



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 38 519 T2** 2008.07.03

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 400 599 B1**

(51) Int Cl.⁸: **C12Q 1/68** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 38 519.5**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **03 076 965.7**

(96) Europäischer Anmeldetag: **15.01.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **24.03.2004**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **03.10.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **03.07.2008**

(30) Unionspriorität:

9700746	15.01.1997	GB
9718255	28.08.1997	GB
9726953	19.12.1997	GB

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

Xzillion GmbH & Co. KG, 65929 Frankfurt, DE

(72) Erfinder:

Schmidt, Gunter, Houghton, Cambs PE17 2BQ, GB; Thompson, Andrew Hugin, Cambridge CB4 3QF, GB; Johnstone, Robert Alexander Walker, Bebington L63 9LD, GB

(74) Vertreter:

**TER MEER STEINMEISTER & Partner GbR
Patentanwälte, 81679 München**

(54) Bezeichnung: **Massenmarkierte Hybridisierungssonden**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Array von Hybridisierungssonden, die Verwendung von Hybridisierungssonden, ein Verfahren zum Bestimmen der Hybridisierung eines Arrays solcher Sonden sowie Verfahren zum Charakterisieren von cDNA und zur Nucleinsäuresequenzierung.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Die Massenspektrometrie ist eine hochempfindliche Technik zur Bestimmung von Molekülmassen. Sie ist derart empfindlich, dass sie auch verwendet werden kann, um eine detaillierte strukturelle Information zu liefern. Im Wesentlichen wird das bzw. die zu analysierende(n) Molekül(e) in Vakuum gesprüht und ionisiert. Die Ionen in der Dampfphase werden durch elektromagnetische Felder beschleunigt und ihr Masse/Ladungs-Verhältnis wird durch die Analyse des Verhaltens der Moleküle in den elektromagnetischen Feldern bestimmt. Es existieren verschiedene Massenspektrometrie-Techniken, die durch die Hauptangriffsziele der Systeme oder die verschiedenen Ionisierungstechniken, die sie einsetzen, festgelegt sind. Im Grossen und Ganzen wird Massenspektrometrie zur direkten Analyse von Molekülen verwendet, um deren Masse zu bestimmen, sie zu identifizieren oder strukturelle Informationen zu erhalten. Bezüglich eines Fachbuches über Massenspektrometrie siehe Referenz 1).

[0003] Die kombinatorische Chemie (bezüglich eines Übersichtartikels über dieses Gebiet siehe Referenz 2) führte zu spezielleren Anforderungen für die indirekte Analyse von Molekülen. Es existieren jetzt verschiedene Strategien, um unter Verwendung von Festphasensynthesetechniken große Anzahlen verwandter Moleküle kombinatorisch herzustellen. Da die meisten Systeme einzelne Moleküle an Beads erzeugen, können diese auf wünschenswerte Eigenschaften durchmustert werden. Es ist jedoch oft der Fall, dass das durchmusterte Molekül nicht direkt zurückgewonnen werden kann oder aus anderen Gründen, wie einer indirekten Markierung der Beads, schwer direkt analysiert werden kann, und deshalb wurden deren Moleküle als Lösung vorgeschlagen. Die meisten Techniken zur „Kodierung“ (siehe Referenz 3) von kombinatorischen Bibliotheken scheinen den Gebrauch von Markierungen einzubeziehen, die in gewissem Sinne „sequenziert“ werden können (siehe Referenz 4). Zum Beispiel werden Aminosäuren und Nucleinsäuren häufig zur Kodierung von Bibliotheken verwendet, da die Techniken für deren Sequenzierung Standardtechniken sind und für kurze Peptide und Oligonucleotide relativ schnell sind, eine Analyse, die heute oft auch mittels Massenspektrometrie durchgeführt wird. Andere organische Einheiten, wie Halogenbenzole und sekundäre Amide, sind sequenzierbar und können zu diesem Zweck verwendet werden (siehe Referenzen 5 und 6).

[0004] Eine alternative Vorgehensweise (siehe Referenz 7) verwendet eine Vielfalt von kombinatorischen Monomeren, die mit bestimmten Isotopen angereichert sein können, um Markierungen herzustellen, die in einem Massenspektrum eindeutige Isotopensignale erzeugen. Diese Vorgehensweise erlaubt die Erzeugung einer großen Anzahl von Markierungen, deren Isotopenpeaks unterschiedliche Muster in begrenzten Bereichen des Massenspektrums aufweisen. Dieses Verfahren ist zum Beispiel ideal zur eindeutigen Identifizierung einer einzelnen Verbindung, deren Bead aus einer großen kombinatorischen Bibliothek isoliert wurde, würde aber fast sicher Probleme dabei aufweisen, große Molekülezahlen gleichzeitig aufzulösen.

[0005] Die Referenzen 15 bis 17 offenbaren Anwendungen der Massenspektrometrie zum Nachweis der Bindung verschiedener Liganden.

Zusammenfassung der Erfindung

[0006] Die vorliegende Erfindung sieht ein Array von Hybridisierungssonden vor, wobei jede von diesen eine Massenmarkierung umfasst, die mit einer bekannten Basensequenz von vorbestimmter Länge verbunden ist, worin jede Massenmarkierung des Arrays, gegebenenfalls zusammen mit der bekannten Basensequenz, mittels Massenspektrometrie dieser Basensequenz zugeordnet werden kann. Vorzugsweise umfasst jede der Hybridisierungssonden eine Massenmarkierung, welche mit einer bekannten Basensequenz von vorbestimmter Länge spaltbar verbunden ist, worin jede Massenmarkierung des Arrays, nach Freisetzung aus ihrer jeweiligen Basensequenz, mittels Massenspektrometrie dieser Basensequenz zugeordnet werden kann, üblicherweise mittels ihres Massen-/Ladungsverhältnisses, das in Bezug auf jede andere Massenmarkierung des Arrays vorzugsweise eindeutig identifizierbar ist.

[0007] Die vorliegende Erfindung sieht weiterhin die Verwendung einer Hybridisierungssonde vor umfassend

eine Massenmarkierung, die mit einer bekannten Basensequenz von vorbestimmter Länge verbunden ist, in einem Verfahren zum Bestimmen der Hybridisierung der Sonde mittels Massenspektrometrie der Massenmarkierung, gegebenenfalls zusammen mit der bekannten Basensequenz. Vorzugsweise umfasst die Hybridisierungssonde eine Massenmarkierung, die mit einer bekannten Basensequenz von vorbestimmter Länge spaltbar verbunden ist.

[0008] Die vorliegende Erfindung umfasst weiterhin ein Verfahren zum Bestimmen der Hybridisierung einer Sonde mit einer Zielnucleinsäure, wobei das Verfahren umfasst

- (a) das Kontaktieren einer Zielnucleinsäure mit einer Hybridisierungssonde, welche eine mit einer bekannten Basensequenz vorbestimmter Länge verbundene Massenmarkierung umfasst, unter Bedingungen zum Hybridisieren der Sonde mit einer Zielnucleinsäure und gegebenenfalls Entfernen nicht-hybridisierten Materials; und
- (b) das Identifizieren der Sonde unter Anwendung von Massenspektrometrie.

[0009] Die vorliegende Erfindung schlägt weiter ein Verfahren zum Bestimmen der Hybridisierung eines Arrays von Sonden mit einer Zielnucleinsäure vor, wobei das Verfahren umfasst

- (a) das Kontaktieren einer Zielnucleinsäure mit jeder Hybridisierungssonde des Arrays unter Bedingungen zum Hybridisieren der Sonde mit der Zielnucleinsäure und gegebenenfalls Entfernen nicht-hybridisierten Materials, wobei jede Sonde eine mit einer bekannten Basensequenz vorbestimmter Länge verbundene Massenmarkierung umfasst; und
- (b) das Identifizieren der Sonde unter Anwendung von Massenspektrometrie.

[0010] Vorzugsweise ist die oder jede Massenmarkierung spaltbar mit ihrer jeweiligen bekannten Basensequenz verbunden und jede hybridisierte Sonde wird gespalten, um die Massenmarkierung freizusetzen, wobei die freigesetzte Markierung unter Anwendung von Massenspektrometrie identifiziert wird.

[0011] Die vorbestimmte Länge der Basensequenz beträgt gewöhnlich zwischen 2 und 25.

[0012] Jede Massenmarkierung kann mittels einer Bindung mit der bekannten Basensequenz spaltbar verbunden sein, wobei die Bindung eine durch Licht spaltbare Bindung, eine chemisch spaltbare Bindung oder eine thermisch spaltbare Bindung sein kann. Gemäß einer Ausführungsform wird die Bindung in einem Massenspektrometer, zum Beispiel in der Ionisationskammer des Massenspektrometers, gespalten. Dies hat den Vorteil, dass keine Spaltung der Bindung außerhalb des Massenspektrometers stattzufinden hat. Bei geeigneter Wahl der Bindung erfolgt die Spaltung der Bindung in dem Massenspektrometer, um eine schnelle Trennung der bekannten Basensequenz von der Massenmarkierung zu gewährleisten, so dass die Massenmarkierung schnell identifiziert werden kann. Die Bindung ist bevorzugt weniger stabil gegenüber einer Elektronenionisation als die Massenmarkierung. Dies erlaubt eine Spaltung der Bindung, ohne dass ein Teil der Massenmarkierung in dem Massenspektrometer fragmentiert wird.

[0013] In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Massenmarkierung gegenüber einer Elektronenionisation bei 50 Volt, bevorzugt 100 Volt, stabil. Die Bedingungen einer Elektronenionisation, die in Massenspektrometern auftritt, kann die Fragmentierung von Molekülen verursachen, weshalb es angebracht ist, die Stabilität einer Massenmarkierung hinsichtlich ihrer Fähigkeit zu messen, einer Elektronenionisation bei einer bestimmten Spannung standzuhalten. Die Stabilität gegenüber einer Elektronenionisation ist auch ein brauchbarer Anhaltspunkt für die Stabilität des Moleküls unter in einem Massenspektrometer getesteten Bedingungen einer kollisionsinduzierten Dissoziation.

[0014] Bevorzugt können die Massenmarkierungen in der Massenspektrometrie mit Bezug auf die bekannten Basensequenzen aufgelöst werden. Dies ist vorteilhaft, da damit das Erfordernis einer Trennung oder Reinigung jeder Massenmarkierung von ihren jeweiligen Basensequenzen umgangen wird. Demgemäß werden die Massenmarkierung und die bekannten Basensequenzen in einer bevorzugten Ausführungsform nicht vor Eintritt in das Massenspektrometer getrennt.

[0015] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das Verfahren ausschließlich online. Unter online ist zu verstehen, dass in keiner Stufe des Verfahrens ein Schritt vorkommt, der offline ausgeführt wird. Dies ist vorteilhaft, da das Verfahren als kontinuierliches Verfahren ausgeführt werden kann und leicht automatisiert werden kann.

[0016] In einer Ausführungsform ist jede Massenmarkierung so ausgelegt, dass sie unter Ionisierungsbedingungen negativ geladen ist. Dies hat den Vorteil, dass Pufferbedingungen eingestellt werden können, wobei

die Nucleinsäure, welche die Massenmarkierung begleitet, positiv geladen ist. In einem Massenspektrometer ermöglicht dies eine leichte Trennung der Massenmarkierung von der DNA und hat ein schwächeres Hintergrundrauschen im Massenspektrum zur Folge.

[0017] Bevorzugt sind an die bekannte Basensequenz mehrere identische Massenmarkierungen gebunden. Die Verwendung mehrerer identischer Massenmarkierungen hat den Vorteil, dass die gleichzeitige Abspaltung der mehreren Massenmarkierungen ein stärkeres Signal erzeugt, da eine höhere Konzentration an Massenmarkierungen gemessen werden kann.

[0018] In einer Ausführungsform umfasst die bekannte Basensequenz ein klebriges Ende eines Adapter-Oligonucleotids, welches eine Erkennungsstelle für eine Restriktionsendonuclease enthält, die bei einer vorgegebenen Versetzung von der Erkennungsstelle schneidet.

[0019] Diese Erfindung empfiehlt die Verwendung von Markierungen mit geeigneten massenspektrometrischen Eigenschaften, um die Identifizierung relativ großer Molekülzahlen in einem einzigen Massenspektrum zu ermöglichen. Geeignet heißt, dass die Moleküle die Anzahl an Peaks, die sie in einem Spektrum erzeugen, durch das Vermeiden mehrerer Ionisationsstufen minimieren und nicht besonders labile Gruppen verwenden. Mehrere Jahrzehnte Massenspektrometrie in der organischen Chemie haben bestimmte molekulare Eigenschaften, die für eine solche Verwendung geeignet sind, und bestimmte Eigenschaften, die zu vermeiden sind, identifiziert.

Massenspektrometrie zur Analyse markierter Moleküle:

[0020] Es ist möglich, Moleküle, insbesondere biologische Moleküle, mit „Masse“ als Indikator für die Identität der Moleküle zu markieren. Ein Code, der die Masse eines Moleküls und dessen Identität in Bezug bringt, ist leicht herzustellen; z. B. kann man im Fall einer Reihe von Molekülen, die man zu identifizieren wünscht, einfach für jedes unterschiedliche zu identifizierende Molekül eine zunehmende Masse wählen. Natürlich können viele Moleküle allein aufgrund ihrer Masse identifiziert werden und eine Markierung kann überflüssig erscheinen. Es kann der Fall sein, dass bestimmte Reihen von Molekülen, obwohl sie eindeutig unterschiedlich sind, nahe beieinander liegende Massen aufweisen und mehrfach ionisierbar sind, was die Auflösung im Massenspektrometer schwierig macht, daher die Nützlichkeit einer Massenmarkierung. Dies trifft insbesondere für Nucleinsäuren zu, die häufig isobar aber dennoch unterschiedlich sind, z. B. ist die Sequenz TATA von TTAA, TAAT, usw. verschieden, aber in einem Massenspektrometer wären diese schwer aufzulösen. Darüber hinaus kann es erwünscht sein, dass die zu identifizierenden Moleküle eine bestimmte Funktion ausüben und zugleich nachweisbar sind, was heißt, dass ein direkter Nachweis unmöglich ist, so dass eine entfernbare Markierung, die unabhängig nachgewiesen werden kann, von großem Nutzen ist. Dies ermöglicht die gleichzeitige Analyse einer großen Zahl von Molekülen, die sehr ähnlich sein können, für Durchmusterungen in großem Maßstab.

[0021] Die Erfindung beschreibt die Verwendung von Bibliotheken von Massenmarkierungen, welche die Sequenz einer kovalent gebundenen Nucleinsäuresonde identifizieren. Die Konstruktion von Massenmarkierungen ist für einen qualifizierten organischen Chemiker relativ einfach. Dies macht es einfach, Markierungen herzustellen, die von ihrer jeweiligen Sonde kontrolliert entfernt werden können und die vorteilhafte physikalische Eigenschaften haben, welche die Ionisation in einem Massenspektrometer fördern und welche den Nachweis und die Auflösung von mehreren Markierungen über ein breites Spektrum an relativen Mengen dieser Markierungen fördern.

[0022] Die vorliegende Erfindung wird nun anhand von Beispielen mit Bezug auf die beiliegenden Zeichnungen ausführlicher beschrieben, wobei:

[0023] die [Fig. 1a](#) und [1b](#) die Verwendung von massenmarkierten Hybridisierungs sonden gemäß der vorliegenden Erfindung in einem Genexpressions-Profilierungs-Verfahren zeigen;

[0024] die [Fig. 2a](#) und [Fig. 2b](#) die Verwendung von massenmarkierten Hybridisierungs sonden gemäß der vorliegenden Erfindung in einem weiteren Genexpressions-Profilierungs-Verfahren zeigen;

[0025] die [Fig. 3a](#) und [Fig. 3b](#) die Verwendung von massenmarkierten Hybridisierungs sonden gemäß der vorliegenden Erfindung in einem weiteren Genexpressions-Profilierungs-Verfahren zeigen;

[0026] [Fig. 4](#) eine schematische Darstellung eines orthogonalen Flugzeitmassenspektrometers zeigt, das zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung geeignet ist;

- [0027] [Fig. 5](#) photospaltbare Linker zeigt, die zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung geeignet sind;
- [0028] [Fig. 6](#) ein Reaktionsschema zur Herstellung von massenmarkierten Basen zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung zeigt;
- [0029] [Fig. 7](#) fragmentierbare Linker zeigt, die zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung geeignet sind;
- [0030] [Fig. 8](#) Massenmarkierungsstrukturen zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung zeigt;
- [0031] [Fig. 9](#) verschiedene Gruppen und Massenreihen-modifizierende Gruppen zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung zeigt;
- [0032] [Fig. 10](#) löslichmachende und ladungstragende Gruppen zeigt, die zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung geeignet sind;
- [0033] [Fig. 11](#) ein Massenspektrum der Modellverbindung AG/1/75 im Negativ-Ionen-Modus zeigt;
- [0034] [Fig. 12](#) ein Massenspektrum der Modellverbindung AG/1/75 im Positiv-Ionen-Modus zeigt;
- [0035] [Fig. 13](#) ein weiteres Massenspektrum der Modellverbindung AG/1/75 im Positiv-Ionen-Modus zeigt;
- [0036] die [Fig. 14](#) und [Fig. 15](#) Massenspektren eines PCR-Produkt in verschiedenen Puffern im positiven und negativen Modus zeigen;
- [0037] die [Fig. 16](#) und [Fig. 17](#) Massenspektren des PCR-Produkts mit AG/1/75 im Negativ- und Positiv-Ionen-Modus zeigen;
- [0038] die [Fig. 18](#) und [Fig. 19](#) Massenspektren des PCR-Produkts mit AG/1/75 nach Signalverarbeitung zeigen;
- [0039] die [Fig. 20](#) und [Fig. 21](#) Massenspektren der massenmarkierten Base FT23 im Negativ- und Positiv-Ionen-Modus zeigen;
- [0040] die [Fig. 22](#) und [Fig. 23](#) Massenspektren von FT23 im Negativ- und Positiv-Ionenmodus mit Oligonucleotid-Hintergrund zeigen;
- [0041] [Fig. 24](#) die erfindungsgemäßen massenmarkierten Basen FT9 und FT17 zeigt; und
- [0042] [Fig. 25](#) die erfindungsgemäßen massenmarkierten Basen FT18 und FT23 zeigt.

Anwendungen der Massenmarkierungs-Technik:

[0043] Es gibt zwei Schlüssel-Massenspektrometrie-Ionisierungstechniken, die bei der biologischen Analyse routinemäßig eingesetzt werden. Dies sind die Elektrospray-Massenspektrometrie (ESMS) und die MALDI TOF-Massenspektrometrie. Die ESMS ist im Wesentlichen eine Technik, welche die Ionisation aus der Flüssigphase in die Gasphase ermöglicht, während MALDI-Techniken im Wesentlichen die Ionisation aus der Festphase in die Gasphase ermöglichen. Molekularbiologie wird häufig in der Flüssigphase durchgeführt oder verwendet Festphasenchemie in einem Flüssigmedium, wodurch Reagenzien zu Molekülen, die an Festphasenträgern fixiert sind, hinzugegeben oder von diesen entfernt werden können. Diese beiden Techniken sind gewissermaßen komplementär, da sie sowohl die Analyse von Festphasen-Elementen als auch von Flüssigphasen-Elementen erlauben.

Verwendung von massenmarkierten Adaptermolekülen zur Genprofilierung:

[0044] Ein Verfahren zur Klassifizierung (Indexierung) von cDNA, die aus RNA aus Gewebe oder Zellen revers transkribiert wurde, oder von DNA unter Verwendung von Restriktionsenzymen der Klasse II ist in Referenz 32 beschrieben.

[0045] Die in Referenz 8 beschriebene Genprofilierungs-Technik stellt ein Verfahren zur Analyse von Genexpressionsprofilen in einer Zelle durch Sampling jeder cDNA innerhalb der Population dieser Zelle bereit. Ent-

sprechend dieser Patentanmeldung wird ein Verfahren zur Charakterisierung von cDNA bereitgestellt. Das Verfahren umfasst:

- (a) das Schneiden einer Probe, umfassend eine Population von einer oder mehreren cDNAs oder isolierten Fragmenten daraus, wobei jedes dieser Fragmente ein Ende der cDNA trägt, wie beispielsweise den Poly-A-Schwanz, mit einer ersten Probe-Endonuclease an einer ersten Probennahmestelle in bekanntem Abstand von einer Referenzstelle proximal zum Ende der cDNA, um aus jeder cDNA oder jedem isolierten Fragment daraus ein erstes und ein zweites Subfragment zu erzeugen, wobei jedes eine klebrige Endsequenz vorbestimmter Länge und unbekannter Sequenz umfasst, und das erste Subfragment das Ende der cDNA aufweist;
 - (b) das Sortieren entweder der ersten oder der zweiten Subfragmente in Subpopulationen gemäß ihrer klebrigen Endsequenz und das Registrieren der klebrigen Endsequenz jeder Subpopulation als erstes klebriges Ende;
 - (c) das Schneiden der Subfragmente in jeder Subpopulation mit einer zweiten Probe-Endonuclease, die gleich wie oder anders als die erste Probe-Endonuclease ist, an einer zweiten Probennahmestelle mit einer bekannten Versetzung von der ersten Probennahmestelle, um aus jedem Subfragment ein weiteres Subfragment zu erzeugen, welches eine zweite klebrige Endsequenz vorbestimmter Länge und unbekannter Sequenz umfasst; und
 - (d) das Bestimmen jeder zweiten klebrigen Endsequenz;
- wobei die aggregierte Länge der ersten und zweiten klebrigen Endsequenzen jedes Subfragments 6 bis 10 beträgt; und wobei die Sequenzen und relativen Positionen der Referenzstelle und des ersten und zweiten klebrigen Endes die oder jede cDNA charakterisieren.

[0046] Die mit der ersten Probe-Endonuclease geschnittene Probe umfasst bevorzugt isolierte Fragmente der cDNAs, die durch Schneiden einer Probe, welche eine Population von einer oder mehreren cDNA umfasst, mit einer Restriktionsendonuclease und durch Isolieren von Fragmenten, deren Restriktionsschnittstelle an der Referenzstelle liegt, hergestellt werden.

[0047] Die erste Probe-Endonuclease bindet bevorzugt eine erste Erkennungsstelle und schneidet an der ersten Probennahmestelle bei einer vorgegebenen Versetzung von der Restriktionsschnittstelle der Restriktionsendonuclease. in Übereinstimmung mit diesem Aspekt der vorliegenden Erfindung wird die erste Erkennungsstelle in einem ersten massenmarkierten Adapter-Oligonucleotid, wie vorstehend beschrieben, vorgesehen, welches mit der Restriktionsstelle der isolierten Fragmente hybridisiert wird. Gemäß diesem Verfahren beträgt die aggregierte Länge der ersten und zweiten klebrigen Endsequenz jedes Subfragments vorzugsweise 8.

[0048] In einer Ausführungsform entnimmt das Sampling-System zwei Proben von 4 bp von jeder cDNA in einer Population und bestimmt deren Sequenz bezüglich eines gegebenen Referenzpunktes. Hierfür wird jede cDNA in einer Population immobilisiert und kann mit einer Restriktionsendonuclease geschnitten werden. Das entstehende bekannte klebrige Ende wird mit einem Adapter verknüpft. Der Adapter ist so ausgelegt, dass er die Bindungsstelle für eine Typ II-Restriktionsendonuclease trägt. An den Adapterenden jeder cDNA in der Population wird unter Verwendung der Typ II-Restriktionsendonuclease ein unbestimmtes 4 bp langes klebriges Ende freigelegt. Eine Familie von Adaptermolekülen wird verwendet, um diese 4 freigelegten Basen zu hybridisieren. Mit auf Fluoreszenz basierenden Systemen können nur 4 von 256 möglichen Sondenmolekülen gleichzeitig zugegeben werden, um einen Pool von cDNAs zu hybridisieren, wie in Referenz 8 diskutiert. Offensichtlich ist dies ein langsames Verfahren zur Bestimmung der Sequenz der 4 Basenpaare. Mit massenmarkierten Adaptern können alle 256 möglichen 4-bp-Adapter gleichzeitig zu einem Pool freigelegter cDNAs gegeben werden, was die Genprofilierungs-Erfindung bedeutend beschleunigt. Dies ist wesentlich für eine kommerziell brauchbare Technologie.

[0049] Ein derartiges System könnte an ESMS angepasst werden. In der Genprofilierungs-Erfindung wird die cDNA-Population entsprechend der durch eine Typ II-Restriktionsendonuclease freigelegten Sequenz in 256 Teilmengen unterteilt. Diese Unterteilung produziert 256 cDNA-Populationen in 256 Vertiefungen. Eine zweite 4bp-Sequenz kann für jede cDNA durch eine zweite Spaltung mit einer Typ II-Restriktionsendonuclease freigelegt werden, und diese 4 Basen können dann durch Ligieren von massenmarkierten Adaptern bestimmt werden.

