfedern des Trägers.
- Die verwendeten Modifikationsreaktionen führen in der A+G-, T+C- und C- Reaktion zu nahezu 100 % Verlusten, wenn sie in Reaktionsgefäßen (z.B. in Eppendorf-Hütchen) mit Reagenzüberschuß ausgeführt werden.
 - Aufgrund der schlechten mechanischen Eigenschaften des DE 81 Trägers ist die gleichzeitige Sequenzierung großer Stückzahlen von Nucleinsäurefragmenten in einem Reaktionsgefäß nicht möglich.
 - Insgesamt sind 8 Operationen nötig, wobei die Operation der Ethanol-Precipitation (Nr. 8) prinzipiell nicht für eine automatische Betriebsweise geeignet ist.
 - Oligonucleotide $\leq$ 8 Einheiten können nach diesem Verfahren nicht sequenziert werden, da die ersten 5'-ständigen Nucleotide bei der Umfällung verloren gehen und damit die Sequenzierungsmuster nicht vollständig gelesen werden können.

Aufgrund aller dargestellten Nachteile ist das beschriebene Verfahren erstens nicht automatisierbar und zweitens können selbst bei manuellem Betrieb keine großen Stückzahlen gleichzeitig sequenziert werden. Kurze Nucleinsäurefragmente (DNA- und RNA-Oligomere) können nicht sequenziert werden.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Sequenzierung großer Stückzahlen von kurzen und langen Nucleinsäurefragmenten bei gleichzeitiger Einsparung von Zeit und Reagenzien sowie die vollständige Automatisierung aller Operationen der Sequenzanalyse.

Darlegung des Wesens der Erfindung

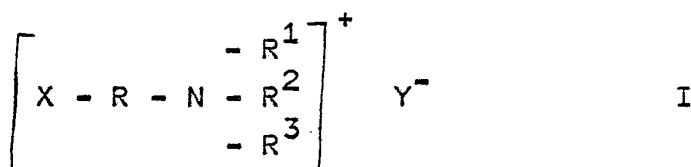
Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Sequenzierungsverfahren zu entwickeln, das die gleichzeitige Sequenzierung großer Stückzahlen von kurzen und langen Nucleinsäurefragmenten erlaubt und auch vollständig automatisierbar ist.

Erfindungsgemäß wird das Verfahren zur Festphasen-Sequenzierung von Nucleinsäurefragmenten unter Verwendung eines mechanisch stabilen Flächenträgers mit Anionenaustauscheigenschaften durchgeführt. Die Immobilisierung des oder der markierten Fragmente an diesen Träger erfolgt in an sich bekannter Weise z.B. durch Auftropfen oder durch Elektroelution aus Gelen (pro Fragment 4 Träger). Diese Träger werden gewaschen und anschließend

werden das immobilisierte Fragment oder mehrere immobilisierte Fragmente gleichzeitig chemisch modifiziert. Die chemischen Modifikationsreaktionen erfolgen in speziellen Reaktionsgefäßen (z. B. Eppendorf-Hütchen, Glasreaktoren mit dosierbarem Zu- und Ablauf (Automat), Reaktorkammern für größere Flächenträger) mit Reagenzüberschuß bzw. ohne Reagenzüberschuß. Ohne Reagenzüberschuß werden die Flächenträger auf eine chemisch inerte Matrix wie Glasplatten oder Kunststoffplatten aufgelegt und gerade soviel Reagenzien mit Mikropipetten auf einen Flächenträger aufgetragen, daß er nur befeuchtet ist.

Nach einem Waschprozeß werden die sortierten Fragmente einzeln mit Piperidin umgesetzt und mit chemischen, ionischen oder elektromagnetischen Mitteln eluiert.

Als mechanisch stabiler Flächenträger mit Anionenaustauschigenschaften wird ein Flächenträger verwendet, der durch Umsetzung an sich bekannter geformter oder nicht geformter makromolekularer Massen mit Verbindungen der allgemeinen Formel I,



in der X
R

= NH₂-, OH- oder SH-Gruppierungen

= Alkylgruppen mit 1 - 10 C-Atomen, Aromaten, photolytische Gruppen wie substituierte o-Nitrobenzylester bzw. substituierte Methylphenancylester oder Heterocyclen

R¹, R², R³ = Alkylgruppen mit 1 - 4 C-Atomen oder H-Atomen

Y = Halogenide, Hydroxylgruppen

bedeuten, entsteht. Verbindungen der allgemeinen Formel I kann man gegebenenfalls intermediär erzeugen.