Oligonucleotid-Arrays:

[0050] Verschiedene Nucleinsäure-Assays können unter Verwendung von Arrays von Oligonucleotiden durchgeführt werden, die an einem ebenen Festphasensubstrat, wie einem Glaträger, synthetisiert wurden. Derartige Arrays werden im Allgemeinen so hergestellt, dass der Träger in unterschiedliche Bereiche oder Felder unterteilt ist und jedes Feld nur ein einziges Oligonucleotid trägt. Eine Hybridisierung einer markierten Nucleinsäure an den Array wird durch Messung des Signals der markierten Nucleinsäure von jedem Feld des Arrays bestimmt. Eine Bestimmung der mRNA-Konzentrationen kann auf mehrere Weisen erfolgen. Poly-A-mRNA kann unter Verwendung der Reversen Transkription leicht in cDNA umgeschrieben werden. Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)-Verfahren ermöglichen die Bestimmung der Menge einzelner RNAs, jedoch mit einer relativ geringen Genauigkeit. Oligonucleotid-Arrays sind eine relativ neue Vorgehensweise zur Nucleinsäure-Analyse, die eine Mutationsanalyse, eine Sequenzierung durch Hybridisierung und eine Analyse der mRNA-Expression ermöglicht. Verfahren zur Herstellung solcher Arrays wurden entwickelt (siehe zum Beispiel Referenzen 9, 10, 11) und weitere Verfahren werden in Betracht gezogen.

[0051] Die Hybridisierung von markierten Nucleinsäuren an Oligonucleotid-Arrays der vorstehend beschriebenen Art wird üblicherweise unter Verwendung von Fluoreszenzmarkierungen nachgewiesen. Oligonucleotid- oder cDNA-Arrays können mit fluoreszenzmarkierten Nucleinsäuresonden hybridisiert werden. Bei einem Oligonucleotid-Chip würde dies durch das Auftreten von Fluoreszenz in den Feldern des Arrays, die Oligonucleotide enthalten, an welche die markierte Nucleinsäure hybridisiert, zeigen, zu welchen Oligonucleotiden eine markierte Nucleinsäure komplementär ist. Solche Oligonucleotid-Arrays könnten unter Verwendung von MALDI-Massenspektrometrie gelesen werden, wenn die Nucleinsäuren, die an den Oligonucleotid-Array hybridisieren, mit Massenmarkierungen gekennzeichnet wären. Die Massenmarkierungen würden bevorzugt unter Verwendung eines photospaltbaren Linkers an ihre entsprechende Nucleinsäure gebunden. Diese Massenmarkierungen könnten mit Laser anregbare Mittel in ihre Struktur einschließen oder der Oligonucleotid-Array könnte nach Ausüben einer Hybridisierungsreaktion mit geeigneten Desorptionsmitteln, wie 3-Hydroxypicolinsäure, behandelt werden. Nach Hybridisierung von (einer) massenmarkierten Nucleinsäure(n) an den Chip kann der Linker zwischen der Massenmarkierung und der Nucleinsäure durch Anwenden von Laserlicht geeigneter Frequenz gespalten werden. Die Markierungen können dann von spezifischen Bereichen eines Oligonucleotid-Arrays durch Scannen dieser Regionen mit Laserlicht geeigneter Frequenz desorbiert werden. Die Identität der hybridisierten Nucleinsäure in einem bestimmten Feld des Oligonucleotid-Arrays kann dann aus der Masse der Markierung bestimmt werden, die von diesem Feld des Arrays desorbiert wird.

[0052] Der Vorteil hiervon gegenüber der Verwendung von auf Fluoreszenz basierenden Systemen liegt einfach in der Zahl von verfügbaren Markierungen. Techniken, die auf einem Fluoreszenzfarbstoff beruhen, werden durch Probleme spektraler Überlappung stark eingeschränkt, welche die Zahl von Farbstoffen, die für den gleichzeitigen Gebrauch mit Fluoreszenz-Readern hergestellt werden können, einschränkt. Bei Verwendung von Massenspektrometrie als Markierungsnachweissystem kann eine sehr viel höhere Zahl von Massenmarkierungen erzeugt werden.

[0053] Oligonucleotid-Arrays können direkt an die Verwendung mit der in Referenz 12 offenbarten Genprofilierungs-Technologie angepasst werden. Ein Array, der alle 256 möglichen 4-Basen-Oligonucleotide an definierten Punkten auf seiner Oberfläche trägt, kann verwendet werden, um den von dieser Erfindung erforderten vorstehend beschriebenen Sortierschritt durchzuführen. Damit diese Chip-basierte Ausführungsform des Profilierungs-Systems mit einer massenspektrometrischen Analyse kompatibel ist, ist es erforderlich, dass die Markierungen, die an den Adaptern verwendet werden, um die zweite 4-Basen-Sequenzprobe zu bestimmen, mit MALDI kompatibel so dass der Oligonucleotid-Chip in einem MALDI-Spektrometer durch einen Ultraviolett-Laser gescannt werden kann. Dies ermöglicht die Bestimmung einer 8-Basen-Signatur für jede cDNA in einer Population mit einer einzigen DNA-Probe, die einer einzigen immobilisierten Quelle entnommen und in einer einzigen Reihe von Laserscans analysiert wurde. Der Bereich des Chips, von dem eine Reihe von Markierungen desorbiert wird, legt die ersten 4 bp der Signatur fest, während die Zusammensetzung der Markierungen die zweiten 4 Basen der Signatur und die Anteile jeder cDNA festlegt.

Genprofilierung unter Verwendung von Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie

[0054] Der Genprofilierungs-Vorgang erfolgt in zwei Schritten: dem molekularen Sortieren von Signaturen, gefolgt von der Analyse der an die sortierten Signaturen gebunden Sondenmoleküle. Die MALDI-Vorgehensweise verwendet einen Oligonucleotid-Array zur Durchführung der Sortierung der Signaturen. Eine Alternative

zur Verwendung eines Arrays ist die Affinitätschromatographie. Eine Affinitätssäule zur Sortierung von Signaturen aufgrund eines unbestimmten klebrigen Endes von gegebener Länge. Zur Sortierung von Signaturen mit einem unbestimmten klebrigen Ende mit einer Länge von 4 bp können für eine Verwendung in HPLC-Format geeignete Beads mit den 256 möglichen 4-meren an dem klebrigen Ende derivatisiert werden. Solch eine Säule kann mit den Signaturen beladen werden, die in einem Puffer gelöst sind, der die Hybridisierung mit den 4-meren an den derivatisierten Beads fördert. Dadurch wird das Hybridisierungsgleichgewicht zugunsten einer Hybridisierung verschoben. Die Säule kann dann mit schrittweise zunehmenden Konzentrationen eines Puffers gewaschen werden, der die Hybridisierung hemmt. Signaturen, die mit klebrigen AAAA- oder TTTT-Enden enden, werden zuerst freigesetzt, während GGGG- und CCCC-Signaturen zuletzt freigesetzt werden. Um die Trennung von Signaturen zu gewährleisten, die zueinander komplementär sind, können Beads mit Basenanaloga derivatisiert werden, so dass sich die Hybridisierungsaffinität eines Guanins in einer Signatur zu einem Cytosin an einem Bead von der Hybridisierung eines Cytosins in einem klebrigen Ende einer Signatur an ein Guanin an einem Bead unterscheidet. Darüber hinaus kann gewährleistet werden, dass jedes 4-mer in einer zu allen anderen unterschiedlichen relativen Konzentration auf den Beads vorhanden ist.

[0055] Eine derartige Affinitätssäule sollte es ermöglichen, eine Population von Signaturen entsprechend der Sequenz ihres unbestimmten klebrigen Endes in 256 Fraktionen zu sortieren. Solche Fraktionen können dann direkt zur Analyse in ein Elektrospray-Massenspektrometer geladen werden.

Verwendung von massenmarkierten Adaptermolekülen zur DNA-Sequenzierung

[0056] Ein Verfahren zur DNA-Sequenzierung unter Verwendung eines Reagenz, das einen an eine oder mehrere Reportergruppen gebundenen Analyten-Einheit umfasst, ist in Referenz 33 beschrieben.

[0057] In Referenz 13 ist eine Sequenziertechnik beschrieben, in der ein Verfahren zur Sequenzierung von Nucleinsäure bereitgestellt ist, welches umfasst:

- (a) den Erhalt einer Zielnucleinsäure-Population, umfassend Nucleinsäure-Fragmente, in welcher jedes Fragment in einer unterschiedlichen Menge vorhanden ist und an einem Ende eine klebrige Endsequenz von gegebener Länge und unbekannter Sequenz trägt;
- (b) das Schützen des anderen Endes jedes Fragments; und
- (c) das Sequenzieren jedes Fragments durch
 - (i) das Kontaktieren der Fragmente mit einem Array von Adapter-Oligonucleotiden in einem Zyklus, wobei jedes Adapter-Oligonucleotid eine Markierung, eine Erkennungsstelle für ein Sequenzierungszym, und eine bekannte eindeutige Basensequenz mit gleicher vorbestimmter Länge wie die klebrige Endsequenz aufweist, wobei das Array alle möglichen Basensequenzen von dieser vorbestimmten Länge enthält; worin der Zyklus das sequentielle Kontaktieren jedes Adapter-Oligonucleotids des Arrays mit den Fragmenten unter Hybridisierungsbedingungen in Gegenwart einer Ligase, Entfernen jeglichen ligierten Adapter-Oligonucleotids und Registrieren der Menge jeglichen ligierten Adapter-Oligonucleotids durch Detektion der Markierung umfasst, anschließend Wiederholung des Zyklus, bis sämtliche im Array vorliegenden Adaptere getestet wurden;
 - (ii) das Kontaktieren der ligierten Adapter-Oligonucleotide mit einem Sequenzier-Enzym, das an die Erkennungsstelle bindet und das Fragment schneidet, um eine neue klebrige Endsequenz freizulegen, welche an die vorhergehende klebrige Endsequenz angrenzt oder mit dieser überlappt;
 - (iii) das Wiederholen der Schritte (i) und (ii) in ausreichender Anzahl an Malen und das Bestimmen der Sequenz des Fragments durch Vergleichen der Mengen, die für jede klebrige Endsequenz registriert wurden.

[0058] Die vorbestimmte Länge der Basensequenz der klebrigen Enden beträgt bevorzugt 3 bis 5. Gemäß der vorliegenden Erfindung trägt jedes Adapter-Oligonucleotid eine Massenmarkierung, wie vorstehend beschrieben. Dies ähnelt im Prinzip dem in der Referenz 8 beschriebenen Genprofilierungs-System, indem DNA-Moleküle immobilisiert sind und an ihren Enden mittels Typ II-Restriktionsendonucleasen in einem iterativen Zyklus 4-Basen-Sequenzen freigelegt werden. Diese werden aus denselben Gründen, aus denen die Verwendung von massenmarkierten Adaptern bei der Genprofilierung vorteilhaft ist, ebenso mit Adaptermolekülen hybridisiert, obwohl Markierungen, die mit einem Flüssigphasensystem vereinbar sind, zum Beispiel für die Verwendung mit einem Elektrospray-Massenspektrometrie-System besser geeignet wären, da die Sequenzierung-Erfindung ein iterativer Vorgang ist und die Sequenzproben kontinuierlich und nicht wie in dem Genprofilierungs-System nur einmal analysiert werden.

Hybridisierungs-Assay

[0059] Die Referenz 14 offenbart ein Verfahren zur Identifizierung von Oligonucleotiden zugänglichen Stellen

in der Tertiärstruktur der RNA, welches keine Amplifizierung von Oligonucleotiden oder irgendeine Form der Elektrophorese erforderlich macht. Die Bindung kurzer Oligonucleotid-Sonden, bevorzugt 4-mer, an eine mRNA wird nachgewiesen und das Bindungsprofil wird mit der Primärstruktur der mRNA in Bezug gebracht. Eine Anzahl von Sonden binden mit hoher Affinität an einen zugänglichen Bereich, und die Sequenzen dieser Sonden sollten zu der Primärsequenz in diesem zugänglichen Bereich komplementär sein. Die Sequenzen der Sonden sollten auch überlappen. In der obigen Patentanmeldung werden die mRNA oder die Sonden an einem Festphasensubstrat immobilisiert und die markierten Sonden beziehungsweise mRNA werden an die zurückgehaltenen Nucleinsäuren hybridisiert. Das in Referenz 14 offenbarte bevorzugte Markierungsverfahren ist die Fluoreszenzmarkierung, aber zweifellos könnten stattdessen massenmarkierte Nucleinsäuren verwendet werden.

[0060] Zahlreiche auf Hybridisierung basierende Assays sind im Stand der Technik bekannt, wenngleich Southern-Blotting und andere Verfahren zum Nachweis des Vorliegens einer bestimmten Sequenz in einer Probe von besonderer Bedeutung sind. Für den Fachmann sollte es klar sein, dass für diese Zwecke massenmarkierte Hybridisierungssonden verwendet werden können. Es sollte ebenfalls klar sein, dass der Vorteil der Verwendung von massenmarkierten Hybridisierungssonden in der Möglichkeit liegt, mit einer mehrfach eindeutig massenmarkierten Nucleinsäure-Hybridisierungssonde mehrere Sequenzen gleichzeitig zu hybridisieren.

[0061] Die Referenz 15 diskutiert verschiedene Hybridisierungs-Assays, die mit massenmarkierten Nucleinsäure-Sonden vereinbar sind.

Analyse von massenmarkierten Nucleinsäuren durch Massenspektrometrie:

[0062] Die wesentlichen Merkmale eines Massenspektrometers sind wie folgt:

Einlasssystem → Ionenquelle → Massenanalysator → Ionendetektor → Datenerfassungssystem. Um Biomoleküle zu analysieren, die bei dieser Anmeldung Proben massenmarkierter Nucleinsäuren sind, ist das entscheidende Merkmal das Einlasssystem und die Ionenquelle. Andere Merkmale von Bedeutung für den Zweck einer biologischen Analyse sind die Empfindlichkeit der Massenanalysator/Detektor-Anordnungen und deren Fähigkeit, Analytenmoleküle zu quantifizieren.

Ionisationstechniken:

[0063] Für viele biologische Massenspektrometrie-Anwendungen werden sogenannte "weiche" Ionisationstechniken verwendet. Diese ermöglichen es, große Moleküle, wie zum Beispiel Proteine und Nucleinsäuren, im Wesentlichen ohne Fragmentierung zu ionisieren. Die Flüssigphasentechniken erlauben es, dass große Biomoleküle in Lösungen mit niedrigem pH und bei geringen Konzentrationen in das Massenspektrometer gelangen. Eine Anzahl von Techniken ist zur Verwendung mit dieser Erfindung ideal, einschließlich, aber ohne darauf beschränkt zu sein, Elektrospray-Ionisation, Fast Atom Bombardement und Matrix-unterstützter Laser-Desorptionsionisation (MALDI; engl.: Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation).

Elektrospray-Ionisation:

[0064] Elektrospray-Ionisation erfordert es, dass eine verdünnte Lösung eines Biomoleküls in das Spektrometer hinein zerstäubt wird, d. h. als feiner Spray injiziert wird. Zum Beispiel kann die Lösung ausgehend von der Spitze eines Kapillarröhrchens mittels eines Strom trockenen Stickstoffs und unter dem Einfluss eines elektrostatischen Felds versprüht werden. Der Mechanismus der Ionisation ist nicht vollständig verstanden, aber man nimmt an, dass er weitgehend wie folgt ist. Das Lösungsmittel verflüchtigt sich in einem Strom von Stickstoff. Wenn die Tröpfchen kleiner werden, steigt die Konzentration des Biomoleküls an. Unter den Sprühbedingungen tragen die meisten Biomoleküle eine positive oder negative Gesamtladung, welche die elektrostatische Abstoßung zwischen den gelösten Biomolekülen erhöht. So wie sich das Verflüchtigen des Lösungsmittels fortsetzt, wird diese Abstoßung tatsächlich größer als die Oberflächenspannung des Tröpfchens und das Tröpfchen "explodiert" in kleinere Tröpfchen. Das elektrostatische Feld trägt dazu bei, die Oberflächenspannung der Tröpfchen weiter zu überwinden, und unterstützt den Sprühprozess. Die Verflüchtigung setzt sich ausgehend von den kleineren Tröpfchen fort, die wiederum wiederholend explodieren, bis sich die Biomoleküle im Wesentlichen in der Dampfphase befinden, wie es das gesamte Lösungsmittel ist. Diese Technik ist insofern von besonderer Bedeutung für die Verwendung von Massenmarkern, als sie nur sehr wenig zusätzliche Energie in Ionen hinein abgibt, so dass die innere Energieverteilung innerhalb einer Population dazu neigt, in einen schmalen Bereich zu fallen. Die Ionen werden unter dem Einfluss des angelegten elektrischen Feldgradienten aus der Ionisationskammer heraus beschleunigt. Die Richtung dieses Gradienten bestimmt, ob positive oder

negative Ionen in den Massenanalysator eintreten. Die Stärke des elektrischen Felds erhöht deren kinetische Energie. Dies führt wiederum zu mehr oder weniger Energieübertragung während Kollisionen von Ionen und neutralen Molekülen, die dann zur Fragmentierung führen kann. Dies ist von Bedeutung, wenn die Fragmentierung von Ionen in dem Massenspektrometer betrachtet wird. Je mehr Energie auf eine Population von Ionen übertragen wird, desto wahrscheinlicher ist es, dass eine Fragmentierung durch Kollision von Analytenmolekülen mit dem in der Quelle vorhandenen Badgas oder Lösungsmitteldampf auftritt. Indem die zum Beschleunigen von Ionen in der Ionisationskammer verwendete Spannung eingestellt wird, kann man die Fragmentierung von Ionen steuern. Dieses Phänomen ist vorteilhaft, wenn eine Fragmentierung von Ionen als Mittel verwendet soll, einen Marker von einer massenmarkierten Nucleinsäure abzuspalten.

Matrix-unterstützte Laser-Desorptionsionisation (MALDI):

[0065] MALDI erfordert es, dass das Biomolekül in einem großen molaren Überschuss einer photoaktiven "Matrix" eingebettet ist. Die Anwendung von Laserlicht der geeigneten Frequenz (266 nm für Nucleinsäure) führt zur Anregung der Matrix, was wiederum zur Anregung und Ionisation des eingebetteten Biomoleküls führt. Diese Technik überträgt eine bedeutsame Menge an translatorischer Energie auf Ionen, neigt aber dazu, keine übermäßige Fragmentierung anzuregen. Wiederum können elektrische Felder verwendet werden, um bei dieser Technik Fragmentierung zu steuern. MALDI-Techniken können auf zwei Arten verwendet werden. Massenmarkierte DNA kann in eine Matrix eingebettet sein, so dass die Markierungen selbst nicht durch den Laser spezifisch anregbar sind oder Marker könnten so aufgebaut sein, dass sie die notwendigen Gruppen enthalten, die eine Laseranregung ermöglichen würden. Der letztere Ansatz würde bedeuten, dass der Marker nicht in eine Matrix eingebettet werden muss, bevor eine Massenspektrometrie durchgeführt wird. Solche Gruppen weisen Nicotin-, Sinapin- oder Zimtsäureanteile auf. MALDI-basierte Abspaltung von Markern würde mit einem photoabspaltbaren Linker wahrscheinlich am Wirksamsten sein, weil dies einen Schritt zur Abspaltung vor der Durchführung von MALDI-Massenspektrometrie vermeiden würde. Die verschiedenen anregbaren Ionisationsmittel weisen unterschiedliche Anregungsfrequenzen auf, so dass eine andere Frequenz als die, die verwendet wird, um den photolytisch zersetzbaren Linker abzutrennen, gewählt werden kann, um die Ionisation auszulösen. Diese anregbaren Anteile könnten unter Verwendung von herkömmlichen synthetischen Techniken in der organischen Chemie abgeleitet werden, um eine Vielfalt von Markern mit einem Bereich von Massen zu erzielen. Der Bereich könnte in kombinatorischer Weise aufgebaut sein.

Fast Atom Bombardment:

[0066] Fast Atom Bombardment (Beschuss mit schnellen Atomen) wird verwendet, um eine Anzahl von Techniken zu beschreiben, um relativ nicht flüchtige Moleküle zu verdampfen und ionisieren. Das wesentliche Prinzip dieser Techniken besteht darin, dass Proben von Oberflächen durch Kollision der Probe mit beschleunigten Atomen oder Ionen, üblicherweise Xenonatomen oder Caesiumionen, desorbiert werden. Die Proben können auf eine feste Oberfläche wie für MALDI aufgetragen werden, allerdings ohne komplexe Matrizen zu erfordern. Diese Techniken sind auch mit Einlasssystemen für flüssige Phasen vereinbar – die Flüssigkeit, die aus einem Kapillar-Elektrophoreseeinlass oder einem Hochdruckflüssigkeitschromatographen austritt, tritt durch eine Fritte hindurch, wobei im Wesentlichen die Oberfläche der Fritte mit einer Analytenlösung beschichtet wird, die von der Oberfläche der Fritte durch Beschuss mit Atomen ionisiert werden kann.

Quantifizierung und Massenspektrometrie:

[0067] Viele biochemische und molekularbiologische Untersuchungen sind größtenteils quantitativ. Ein Massenspektrometer ist keine einfache Vorrichtung zur Quantifizierung, aber die Verwendung von geeignetem Instrumentarium kann zu hoher Empfindlichkeit führen. Die Anzahl von Ionen, die von einem Massenspektrometerdetektor erreichenden Ionen ist kein direktes Maß der Anzahl von tatsächlich in der Ionenquelle vorhandenen Molekülen. Das Verhältnis zwischen der Anzahl von Ionen und der anfänglichen Konzentration von Biomolekülen ist eine komplexe Funktion des Ionisationsverhaltens. Eine Quantifizierung kann bewirkt werden, indem das Massenspektrum abgetastet wird und Ionen für jedes abgetastete Masse/Ladungs-Verhältnis gezählt werden. Die Zählung wird integriert, um die Gesamtanzahl an jeder Stelle in dem Spektrum während einer vorgegebenen Zeitdauer zu ermitteln. Diese Zählungen können auf die ursprünglichen Mengen an Molekülen der Quelle in einer Probe zurückbezogen werden. Verfahren, um die Ionenanzahl oder den Ionenstrom zurück auf die Menge an Molekülen der Quelle in Beziehung zu setzen, variieren. Externe Standards sind ein Ansatz, bei dem das Verhalten der Probenmoleküle vor einer Messung einer unbekannten Probe ermittelt wird. Eine Kalibrierungskurve für jedes Probenmolekül kann ermittelt werden, indem der Ionenstrom für aufeinanderfolgende Verdünnungen eines Probenmoleküls gemessen wird, wenn sie in die verwendete Instrumentenkonfiguration eingebracht werden.

[0068] Vielmehr als externe Standards sind wahrscheinlich interne Standards der in höherem Maß favorisierte Ansatz, weil ein interner Standard den gleichen experimentellen Bedingungen wie die Probe unterworfen wird, so dass jegliche experimentelle Eskapaden sowohl die innere Steuerung als auch die Probenmoleküle beeinflussen. Um die Menge eines Substrats in einer Probe zu ermitteln, wird eine bekannte Menge eines internen Standards der Proben hinzugefügt. Der interne Standard wird so gewählt, dass er ein vergleichbares Ionisationsverhalten wie das des zu erfassenden Substrats hat. Das Verhältnis einer Zählung von Probenionen zu einer Zählung von Ionen des internen Standards kann verwendet werden, um die Menge der Probe zu ermitteln. Die Wahl geeigneter Standards stellt bei diesem Ansatz die größte Schwierigkeit dar. Der interne Standard sollte vergleichbar mit dem des Substrats sein, muss aber nicht die gleiche Masse haben. Der am meisten zu favorisierende Ansatz besteht darin, mit Isotopen markierte interne Standards zu verwenden. Dieser Ansatz könnte aufgrund des Aufwands, geeignete interne Standards zu synthetisieren, weniger wünschenswert als die Verwendung von externen Standard sein, wenn eine große Anzahl von Markern benötigt wird. Solche Marker würden jedoch für eine bessere Quantifizierung sorgen, als dies externe Standards tun würden. Eine Alternative zum Markieren mit Isotopen besteht darin, einen internen Standard zu ermitteln, der ein vergleichbares, aber nicht identisches chemisches Verhalten verglichen mit dem der Probe in dem Massenspektrometer hat. Das Ermitteln solcher Analoga ist schwierig und könnte eine bedeutsame Aufgabe für große Familien von Massenmarkern sein.

[0069] Ein Kompromissansatz könnte geeignet sein, weil die große Familien kombinatorisch zu synthetisierenden Massenmarkern chemisch miteinander in Beziehung stehen. Eine kleine Anzahl an internen Steuerungen könnte verwendet werden, wobei jede einzelne Steuerung die Mengen von einer Anzahl von Massenmarkern ermittelt. Das genaue Verhältnis zwischen dem internen Standard und jedem Massenmarker könnte in externen Kalibrierungsexperimenten ermittelt werden, um jegliche Unterschiede zwischen ihren Ionisationscharakteristika zu kompensieren.

[0070] Die Konfiguration des Massenspektrometers ist für das Ermitteln der tatsächlichen Ionenzählung entscheidend. Die Ionisations- und Massentrennverfahren sind in dieser Hinsicht besonders empfindlich. Bestimmte Massentrennverfahren wirken als "Massenfilter". Zum Beispiel erlaubt es das Quadrupol-Massenspektrometer nur, dass Ionen mit einem bestimmten Masse-Ladungs-Verhältnis gleichzeitig hindurchtreten. Dies bedeutet, dass ein bedeutsamer Anteil der Ionen niemals den Detektor erreicht. Die meisten Massenspektrometer detektieren lediglich einen Teil des Massenspektrums gleichzeitig. Unter der Voraussetzung, dass ein großer Anteil des Massenspektrums leer oder irrelevant sein kann, aber üblicherweise dennoch abgetastet wird, bedeutet dies, dass ein weiterer großer Anteil der Probe verschwendet wird. Diese Faktoren können ein Problem beim Detektieren sehr geringer prozentualer Häufigkeiten von Ionen darstellen, diese Probleme können aber größtenteils durch eine korrekte Konfiguration des Instrumentariums überwunden werden.

[0071] Um eine bessere Quantifizierung zu gewährleisten, könnte man versuchen, dass alle Ionen detektiert werden. Sektorinstrumente mit Mattauch-Herzog-Geometrie ermöglichen dies, haben aber eine Anzahl von Einschränkungen. Sektorinstrumente sind in getrennte Bereiche (Sektoren) unterteilt, die bestimmte Funktionen ausführen. Im Allgemeinen werden Ionen in einer Ionenquelle ausgehend von einem divergenten Strahl erzeugt, der durch einen Durchtritt durch einstellbare Schlitze hindurch schmaler gemacht wird. Dieser definierte Strahl tritt dann durch einen feldfreien Bereich hindurch in einen elektrischen Sektor, der diesen fokussiert. Der Durchtritt durch die Schlitze führt zu einem gewissen Verlust an Ionen und resultiert daher in einer Verringerung der Empfindlichkeit hinsichtlich der Probe. Der fokussierte Ionenstrahl tritt durch einen zweiten feldfreien Bereich hindurch und in einen magnetischen Sektor hinein. Dieser letzte Sektor fokussiert den Strahl auf der Grundlage der Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse der Ionen. Eine fotografische Platte, die quer zum massengetrennten Strahlteil angeordnet ist, kann verwendet werden, um die prozentualen Häufigkeiten von Ionen und deren Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse zu messen. Leider weist die fotografische Platte nur einen kleinen dynamischen Empfindlichkeitsbereich auf, bevor sie gesättigt wird, und dies ist hinderlich. Ein besserer dynamischer Bereich ist durch die Verwendung von Elektronenvervielfacheranordnungen, allerdings auf Kosten eines gewissen Verlusts an Auflösung erreichbar. Durch Verwendung einer solchen Anordnung könnte eine Familie gut charakterisierter Massenmarker überwacht werden. Im Allgemeinen würden Arraydetektoren die gleichzeitige und kontinuierliche Überwachung einer Anzahl von Bereichen des Massenspektrums ermöglichen. Die Einschränkung des Arrays hinsichtlich der Auflösung von eng beabstandeten Bereichen des Spektrums könnte die Anzahl von Markern beschränken, die man verwenden könnte. Für das "Überwachen von ausgewählten Ionen" (SIM; engl.: selected ion monitoring) hat die Quadrupolanordnung gegenüber vielen Konfigurationen dahingehend einen Vorteil, dass die elektrischen Felder, die Ionen unterschiedlicher Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse trennen, sehr schnell geändert werden können, was eine sehr hohe Abtastrate über einer geringen Anzahl von interessierenden Spitzenwerten ermöglicht.

Geometrien von Massenanalysatoren:

[0072] Massenspektrometrie ist eine in hohem Maß mannigfaltige Disziplin und es gibt vielerlei Konfigurationen von Massenanalysatoren und diese können oftmals in einer Vielzahl von Geometrien kombiniert werden, um die Analyse von komplexen organischen Molekülen zu ermöglichen. Typische einstufige Massenanalysatoren sind Quadrupol- oder Flugzeit-Instrumente (engl.: Time-of-flight; TOF), die beide mit dieser vorliegenden Erfindung vereinbar sind. Sektorinstrumente sind ebenfalls anwendbar.

Orthogonale TOF-Massenspektrometrie:

[0073] Für biologische Anwendungen sind die Empfindlichkeit und Quantifizierung von Proben sehr bedeutsam. Ein Ansatz, der hinsichtlich der Empfindlichkeit von Arraygeometrien vergleichbar ist, ist das orthogonale Time-of-Flight-Massenspektrometer. Diese Geometrie erlaubt ein sehr schnelles Abtasten eines Ionenstrahls, gefolgt von einer nahezu unverzüglichen Detektion aller Ionenspezies. Der Ionenstrom, der die Quelle, für viele biologische Anwendungen wahrscheinlich eine Elektrospray-Quelle, verlässt, tritt durch eine flache Elektrode hindurch, die senkrecht zu dem Strahl angeordnet ist. Diese Elektrode ist im Wesentlichen ein elektrisches Gatter. Ein gepulstes elektrisches Potential lenkt einen Teil des Ionenstrahls "senkrecht" in den Flugzeit-Massenanalysator hinein ab. Wenn das elektrische Gatter "geschlossen" ist, um Ionen in den TOF-Analysator hinein abzulenken, wird ein Zeitgeber ausgelöst. Die Flugzeit der abgelenkten Ionen wird aufgezeichnet, und dies reicht aus, um deren Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse zu ermitteln. Das Gatter sendet im Allgemeinen nur einen kurzen Puls von Ionen gleichzeitig in den TOF-Analysator hinein. Weil die Ankunft aller Ionen aufgezeichnet wird und weil die TOF-Trennung sehr schnell ist, wird das gesamte Massenspektrum gleichzeitig wirksam erfasst. Ferner kann die Gatterelektrode den Ionenstrahl bei sehr hohen Frequenzen abtasten, so dass mehrere Spektren in einem sehr kleinen Zeitintervall gesammelt werden können. Dies ist dort bedeutsam, wo die Probenkonzentration in der Ionenquelle gering ist oder nur für eine kurze Zeitdauer vorliegt. Die orthogonale TOF-Geometrie ist sehr empfindlich.

Analyse von massenmarkierten Nucleinsäuren durch Tandem-Massenspektrometrie:

[0074] Tandem-Massenspektrometrie beschreibt eine Anzahl von Techniken, bei denen Ionen einer Probe auf der Grundlage ihrer Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse mittels eines ersten Massenanalysators zur weiteren Analyse durch angeregte Fragmentierung der gewählten Ionen gewählt werden. Die Fragmentierungsprodukte werden durch einen zweiten Massenanalysator analysiert. Der erste Massenanalysator in einem Tandem-Instrument dient als Filter beim Auswählen von Ionen, die zu untersuchen sind. Beim Verlassen des ersten Massenanalysators gehen die gewählten Ionen durch eine Kollisionskammer hindurch, die ein neutrales Gas enthält, was dazu führt, dass einige von diesen fragmentieren.

IONENQUELLE → MS1 → KOLLISIONSZELLE → MS2 → IONENDETEKTOR

Angeregte Abspaltung von Massenmarkern:

[0075] Verschiedene analytische Techniken sind im Laufe der Jahre entwickelt worden, um die Fragmentierung von Ionen zur Verwendung in strukturellen Studien und zur unzweifelhaften Identifikation von Molekülen auf der Grundlage von Fragmentierungs-"Fingerabdrücken" zu unterstützen. Die meisten Ionisationstechniken verursachen eine gewisse Fragmentierung, aber weiche Ionisationsverfahren erzeugen wenige Fragmentierungen. Es können jedoch Variationen von beispielsweise chemischen Ionisationstechniken verwendet werden, um eine Fragmentierung zu unterstützen. In vergleichbarer Weise kann Elektrospray-Ionisation etwas modifiziert werden, um eine Fragmentierung zu unterstützen, einschließlich einer Koronaentladungselektrode, um so mehr Probenmoleküle zu ionisieren oder um eine Fragmentierung von molekularen Ionen zu erhöhen. Diese Technik ist als chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI; engl.: Atmospheric Pressure Chemical Ionisation) bezeichnet worden.

[0076] Ein aktiver Ansatz für eine Fragmentierung umfasst, eine Zersetzung molekularer Ionen anzuregen, wie zum Beispiel durch Kollision angeregte Zersetzung (CID; engl.: collision induced decomposition). CID verwendet Massenspektrometerauslegungen, um eine gewählte Gruppe von Ionen zu separieren und dann deren Fragmentierung durch Kollision mit einem neutralen Gas anzuregen; die resultierende Fragmentionen werden mittels eines zweiten Massenspektrometers analysiert.

[0077] Weitere Techniken zur angeregten Abspaltung sind mit Methoden zur Massenmarkierung vereinbart. Ein bevorzugtes Verfahren ist, wie zuvor diskutiert, durch Photonen angeregte Zersetzung, die die Verwendung von durch Licht abspaltbaren Massenmarkern beinhaltet. Eine typische Geometrie verwendet eine Tan-

dem-Massenanalysator-Konfiguration, die mit denen vergleichbar ist, die bei CID verwendet werden, wobei aber die Kollisionszelle durch eine Photoanregungskammer ersetzt ist, in der der Ionenstrom, der den ersten Massenanalysator verlässt, mit Laserlicht bestrahlt wird. Laser hoher Intensität sind erforderlich, um zu gewährleisten, dass ein bedeutsamer Anteil eines sich schnell bewegenden Ionenstroms in geeigneter Weise mit einem Photon in Wechselwirkung tritt, um die Abspaltung anzuregen. Die Positionierung des Lasers ist äußerst wichtig, um die Belichtung des Stroms für eine bedeutsame Zeitdauer zu gewährleisten. Ein Abstimmen des Lasers auf eine spezifische Frequenz ermöglicht eine genaue Steuerung der Bindungen, die zum Abspalten mittels Licht angeregt werden. Daher können Massenmarker, die mit einem geeigneten durch Licht abspaltbaren Linker mit ihren Proben verbunden sind, innerhalb des Massenspektrometers abgetrennt werden. Die Stufe zum Abspalten mittels Licht erfordert keine Tandem-Geometrie, die Kammer zum Abspalten mittels Licht könnte in der Ionenquelle oder unmittelbar dieser folgend angeordnet sein.

[0078] Eine weitere mögliche Technik, um molekulare Ionen zu fragmentieren, ist die oberflächenangeregte Zersetzung. Oberflächenangeregte Zersetzung ist eine Tandem-Analysetechnik, die umfasst, einen Ionenstrahl zu erzeugen, der in einem ersten Analysator in gewählte m/z -Verhältnisse getrennt wird. Gewählte Ionen werden mit einer festen Oberfläche unter einem Einfallswinkel zur Kollision gebracht. Die resultierenden Kollisionsfragmente können dann mittels eines zweiten Massenspektrometers analysiert werden.

[0079] Ein Typ eines Tandem-Massenspektrometers verwendet eine dreifache Quadrupol-Anordnung, die drei Quadrupol-Massenanalysatoren umfasst, von denen einer als Kollisionskammer dient. Der Kollisionskammer-Quadrupol dient sowohl als Kollisionskammer als auch als Ionenführung zwischen den zwei anderen Massenanalysator-Quadrupolen. Gas kann in den mittleren Quadrupol eingebracht werden, um so zu ermöglichen, dass seine Moleküle mit den Ionen kollidieren, die ausgehend von dem ersten Massenanalysator hinein gelangen. Fragmentationen werden in dem dritten Quadrupol getrennt. Angeregte Abspaltung kann mit anderen Geometrien als jenen durchgeführt werden, die Tandem-Sektor- oder Quadrupol-Analysatoren verwenden. Ionenfallen-Massenspektrometer können verwendet werden, um eine Fragmentierung mittels Einbringens eines Puffers- oder "Bad"-Gases in die Falle zu unterstützen. Alle gefangenen Ionen kollidieren mit Puffergasmolekülen, und die resultierende Energieübertragung kann zur Kollision führen. Die Kollisionsenergie kann erhöht werden, indem die gefangenen Ionen beschleunigt werden. Helium oder Neon kann als Badgas in Ionenfallen verwendet werden. Auf vergleichbare Weise könnte eine Fragmentierung durch Anregung mit Licht auf gefangene Ionen angewendet werden. Eine weitere vorzuziehende Geometrie ist ein Quadrupol/Orthogonal-Flugzeit-Instrument, bei dem die hohe Abtastrate eines Quadrupols mit der höheren Empfindlichkeit eines TOF-Massenanalysators gekoppelt wird, um Fragmentierungsprodukte zu identifizieren.

[0080] Herkömmliche "Sektor"-Instrumente können eine weitere gemeinsame Geometrie sein, die bei Tandem-Massenspektrometrie verwendet wird. Ein Sektor-Massenanalysator umfasst zwei separate "Sektoren", ein elektrischer Sektor, der einen eine Quelle verlassenden Strahl in einen Strahl von Ionen mit der gleichen kinetischen Energie unter Verwendung von elektrischen Feldern fokussiert. Der magnetische Sensor trennt die Ionen auf der Grundlage ihrer Masse, um ein Spektrum an einem Detektor zu erzeugen. Für Tandem-Massenspektrometrie kann ein Zwei-Sektor-Massenanalysator dieser Art verwendet werden, wobei der elektrische Sektor die erste Massenanalysatorstufe bereitstellt, der magnetische Sensor den zweiten Massenanalysator bereitstellt, mit einer Kollisionszelle, die zwischen den zwei Sektoren angeordnet ist. Diese Geometrie könnte recht wirksam sein, um Marker von einer massenmarkierten Nucleinsäure abzuspalten. Zwei vollständige, durch eine Kollisionszelle getrennte Sektor-Massenanalysatoren können auch verwendet werden, um massenmarkierte Nucleinsäuren zu analysieren.

Ionenfallen:

[0081] Ionenfallen-Massenspektrometer sind ein Verwandter der Quadrupol-Spektrometer. Die Ionenfalle weist im Allgemeinen einen Aufbau mit drei Elektroden auf – eine "Ring"-Elektrode und "Deckel"-Elektroden an jedem Ende, die einen Hohlraum bilden (Ionenfalle). Ein sinusförmiges Funkfrequenzpotential wird an die zylindrische Elektrode angelegt, während die Deckelektroden mit Gleichstrom- oder Wechselstrompotentialen vorgespannt sind. Ionen, die in den Hohlraum injiziert werden, werden durch das oszillierende elektrische Feld der zylindrischen Elektrode in eine stabile kreisförmige Trajektorie gezwungen. Für eine vorgegebene Amplitude des oszillierenden Potentials werden jedoch bestimmte Ionen eine nicht stabile Trajektorie haben und aus der Falle ausgestoßen werden. Eine Probe von in die Falle injizierten Ionen kann gemäß ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis sequentiell aus der Falle heraus ausgestoßen werden, indem das oszillierende Funkfrequenzpotential geändert wird. Die ausgestoßenen Ionen können dann detektiert werden, was es ermöglicht, ein Massenspektrum zu erzeugen.

[0082] Ionenfallen werden im Allgemeinen mit einer geringen Menge an "Badgas", wie zum Beispiel Helium, betrieben, das in dem Hohlraum der Ionenfalle vorhanden ist. Dies erhöht sowohl die Auflösung als auch Empfindlichkeit der Vorrichtung, weil die in die Falle gelangenden Ionen wesentlich auf die Umgebungstemperatur des Badgases aufgrund von Kollision mit dessen Molekülen gekühlt werden. Kollision dämpft die Amplitude und Geschwindigkeit von Ionentrajektorien, was diese mehr zum Zentrum der Falle bringt. Dies bedeutet, dass, wenn das oszillierende Potential geändert wird, Ionen, deren Trajektorien instabil werden, im Verhältnis zu den gedämpften zirkulierenden Ionen schneller Energie erhalten und die Falle in einem engeren Paket verlassen, was zu höherer Auflösung führt.

[0083] Ionenfallen können Tandem-Sektor-Massenspektrometer-Geometrien nachahmen. Tatsächlich können sie mehrere Massenspektrometer-Geometrien nachahmen, wobei dadurch komplexe Analysen von gefangenen Ionen ermöglicht werden. Eine einzelne Massenspezies aus einer Probe kann in einer Falle zurückgehalten werden, d. h. alle anderen Spezies können ausgestoßen werden. Dann kann die zurückgehaltene Spezies vorsichtig angeregt werden, indem eine zweite oszillierende Frequenz der ersten überlagert wird. Die kinetisch angeregten Ionen kollidieren mit Badgas-Molekülen und werden fragmentieren, wenn sie ausreichend angeregt sind. Die Fragmente können weiter analysiert werden. Dies ist MS/MS oder MS^2 . Ein Fragmention kann weiter analysiert werden, indem alle anderen Ionen ausgestoßen werden und dann das Fragment kinetisch so angeregt wird, dass es nach Kollision mit Badgas-Molekülen fragmentiert ($MS/MS/MS$ oder MS^3). Dieser Prozess kann solange wiederholt werden, solange ausreichend Probe vorliegt, um eine weitere Analyse zu ermöglichen (MS^n). Es sollte beachtet werden, dass Ionenfallen im Allgemeinen einen großen Anteil an Fragmentationen nach angeregter Fragmentierung zurückbehalten. Vielmehr als räumlich aufgelöste Tandem-Massenspektrometrie, die bei linearen Massenspektrometern zu finden ist, stellen diese Instrumente und FTICR-Massenspektrometer (unten diskutiert), eine Form von zeitlich aufgelöster Tandem-Massenspektrometrie dar.

Ionen-Zyklotron-Resonanz-Massenspektrometrie mit Fourier-Transformation (FTICR MS):

[0084] FTICR-Massenspektrometrie hat insofern mit Ionenfallen vergleichbare Merkmale, als eine Probe von Ionen innerhalb eines Hohlraums zurückgehalten wird, aber bei FTICR MS werden die Ionen in einer Hochvakuumkammer (ICR-Zelle) mittels gekreuzter elektrischer und magnetischer Felder gefangen. Das elektrische Feld wird durch ein Paar Platten Elektroden erzeugt, die zwei Seiten eines Kastens bilden. Der Kasten ist in dem Feld eines Magneten enthalten, das in Verbindung mit den zwei Platten (die Fallenplatten) die injizierten Ionen auf eine Zykloidtrajektorie bringen. Die Ionen können kinetisch in größere Zykloidumlaufbahnen hinein angeregt werden, indem ein Hochfrequenzpuls an die zwei "Sendeplatten" angelegt wird. Die Zykloidbewegungen der Ionen erzeugen entsprechende elektrische Felder in den übrigen zwei gegenüber liegenden Seiten (Platten) des Kastens, welche die "Empfängerplatten" umfassen. Die Anregungspulse regen die Ionen kinetisch in größere Umlaufbahnen hinein an, die kleiner werden, wenn die kohärenten Bewegungen der Ionen aufgrund von Kollision mit neutralen Gasmolekülen verloren geht. Die entsprechenden von den Empfängerplatten detektierten Signale werden mittels Fourier-Transformationsanalyse in ein Massenspektrum umgewandelt.

[0085] Für Experimente mit angeregter Fragmentierung können diese Instrumente in mit einer Ionenfalle vergleichbaren Weise arbeiten – alle Ionen außer einer einzigen interessierenden Spezies können aus der ICR-Zelle ausgestoßen werden. Ein Kollisionsgas kann in die Falle eingebracht werden und eine Fragmentierung kann angeregt werden. Die Fragmentationen können nachfolgend analysiert werden. Im Allgemeinen verbinden sich Fragmentierungsprodukte und Badgas, was zu einer schlechten Auflösung führt, wenn sie durch FT der Signale analysiert werden, die von den "Empfängerplatten" detektiert werden. Die Fragmentationen können jedoch aus der Zelle ausgestoßen und dann in einer Tandem-Konfiguration beispielsweise mit einem Quadrupol analysiert werden.

Massenmarkierte Hybridisierungs sonden

[0086] Um das erforderliche Verhalten einer Massenmarkierung zu erzielen, sind bestimmte chemische Eigenschaften wünschenswert. Diese werden in bestimmten Molekülgruppen oder -einheiten, die in Massenmarkierungen auf verschiedene Weisen eingebaut werden können, repräsentiert.

Struktur von massenmarkierten Hybridisierungs sonden

[0087] Massenmarkierte Hybridisierungs sonden können die folgenden grundlegenden Strukturen aufweisen.
Nu-M
Nu-L-M,

wobei Nu eine Nucleinsäuresonde ist und L eine Linkergruppe, welche die Nucleinsäuresonde mit einer Massenmarkierung M verbindet, ist. Die Linkergruppe (L) ist optional und die Massenmarkierung kann die erforderlichen Linker-Merkmale in diese eingebaut enthalten. Die Linkergruppe ist nicht notwendig, falls eine nicht schneidbare massenmarkierte Hybridisierungssonde benötigt wird. Nucleinsäuren sind lineare Polymere von Nucleotiden, von denen es eine relativ geringe Anzahl von in der Natur vorkommenden Spezies, aber eine wachsende Anzahl von chemisch synthetisierten Analoga gibt, die mit der Linkergruppe an zahlreichen Positionen gekoppelt werden kann. Solche Möglichkeiten werden später diskutiert.

Linker:

[0088] Linkergruppen können die folgenden strukturellen Merkmale aufweisen:
Stiel 1 – [spaltbare Gruppe] – Stiel 2

[0089] Die Stiele 1, 2 sind chemische Gruppen, die ermöglichen, dass ein Ende des Linkers mit der Nucleinsäuresonde und das andere mit der Massenmarkierung gekoppelt wird. Zwischen den Stielen oder als Teil der Stiele ist wenigstens eine spaltbare Gruppe erforderlich, um es der Massenmarkierung zu ermöglichen, von der damit assoziierten Nucleinsäuresonde kontrollierbar entfernt zu werden.

Massenmarkierungen:

[0090] Massenmarkierungen können die folgende Struktur aufweisen:
Stiel – Massenmarkierung,
wobei der Stiel eine Gruppe ist, die es der Massenmarkierung erlaubt, an ihre entsprechende Nucleinsäuresonde oder an den Linker zwischen der Massenmarkierung und deren Nucleinsäuresonde gekoppelt zu werden.

Eigenschaften von Massenmarkierungen:

[0091] Für optimale Leistungseigenschaften bei Verwendung der vorliegenden massenspektrometrischen Techniken ist ein Masse:Ladungs-Verhältnis von bis zu 2000 bis 3000 Einheiten für solche Massenmarkierungen ein geeigneter Bereich, da dies dem Bereich entspricht, innerhalb von welchem einfach geladene Ionen verlässlich mit höchster Empfindlichkeit detektiert werden können. Markierungen mit einer Masse von weniger als 200 bis 300 Dalton sind jedoch nicht ideal, da das niedrige Masse-Ende eines jeglichen Massenspektrums die Tendenz zeigt, durch Lösungsmittelmoleküle, Verunreinigungen durch kleine Moleküle, Mehrfachionisierungsspeaks und Fragmentierungsspeaks bevölkert zu werden. Ferner sollte jede Markierung minimal ungefähr 4 Dalton von ihren Nachbarn beabstandet sein, um eine Überlappung, welche durch Kohlenstoff-, Stickstoff- und Sauerstoff-Isotopen-Peaks verursacht wird, zu vermeiden.

[0092] Die Massenmarkierung sollte ionisieren und sich hauptsächlich unter Bildung einer einzigen Spezies (ohne Fragmentierung) ablösen.

[0093] Die Massenmarkierung sollte leicht ionisiert werden, um sicherzustellen, dass so viel von der abgespaltenen Massenmarkierung wie möglich detektiert wird.

[0094] Um eine Detektion zu ermöglichen, müssen Markierungen eine elektrische Nettoladung aufweisen, sollten aber vorzugsweise nicht mehrfach ionisiert sein, d. h. sie sollten eine einzelne elektrische Ladung aufweisen. Darüber hinaus sollten die Markierungen beständig gegen eine Fragmentierung sein, so dass jeder Peak in einem massenspektrometrischen Scan nur oder einzig einer einzelnen Markierung entspricht; dies vereinfacht eine Analyse der Daten und verringert jegliche Mehrdeutigkeiten bei der Bestimmung der Menge der Markierung, ein Kriterium, das für einige der Anwendungen, für die diese Erfindung entwickelt worden ist, sehr wichtig ist.