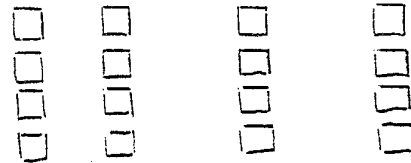
Zur Immobilisierung werden 1 oder n 5'- oder 3'-markierte lange oder kurze Nucleinsäurefragmente auf 4 oder 4 x n einzelne mechanisch stabile Flächenträger (ca. 1 bis 2 x 1 bis 2 mm) mit Anionenaustauschigenschaften aufgetragen.

G- A+G- T+C- C-Reaktion

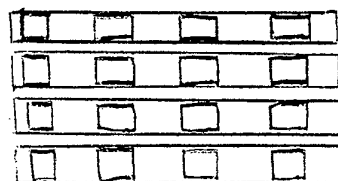
ein Fragment



Fragmente



Oder n 5'- oder 3'-markierte lange oder kurze Nucleinsäurefragmente werden jeweils auf 4 einzelne aber geometrisch größere Flächenträger so immobilisiert, daß alle n Fragmente mit einem Sicherheitsabstand jeweils auf einem Flächenträger fixiert sind.



G- Reaktion

A+G- Reaktion

T+C- Reaktion

C- Reaktion

Alle Flächenträger müssen speziell gekennzeichnet sein. Das nachfolgende Waschen des Flächenträgers erfolgt 2 x nacheinander in Wasser und in Ethanol, wobei sie von Salzen oder anderen Verunreinigungen befreit werden. Danach werden sie kurz an der Luft oder gegebenenfalls mit erwärmter Luft getrocknet.

Zur chemischen Modifikation wird

a) 1 Fragment auf 4 einzelnen Flächenträgern mindestens 4 verschiedenen chemischen Modifikationsreaktionen (G, A+G, T+C, C) unterworfen. Jeweils ein Flächenträger (1 bis 2 mm x 1 bis 2 mm) wird dazu in einem speziellen Reaktionsgefäß z.B. Eppendorf-Hütchen, Glasreaktor mit automatischer Zu- und Ablaufregulation (Automat) plaziert. Der Flächenträger wird dann mit Reagenzüberschuß behandelt, d.h. er schwimmt im Reaktionsmedium während der Reaktion. Folgende Modifikationsreaktionen können verwendet werden: G-Reaktion mit DMS; A+G-Reaktion mit Ameisensäure, Piperidinformiat pH 2 oder mit Diethylpyrocarbonat; T+C-Reaktion mit Kaliumpermanganat oder Osmiumtetroxid; C-Reaktion mit Hydroxylamin. Nach Beendigung der Reaktion wird der Flächenträger manuell mit z.B. einer Pinzette aus dem Reaktionsgefäß entfernt bzw. der Reagenzüberschuß wird im automatischen System durch Ablassen entfernt.

b) n Fragmente, die auf $4 \times n$ Flächenträgern aufgetragen (immobilisiert) sind, werden in G, A+G-, T+C- und C-Fragmente sortiert. Jeweils die n-G, n-A+G, n-T+C und n-C-Fragmente werden in 4 Reaktionsgefäßen nach a) gleichzeitig mit Reagenzüberschuß der jeweiligen Modifikationsreaktion unterworfen.

c) 1 Fragment auf 4 einzelnen Flächenträgern oder n Fragmente auf $4 \times n$ einzelnen Flächenträgern werden nicht in Reaktionsgefäßen sondern auf chemisch inerten Unterlagen wie Glasplatten oder Kunststoffolien einzeln aufgebracht und ohne Reagenzüberschuß den 4 einzelnen Modifikationsreaktionen unterworfen. Dazu werden gerade soviel Reagenzien mit Mikropipetten auf einen Flächenträger aufgetragen, daß er nur befeuchtet ist (für 1 bis 2 mm x 1 bis 2 mm eines Cellulosepapiers mit Anionenaustauscheigenschaften ca. 1-5 μ l Reagenz).

d) n Fragmente werden nicht auf $4 \times n$ (1 bis 2 mm²) großen Flächenträgern aufgetragen, sondern auf 4 geometrisch größere Flächenträger derart aufgetragen, daß alle n Fragmente mit einem Sicherheitsabstand jeweils auf einem Flächenträger fixiert sind. Nach a) oder c) werden mit oder ohne Reagenzüberschuß diese Flächenträger den Modifikationsreaktionen unterworfen. Nach a) sind dabei 4 den geometrisch größeren Flächenträgern angepaßte Reaktionskammern nötig. Nach c) sind entsprechend größere Volumina zur Befeuchtung zu wählen.