[0095] Es gibt verschiedene chemische Funktionalitäten, die positive Ladungen für eine Positiv-Ionen-Massenspektrometrie tragen oder tragen können. Diese umfassen, sind aber nicht beschränkt auf Amine (insbesondere tertiäre Amine und quartäre Amine), Phosphine und Sulfide. Quartäre Ammoniumgruppen tragen eine einzelne positive Ladung und erfordern keine weitere Ionisierung. Für eine Positiv-Ionen-Massenspektrometrie ermöglichen diese vorionisierten Spezies eine hohe Empfindlichkeit. Daher sollten bevorzugte Positiv-Ionen-Massenmarkierungen wenigstens eine derartige Gruppe tragen. Kronenether bilden eine andere Klasse von Verbindungen, die verwendet werden könnten, um positive Ladungen zu tragen.

[0096] Es stehen verschiedene chemische Funktionalitäten zur Verfügung, um eine negative Ladung für eine negative Ionen-Massenspektrometrie zu tragen, und umfassen, sind aber nicht beschränkt auf Carbonsäuren, Phosphonsäuren, Phosphorsäuren und Sulfonsäuren, phenolische Hydroxylverbindungen, Sulfonamide, Sulfonylharnstoffe, Tetrazole und Perfluoralkohole.

Ionisierung und Abtrennung von Massenmarkierungen von Nucleinsäuresonden:

[0097] DNA und andere Nucleinsäuren neigen dazu, in einem Massenspektrometer zu stark zu fragmentieren. Es ist wünschenswert, sicherzustellen, dass DNA-Fragment-Peaks in dem resultierenden Massenspektrum nicht jene, die aufgrund von Massenmarkierungen entstehen, verdecken. Es ist bevorzugt, sicherzustellen, dass Nucleinsäuresonden-Fragmente nach der Spaltung von den Massenmarkierungen abgetrennt werden. Zu diesem Zweck kann man Massenmarkierungen verwenden, die bei einer Ionisation negative Ionen bilden und die durch Negativ-Ionen-Spektrometrie abgetrennt werden können. Nucleinsäuren haben trotz ihrer negativ geladenen Hauptkette eine Neigung, bei einer Ionisation, insbesondere durch Elektrospray- und verwandte Flüssigkeit-zu-Gasphase-Ionisationstechniken, protoniert zu werden. Dies bedeutet, dass, wenn das Massenspektrometer für eine Negativ-Ionen-Spektrometrie konfiguriert ist, nur negativ geladene Massenmarkierungen in dem Massenspektrum auftauchen sollten. Die meisten Nucleinsäure-Fragmente werden den Detektor nicht erreichen.

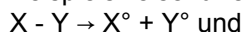
[0098] Wenn ein solcher Ansatz herangezogen wird, kann eine Protonierung der Nucleinsäuresonden durch die Verwendung von geeigneten Pufferlösungen gefördert werden, wodurch sichergestellt wird, dass Nucleinsäuren mit einer vorab existierenden positiven Ladung in großem Umfang vorhanden sind.

Fragmentierung innerhalb des Massenspektrometers:

[0099] Die Fragmentierung ist ein hochgradig signifikantes Merkmal der Massenspektrometrie. In Hinblick auf diese Erfindung ist es wichtig, zu berücksichtigen, wie eine Massenmarkierung identifiziert werden soll. Als ein Extrem können Massenmarkierungen so gestaltet werden, dass sie gegenüber einer Fragmentierung hochgradig beständig sind und die Markierung durch das Auftreten des Molekülions der Markierung im Massenspektrum identifiziert wird. In diesem Falle wäre es erforderlich, Familien von Markierungen, welche einzigartige Molekülionen haben, zu gestalten. Als anderes Extrem könnte eine Massenmarkierung mit einem hochgradig charakteristischen Fragmentierungsmuster gestaltet werden derart, dass dieses Muster diese identifizieren würde. In diesem Falle müssen Familien von Markierungen mit einander nicht überlappenden Mustern oder mit zumindest einer einzigartigen Fragmentierungsspezies für jede Markierung gestaltet werden. Fragmentierung ist eine Eigenschaft des Ausgangsmoleküls und der Ionisationstechnik, die verwendet wird, um die Ionen ausgehend von diesem zu erzeugen. Unterschiedliche Techniken bedingen die Einwirkung von unterschiedlichen Mengen an Energie auf das anfänglich gebildete Ion und die chemische Umgebung der Ionen variiert beträchtlich. Dementsprechend sind Markierungen, die für eine Massenspektrometrietechnik geeignet sind, möglicherweise bei einer anderen ungeeignet. Der bevorzugte Ansatz besteht darin, Fragmentierungsresistente Moleküle zu gestalten, obwohl ein gewisses Ausmaß an Fragmentierung unvermeidbar ist. Dies bedeutet, dass man darauf abzielt, Moleküle mit einer einzigen Hauptspezies, welche entweder das Molekülion oder ein einzelnes leicht erzeugtes Fragmention sein kann, zu identifizieren.

Bestimmung von Bindungsstabilität in einem Massenspektrometer

[0100] Bei neutralen Molekülen ist es relativ einfach, anhand einer Berücksichtigung von Bindungsstärken zu bestimmen, ob ein Molekül beständig gegen eine Fragmentierung ist. Wenn ein Molekül jedoch ionisiert ist, können Bindungsstärken auf Weisen, die a priori schwierig vorherzusagen sind, zunehmen oder abnehmen. Beispielsweise für eine gegebene Bindung X-Y in ihrer nicht-ionisierten Form:



$$\therefore D(X - Y) = \Delta H(X^\circ) + \Delta H(Y^\circ) - \Delta H(X - Y),$$

worin D die Bindungsdissoziationsenergie in geeigneten Einheiten darstellt.

[0101] Aber für eine ionisierte Spezies (in diesem Beispiel positiv):

$$D(X - Y)^+ = \Delta H(X^+) + \Delta H(Y^\circ) - \Delta H(X - Y^+)$$

$$\therefore D(X - Y) - D(X - Y)^+ = \Delta H(X^\circ) - \Delta H(X^+) - \Delta H(X - Y) - \Delta H(X - Y^+)$$

[0102] Da

$$I(X^\circ) = \Delta H(X^+) - \Delta H(X^\circ), \text{ wobei } I \text{ die Ionisationsenergie ist,}$$

$$I(X - Y) = \Delta H(X - Y^+) - \Delta H(X - Y)$$

und $\therefore D(X - Y) - D(X - Y)^+ = I(X - Y) - I(X^\circ)$.

[0103] Dies bedeutet, dass $D(X - Y) - D(X - Y)^+ > 0$, wenn $I(X - Y) > I(X^\circ)$, aber in ähnlicher Weise $D(X - Y) - D(X - Y)^+ < 0$, wenn $I(X - Y) < I(X^\circ)$.

[0104] Da beide $I(X - Y)$ und $I(X^\circ)$ positiv sind, resultiert eine stärkere Bindung, wenn $I(X - Y) < I(X^\circ)$, und entsteht eine schwächere Bindung in dem Ion von $I(X - Y) > I(X^\circ)$.

[0105] In den obigen Gleichungen bezieht sich $D(A - B)$ auf die Bindungsdissoziationsenergie der Spezies in Klammern, bezieht sich $I(N)$ auf die Ionisationsenergie der Spezies in Klammern und ist ΔH die Bildungsenthalpie der Spezies in Klammern. Für die vorliegenden Zwecke $\Delta S \approx 0$ und dementsprechend $\Delta G \approx \Delta H$. Das Endergebnis der obigen Gleichungen ist, dass, um vorherzusagen, ob eine Bindung unter einem gegebenen Satz von Ionisationsbedingungen wahrscheinlich stabil ist, es notwendig ist, die Ionisationsenergie des Moleküls und die Ionisationsenergie des neutralen Fragments, das aus einer Fragmentierung der fraglichen Bindung resultiert, zu kennen.

[0106] Beispielsweise bei Berücksichtigung der C-N-Bindung in Anilin:

$I(NH_2^\circ) = 11,14$ Elektronenvolt (eV) und $I(C_6H_5NH_2) = 7,7$ eV

$\therefore I(C_6H_5NH_2) < (NH_2^\circ)$ um 3,44 eV.

[0107] Die alternative Spaltung an dieser Bindung ist:

$I(C_6H_5^\circ) = 9,35$ eV und $I(C_6H_5NH_2) = 7,7$ eV

$\therefore I(C_6H_5NH_2) < I(C_6H_5^\circ)$ um 1,65 eV.

[0108] Dementsprechend wird diese Bindung somit in dem Ion nicht leicht gebrochen. Es wird im Allgemeinen beobachtet, dass Anilin, wenn es ausreichende Ausgangsenergie für eine Fragmentierung hat, unter Freisetzung von HCN anstelle durch Spaltung einer C-N-Bindung gespalten wird. In ähnlicher Weise treffen Erwägungen auf Phenol zu:

$I(OH^\circ) = 13$ eV und $I(C_6H_5OH) = 8,47$ eV $\therefore I(C_6H_5OH) < I(OH^\circ)$ um 4,53 eV.

[0109] Die alternative Spaltung an dieser Bindung ist:

$I(C_6H_5^\circ) = 9,35$ eV und $I(C_6H_5OH) = 8,47$ eV

$\therefore I(C_6H_5OH) < I(C_6H_5^\circ)$ um 0,88 eV.

[0110] In dem positiven Molekülion von Phenol wird keine C-O-Bindungsspaltung beobachtet.

[0111] Das Bestimmen der Unterschiede bei den Ionisationsenergien von Molekülen und neutralen Fragmenten ist ein allgemeines Arbeitsprinzip, das verwendet werden kann, um wahrscheinliche Ionenbindungsstärken vorherzusagen. Wenn die während einer Ionisation zugeführte Energie geringer ist als die Ionenbindungsstärke, dann wird keine Fragmentierung beobachtet werden. Typische Ionenbindungen, die gute Stärke aufweisen, umfassen: Aryl-O-, Aryl-N-, Aryl-S-Bindungen, die durch Delokalisierung von Elektronen stabilisiert werden. Allgemein werden Bindungen vom aliphatischen Typ in ionischer Form weniger stabil. Dementsprechend sind C-C-Einfachbindungen in Ionen schwach, sind aber C=C-Bindungen noch relativ stark. Aryl-C=C neigt dazu, aus den gleichen Gründen wie Aryl-O usw. ebenfalls stark zu sein. Aryl- oder Aryl-F-Bindungen sind in Ionen ebenfalls stark, was für eine Massenmarkierung attraktiv ist, da Fluorkohlenstoffe billig herzustellen sind, chemisch inert sind, einen detektierbaren Massendefekt in Hinblick auf Kohlenwasserstoff-Moleküle aufweisen und Fluor nur ein einzelnes in der Natur vorkommendes Isotop, ^{19}F , aufweist.

[0112] Ähnliche Erwägungen treffen auf negative Ionen zu mit der Ausnahme, dass in den obigen Gleichungen Elektronenaffinitäten verwendet werden müssen.

Eigenschaften von Linkern:

[0113] Eine kontrollierbare Freisetzung von Massenmarkierungen aus der mit diesen assoziierten Nucleinsäuresonde kann auf verschiedene Weisen bewirkt werden:

- o Spaltung durch Licht
- o Chemische Spaltung
- o Thermische Spaltung
- o Induzierte Fragmentierung innerhalb des Massenspektrometers.

[0114] Durch Licht abspaltbare und chemisch abspaltbare Linker können für die beschriebenen Anwendungen leicht entwickelt werden. [Fig. 5](#) zeigt eine Reihe von exemplarischen durch Licht abspaltbaren Linkern.

[0115] o-Nitrobenzylgruppen sind in diesem Fachgebiet als durch Licht abspaltbare Linker wohlbekannt, wobei die Spaltung an der Benzylamin-Bindung erfolgt. Für eine zusammenfassende Übersicht über abspaltbare Linker siehe Referenz 18, welche verschiedene durch Licht abspaltbare und chemisch abspaltbare Linker diskutiert.

[0116] Eine thermische Spaltung erfolgt durch thermisch induzierte Umlagerungen. [Fig. 6](#) zeigt die Synthese eines Beispiels einer Massenmarkierung, die über einen thermisch abspaltbaren Linker an die 3'-OH-Position eines Thymidinrests gebunden ist. [Fig. 6](#) zeigt auch die thermisch induzierte Umlagerung, die die Markierung von dem damit assoziierten Nucleotid abspalten würde. In diesem Beispiel könnte die Gruppe X natürlich ein Arylether-Polymer sein, wie später diskutiert. Diese thermisch abspaltbare Gruppe erzeugt in vorteilhafter Weise auch reichlich negative Ionen, die für eine Negativ-Ionen-Massenspektrometrie geeignet sind. Eine Thermolyse dieses Moleküls erfordert die S=O-Gruppe im Linker. Hier könnte S durch N oder C ersetzt werden und O durch S ersetzt werden. Für weitere Beispiele siehe Referenz 28.

Abspaltung von Massenmarkierungen innerhalb des Massenspektrometers:

[0117] Eine bevorzugte Spaltungsmethode erfolgt durch die Verwendung des Ionisationsprozesses, um eine Fragmentierung von Markierungen zu induzieren. Ein Linker kann so gestaltet werden, dass er im Ionisationsprozess hochgradig labil ist, so dass er abgespalten werden wird, wenn das Molekül, an welches er gebunden ist, in einem Massenspektrometer ionisiert wird. Es gibt zwei Faktoren, die man beim Steuern einer Spaltung unter Verwendung dieser Methode berücksichtigen muss: (1) wie hoch der Energieüberschuss ist, der an das Ion während des Ionisationsprozesses abgegeben wird, und (2) ob dieser Überschuss ausreichend ist, um irgendeine der Bindungsenergien in dem Ion zu überwinden. Der abgegebene Energieüberschuss wird stark durch die verwendete Ionisationstechnik bestimmt. Damit die abgegebene Energie eine Spaltung einer Bindung bewirken kann, muss die Energie in einem Schwingungs-/Rotationsmodus sein und muss ausreichend sein, um die Dissoziationsenergie der Bindung zu überwinden. Die Bindungsenergie wird offensichtlich durch die chemische Struktur des analysierten Moleküls bestimmt. Bindungsenergien werden später diskutiert. Allgemein gesagt, wird Energie als elektronische, Schwingungs-, Rotations- und Translationsenergie in dem Ionisationsprozess abgegeben. Innerhalb einer sehr kurzen Ionisationszeit wird der größte Teil dieses Überschusses an interner Energie sich in Schwingungs- und Rotationsenergie durch Zwischensystem- und Zwischenzustandsübergang umgewandelt haben. Der Überschuss an interner Revibrationsenergie kann zu einer Bindungsspaltung führen oder nicht. Um an die sich bewegenden Ionen mehr interne Schwingungsenergie abzugeben, kann man sie mit einem Badgas kollidieren lassen, um eine Fragmentierung des Ions zu erhalten. In einer Elektrospray-Quelle gibt es ein Badgas und ein verflüchtigtes Lösungsmittel. Ionen können durch ein elektrisches Feld beschleunigt werden, um die Kollisionsenergie mit einem Badgas zu erhöhen. Die Beschleunigung (verleiht) den Ionen kinetische Energie. Wenn ausreichend kinetische Energie an die Ionen abgegeben wird, dann werden Kollisionen mit dem Badgas zu einer Fragmentierung der Ionen führen. Die Menge an kinetischer Energie, welche benötigt wird, hängt von der Stärke der Bindungen in dem Ion ab, aber die abgegebene Energiemenge kann gesteuert werden, indem das Beschleunigungspotential reguliert wird.

[0118] Um einen Linker für Massenmarkierungen, der bei einer vorher festgelegten Bindung während einer Ionisation gespalten wird, zu erzeugen, muss es eine einzige schwache Bindung in dem Linker geben, wobei die restlichen starke Bindungen sind. Bestimmte Gruppen sind besonders beständig gegen eine Fragmentierung, während andere, wie Bindungen vom aliphatischen Typ, einer Spaltung in vernünftigem Ausmaße zugänglich sind. Um einen Linker zu gestalten, der bei einer speziellen Stelle gespalten wird, könnte ein Molekül gestaltet werden, das gegenüber einer Fragmentierung im Großen und Ganzen resistent ist, welches aber ein „schwaches Glied“ enthält. Es wird festgestellt, dass bestimmte strukturelle Merkmale Fragmentationen stabilisieren, wenn eine Spaltung bei bestimmten Bindungen in einem Ion auftritt. Lineare Alkane fragmentieren relativ zufällig, während Moleküle, die sekundäre und tertiäre Alkylgruppen enthalten, aufgrund der erhöhten Stabilisierung von sekundären und tertiären Carbokationen am häufigsten an den Verzweigungsstellen des Moleküls gespalten werden. In ähnlicher Weise stabilisieren Doppelbindungen benachbarte positive oder negative Ladungen durch Resonanz- oder Delokalisierungseffekte. Ähnliche Wirkungen werden in Bindungen, welche an Arylgruppen angrenzen, festgestellt. Einige abspaltbare Linker, bei denen eine Fragmentierung durch Kollision oder auf andere Weise induziert werden kann, sind in [Fig. 7](#) gezeigt. Diese sind in der Reihenfolge ihrer zunehmenden Labilität nummeriert. Die Gruppen links von der spaltbaren Bindung sind als gute austretende Gruppen wohlbekannt und werden verwendet, um reaktive Positionen in einem Molekül zu schützen. Als solche werden sie einer chemischen Spaltung unter bestimmten Bedingungen zugänglich sein. Die genaue Struk-

tur, die gewählt werden könnte, würde von der Anwendung und der chemischen Umgebung der Sonde abhängen. In [Fig. 7](#) ist der Linker (4) hochgradig anfällig für einen erotischen chemischen Angriff und würde dementsprechend nur als ein fragmentierbarer Linker verwendbar sein, wenn die Hybridisierungsreaktion nicht sauer ist. Der Linker (1) ist beträchtlich weniger photolytisch spaltbar. Offensichtlich könnten diese Gruppen bewusst gewählt werden, um chemisch abgespalten zu werden, wie erforderlich. Aus [Fig. 7](#) ist leicht zu ersehen, dass diese Linker auch einen Teil eines delokalisierten Arylether-Polymer-Systems bilden können. Die Gruppe rechts von der spaltbaren Bindung stabilisiert eine negative Ladung wesentlich, was vorteilhaft ist, indem sie die Spaltung der Bindung an dieser Stelle fördert und ein detektierbares negatives Ion liefern kann. An dieser Stelle könnten andere ladungsstabilisierende Gruppen verwendet werden. Die „Stiele“ in dieser und anderen Figuren stellen allgemein eine reaktive Gruppe dar, welche bei der Synthese der massenmarkierten Basensequenz nützlich ist und möglicherweise in dem massenmarkierten Molekül, wie synthetisiert, nicht vorhanden ist.

Nucleinsäuresonden:

Verbindungsgruppen zu Nucleinsäuren:

[0119] Massenmarkierungen und ihre Linker können an verschiedenen Stellen an eine Nucleinsäure angeheftet werden. Für herkömmliche Festphasen-Synthetisiergeräte ist das 5'-Hydroxyl des Ribose-Zuckers die leichteste Gruppe, welche derivatisiert werden kann. Andere begünstigte Positionen für Modifizierungen befinden sich an der Base an der 5'-Position in Pyrimidinen und an den 7'- und 8'-Positionen in Purinen. Diese würden die bevorzugten Positionen für eine Anheftung von abspaltbaren Massenmarkierungen und von nicht-abspaltbaren Massenmarkierungen sein.

[0120] Die 2'-Position am Zucker ist für Massenmodifikationen zugänglich, ist aber für Modifikationen mittels kleiner Massen, die nicht entfernt werden sollen, besser geeignet.

[0121] Die Phosphat-Bindung in natürlichen Nucleinsäuren kann bis zu einem beträchtlichen Ausmaß ebenfalls modifiziert werden, einschließlich einer Derivatisierung mit Massenmarkierungen.

Hybridisierungssonden:

[0122] Abhängig von der Anwendung möchte man möglicherweise modifizierte Nucleinsäuren verwenden, die eine Anzahl von unterschiedlichen Analoga, bei welchen das Hybridisierungsverhalten modifiziert ist, enthalten. Dies ist besonders wichtig, wenn Gruppen von Hybridisierungssonden gleichzeitig verwendet werden. Es kann wünschenswert sein, das Hybridisierungsverhalten einer Gruppe von Sonden zu modifizieren, so dass die Schmelztemperaturen der korrekt hybridisierten Sonden sehr nahe bei oder zumindest oberhalb eines bestimmten Schwellenwerts liegen. Die Schmelztemperatur von nicht-korrekt hybridisierten Sonden wird vorzugsweise unter diesen Schwellenwert fallen. Dies ermöglicht, dass Gruppen von Sonden gleichzeitig verwendet werden können, während die Stringenz von Hybridisierungsreaktionen sichergestellt wird.

[0123] Es gibt bedeutende Unterschiede zwischen der Stabilität von kurzen Oligonucleotid-Doppelsträngen, welche alle Watson-Crick-Basenpaarungen enthalten. Beispielsweise sind Doppelstränge, welche nur Adenin und Thymin umfassen, instabil verglichen mit Doppelsträngen, welche nur Guanin und Cytosin enthalten. Diese Stabilitätsunterschiede können Probleme aufwerfen, wenn versucht wird, Mischungen von kurzen Oligonucleotiden mit einer Ziel-RNA zu hybridisieren. Es werden niedrige Temperaturen benötigt, um A-T-reiche Sequenzen zu hybridisieren, aber bei diesen Temperaturen hybridisieren G-C-reiche Sequenzen an Sequenzen, die nicht vollständig komplementär sind. Dies bedeutet, dass einige Fehlpaarungen auftreten können und für die G-C-reichen Sequenzen Spezifität verloren gehen kann. Bei höheren Temperaturen hybridisieren G-C-reiche Sequenzen spezifisch, aber A-T-reiche Sequenzen hybridisieren nicht.

[0124] Um diese Effekte zu normalisieren, können Modifikationen an Nucleinsäuren vorgenommen werden. Diese Modifikationen fallen unter drei breite Kategorien: Basen-Modifikationen, Rückgrat-Modifikationen und Zucker-Modifikationen.

Basen-Modifikationen:

[0125] An den Watson-Crick-Standardbasen können zahlreiche Modifikationen vorgenommen werden. Das Folgende sind Beispiele für Modifikationen, die Basenpaarungsenergien bis zu einem gewissen Ausmaß normalisieren sollten, sie sind aber nicht als Einschränkung zu verstehen:

- o Das Adenin-Analog 2,6-Diaminopurin bildet drei Wasserstoffbrückenbindungen zu Thymin anstelle von zwei aus und bildet dementsprechend stabilere Basenpaare.
- o Das Thymin-Analog 5-Propinyldesoxyuridin bildet stabilere Basenpaare mit Adenin.
- o Das Guanin-Analog Hypoxanthin bildet zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu Cytosin anstelle von drei aus und bildet dementsprechend weniger stabile Basenpaare.

[0126] Diese und andere mögliche Modifikationen sollten es möglich machen, den Temperaturbereich einzugehen, bei welchem kurze Oligonucleotide spezifisch mit ihren komplementären Sequenzen hybridisieren können.

Rückgrat-Modifikationen:

[0127] Nucleotide können leicht im Bereich der Phosphat-Gruppierung modifiziert werden. Es ist gezeigt worden, dass unter bestimmten Bedingungen, wie niedriger Salzkonzentration, Analoga, wie Methylphosphonate, Triester und Phosphoramidate, die Doppelstrang-Stabilität erhöhen. Solche Modifikationen können auch erhöhte Nuclease-Resistenz aufweisen. Weitere Phosphat-Modifikationen umfassen Phosphodithirate und Boranophosphate, von welchen jedes die Stabilität eines Oligonucleotids gegenüber Exonucleasen erhöht.

[0128] Das isosterische Ersetzen von Phosphor durch Schwefel ergibt Nuclease-resistente Oligonucleotide (siehe Referenz 19). Das Ersetzen von entweder Phosphor oder zur Verknüpfung dienendem Sauerstoff durch Kohlenstoff ist ebenfalls eine weitere Möglichkeit.

Zucker-Modifikationen:

[0129] Es können verschiedene Modifikationen an der 2'-Position in der Zucker-Gruppierung vorgenommen werden (siehe Referenzen 20 und 21). Der Zucker kann ersetzt einen unterschiedlichen Zucker, wie Hexose, werden durch oder das gesamte Zucker-Phosphat-Rückgrat kann vollständig durch eine neue Struktur, wie in Peptidnucleinsäuren (PNA), ersetzt werden. Für eine Diskussion siehe Referenz 22. PNA bildet Doppelstränge mit der höchsten Wärmestabilität jeglicher Analoga, die bislang entdeckt worden sind.

Hydrophobe Modifikationen:

[0130] Das Hinzufügen von hydrophoben Gruppen an die 3'- und 5'-Termini eines Oligonucleotids erhöht ebenfalls die Doppelstrang-Stabilität, indem Wasser aus den Basen ausgeschlossen wird, wodurch das „Ausfransen“ des Komplexes verringert wird, d. h. hydrophobe Gruppen verringern die Solvatisierung der terminalen Basen.

Künstliche Fehlpaarungen:

[0131] Eine Hauptquelle für Fehler in Hybridisierungsreaktionen ist die Stringenz der Hybridisierung der Primer an die Zielsequenz und an die unbekannten Basen dahinter. Wenn die für eine Zielsequenz gestalteten Primer einzelne künstlich eingeführte Fehlpaarungen enthalten, ist die Diskriminierung des Systems viel höher (siehe Referenz 23). Zusätzliche Fehlpaarungen werden nicht in dem gleichen Ausmaß toleriert, wie dies eine einzelne Fehlpaarung würde, wenn ein vollständig komplementärer Primer verwendet wird. Es wird allgemein festgestellt, dass der Unterschied bei der Schmelztemperatur zwischen einem Doppelstrang mit einer Fehlpaarung und einem Doppelstrang mit zwei Fehlpaarungen größer ist als der Unterschied zwischen einem korrekt hybridisierten Doppelstrang und einem Doppelstrang, welcher eine einzelne Fehlpaarung enthält. Dementsprechend würde dies als ein wichtiges Merkmal der in dieser Anmeldung offenbarten Hybridisierungssonden antizipiert. Wenn eine Nucleinsäuresonde eine kritische Base aufweist, d. h. um einen Einzelnucleotid-Poly-morphismus („Single Nucleotide Polymorphism“) zu detektieren, destabilisiert eine künstliche Fehlpaarung, welche 1 Helix-Drehung entfernt von der kritischen Base eingeführt wird, die Doppelhelix in einem beträchtlichen Ausmaß, wenn es eine zweite Fehlpaarung an der Sondenstelle gibt.

Hybridisierungsprotokolle:

[0132] Einzelheiten von Auswirkungen auf Hybridisierungsbedingungen, insbesondere jene von Puffern und Temperatur, für Nucleinsäuresonden können in den Referenzen 24 bis 26 gefunden werden.

Oligonucleotid-Synthese:

[0133] Verfahren zur Synthese von Oligonucleotiden sind in diesem Fachgebiet wohlbekannt (siehe Referenzen 27 und 28).

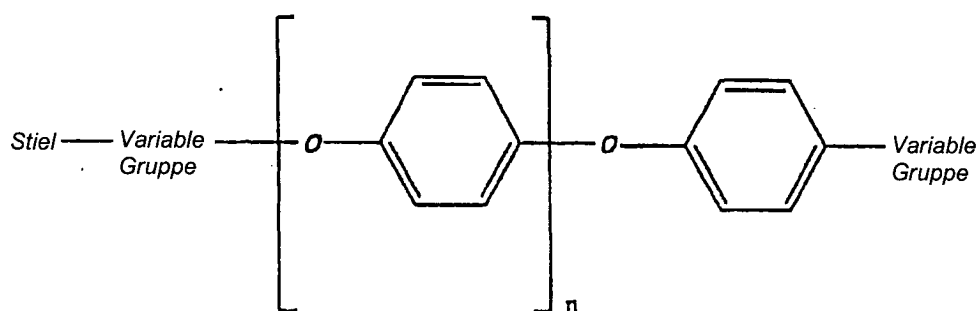
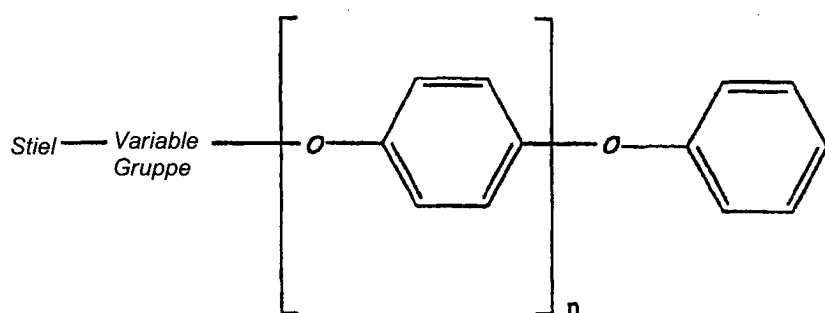
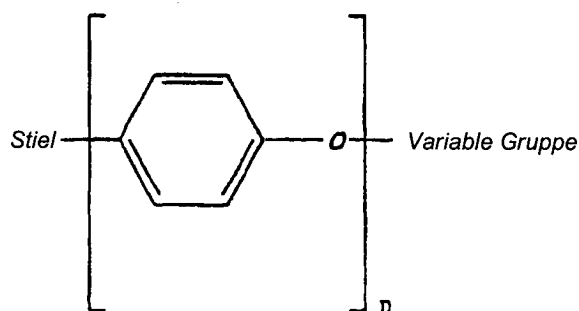
Massenmarkierungs-Synthese:

[0134] Für ein jegliches in der Praxis oder kommerziell nützliches System ist es wichtig, dass die Konstruktion der Markierungen so einfach wie möglich unter Verwendung von so wenig Reagenzien und Verarbeitungsschritten wie möglich ist. Ein kombinatorischer Ansatz, bei welchem eine Reihe von monomeren Moleküleinheiten zur Verfügung steht, um in einer Mehrzahl von Kombinationen miteinander verwendet zu werden, wäre ideal.

[0135] Man kann Massenmarkierungen unter Verwendung von Techniken der organischen Chemie synthetisieren. Solche Markierungen können eine einzelne Ladung tragende Gruppe tragen und sollten gegenüber einer Fragmentierung bei der verwendeten Massenspektrometrie-Technik resistent sein. Aminderivate, quartäre Ammoniumionen oder positive Schwefel-Zentren sind gute Ladungsträger, wenn eine Positiv-Ionen-Massenspektrometrie verwendet wird. Diese haben extrem gute Detektionseigenschaften, die saubere scharfe Signale erzeugen. In ähnlicher Weise können negativ geladene Ionen verwendet werden; so sind Moleküle mit Carbonsäure-, Sulfonsäure- und anderen Gruppierungen für eine Negativ-Ionen-Spektrometrie geeignet. Markierungen für eine MALDI-Massenspektrometrie können erzeugt werden, indem bekannte Moleküle, die durch UV-sichtbares Laserlicht anregbar sind, wie Sinapinsäure oder Zimtsäure, von welcher bereits eine Anzahl von Derivaten kommerziell erhältlich ist, derivatisiert werden. Fragmentierungsbeständige Gruppen werden oben diskutiert.

[0136] Für einen Text über organische Chemie siehe Referenz 29 oder 30.

[0137] Eine kombinatorische Synthese von solchen Markierungen kann auf eine relativ einfache Weise erzielt werden. Bevorzugte Massenmarkierungs-Strukturen sind nachfolgend gezeigt.



[0138] Diese Polyarylether-Strukturen sind gegen eine Fragmentierung sehr beständig und erzeugen gute negative Ionen, da die Delokalisierung von Elektronen über das Molekül hinweg wirksam eine negative Ladung stabilisieren kann. Diese Moleküle sind auch thermisch stabil und so besonders mit thermisch abgespaltenen Linkern und mit Linkern, die durch Kollisionsprozesse innerhalb des Massenspektrometers abgespalten werden, kompatibel. Die "variablen Gruppen" an einem oder beiden Enden der Polyarylether sind bevorzugt substituierte Arylether, welche die Eigenschaften der Massenmarkierung modifizieren ([Fig. 9](#)). Derartige modifizierende Gruppen umfassen "Massenreihen-modifizierende" Gruppen (siehe [Fig. 9](#)), löslichmachende Gruppen, ladungstragende Gruppen (siehe [Fig. 10](#)) und Massendefektgruppen (siehe [Fig. 8](#)). Ein lineares Polymer von Polyarylethern nimmt mit jedem zusätzlichen "Phenoxy"-Rest im Molekül um 92 Masseneinheiten bezüglich der Masse zu. Um das Massenspektrum vollständig auszuwerten, müssen Massenmarkierungen nur etwa 4 Dalton auseinander liegen. Um Massenmarkierungen zu erzeugen, die 4 Dalton auseinander liegen, enthält jede Massenmarkierung bevorzugt eine Gruppe, welche die Masse jeder Reihe von Arylethern verschiebt. Diese Massenreihen-modifizierende Gruppe (MSM) (siehe [Fig. 9](#)) wirkt so, dass sie jede Reihe von Arylether-Polymeren von den anderen abhebt. Bei linearen Polymeren von Arylethern, bei denen jedes Monomer densel-

ben 92 Dalton hinzufügt, gibt es keine Massen-Koinzidenz bei maximal 23 Reihen, wenn jede Reihe von Massenmarkern 4 Masseneinheiten auseinander liegt. Um beispielsweise 256 Massenmarker zu erzeugen, muss man dann die 23 MSM-Gruppen erzeugen, um sie an Polymere von Arylethern mit bis zu 12 aufeinanderfolgenden Phenoxy-Struktureinheiten zu knüpfen. Dies würde insgesamt 276 Massenmarkierungen ergeben.

[0139] Auf klare Weise kann ein Polymer erzeugt werden, das eine Anzahl von verschiedenen Untereinheiten umfasst, wobei diese Untereinheiten in verschiedenen Sequenzen auftreten. Weiter sind auch verzweigte Strukturen möglich, aber nur lineare Polymere sind für die Zweckmäßigkeit der Veranschaulichung gezeigt. Die gezeigten bevorzugten Strukturen werden wegen der Synthesezweckmäßigkeit ausgewählt. Es ist nicht signifikant schwieriger, verschiedene Sequenzen der gleichen Untereinheiten zu erzeugen, aber es ist vorzuziehen, so viele Markierungen wie möglich in möglichst wenigen synthetischen Schritten zu erzeugen. Eine bevorzugte Synthesestrategie besteht darin, Polyarylether mit bis zu 12 Struktureinheiten zu erzeugen und dann diese mit einer Anzahl von verschiedenen MSM-Gruppen zu derivatisieren, deren Massen sich idealerweise um etwa 4 Dalton unterscheiden, um eine Überlappung von Isotopen-Peaks zu vermeiden. Die Variation der MSM-Gruppen kann unter Verwendung von Isotopen-Substitutionen feinabgestimmt werden; zum Beispiel ergibt ein Ersatz von 4 Wasserstoffen in einem Molekül durch 4 Deuteriumatome einen Massenunterschied von 4 Dalton.

[0140] Weitere Beispiele für Massenmarkierungen gemäß der vorliegenden Erfindung schließen Aromaten, Phenole, Aniline und Heteroanaloge derselben in monomerer, oligomerer oder polymerer Form und andere Einheiten, die C=C oder C≡C oder Heteroanaloge derselben enthalten, sowie deren oligomere oder polymere Gegenstücke ein. Moleküle oder deren Einheiten, die C-H- oder C-Hal-(nicht F-) Bindungen enthalten, sind zu vermeiden. Zusätzlich zu den oben erörterten Polyethern kann man als Massenmarkierungen analoge Thioether, Amine, Phosphate, Phosphonate, Phosphorothioate, Silane, Siloxane, Sulfonate, Sulfonamide und jene verwenden, die C=C, C≡C und C=N enthalten.

[0141] Wenn Aromaten oder Heteroaromaten verwendet werden, können diese substituiert oder unsubstituiert sein. Wenn sie substituiert sind, müssen die Substituenten ebenfalls gegen eine Fragmentierung beständig sein und können aus irgendeiner der oben angeführten Kategorien ausgewählt sein.

[0142] Wie weiter oben erörtert, wird es bevorzugt, dass jede Massenmarkierung gegen eine Fragmentierung beständig ist und auch bevorzugt eine Stabilität gegenüber Elektronenionisations-Bedingungen bei 50 Volt aufweisen.

[0143] Eine vorteilhafte Ausführungsform dieser Technologie ist die Verwendung von fluorierten Massenmarkierungen, wenn eine Hochauflösungs-Massenanalyse von Markierungen nach deren Abspaltung von ihrer Nucleinsäure verwendet wird. Ein Kohlenwasserstoffmolekül, dessen ganzzahlige Masse 100 ist, wird eine um einen Bruchteil höhere genaue Masse aufweisen. Im Gegensatz dazu weist ein fluoriertes Molekül, dessen ganzzahlige Masse 100 ist, eine um einen Bruchteil niedrigere genaue Masse auf. Diese Massenunterschiede sind in einer Hochauflösungs-Massenanalyse unterscheidbar, und zwei Moleküle mit der gleichen ganzzahligen Masse, aber verschiedenen Zusammensetzungen erzeugen unterschiedliche Peaks im Massenspektrum, wenn sie verschiedene Mengen an Kohlenwasserstoff und Fluorkohlenstoff aufweisen. Man sagt, dass fluorierte Moleküle einen "Massendefekt" aufweisen. Da fluorierte Moleküle in lebenden Systemen nicht häufig sind, bedeutet dies, dass eine fluorierte Massenmarkierung im Massenspektrum unterscheidbar ist, selbst in Anwesenheit von kontaminierenden Peaks aufgrund einer Fragmentierung der Nucleinsäuren oder aus Puffern, solange die Nucleinsäuren und verwendeten Reagenzien nicht selbst fluoriert sind. Die Einführung einer Anzahl von Einheiten von fluorierten Arylethern ist ein einfaches Mittel zur Einführung eines Massendefekts in die Massenmarkierung (siehe [Fig. 8](#)). Eine Alternative zur Verwendung von getrennten Reihen von Massendefektgruppen besteht darin, die Polymere von normalen Arylethern durch ihre fluorierten Analoga zu ersetzen.

Aminosäuren:

[0144] Mit einer kleinen Zahl von Aminosäuren wie Glycin, Alanin und Leucin kann unter Verwendung von in der Technik wohlbekannten Standard-Peptidsyntheseverfahren eine große Zahl kleiner Peptide mit verschiedenen Massen erzeugt werden. Mit mehr Aminosäuren können viel mehr Markierungen synthetisiert werden. Man muss sich nicht auf natürliche Aminosäuren beschränken. Jede chirale Form ist annehmbar, und verschiedene nicht-natürliche Seitenketten sind ebenfalls annehmbar. (siehe Referenz 31)

Beispiel 1:

Synthese von negative Ionen bildenden Spezies

Materialien:

BSA (cyclisches 2-Sulfobenzoessäureanhydrid) – 100 mg, 0,54 mMol
 Benzylalkohol – 2 ml
 Natriumcarbonat – 1,1 Äquiv., 63 mg.

Verfahren:

[0145] Man löse Carbonat und BSA zusammen und gebe Benzylalkohol dazu. Man erwärme, um die Reaktion zu starten (CO_2 entwickelt sich). Man rühre, bis das Aufschäumen aufhört. Man filtriere und fälle das Produkt durch die Zugabe von Diethylether aus. Man rühre 10 Minuten und isoliere das Produkt durch Filtration. Das Produkt ist ein weißer Festkörper. Dieses Molekül wird als AG/1/75 bezeichnet. (Siehe [Fig. 11](#)).

Massenspektrometrie: Negativ-Ionen-Modus

[0146] Ein Negativ-Ionen-Massenspektrum des vorstehend synthetisierten Moleküls AG/1/75 ist in [Fig. 11](#) gezeigt. Dieses Spektrum wurde mit dem zu 10 ng/µl vorliegenden Molekül erzeugt. Das Lösungsmittel war Methanol und Wasser in einem Verhältnis von 1:1. Das Spektrum wurde mit einem Elektrospray-Einlasssystem erzeugt, das an ein Quadrupol-Scanning-Massenspektrometer gekoppelt war. Die Vergrößerung zeigt die Massenpeaks, die dem Anion des AG/1/75-Moleküls entsprechen, einem einzigen geladenen negativen Ion bei m/z 291 Dalton $[\text{M}-\text{Na}]^-$. Man bemerke, dass die Isotopen-Peaks über etwa drei Dalton vom Quasi-Molekülion-Peak entfernt signifikant sind.

[0147] [Fig. 12](#) zeigt ein Positiv-Ionen-Spektrum von AG/1/75. Es gibt kein nachweisbares Molekülion in diesem Spektrum, deshalb wird dieses Molekül am besten als Negativ-Ionen-Modus-Markierung verwendet. Beide obigen Spektren werden mit einer Kegelspannung von 45 V in der Elektrospray-Quelle erzeugt.

[0148] [Fig. 13](#) zeigt ein Negativ-Ionen-Spektrum von AG/1/75 in der gleichen Lösung wie bei den vorherigen Spektren, aber mit einer Kegelspannung von 75 V. Diese Spannung reicht aus, um eine signifikante Fragmentierung in dem Molekül zu bewirken, was einen größeren Negativ-Fragmentation-Peak bei m/z 156 Dalton erzeugt, welcher der Abspaltung an der Position entspricht, die in der eingefügten Struktur in [Fig. 13](#) gezeigt ist.

[0149] Die [Fig. 14](#) und [Fig. 15](#) zeigen Massenspektren eines "unkonditionierten" PCR-Produkts in verschiedenen Puffern im positiven und negativen Modus. Das PCR-Produkt war "unkonditioniert", indem keine Anstrengung unternommen worden war, die DNA vom Puffer und Reaktionsmaterial über das hinaus abzutrennen, was normalerweise für Gelelektrophorese getan wird. Es wurde kein Versuch unternommen, Metallionen-Addukte gegen Ammoniumionen auszutauschen oder reine DNA zu erzeugen, wie es die übliche Praxis für Massenspektrometrie-Zwecke ist. Die [Fig. 16](#) und [Fig. 17](#) zeigen das gleiche PCR-Produkt mit AG/1/75, das klar im Negativ-Ionen-Modus, aber nicht im positiven Modus nachgewiesen werden kann. Die [Fig. 18](#) und [Fig. 19](#) zeigen dieselben Spektren nach Signalverarbeitung, um Hintergrundrauschen zu subtrahieren, und es ist klar, dass AG/1/75 im Negativ-Ionen-Modus leicht nachgewiesen werden kann.

Beispiel 2

Synthese einer Base, die mit einem Arylether massenmarkiert ist

[0150] Das folgende sind Protokolle der Synthese einer Reihe von Arylethern von Thymidin-Nucleotiden. Die Strukturen dieser Verbindungen sind in den [Fig. 24](#) und [Fig. 25](#) gezeigt.

FT9 (siehe [Fig. 24](#))

[0151] Eine Lösung von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-3'-succinoylthymidin (161 mg, 0,25 mMol) in Dichlormethan (4 ml) wurde mit N-Methylmorpholin (27 µl, 0,25 mMol) und 2-Chlor-4,6-dimethoxytriazin (44 mg, 0,25 mMol) behandelt, und das Ganze wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde 4-Phenoxyphenol (51 mg, 0,27 mMol) dazugegeben und das Rühren wurde 5 Tage fortgesetzt. Die Reaktionsmischung wurde mit Dichlormethan verdünnt und mit einer wässrigen Citronensäure-Lösung (10% Gew./Vol.) und zweimal mit

Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde getrocknet (Na_2SO_4) und das Lösungsmittel wurde unter verringertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde durch Flash-Chromatographie unter Verwendung von Ethylacetat/n-Hexan (2:1), das 1% Triethylamin enthielt, als Eluat gereinigt, was 86 mg (42% Ausbeute) FT9 als farblosen Schaum ergab. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 1,39 (3 H, m); 2,46 (2 H, m); 2,75 (2 H, m); 2,86 (2 H, m); 3,48 (2 H, m); 3,78 (6 H, s); 4,14 (1 H, m); 5,52 (1 H, m); 6,44 (1 H, m); 6,75–7,45 (22 H, m); 7,60 (1 H, d). MS (FAB), m/z 812 (M^+). Berechn. für $\text{C}_{47}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_{11}$: C 69,44; H 5,46; N 3,46% Gefunden: C 69,66; H 5,53; N 3,24%

FT17 (siehe [Fig. 24](#))

[0152] Eine Lösung von 5'-O-(tert-Butyldimethylsilyl)-3'-succinoylthymidin (288 mg, 0,5 mMol) in Dichlormethan (3 ml) wurde mit drei Tropfen Pyridin und dann tropfenweise mit einer Lösung von Oxalylchlorid (2 M; 0,3 ml, 0,6 mMol) in Dichlormethan behandelt. Die Reaktionsmischung wurde 90 min bei Raumtemp. gerührt. Die Lösung des so gebildeten Säurechlorids wurde in eine eiskalte Lösung von 4-Phenoxyphenol (110 mg, 0,59 mMol) und Pyridin (0,3 ml) in Dichlormethan (3 ml) getropft. Nach 30 min wurde eine weitere Portion 4-Phenoxyphenol (35 mg, 0,19 mMol) in Dichlormethan (0,7 ml) dazugegeben, und das Rühren wurde 4 h fortgesetzt. Die Reaktionsmischung wurde mit Dichlormethan verdünnt und mit einer wässrigen NaHCO_3 -Lösung (5% Gew./Vol.) und zweimal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde mit Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter verringertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde durch Flash-Chromatographie unter Verwendung von Ethylacetat/n-Hexan (1:1) als Eluent gereinigt, was 145 mg (47% Ausbeute) FT17 als farblosen Schaum ergab. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 0,12 (6 H); 0,92 (9 H); 1,92 (3 H, s); 2,12 (1 H, m); 2,40 (1 H, m); 2,77 (2 H, m); 2,89 (2 H); 3,90 (2 H, d); 4,11 (1 H, d); 5,30 (1 H, d); 6,36 (1 H, dd); 7,00–7,27 (9 H, m); 7,54 (1 H, d); 8,28 (1 H, br. s). MS (FAB) m/z 625 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$. Berechn. für $\text{C}_{32}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_9\text{Si}$: C 61,52; H 6,45; N 4,48% Gefunden: C 61,60; H 6,45; N 4,45.

FT18/1 (siehe [Fig. 25](#))

[0153] Eine Lösung von 4-Phenoxyphenylglutarat (180 mg, 0,6 mMol) in Dichlormethan (3 ml) wurde mit drei Tropfen Pyridin und dann tropfenweise mit einer Lösung von Oxalylchlorid (2 M; 0,35 ml, 0,7 mMol) in Dichlormethan behandelt. Die Reaktionsmischung wurde 90 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung des so gebildeten Säurechlorids wurde in eine eiskalte Lösung von 5'-O-(tert-Butyldimethylsilyl)thymidin (228 mg, 0,5 mMol) und Pyridin (0,3 ml) in Dichlormethan (3 ml) getropft. Das Rühren wurde 5 h bei Raumtemperatur fortgesetzt. Die Reaktionsmischung wurde mit Dichlormethan verdünnt und mit wässrigem NaHCO_3 (5% Gew./Vol.) und zweimal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde getrocknet (Na_2SO_4) und das Lösungsmittel wurde unter verringertem Druck verdampft. Der Rückstand wurde durch Flash-Chromatographie unter Verwendung von Ethylacetat/n-Hexan (1:1) als Eluent gereinigt, was 111 mg (35% Ausbeute) FT18/1 als farbloses Öl ergab. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 0,12 (6 H); 0,92 (9 H, s); 1,92 (3 H, s); 2,02–2,30 (3 H, m); 2,35–2,75 (5 H, m); 3,92 (2 H, d); 4,10 (1 H, d); 5,29 (1 H, d); 6,36 (1 H, dd); 6,97–7,37 (9 H, m); 7,54 (1 H, d); 8,65 (1 H, br. s). MS (FAB), m/z 639 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$. Berechn. für $\text{C}_{33}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_9\text{Si}$ (H_2O): C 60,35; H 6,75; N 4,26%, Gefunden: C 60,57; H 6,60; N 4,18%.