Nach Beendigung der Modifikationsreaktionen werden die chemisch modifizierten Flächenträger 2 x nacheinander mit Wasser und Ethanol sorgfältig gewaschen. Das geschieht manuell, in dem die Flächenträger mit der Pinzette in die entsprechenden Lösungsmittel getaucht, jeweils zwischen Fließpapier gelegt und durch Druck getrocknet werden. Die nach c) sich ergebende größere Anzahl an Flächenträgern können gemeinsam gewaschen, müssen aber danach wieder auseinander sortiert werden. In automatischen Systemen wird nach Ablassen der Modifikations-Reagenzien die Träger in den Reaktoren mit Fritte ebenfalls durch kontinuierliche oder diskontinuierliche Zudosierung von Wasser und Ethanol gewaschen. Anschließend werden alle Flächenträger mit nur einem immobilisierten Fragment einzeln mit einer frischen 10 %igen wässrigen Piperidinlösung 15-45 min bei 90°C behandelt. Dabei kommt es zum DNA-Strangbruch und gleichzeitig erfolgt die Elution vom Träger. Die geometrisch größeren Flächenträger mit n immobilisierten

Fragmenten werden so zerschnitten, daß aus einem größeren Träger n einzelne Stücke entstehen. Diese werden wie oben einzeln mit Piperidin behandelt.

Zur Elution der Fragmente vom Träger werden chemische, ionische oder elektromagnetische Mittel verwendet. Zur ionischen Elution verwendet man hohe Ionenstärken von Salzen wie

$(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$, $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, Et_3NHCO_3 , Et_3NHAc , NH_4Ac , K_2HPO_4 u.a.

Das erfindungsgemäße Verfahren hat folgende Vorteile:

1. Während sämtlicher Manipulationen ist eine hervorragende mechanische Stabilität gewährleistet. Diese mechanische Stabilität verbunden mit der chemischen Elution während der Piperidin-Reaktion ermöglicht die vollständige Automatisierbarkeit, da keine Fällungsschritte im Gesamtprozeß durchzuführen sind.
2. Die mechanische Stabilität der Flächenträger eröffnet die Möglichkeit, bei Reagenzüberschuß d.h. im Reaktionsgefäß eine große Anzahl von Nucleinsäurefragmenten gleichzeitig zu sequenzieren.
3. Aufgrund der chemischen Elution während der Piperidin-Reaktion kann eine ionische Elution vermieden werden, die Fällungsreaktionen notwendig macht und dadurch den Verlust kurzer Fragmente bewirkt. Kurze DNA/RNA-Oligomere lassen sich vorteilhaft sequenzieren.
4. Es ist sowohl die manuelle als auch die automatische Sequenzierung großer Stückzahlen von kurzen und langen Nucleinsäurefragmenten möglich.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Synthese des Anionenaustausch-Flächenträgers auf Papierbasis

Cellulose-Papier z.B. Whatman 540 Papier wird nach WP C08L / 262265 / 7 mit Cyanurchlorid aktiviert. Das auf diese Weise oberflächenbehandelte Papier ($5 \times 7 \text{ cm}^2$) wird aus seiner verschweißten und bei -20°C unter N_2 -Begasung gelagerten Verpackung entnommen und in eine gläserne Reaktionskammer gelegt, in der 500 mg 1-Brom-2-aminoethan-hydrobromid in 7 ml Acetonitril vorgelegt wurden.

Die Reaktion wird sodann unter Zugabe von 5 ml Triethylamin gestartet. Die Reaktionskammer wird mit Parafilm abgedichtet und ca. 12 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Beendigung der Reaktion wird das Papier mehrmals mit Wasser gewaschen und auf Fließpapier getrocknet.