F23 (siehe [Fig. 25](#))

[0154] Eine Lösung von 5'-O-(tert-Butyldimethylsilyl)-3'-succinoylthymidin (288 mg, 0,5 mMol) in Dichlormethan (3 ml) wurde mit drei Tropfen Pyridin und dann tropfenweise mit einer Lösung von Oxalylchlorid (2 M; 0,3 ml, 0,6 mMol) in Dichlormethan behandelt. Die Reaktionsmischung wurde 90 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung des so gebildeten Säurechlorids wurde in eine eiskalte Lösung von (4'-Phenoxy)-4-phenoxybenzylalkohol (146 mg, 0,5 Mol) und Pyridin (0,3 ml) in Dichlormethan (3 ml) getropft. Das Rühren wurde 4 h bei Raumtemperatur fortgesetzt. Die Reaktionsmischung wurde mit Ethylacetat verdünnt und mit wässrigem NaHCO_3 (5% Gew./Vol.) und zweimal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde mit Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter verringertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde durch Flash-Chromatographie unter Verwendung von Ethylacetat/n-Hexan (1:1) gereinigt, was 73 mg (20% Ausbeute) FT 23 ergab. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 0,13 (6 H, s); 0,92 (9 H, s); 1,92 (3 H, s); 2,11 (1 H, m); 2,39 (1 H, m); 2,68 (4 H, s); 3,90 (2 H, d); 4,06 (1 H, d); 5,11 (2 H, s); 5,27 (1 H, d); 6,34 (1 H, m); 6,95–7,37 (13 H, m); 7,35 (1 H, d); 8,27 (1 H, br. s). MS (FAB), m/z 731 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$. Berechn. für $\text{C}_{39}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{Si}$: C 64,08; H 6,34; N 3,85%, Gefunden: C 64,32; H 6,38; N 3,79%.

Massenspektrometrie von massenmarkierter Base FT23

[0155] Massenspektrometrie-Untersuchungen wurden an FT23 als Modell für das Verhalten einer massenmarkierten Base in Anwesenheit und Abwesenheit eines Oligonucleotid-Hintergrunds durchgeführt. Die Ergeb-

nisse dieser Untersuchungen sind in den [Fig. 20](#) bis [Fig. 23](#) dargestellt. Jede Figur zeigt ein Massenspektrum, das unter Verwendung einer Elektrospray-Ionenquelle mit einer Kegelspannung von 45 V in einem Plattform-LC-Quadrupol-Scanning-Massenspektrometer (Micromass UK) erzeugt wurde. In jedem Fall lag FT23 zu 4 pMol/µl vor. [Fig. 20](#) zeigt das Massenspektrum im Negativ-Ionen-Modus mit einem herausragenden Peak bei 729,3, was dem $[M - H]^-$ -Ion entspricht. [Fig. 21](#) zeigt das entsprechende Massenspektrum im Positiv-Ionen-Modus mit einer Anzahl von herausragenden Peaks.

[0156] Die [Fig. 22](#) und [Fig. 23](#) zeigen ein Negativ-Ionen- bzw. Positiv-Ionen-Modus-Massenspektrum, das unter den gleichen Bedingungen wie jenen erzeugt wurde, die in den [Fig. 20](#) und [Fig. 21](#) gezeigt sind, mit der Ausnahme, dass eine Oligonucleotid-Probe mit einem ungefähren Molekulargewicht von 3000 zusätzlich zu jeweils 4 pMol/µl anwesend ist. Wiederum ist im Negativ-Ionen-Modus ([Fig. 22](#)) ein klarer Peak bei 729,3 wahrnehmbar. Im Positiv-Ionen-Modus ([Fig. 23](#)) wird wiederum eine Anzahl von Peaks nachgewiesen.

[0157] Diese Ergebnisse zeigen an, dass die massenmarkierte Base FT23 leicht in der Negativ-Ionen-Modus-Massenspektrometrie nachweisbar ist, selbst in Anwesenheit von äquimolarem (kontaminierendem) Oligonucleotid.

Referenzen

1. R. A. W. Johnstone und M. E. Rose, "Mass Spectrometry for chemists and biochemists" 2. Auflage, Cambridge University Press, 1996
2. G. Jung und A. G. Beck-Sickinger, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 31, 367–383
3. S. Brenner und R. A. Lerner, "Encoded combinatorial chemistry", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 5381–5383
4. M. J. Bishop und C. J. Rawlings, Herausgeber, 'Nucleic Acid and Protein Sequence Analysis: A Practical Approach', IRL Press, Oxford, 1991
5. P. H. Nestler, P. A. Bartlett und W. C. Still, "A general method for molecular tagging of encoded combinatorial chemistry libraries", J. Org. Chem. 59, 4723–4724, 1994
6. Z.-J. Ni et al., "Versatile approach to encoding combinatorial organic syntheses using chemically robust secondary amine tags", J. Med. Chem. 39, 1601–1608, 1996
7. H. M. Geysen et al., "Isotope or mass encoding of combinatorial libraries", Chemistry and Biology 3, 679–688, August 1996
8. Britische Patentanmeldung Nr. 9618544.2
9. A. C. Pease et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91, 5022–5026, 1994
10. U. Maskos und E. M. Southern, Nucleic Acids Research 21, 2269–2270, 1993
11. E. M. Southern et al., Nucleic Acids Research 22, 1368–1373, 1994
12. WO 98/10095
13. Britische Patentanmeldung Nr. 9620769.1
14. WO 98/15651
15. WO 97/27325
16. WO 97/27327
17. WO 97/27331
18. Lloyd-Williams et al., Tetrahedron 49: 11065–11133
19. J. F. Milligan, M. D. Matteucci, J. C. Martin, J. Med. Chem. 36(14), 1923–1937, 1993
20. C. J. Guinasso, G. D. Hokie, S. M. Freier, J. F. Martin, D. J. Ecker, C. K. Mirabelle, S. T. Crooke, P. D. Cook, Nucleosides Nucleotides 10, 259–262, 1991
21. M. Carmo-Fonseca, R. Pepperkok, B. S. Sproat, W. Ansorge, M. S. Swanson, A. I. Lamond, EMBO J. 7, 1863–1873, 1991
22. (8) P. E. Nielsen, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 24, 167–183, 1995
23. Zhen Guo et al., Nature Biotechnology 15, 331–335, April 1997
24. Wetmur, Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 26, 227–259, 1991
25. Sambrook et al., 'Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition', Cold Spring Harbour Laboratory, New York, 1989
26. Hames, B. D., Higgins, S. J., 'Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach', IRL Press, Oxford, 1988
27. Gait, M. J., Herausgeber, 'Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach', IRL Press, Oxford, 1990
28. Eckstein, Herausgeber, 'Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach', IRL Press, Oxford, 1991
29. Vogel, "Textbook of Organic Chemistry" 4. Auflage, Revidiert von B. S. Furniss, A. J. Hannaford, V. Rogers, P. W. G. Smith
30. Advanced Organic Chemistry von J. March
31. E. Atherton und R. C. Sheppard, Herausgeber, 'Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach', IRL32. Europäische Patentanmeldung EP 0 735 144

32. Europäische Patentanmeldung EP 0 735 144

33. WO 95/04160

Schlüssel zu den Figuren

Schlüssel zu [Fig. 1](#)

Schritt 1: Herstellen von cDNA, die auf einem Festphasenträger fixiert ist, z. B. unter Verwendung eines biotinylierten poly-T-Primers

Schritt 2: Behandeln von zurückgehaltenen poly-A-tragenden cDNAs mit einem „Referenzenzym“ und Waschen zur Entfernung von freien Fragmenten

Schritt 3: Zugabe eines Adapters mit einem klebrigen Ende, das zu dem klebrigen „Referenzenzym“-Ende komplementär ist und eine Bindungsstelle für das „Probe-Enzym“ trägt. Der Adapter kann auch eine Primersequenz tragen, um eine lineare Amplifikation der Matrizen-DNA zu gewährleisten

Schritt 4: Behandeln der Adapter-cDNAs mit „Probe-Endonuclease“ und Waschen zur Entfernung von ungebundenen Fragmenten

Schritt 5: Zugabe eines Adapters mit einem klebrigen Ende, das zu dem klebrigen „Referenzenzym“-Ende komplementär ist und eine Bindungsstelle für das „Probe-Enzym“ trägt. Der Adapter sollte auch eine Massenmarkierung mit einem photospaltbaren Linker tragen.

Schritt 6: Zugabe von „Probe-Enzym“

Schritt 7: Entfernen der flüssigen Phase, in welche Signaturfragmente freigesetzt wurden, und Ligieren an einen Oligonucleotid-Array, der alle der 256 möglichen 4-mere an getrennten Stellen auf einem Glaschip trägt

Schritt 8: Einbetten der ligierten Signaturen in MALDI-MATRIX. Überführen des Chips mit den ligierten Signaturen in ein MALDI-Massenspektrometer

Schritt 9: Laserscannen des Chips zur Abspaltung der Massenmarkierungen von den Signaturen in einem Feld des Chips. Scannen des gleichen Bereichs mit einem UV-Laser mit einer zweiten Frequenz zur Ionisierung der abgespaltenen Massenmarkierungen für die massenspektrometrische Analyse.

Schlüssel zu [Fig. 2a](#)

Schritt 1: Durchleiten durch eine Matrix mit Biotin-markiertem Poly-T, das an Avidin-beschichtete Beads gebunden ist

Schritt 2: Behandeln von zurückgehaltenen poly-A-tragenden cDNAs mit einer „Referenz-Endonuclease“ und Waschen zur Entfernung von ungebundenen Fragmenten

Schritt 3: Zugabe eines Adapters mit einem klebrigen Ende, das zu dem klebrigen „Referenzenzym“-Ende komplementär ist und eine Bindungsstelle für die „Probe-Endonuclease“ trägt.

Schritt 4: Zugabe von „Probe-Enzym“

Schritt 5: Zugabe von Adaptern mit klebrigen Enden, die zu allen möglichen klebrigen 4-Basen-Enden komplementär sind und eine Bindungsstelle für die „Probe-Endonuclease“ tragen. Diese Adapter tragen auch eine „Massenmarkierung“ zur Identifizierung der Sequenz des unbestimmten von ihnen identifizierten klebrigen Endes.

Schlüssel zu [Fig. 2b](#)

Schritt 6: Zugabe von „Probe-Enzym“

Schritt 7: Entfernen der flüssigen Phase, in welche Signaturfragmente freigesetzt wurden, und Aufteilen in 256 Vertiefungen.

Schritt 8: Ligieren der Signaturen mit den Beads in der Vertiefung. Jede Vertiefung enthält Beads, die einem möglichen klebrigen Ende entsprechen. Waschen zur Entfernung von unligierten Signaturen in jeder Vertiefung.

Schritt 9: Abspalten der Massenmarkierung von den immobilisierten Signaturfragmenten, so dass diese in die flüssige Phase freigesetzt wird, und Analyse mittels Elektrospray-Massenspektrometrie

Schlüssel zu [Fig. 3a](#)

Schritt 1: Durchleiten durch eine Matrix mit Biotin-markiertem Poly-T, das an Avidin-beschichtete Beads gebunden ist

Schritt 2: Behandeln von zurückgehaltenen poly-A-tragenden cDNAs mit einer „Referenz-Endonuclease“ und Waschen zur Entfernung von ungebundenen Fragmenten

Schritt 3: Zugabe eines Adapters mit einem klebrigen Ende, das zu dem klebrigen „Referenzenzym“-Ende

komplementär ist und eine Bindungsstelle für die „Probe-Endonuclease“ trägt.

Schritt 4: Zugabe von „Probe-Enzym“

Schritt 5: Zugabe von Adaptern mit klebrigen Enden, die zu allen möglichen klebrigen 4-Basen-Enden komplementär sind und eine Bindungsstelle für die „Probe-Endonuclease“ tragen. Diese Adapter tragen auch eine „Massenmarkierung“ zur Identifizierung der Sequenz des unbestimmten von ihnen identifizierten klebrigen Endes.

Schlüssel zu [Fig. 3b](#)

Schritt 6: Zugabe von „Probe-Enzym“

Schritt 7: Entfernen der flüssigen Phase, in welche Signaturfragmente freigesetzt wurden, und Beladen einer HPLC-Affinitätssäule zur Aufteilung der Fragmente in 256 Teilmengen aufgrund des klebrigen Endes

Schritt 8: Die Säule sollte die Signaturen in Fraktionen aufteilen, die das gleiche klebrige Ende tragen. Diese Fraktionen müssen dann einem Laser ausgesetzt werden, um die Massenmarkierung abzuspalten.

Schritt 9: Die abgespaltenen Massenmarkierungen und Signaturfragmente können dann direkt zur Analyse in ein Elektrospray-Massenspektrometer geleitet werden. Die Ladung der Markierung kann so ausgelegt sein, dass sie der Oligonucleotid-Signatur entgegengesetzt ist. Demgemäß können die Markierungen bei negativer Ladung mittels Negativ-Ionen-Massenspektrometrie analysiert werden.

Schlüssel zu [Fig. 4](#)

- A Ionenquelle
- B Ionenstrom
- C elektrisches Gatter
- D Reflekttron
- E Detektor

(1), (2) bevorzugte photospaltbare Linker

Schlüssel zu [Fig. 8](#)

(1)–(3) bevorzugte Strukturen für Massenmarkierungen, wobei $n \geq 0$

(4) Massendefekt enthaltende Massenmarkierungen, wobei $n \geq 0$ und $m \geq 0$ und X bevorzugt F oder H ist

Schlüssel zu [Fig. 9](#)

(1) bevorzugte Endvariable oder Massenreihen-modifizierende Gruppe

(2) bevorzugte innere Variable oder Massenreihen-modifizierende Gruppe, wobei $n \geq 0$ und R beliebige Gruppen sein können. Bei Massenreihenmodifizierenden Gruppen sollten die R-Gruppen bevorzugt nicht ionisieren oder fragmentieren. Ionisierende Gruppen sind in einer anderen Figur dargestellt.

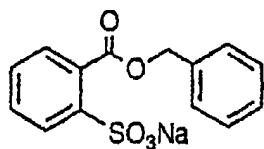
Schlüssel zu [Fig. 10](#)

(1) Negativ-Ionen-Modus-Gruppen

(2) Positiv-Ionen-Modus-Gruppen

Schlüssel zu [Fig. 11](#)

Legende: Probe AG/1/75, 10 ng/μl, 1:1 MeOH:Wasser, CV = 45V LIVER01 1 (0,997) Sm (SG, 2 × 0,60), Scan ES-1,79e8, wobei AG/1/75



(M_r314)

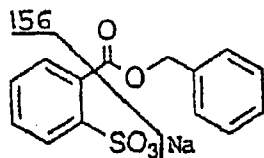
ist.

Schlüssel zu [Fig. 12](#)

Legende: AG/1/75 5×10^{-7} M 20 μ l/min Einleitung in MeOH/H₂O 1:1 LPOOL3 13 (0,496) Cm (9:13), Scan ES + 1,89e6

Schlüssel zu [Fig. 13](#)

Legende: Probe AG/1/75, 10 ng/ μ l, 1:1 MeOH:Wasser, CV = 75V LIVER02 1 (0,998) Sm (SG, 2 \times 0,60), Scan ES – 4,37e7, wobei AG/1/75

(M_r314)

ist.

Schlüssel zu [Fig. 14](#)

Legende: DNA 1:5 V in MeOH:H₂O + 0,2% AMEISENSÄURE 45V +/- UMSCHALTEN
 (1): LPOOL5 9 (0,628) Cm (2:13), 1: Scan ES – 4,56e3
 (2): LPOOL5 3 (0,243) Cm (3:10), 2: Scan ES + 1,13e5

Schlüssel zu [Fig. 15](#)

Legende: DNA 1:5 V in MeOH:H₂O + 0,2% AMMONIAK 45V +/- UMSCHALTEN
 (1): LPOOL6 10 (0,761) Cm (4:12), 1: Scan ES – 1,37e4
 (2): LPOOL6 11 (0,726) Cm (2:11), 2: Scan ES + 8,13e4

Schlüssel zu [Fig. 16](#)

Legende: DNA + AG/1/75 + 0,2% AMEISENSÄURE SCHLEIFEN-INJ +/- ES
 (1): LPOOL9 14 (0,800) Cm (11:18), 2: Scan ES + 1,04e6
 (2): LPOOL9 14 (0,771) Cm (12:18), 1: Scan ES – 4,20e3

Schlüssel zu [Fig. 17](#)

Legende: DNA + AG/1/75 + 0,2% AMEISENSÄURE SCHLEIFEN-INJ +/- ES
 (1): LPOOL10 13 (0,747) Cm (11:17), 2: Scan ES + 1,86e6
 (2): LPOOL10 11 (0,608) Cm (11:17), 1: Scan ES – 3,23e3

Schlüssel zu [Fig. 18](#)

Legende: DNA + AG/1/75 + 0,2% AMEISENSÄURE SCHLEIFEN-INJ +/- ES
 (1): LPOOL9 14 (0,800) Cm (13:15 – (22:29 + 4:7)), 2: Scan ES + 1,02e6, (Hintergrund abgezogen)
 (2): LPOOL9 16 (0,881) Cm (16:19 – (23:29 + 9:13)), 1: Scan ES – 2,70e3, (Hintergrund abgezogen)

Schlüssel zu [Fig. 19](#)

Legende: DNA + AG/1/75 + 0,2% AMMONIAK SCHLEIFEN-INJ +/- ES
 (1): LPOOL10 13 (0,747) Cm (13:14 – (6:8 + 22:25)), 2: Scan ES + 2,93e6, (Hintergrund abgezogen)
 (2): LPOOL10 11 (0,608) Cm (11:16 – (8 + 26)), 1: Scan ES – 1,03e3, (Hintergrund abgezogen)

Schlüssel zu [Fig. 20](#)

Legende: FT23 (nur)(– ves Ion) 4 pmol/ μ l, LPOOL2 3 (0,266) Cm (2:24), 2: Scan ES – 7,35e5

Schlüssel zu [Fig. 21](#)

Legende: FT23 (nur)(+ ves Ion) 4 pmol/μl, LPOOL2 5 (0,381) Cm (2:24), 1: Scan ES + 3,68e6

Schlüssel zu [Fig. 22](#)

Legende: FT23/OLIGO (– ves Ion) 4 pmol/μl, LPOOL1 18 (1,405) Cm (3:25), (Oligonucleotid Mol.-Gew. = 3000), 2: Scan ES – 3,21e5

Schlüssel zu [Fig. 23](#)

Legende: FT23/OLIGO (+ ves Ion) 4 pmol/μl, LPOOL1 11 (0,830) Cm (4:26), (Oligonucleotid Mol.-Gew. = 3000), 1: Scan ES + 2,03e6

Patentansprüche

1. Array von Hybridisierungssonden, von denen jede einen Massenmarker aufweist, der mit einer bekannten Basensequenz vorbestimmter Länge verbunden ist, worin jeder Massenmarker des Arrays, gegebenenfalls zusammen mit der bekannten Basensequenz, durch Massenspektrometrie mit dieser Basensequenz in Beziehung gesetzt werden kann, und worin jeder Massenmarker eine aus Nicotinsäure, Sinapinsäure und Zimtsäure ausgewählte Photo-Anregungsgruppe aufweist.
2. Array nach Anspruch 1, worin jeder Massenmarker in Bezug auf jeden anderen Massenmarker in dem Array eindeutig identifizierbar ist.
3. Array nach Anspruch 1 oder 2, worin die vorbestimmte Länge der Basensequenz 2 bis 25 beträgt.
4. Array nach einem der Ansprüche 1 bis 3, worin jeder Massenmarker abspaltbar an seiner betreffende bekannte Basensequenz gebunden ist und nach der Freisetzung davon durch Massenspektrometrie zu seiner Basensequenz in Beziehung gesetzt werden kann.
5. Array nach Anspruch 4, worin jeder Massenmarker durch eine durch Kollision spaltbare, durch Lichteinwirkung spaltbare, chemisch spaltbare oder thermisch spaltbare Bindung abspaltbar an die bekannte Basensequenz gebunden ist.
6. Array nach Anspruch 4 oder Anspruch 5, worin jeder Massenmarker durch eine Bindung, die in einem Massenspektrometer gespalten wird, abspaltbar an die bekannte Basensequenz gebunden ist.
7. Array nach einem der Ansprüche 4 bis 6, worin jeder Massenmarker unter Ionisierungsbedingungen negativ geladen wird.
8. Array nach einem der vorhergehenden Ansprüche, worin die bekannte Basensequenz ein kohäsives Ende (sticky end) eines Adaptor-Oligonucleotids umfasst, welches eine Erkennungssequenz für eine Restriktions-Endonuclease aufweist, die in einem vorbestimmten Abstand von der Erkennungssequenz spaltet.
9. Array nach einem der vorhergehenden Ansprüche, worin die bekannte Basensequenz eine Vielzahl von daran gebundenen identischen Massenmarkern aufweist.
10. Array nach einem der vorhergehenden Ansprüche, worin die Photo-Anregungsgruppe ein anregbares Ionisierungsmittel ist und für die Durchführung einer Matrix-assistierten Laser-Desorptions-Ionisierung geeignet ist.
11. Verwendung eines Arrays von Hybridisierungssonden, wie er in einem der vorhergehenden Ansprüche definiert ist, bei einem Verfahren zur Bestimmung der Hybridisierung der Sonden durch Massenspektrometrie der Massenmarker gegebenenfalls zusammen mit ihren jeweiligen bekannten Basensequenzen.
12. Verwendung einer Hybridisierungssonde, die einen an eine bekannte Basensequenz vorbestimmter Länge gebundenen Massenmarker umfasst, bei einem Verfahren zur Bestimmung der Hybridisierung der Sonde durch Massenspektrometrie des Massenmarkers gegebenenfalls zusammen mit der bekannten Basensequenz, worin der Massenmarker eine Photo-Anregungsgruppe ausgewählt aus Nicotinsäure, Sinapinsäure

und Zimtsäure umfasst.

13. Verwendung nach Anspruch 12, worin die vorbestimmte Länge der Basensequenz 2 bis 25 beträgt.
14. Verwendung nach Anspruch 12 oder 13, worin der Massenmarker abspaltbar an die bekannte Basensequenz gebunden ist.
15. Verwendung nach Anspruch 14, worin der Massenmarker durch eine Kollisions-spaltbare, durch Licht-einwirkung spaltbare, chemisch spaltbare oder thermisch spaltbare Bindung abspaltbar an die bekannte Basensequenz gebunden ist.
16. Verwendung nach Anspruch 14 oder Anspruch 15, worin der Massenmarker über eine Bindung, die in einem Massenspektrometer gespalten wird, abspaltbar an die bekannte Basensequenz gebunden ist.
17. Verwendung nach einem der Ansprüche 14 bis 16, worin der Massenmarker unter ionisierenden Bedingungen negativ geladen wird.
18. Verwendung nach einem der Ansprüche 14 bis 17, worin der Massenmarker durch Massenspektrometrie von der bekannten Basensequenz getrennt werden kann.
19. Verwendung nach einem der Ansprüche 12 bis 18, worin die bekannte Basensequenz ein kohäsives Ende eines Adaptor-Oligonucleotids aufweist, welches eine Erkennungssequenz für eine Restriktions-Endonuclease umfasst, die in einem vorbestimmten Abstand von der Erkennungssequenz spaltet.
20. Verwendung nach einem der Ansprüche 12 bis 19 zur Bestimmung der Hybridisierung der Probe in einer Polymerase-Kettenreaktion oder einer Ligase-Kettenreaktion.
21. Verwendung nach einem der Ansprüche 12 bis 20, worin die bekannte Basensequenz eine Vielzahl von daran gebundenen identischen Massenmarkern aufweist.
22. Verwendung nach einem der Ansprüche 12 bis 21, worin die Photo-Anregungsgruppe ein anregbares Ionisierungsmittel ist und für die Durchführung einer Matrix-assistierten Laser-Desorptions-Ionisierung geeignet ist.
23. Verwendung nach einem der Ansprüche 11 bis 22, worin das Verfahren ausschließlich on-line durchgeführt wird.
24. Verfahren zur Bestimmung der Hybridisierung eines Arrays von Sonden mit einer Target-Nucleinsäure, welches Verfahren darin besteht
 - (a) die Target-Nucleinsäure mit jeder Hybridisierungssonde des Arrays unter Bedingungen, bei denen die Sonde mit der Target-Nucleinsäure hybridisiert, in Kontakt zu bringen, und gegebenenfalls nicht hybridisiertes Material zu entfernen, worin jede Sonde einen Massenmarker aufweist, der an eine bekannte Basensequenz vorbestimmter Länge gebunden ist, worin jeder Massenmarker eine Photo-Anregungsgruppe aufweist ausgewählt aus Nicotinsäure, Sinapinsäure und Zimtsäure; und
 - (b) die hybridisierte Sonde durch Massenspektrometrie zu identifizieren.
25. Verfahren nach Anspruch 24, worin jeder Massenmarker abspaltbar an seine betreffende bekannte Basensequenz gebunden ist und jede hybridisierte Sonde zur Freisetzung des Massenmarkers gespalten wird, welcher freigesetzte Marker unter Verwendung eines Massenspektrometers identifiziert wird.
26. Verfahren zur Bestimmung der Hybridisierung einer Sonde mit einer Target-Nucleinsäure, welches Verfahren darin besteht
 - (a) die Target-Nucleinsäure mit einer Hybridisierungssonde, welche einen an eine bekannte Basensequenz vorbestimmter Länge gebundenen Massenmarker aufweist, unter Bedingungen, bei denen die Sonde mit der Target-Nucleinsäure hybridisiert, in Kontakt zu bringen und gegebenenfalls nicht hybridisiertes Material zu entfernen, worin der Massenmarker eine aus Nicotinsäure, Sinapinsäure und Zimtsäure ausgewählte Photo-Anregungsgruppe aufweist, und
 - (b) die hybridisierte Sonde durch Massenspektrometrie zu identifizieren.
27. Verfahren nach Anspruch 26, worin der Massenmarker abspaltbar an seine betreffende bekannte Ba-

sensequenz gebunden ist und die hybridisierte Sonde zur Freisetzung des Massenmarkers gespalten wird, welcher freigesetzte Massenmarker unter Verwendung eines Massenspektrometers identifiziert wird.

28. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 27, worin der oder die Sonde(n) zur Matrix-unterstützte Laser-Desorptions-Ionisations-Massenspektrometrie analysiert wird.

29. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 28, worin die vorbestimmte Länge der Basensequenz 2 bis 25 beträgt.

30. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 29, worin die oder jeder Massenmarker durch eine Kollisions-spaltbare, durch Lichteinwirkung spaltbare, chemisch spaltbare oder thermisch spaltbare Bindung abspaltbar an die bekannte Basensequenz gebunden ist.

31. Verfahren nach einem der Ansprüche 25 oder 27 bis 30, worin die Bindung in dem Massenspektrometer gespalten wird.

32. Verfahren nach Anspruch 31, worin die Spaltung der Bindung durch Laser-Photospaltung ausgelöst wird.

33. Verfahren nach Anspruch 31, worin die Spaltung der Bindung durch Kollision ausgelöst wird.

34. Verfahren nach einem der Ansprüche 25 oder 27 bis 33, worin jeder Massenmarker unter Ionisierungsbedingungen negativ geladen wird.

35. Verfahren nach einem der Ansprüche 25 oder 27 bis 34, worin die Massenmarker und die bekannten Basensequenzen vor dem Eintreten in den Massenspektrometer nicht getrennt werden.

36. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 35, worin die bekannte Basensequenz ein kohäsives Ende eines Adaptor-Oligonucleotids umfasst, welches eine Erkennungssequenz für eine Restriktions-Endonuclease aufweist, die in einem vorbestimmten Abstand von der Erkennungssequenz spaltet.

37. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 36, worin die bekannte Basensequenz eine Vielzahl von daran gebundenen identischen Massenmarkern aufweist.

38. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 37, worin die Photo-Anregungsgruppe ein anregbares Ionisierungsmittel ist und für die Durchführung einer Matrix-unterstützten Laser-Desorptions-Ionisierung geeignet ist.

39. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 38, welches on-line durchgeführt wird.

40. Verwendung eines Arrays, wie es in einem der Ansprüche 1 bis 10 definiert ist, für das Ablesen eines Oligonucleotid-Chips.

41. Verwendung eines Arrays, wie er in einem der Ansprüche 1 bis 10 definiert ist, in einem kompetitiven Bindungsassay zur Identifizierung eines Oligonucleotid-Bindungsmittels.

42. Verwendung eines Arrays, wie er in einem der Ansprüche 1 bis 10 definiert ist, bei einer Polymerase-Kettenreaktion oder einer Ligase-Kettenreaktion zur Sondierung vorbestimmter Sequenzen.

43. Verfahren zur Charakterisierung von cDNA, welches Verfahren darin besteht:

- (a) eine Probe, die eine Population aus einer oder mehreren cDNAs umfasst, mit einer Restriktions-Endonuclease zu spalten und Fragmente, die ein Ende der cDNA aufweisen, deren Restriktionssequenz eine Restriktionssequenz proximal zu dem Ende der cDNA ist, zu isolieren;
- (b) die isolierten Fragmente mit einer ersten probenbildenden Endonuclease an einer ersten Probensequenz bekannten Abstands von der Referenz-Stelle zu spalten, zur Erzeugung eines ersten und zweiten Sub-Fragments, die jeweils eine Sequenz vorbestimmter Länge mit kohäsivem Ende und eine unbekannte Sequenz umfassen, wobei das erste Sub-Fragment das Ende der cDNA aufweist;
- (c) entweder die ersten oder zweiten Sub-Fragmente gemäß ihrer Sequenz mit kohäsivem Ende unter Bildung von Sub-Populationen zu sortieren und die Sequenz mit kohäsivem Ende einer jeden Sub-Population als erstes kohäsives Ende aufzuzeichnen;

(d) die Sub-Fragmente in jeder Sub-Population mit einer zweiten probenbildenden Endonuclease, welche die gleiche ist wie oder verschieden ist von der ersten probenbildenden Endonuclease an einer zweiten Probenbildungsstelle bekannten Abstands von der ersten Probenbildungsstelle zu spalten, um aus jedem Sub-Fragment ein weiteres Sub-Fragment zu erzeugen, welches eine zweite Sequenz mit kohäsivem Ende vorbestimmter Länge und eine unbekannte Sequenz aufweist; und

(e) jede zweite Sequenz mit kohäsivem Ende zu bestimmen;

worin die Aggregatlänge der ersten und zweiten Sequenzen mit kohäsivem Ende eines jeden Sub-Fragments 6 bis 10 beträgt, die Sequenzen und relativen Positionen der Referenz-Stelle der ersten und zweiten kohäsiven Enden die oder jede cDNA kennzeichnen, wobei die erste probenbildende Endonuclease an eine erste Erkennungssequenz bindet und an der ersten Probenbildungsstelle in einem vorbestimmten Abstand von der Restriktionsstelle der Restriktions-Endonuclease spaltet, und worin die ersten und/oder zweiten Erkennungssequenzen in ersten und/oder zweiten Adaptor-Oligonucleotiden eines Arrays gemäß Anspruch 8 vorgesehen sind, und an die Restriktionsstelle der isolierten Fragmente hybridisieren.

44. Verfahren zur Nucleinsäure-Sequenzierung, welches darin besteht:

(a) eine Target-Nucleinsäure-Population zu gewinnen, welche Nucleinsäurefragmente umfasst, bei der jedes Fragment in einer eindeutigen Menge vorhanden ist und an einem Ende eine Sequenz mit kohäsivem Ende vorbestimmter Länge und eine unbekannte Sequenz aufweist,

(b) das andere Ende jeden Fragments zu schützen, und

(c) jedes der Fragmente zu sequenzieren durch

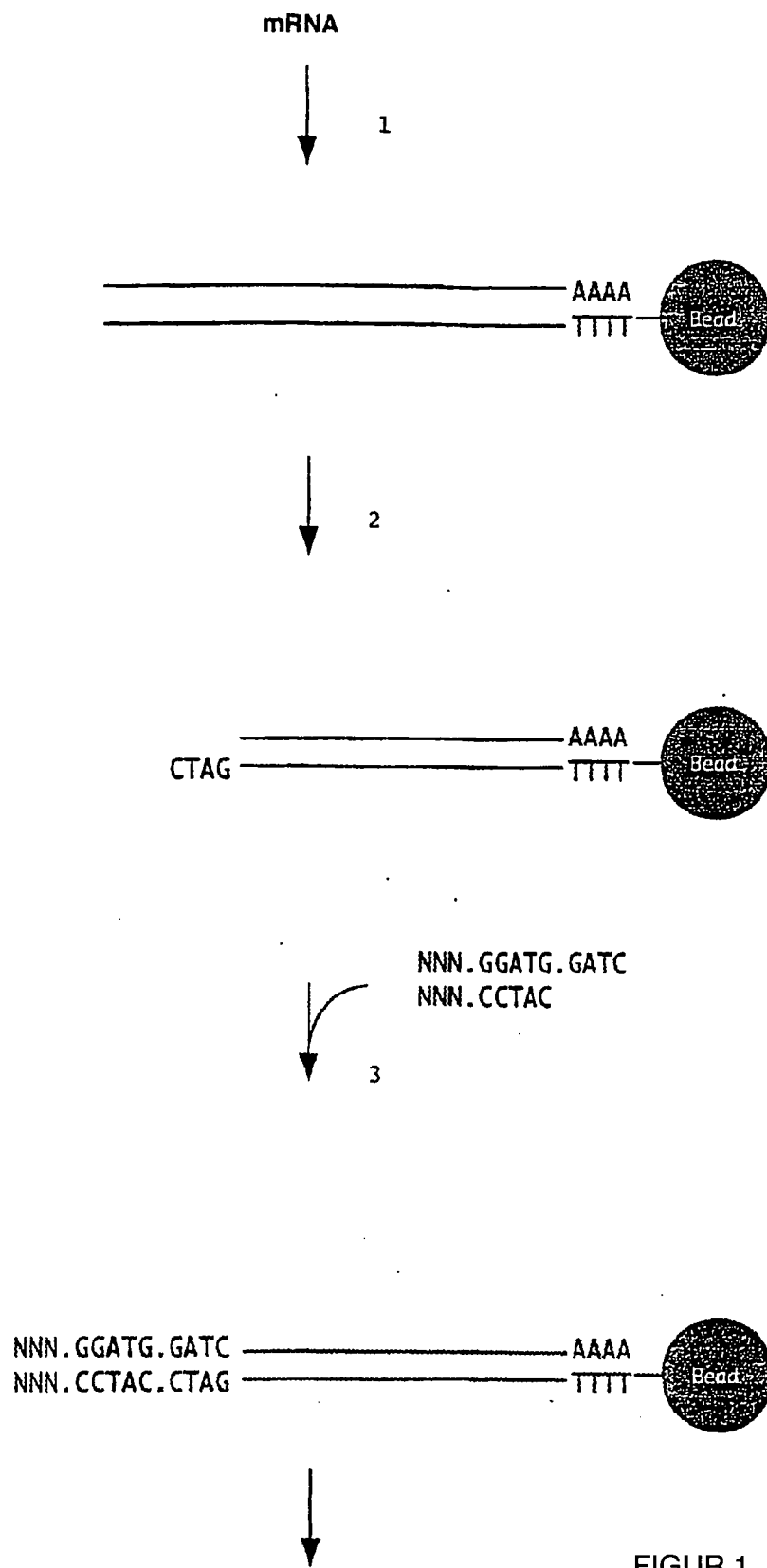
(i) Inkontaktbringen der Fragmente unter Hybridisierungsbedingungen in Gegenwart einer Ligase mit einem Array nach Anspruch 8, dessen Basensequenz die gleiche vorbestimmte Länge wie die Sequenz mit kohäsivem Ende aufweist und der Array sämtliche möglichen Basensequenzen der vorbestimmten Länge enthält; irgendein gebundenes Adaptor-Oligonucleotid zu entfernen und die Menge irgendwelchen gebundenen Adaptor-Oligonucleotids zu bestimmen durch Freisetzen des Massenmarkers und Identifizieren des freigesetzten Massenmarkers durch Massenspektrometrie;

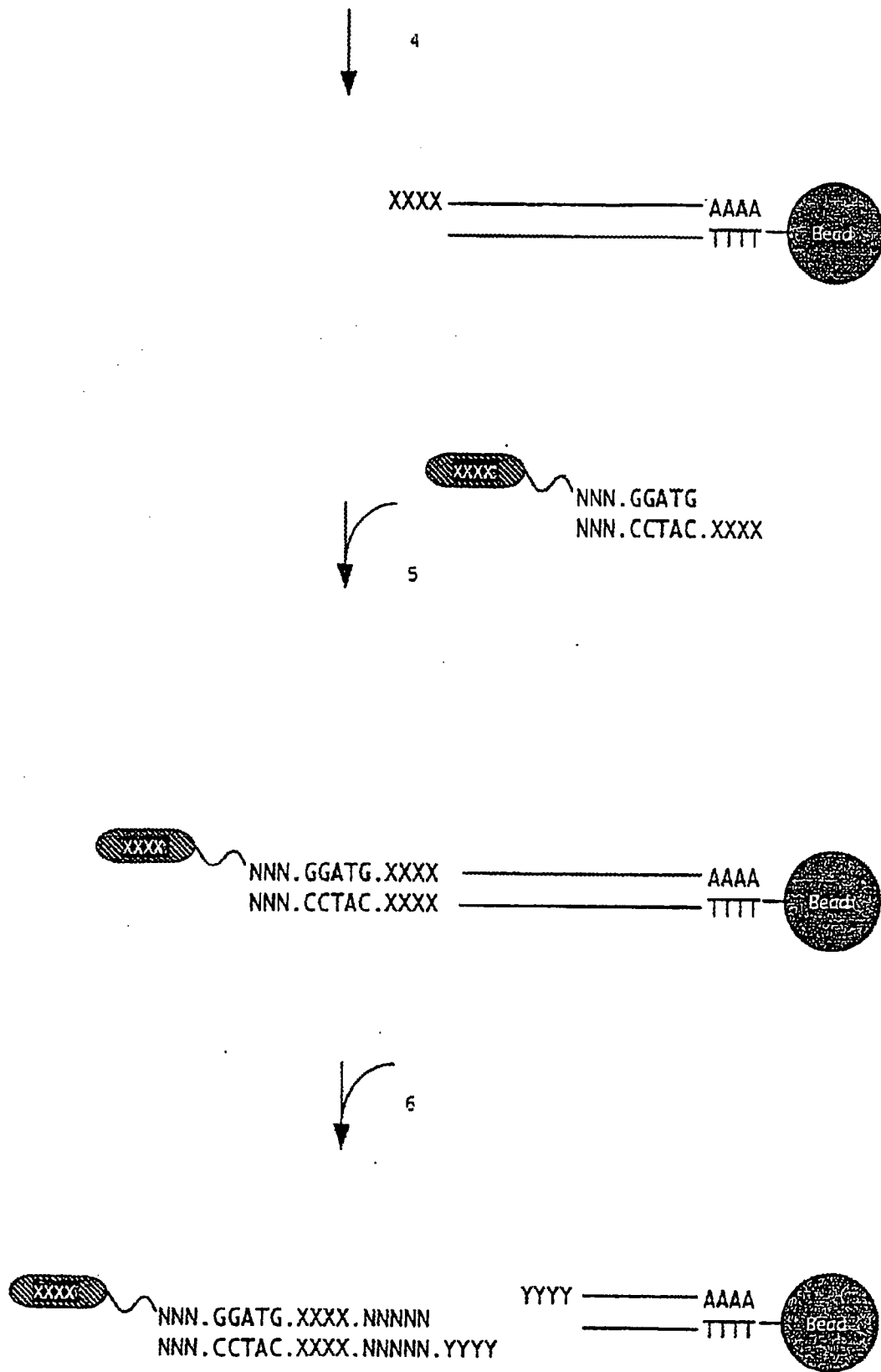
(ii) Inkontaktbringen der gebundenen Adaptor-Oligonucleotide mit einem Sequenzierungsenzym, welches an die Erkennungssequenz bindet und das Fragment spaltet unter Freisetzung einer neuen Sequenz mit kohäsivem Ende, welche an die vorausgehende Sequenz mit kohäsivem Ende angrenzt oder sie überlappt; und

(iii) Wiederholen der Schritte (i) und (ii) ausreichend oft und Bestimmen der Sequenz des Fragments durch Vergleichen der für jede Sequenz mit kohäsivem Ende aufgezeichneten Mengen.

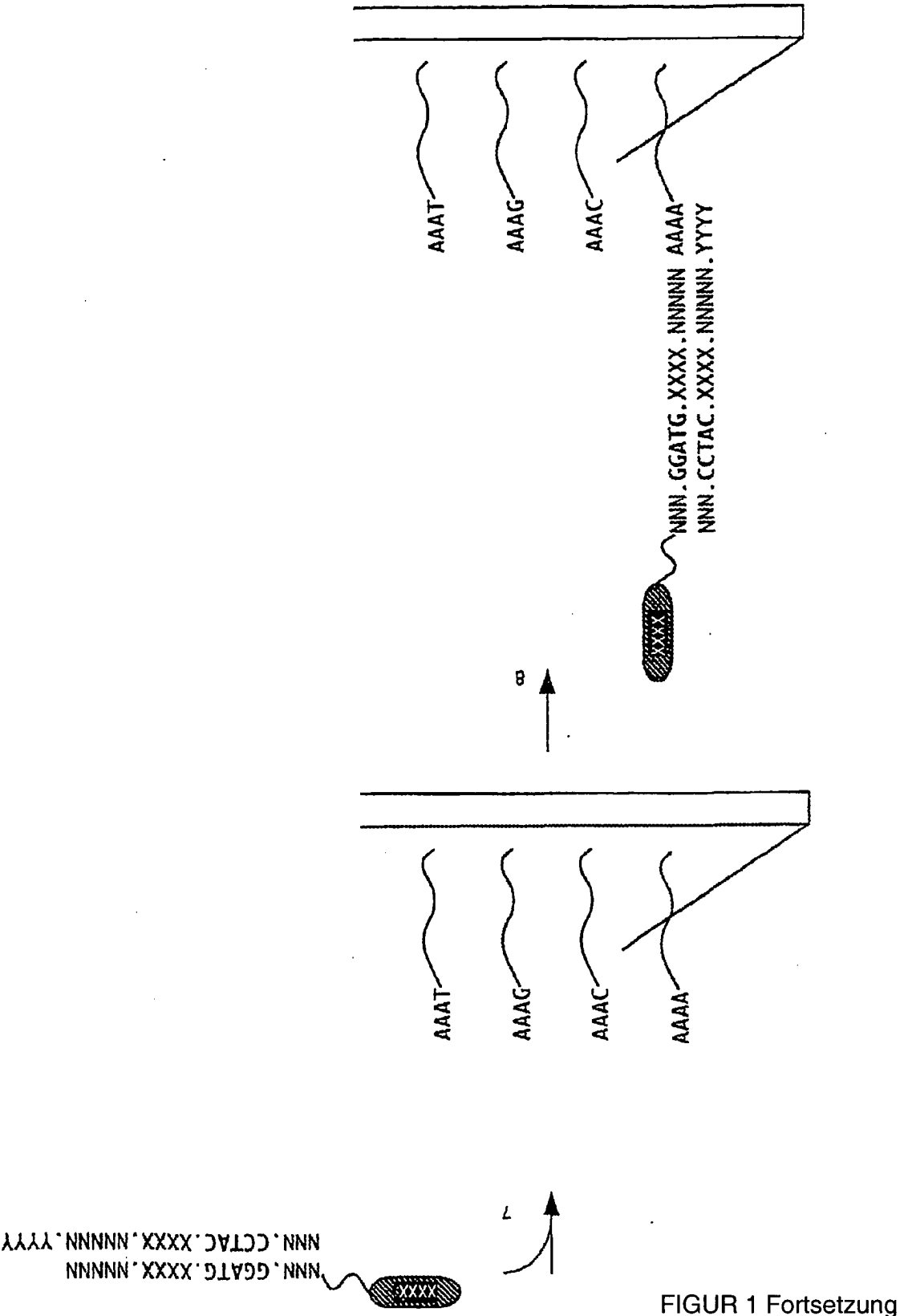
Es folgen 30 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