Beispiel 2

Manuelle Sequenzierung einzelner Oligonucleotide mit Kettenlängen von 4 bis 15 Einheiten

2.1. Radioaktive Markierung der DNA-Sequenzen

10-50 pmol Oligonucleotid (oder längeres Fragment) wird am 5'-Ende mit $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP und Polynucleotid-Kinase nach üblichen Methoden markiert. Nach Beendigung der Kinase-Reaktion wird das Gesamtvolumen auf ein z.B. 20% Polyacrylamid-Gel, das gegebenenfalls Harnstoff (7 M) enthält, aufgetragen und gelelektrophoretisch von ATP und anderen Verunreinigungen wie nicht erwünschten Nebenprodukten abgetrennt. Die gewünschte DNA-Bande wird durch kurze Autoradiographie auf Röntgenfilm sichtbar gemacht und aus dem Gel herausgeschnitten. Das Gelstück wird zerkleinert und in ein Eppendorf-Hütchen überführt. Das markierte Oligonucleotid wird durch 2 x Elution mit Wasser zwischen 37 und 60°C 30 min wiedergewonnen.

2.2. Immobilisierung der DNA-Sequenzen auf den Flächenträger mit Anionenaustausch-Eigenschaften

1-2 μl der unter 2.1. erhaltenen wässrigen Lösung, die neben dem markierten Oligonucleotid gegebenenfalls Salze und Harnstoff enthält, werden auf mindestens 4 ca. 2 mm x 2 mm große Stücken des Flächenträgers aufgetropft. Nach kurzer Trocknung der Papier-Stückchen bei Raumtemperatur oder mit erwärmter Luft wird die Operation des Auftropfens so lange wiederholt, bis ca. 10000 bis 50000 cpm pro Flächenträger an einem Scintillationsmeßgerät gemessen werden. Die Papiere werden dann mit einer Pinzette 2 x nacheinander in Wasser und Ethanol gewaschen (ca. 1 min), nach jeder Waschoperation zwischen Fließpapier kurz mittels Druck getrocknet.

2.3. Chemische Modifikationsreaktionen für die Oligonucleotide d(TCTA), d(TCTAGA), d(GTGAAUUCAC), d(TTCTTCTACACACCC) und d(TGATCAGATGGCTTT) mit Reagenzüberschuß im Reaktionsgefäß

Die nach 2.2. von jedem Oligonucleotid erhaltenden 4 Papierstückchen mit immobilisiertem markierten Fragment werden jeweils einzeln in ein Eppendorf-Hütchen plaziert. Die Eppendorf-Hütchen sind entsprechend der verwendeten Modifikationsreaktion gekennzeichnet. Insgesamt liegen nunmehr von den 5 Oligonucleotiden $5 \times 4 = 20$ Eppendorf-Hütchen vor. Folgende Reagenzien werden zupipetiert:

- G-Reaktion - 200 μ l Kakodylat-Puffer pH 8 oder 200 μ l Ammoniumformiat-Puffer pH 3,5
 - 1 bis 2 μ l DMS
- A+G-Reaktion - 80 μ l 88% Ameisensäure
- T C-Reaktion - 80 μ l einer 10^{-4} M KMnO_4 -Lösung, die kurz zuvor aus einer 10^{-2} M Stammlösung hergestellt wurde
- C-Reaktion - 40 μ l einer 4 M Hydroxylamin Lösung pH 6, die aus Hydroxylamin-hydrochlorid mittels Triethylamin hergestellt wurde.

Die Reaktionszeiten betragen für die G- 10 min und für alle anderen Reaktionen 20 min. Außer den erwähnten Reaktionen können auch die T>C-Reaktion mit Osmiumtetroxid (80 μ l einer 5 mM OsO_4 -Lösung + 1 μ l Pyridin, 15 min bei 0°C), die A+G-Reaktion mit Piperidininformiat (80 μ l Piperidininformiat pH 2, 1h bei 37°C) oder Diethylpyrocarbonat (150 μ l A-Puffer (50 mM Natriumacetat pH 5 + 1 mM EDTA) + 5 bis 10 μ l einer frisch hergestellten 10 % DEPC-Lösung in Ethanol, 20 min bei 90°C). Die T+C- und C-Reaktionen mit Hydrazin nach Maxam und Gilbert bzw. die A>C-Reaktion mit 1,2 M NaOH Lösung führen zum vollständigen Verlust der Radioaktivität und können deshalb nicht verwendet werden. Während der o.g. Modifikationsreaktionen treten folgende Verluste auf: 20 % in der G- , 50 % in der A+G- , 0 % in der T C- und 50-80 % in der C-Reaktion. Diese werden durch doppelte oder vierfache Radioaktivität in der A+G- bzw. in der C-Reaktion ausgeglichen werden.

2.4. Piperidin-Reaktion zur Erzeugung des DNA-Strangbruches und zur gleichzeitigen Elution der Fragmente vom Träger

Beispiele der Autoradiogramme für die o.g. Oligonucleotide:

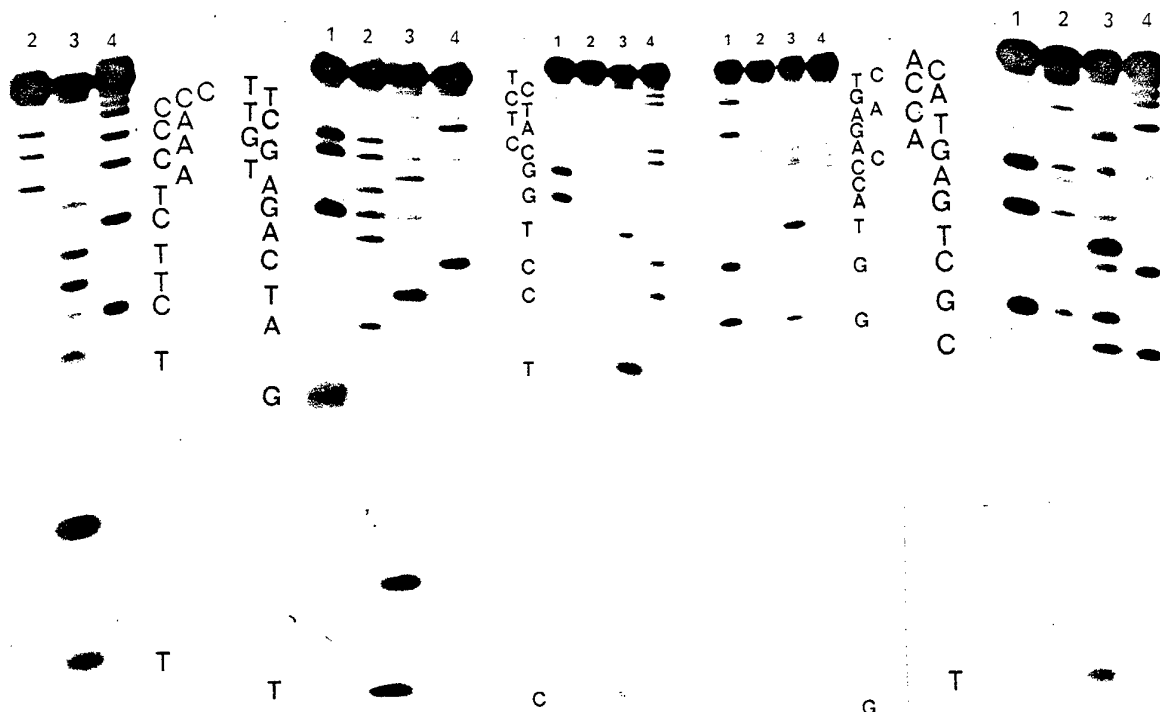


Beispiel 3

Manuelle gleichzeitige Sequenzierung großer Stückzahlen von Oligonucleotiden mit Reagenzüberschuß im Reaktionsgefäß

Markierung und Immobilisierung von 5 Pentadecanucleotiden d(TTCTTCTACACACCC), d(TGATCAGATGGCTTT), d(CTCCTGGCCATTCTT) d(GGGTACCCAGAAGTC) und d(TCGCTGAGATCACCA) erfolgt wie unter Beispiel 2 (2.1. und 2.2.) beschrieben. Die chemischen Modifikationsreaktionen werden nunmehr nur in 4 Eppendorf-Hütchen durchgeführt, wobei in jedem jeweils 5 Papier-Träger enthalten sind. Die Reaktionsbedingungen und die nachfolgenden Waschoperationen sind wie in 2.3. Nach Waschung und Trocknung der Papiere werden die vorher gekennzeichneten Träger wieder auseinander sortiert, so daß jeweils wieder 4 einzelne Papiere pro Oligonucleotid vorliegen und für die nachfolgende Piperidin-Reaktion jeweils einzeln in ein Eppendorf-Hütchen plaziert werden können. Die Piperidin-Reaktion erfolgt analog Beispiel 2 (2.4.).

Beispiele der Autoradiogramme für die o.g. Oligonucleotide



Beispiel 4

Manuelle_gleichzeitige_Sequenzierung_großer_Stückzahlen_von_Oligonucleotiden_mit_Reagenzüberschuß_in_Reaktionsgefäßen

Die Markierung der 5 Pentadecanucleotide von Beispiel 3 erfolgt wie unter 2.1. beschrieben. Die Immobilisierung der Fragmente erfolgt diesmal nicht auf 4 x n (n = 5) also 20 (2 mm x 2 mm) großen Stücken des Flächenträgers, sondern auf 4 (2 mm x 20 mm) großen Stücken dadurch, daß ca. 1-2 µl jedes Oligonucleotides auf eine Fläche von 2 mm x 2 mm aufgetropft und insgesamt alle 5 Oligonucleotide auf den Gesamt-Flächenträger aufgebracht werden. Die 4 größeren Flächenträger werden in größeren Reaktionsgefäßen (entsprechend der Größe der Flächenträger) den bereits beschriebenen Modifikationsreaktionen unterworfen. Nach Waschen und Trocknung der Träger werden die 4 (2 mm x 20 mm) großen Flächenträger mit Hilfe einer Schere in jeweils 5 kleinere (2 mm x 2 mm) große Papierstücken zerschnitten und für die Piperidin-Reaktion in insgesamt 20 Eppendorf-Hütchen einzeln plziert. Piperidin-Reaktion und Lyophilisierung erfolgt wie bereits beschrieben.

Beispiel 5

Manuelle_Sequenzierung_von_langen_DNA-Sequenzen_mit_Reagenzüberschuß_in_Reaktionsgefäßen

Lange DNA-Sequenzen werden völlig analog, wie in den Beispielen 2, 3 und 4 beschrieben, sequenziert. Einzig die Reaktionszeiten der unter Beispiel 2 (2.3.) aufgelisteten Modifikationsreaktionen müssen auf folgende Werte verkürzt werden: G- 3 bis 5 min und alle anderen Reaktionen 10 min. Die Verluste an Radioaktivität sind bei den langen DNA-Fragmenten während der Modifikationsreaktionen wesentlich geringer.

Beispiel 6

Manuelle_Sequenzierung_von_DNA-Sequenzen_ohne_Reagenzüberschuß

Markierung und Immobilisierung der DNA-Sequenzen erfolgt analog Beispiel 2 (2.1. und 2.2.) und 4. Die Flächenträ-

ger werden nunmehr nicht in Reaktionsgefäßen wie Eppendorf-Hütchen sondern auf eine ebene, mit einer Plastikfolie bedeckten Unterlage plaziert und mit nur soviel Volumina der Modifikations-Reagenzien (siehe 2.3.) versetzt, daß sie gerade durchfeuchtet sind. In der Regel betragen die Volumina für 2 mm x 2 mm große Papiere ca. 1-3 μ l. Werden größere Flächenträger z.B. 2 mm x 20 mm verwendet, muß das Volumen der Reagenzien etwas erhöht werden. Alle anderen Operationen wie Dauer der Modifikationsreaktionen, Waschen und Piperidin-Reaktion werden, wie bereits beschrieben, durchgeführt.

Beispiel 7

Automatische Durchführung des Verfahrens

Ein DNA/RNA-Sequenzierungsautomat ist wie folgt aufgebaut. Im einfachsten Fall zur Sequenzierung nur eines Nucleinsäurefragmentes werden 4 mit einer Fritte ausgerüstete, thermostatisierbare Reaktoren mit einem Fassungsvermögen von maximal 250 μ l mit dosierbarem Zu- und Ablauf parallel angeordnet. Die 4 einzelnen Flächenträger (2 mm x 2 mm) mit den immobilisierten markierten Nucleinsäurefragmenten werden in die Reaktoren plaziert. Nun erfolgt nach einem vorgegebenen Programm der automatische Ablauf der Operationen: 1) Waschen; 2) Chemische Modifikationsreaktionen; 3) Waschen; 4) Piperidin-Reaktion (Elution). Dazu werden die individuellen Reagenzien nach Beispiel 2 (2.3.) über Dosierpumpen hinzugegeben und verbleiben für die festgelegte Zeit bei geschlossenem Ablaufventil im Reaktor. Nach Beendigung der Reaktionen werden die Ventile der Reaktoren geöffnet und die Reagenzien fließen gegebenenfalls unter leichtem Luftdruck ab. Alle Waschschrte mit Wasser und Ethanol können kontinuierlich (bei geöffnetem Ablaufventil werden in die Reaktoren abwechselnd o.g. Lösungsmittel geleitet) oder diskontinuierlich erfolgen (100 μ l Volumina o.g. Lösungsmittel werden bei geschlossenem Ablaufventil in den Reaktor geleitet und verbleiben dort für kurze Zeit, bevor sie wieder abgelassen werden). Bei diskontinuierlichem Waschen bzw. am Ende des kontinuierlichen Waschprozesses können die Träger gegebenenfalls für wenige Sekunden mit erwärmter Luft

getrocknet werden. Zur Durchführung der Piperidin-Reaktion wird ca. 25-50 μ l 10 % wässrige Piperidin-Lösung in die 4 Reaktoren gepumpt (bei geschlossenem Ablaufventil) und der (die) Reaktoren auf 90°C für 30 min erwärmt. Nach Öffnen der Ablaufventile werden die Piperinvolumina unter leichtem Luftdruck in 4 einzelne Eppendorf-Hütchen geblasen, die über Teflonschläuche ($\varnothing$ 0,4 - 1 mm) mit den Reaktoren verbunden sind. Die 4 Eppendorf-Hütchen mit den eluierten Fragmenten werden entweder direkt im Atomat innerhalb einer speziellen Vakuumkammer lyophilisiert oder die Lyophilisation wird außerhalb des Systems vorgenommen. Im ersten Fall wird nach der ersten Lyophilisation die Prozedur mit jeweils 10 bis 20 μ l Wasser, die automatisch zugeführt werden, wiederholt (2 bis 3 mal). Die Gesamtzeit des Operationszyklus beträgt ca. 2,5 h. Im zweiten Fall mit manueller Lyophilisation beträgt die Gesamtzeit ca. 20-30 min. Die Proben sind dann fertig für die Gelelektrophorese. Im komplizierteren Fall zur Sequenzierung großer Anzahlen von DNA-Fragmenten müssen die 4 Reaktoren räumlich andere Ausmaße besitzen. Die Grundfläche eines Reaktors beträgt bei 8-15 zu sequenzierenden Fragmenten ca. 0,5 cm x 6 cm. Die 4 (0,4 cm x 5,5 cm) großen Flächenträger mit aufgetragenen 8-15 Fragmenten werden wiederum in die Reaktoren platziert und die Operationen 1) und 2) selbstverständlich mit größeren Volumina an Reagenzien durchgeführt. Nach Ablassen der Reagenzien der Modifikationsreaktionen schließt sich ein Waschen (Operation 3)) an. Danach werden die getrockneten Flächenträger automatisch durch ein bestimmtes zu realisierendes technisches Prinzip in die einzelnen, kleineren Stücken zerschnitten und dabei gleichzeitig jeweils in unterschiedliche Piperin-Reaktoren mit Fritte und Ablaufventil (ca. 50 Reaktoren) platziert. Am besten gelingt das durch die Konstruktion von 4 beweglichen Modifikations-Reaktoren, die sich nach Operation 3) um 180° senken und sich dann am Reaktordeckel öffnen. Die Flächenträger werden dabei in 4 bewegliche (vertikale Verschiebung) Schneidevorrichtungen gebracht. Durch Abschneiden kleiner Stücke von den Flächenträgern in den 4 vertikal verschiebbaren Schneidevorrichtungen werden die 4 x 8 bis 15 = 32 bis 45 Piperidin-Reaktoren

gezielt mit nur einem Fragment beschickt. Die Piperidin-Reaktionen laufen analog, wie bereits beschrieben, ab. Nach Beendigung der Reaktion werden die Piperidin-Lösungen mit den eluierten Fragmenten durch leichten Luftdruck in die mit den Reaktoren über Teflon-Schläuche verbundenen Eppendorf-Hütchen (ca. 50 Stück) überführt und anschließend lyophilisiert.

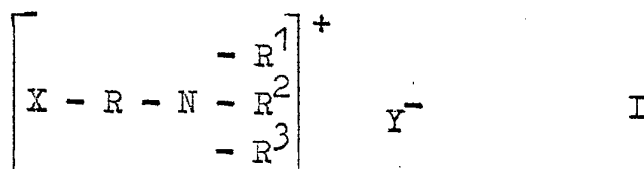
Beispiel 8

Sequenzierung mittels Verwendung hoher Ionenstärken zur Elution der Nucleinsäurefragmente vom Träger

Bei Verwendung des beschriebenen Flächenträgers kann die Elution der Fragmente vor der Piperidin-Reaktion auch mit 1 bis 2 M Lösungen der Salze von NH_4HCO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, NH_4Ac , Et_3NHAc u.a. erfolgen. Die Elution wird dadurch erreicht, daß die Flächenträger einzeln in Reaktionsgefäßen wie Eppendorf-Hütchen 2 x mit 50 µl o.g. Salzlösungen bei 60°C versetzt werden. Bei Oligonucleotiden werden die Eluate lyophilisiert, wobei sich die Salze bei wiederholter Lyophilisation mit wässrigem Ethanol verflüchtigen lassen. Bei langen DNA-Fragmenten kann man die Salze auch mittels Ethanol-Precipitation entfernen. Danach erfolgt dann die übliche Piperidin-Reaktion in homogener Phase.

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Festphasen-Sequenzierung von Nucleinsäurefragmenten, dadurch gekennzeichnet, daß ein mechanisch stabiler Flächenträger mit Anionenaustausch-Eigenschaften verwendet wird, die Immobilisierung der Fragmente an diesen Trägern in an sich bekannter Weise erfolgt, anschließend das immobilisierte Fragment oder mehrere immobilisierte Fragmente gleichzeitig gegebenenfalls mit Reagenzüberschuß chemisch modifiziert werden, nach Waschen die sortierten Nucleinsäurefragmente einzeln mit Piperidin umgesetzt werden und die Elution mit chemischen, ionischen oder elektromagnetischen Mitteln erfolgt.
2. Verfahren zur Festphasen-Sequenzierung von Nucleinsäurefragmenten nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß ein mechanisch stabiler Flächenträger mit Anionenaustausch-Eigenschaften verwendet wird, der durch Umsetzung geformter oder nicht geformter makromolekularer Massen, die
 - aus einer makromolekularen Verbindung in einer Konzentration von 5-80 Vol%
 - aus einer makromolekularen Verbindung mit 4,6-Dihalogen-1,3,5-triazin-Gruppierungen in einer Konzentration von 1-80 Vol%
 - aus 2,4,6-Trihalogen-1,3,5-triazin in einer Konzentration von 0,5-50 Vol%
 - aus Halogeniden in einer Konzentration bis zu 20 Vol% gegebenenfalls aus puffernden Substanzen bis zu 5 Vol%
 - und gegebenenfalls aus einem flüssigen Dispersionsmittel bestehen,mit Verbindungen der allgemeinen Formel I erhalten wird, wobei



X NH_2 -, OH- oder SH-Gruppierungen

R Alkylgruppen mit 1-10 C-Atomen, Aromaten,

photolytische Gruppen wie substituierte
o-Nitrobenzylester oder Methylphenancyl-
ester sowie Heterocyclen

R^1, R^2, R^3 Alkylgruppen mit 1-4 C-Atomen oder H-Atomen
Y Halogenide oder Hydroxyl-Gruppen

sind.

3. Verfahren zur Festphasen-Sequenzierung von Nucleinsäure-fragmenten nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß die Immobilisierung von n Fragmenten auf mindestens $4 \times n$ einzelnen Stücken des Flächenträgers erfolgt.
4. Verfahren zur Festphasen-Sequenzierung von Nucleinsäure-fragmenten nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß die Immobilisierung von n Fragmenten auf mindestens 4 geometrisch größeren Flächenträgern erfolgt, wobei auf jedem einzelnen Flächenträger n Fragmente aufgetragen werden, und daß nach den Modifikationsreaktionen und den Waschoperationen jeder einzelne der 4 Flächenträger in n einzelne Stücke zerschnitten und für die Piperidin-Reaktionen sortiert werden.
5. Verfahren zur Festphasen-Sequenzierung von Nucleinsäure-fragmenten nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß zur Elution chemische Mittel wie primäre, sekundäre oder tertiäre Amine insbesondere z.B. wässrige Piperidin- oder wässrige Anilinlösungen verwendet werden.
6. Verfahren zur Festphasen-Sequenzierung von Nucleinsäure-fragmenten nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß zur Elution hohe Ionenstärken von Salzen wie z.B. NH_4HCO_3 , $(NH_4)_2CO_3$, Et_3NHCO_3 , Et_3NHAc , NH_4Ac , K_2HPO_4 , NaCl u.a. gegebenenfalls bei höheren Temperaturen verwendet werden.