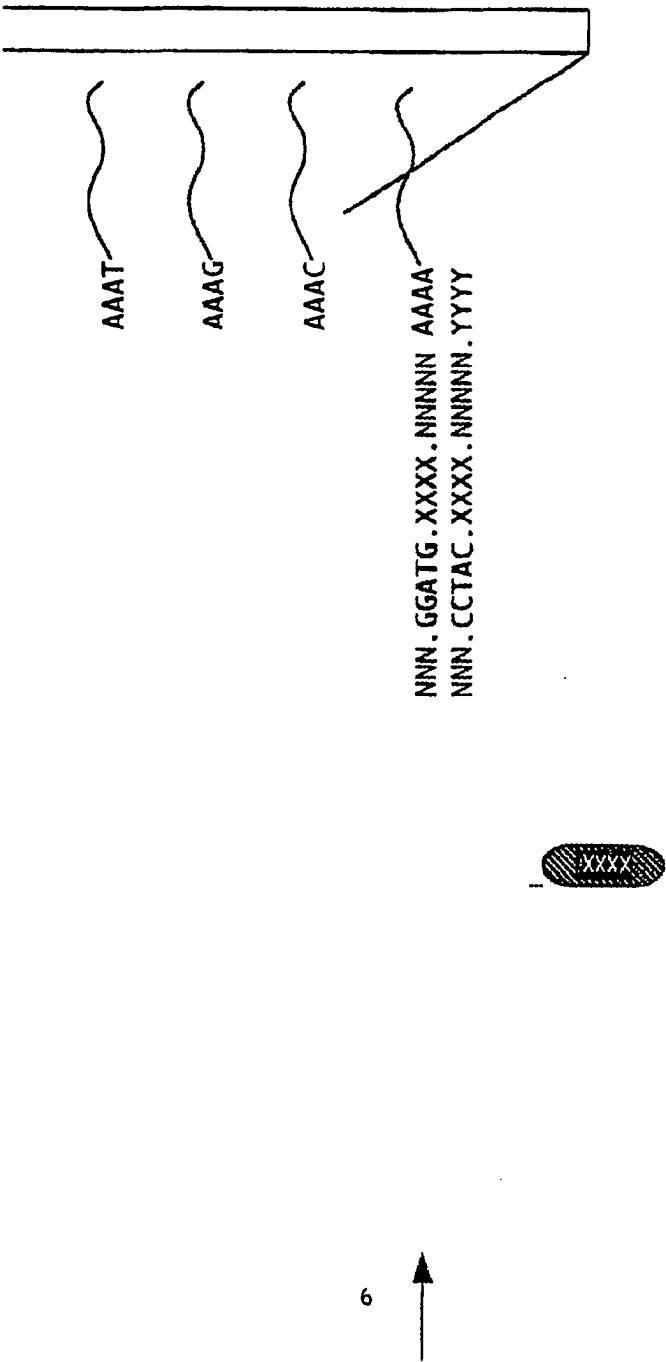




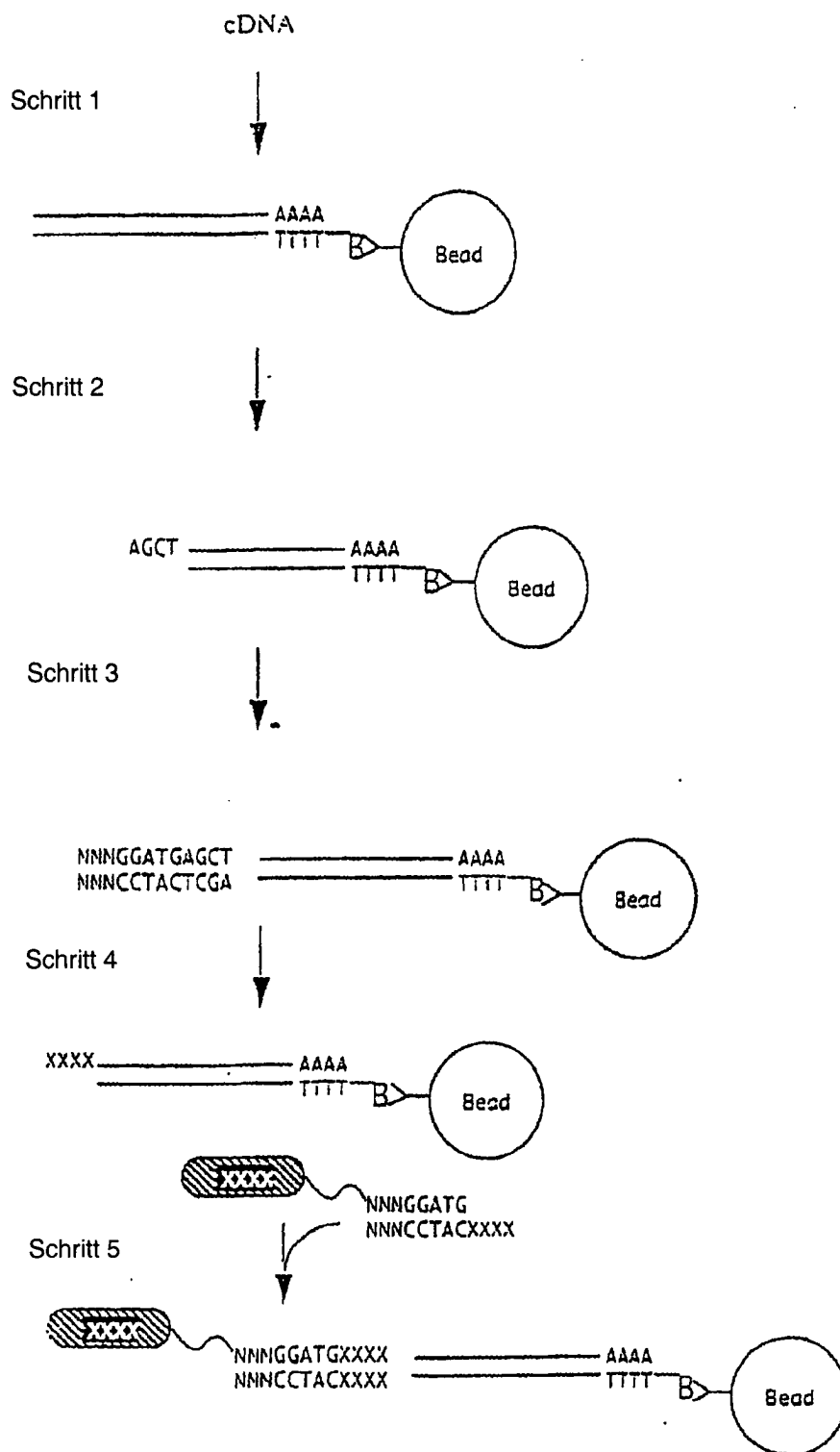
FIGUR 1 Fortsetzung



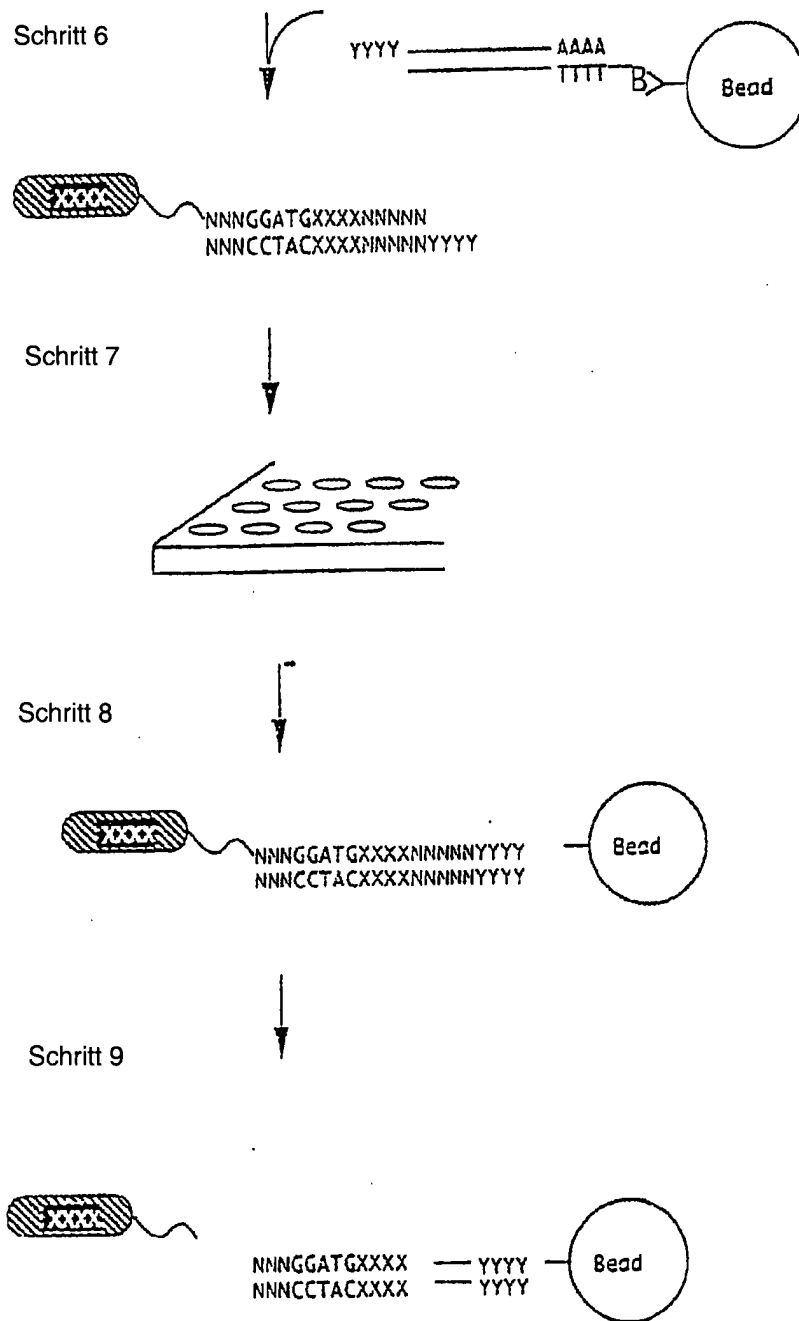
FIGUR 1 Fortsetzung



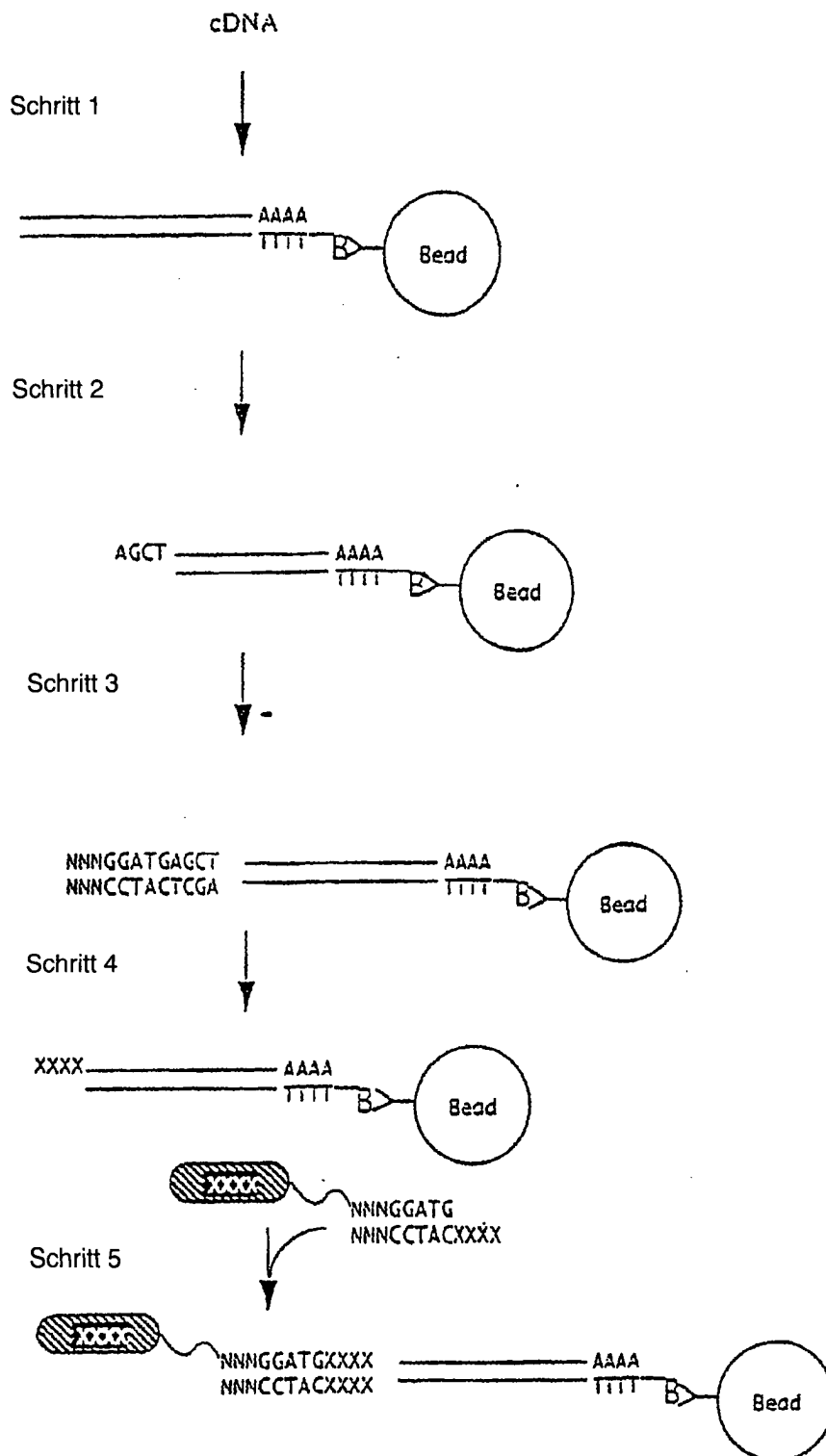
FIGUR 1 Fortsetzung



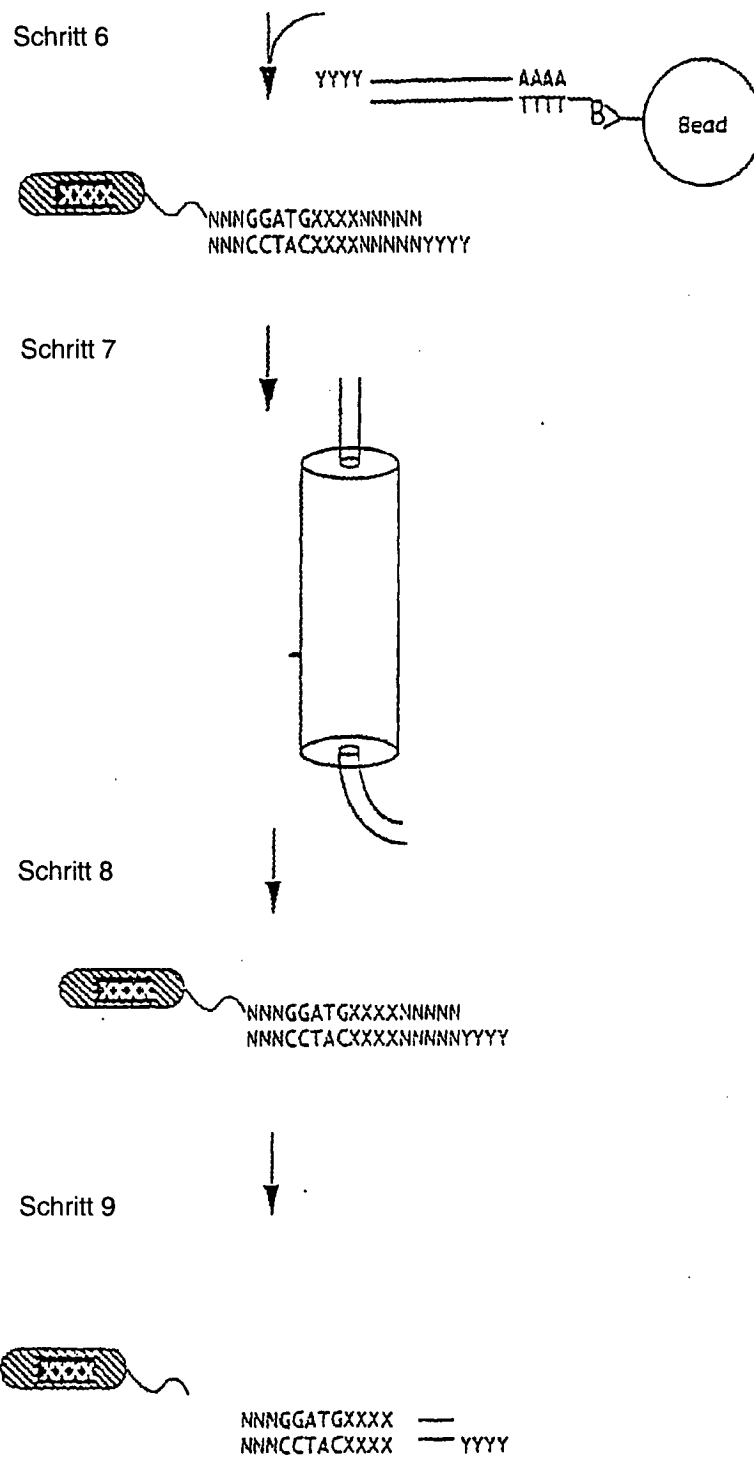
FIGUR 2a



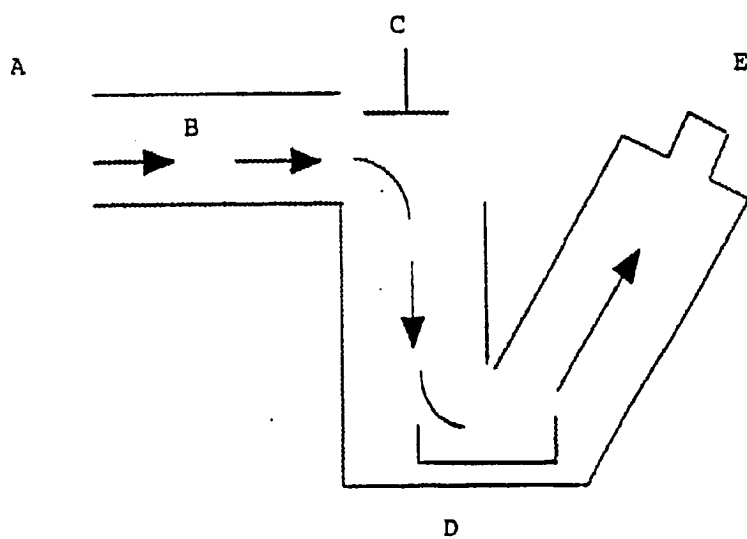
FIGUR 2b



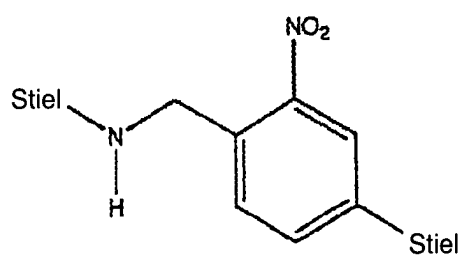
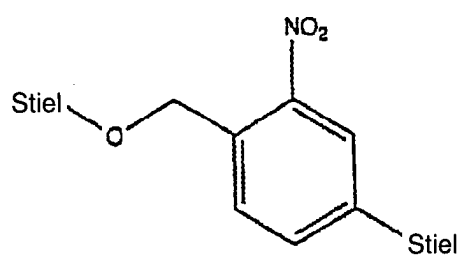
FIGUR 3a



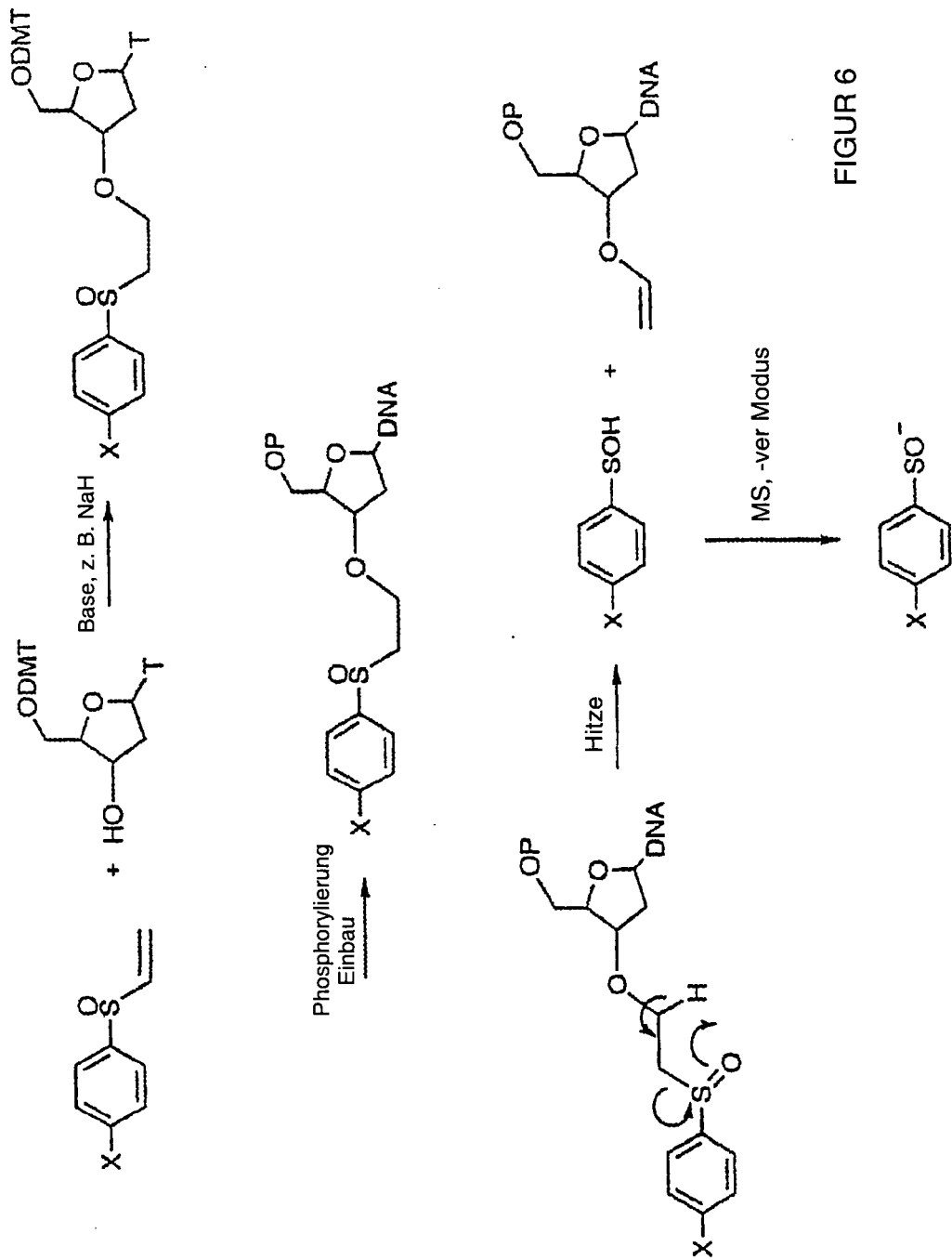
FIGUR 3b

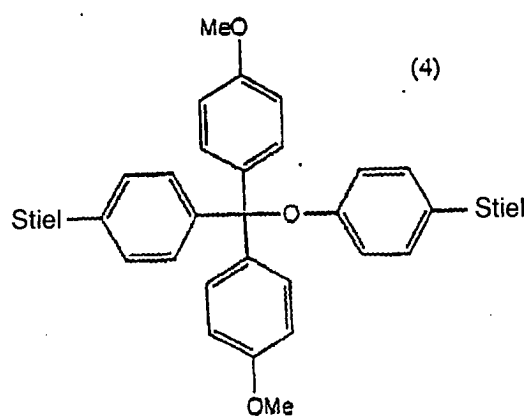
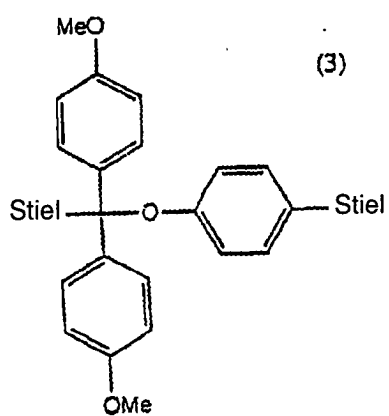
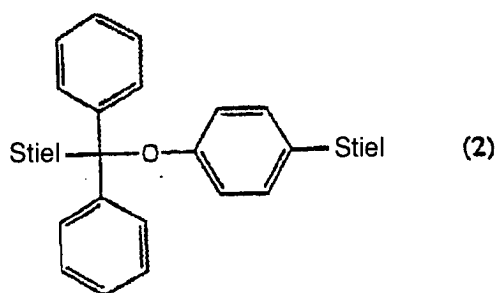
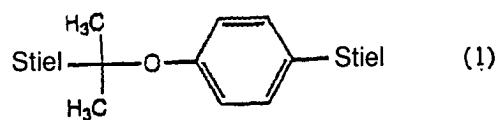


FIGUR 4

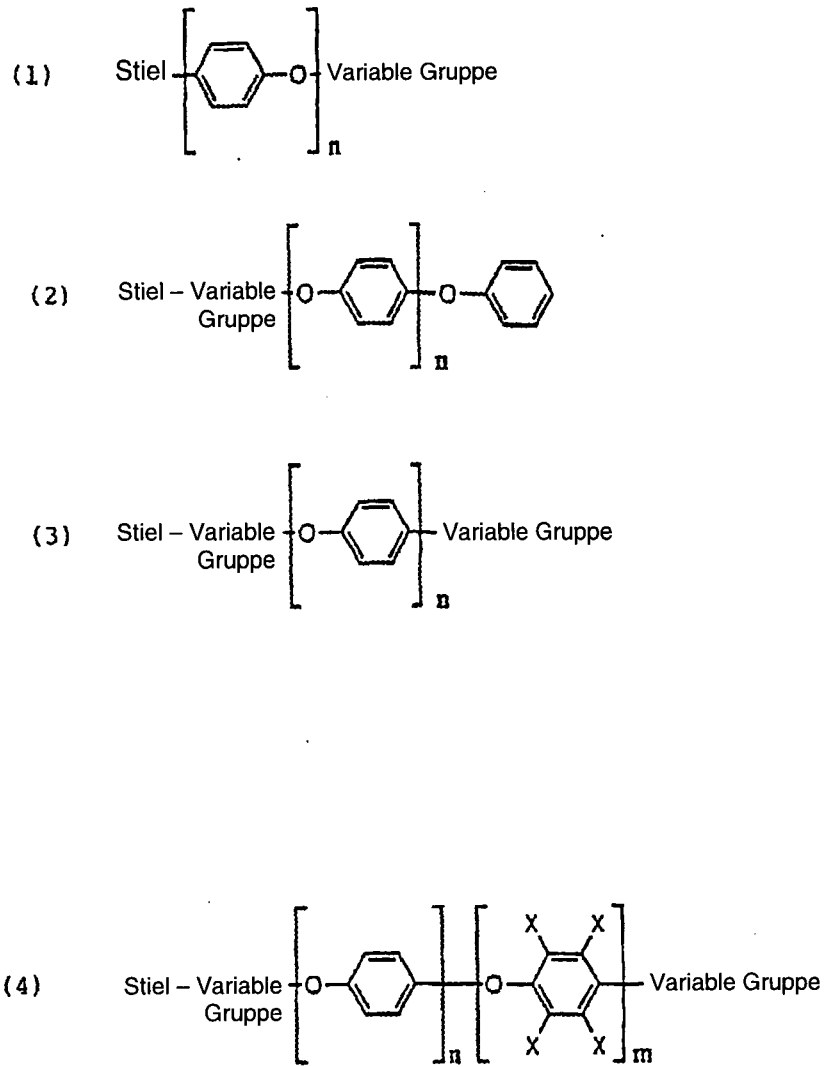


FIGUR 5

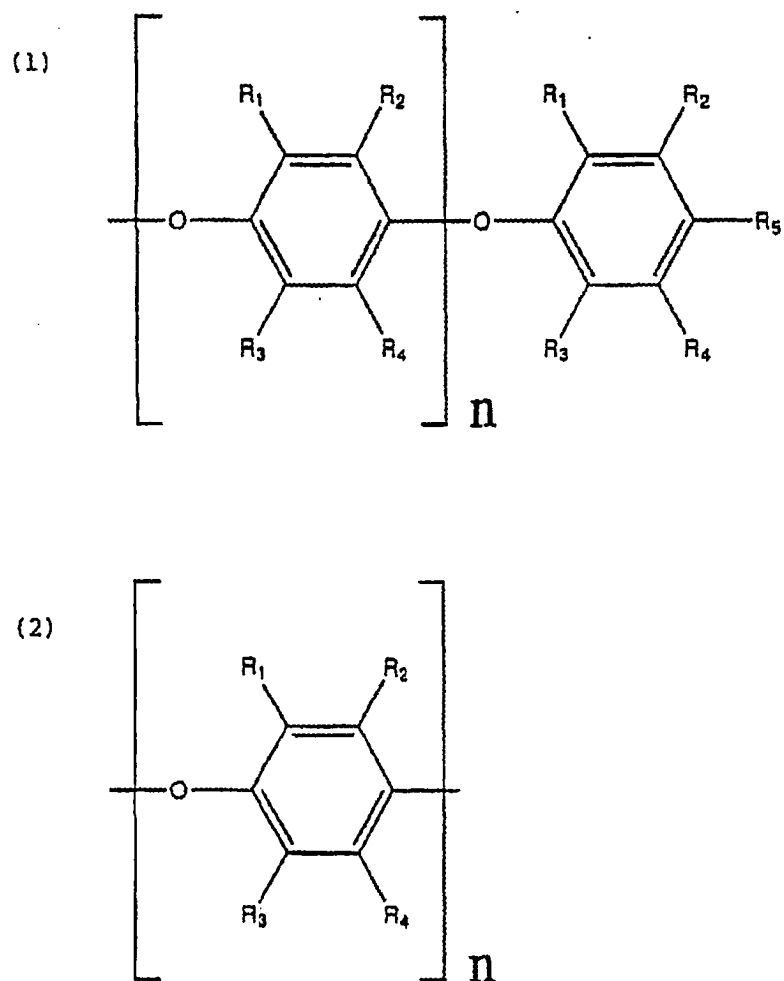




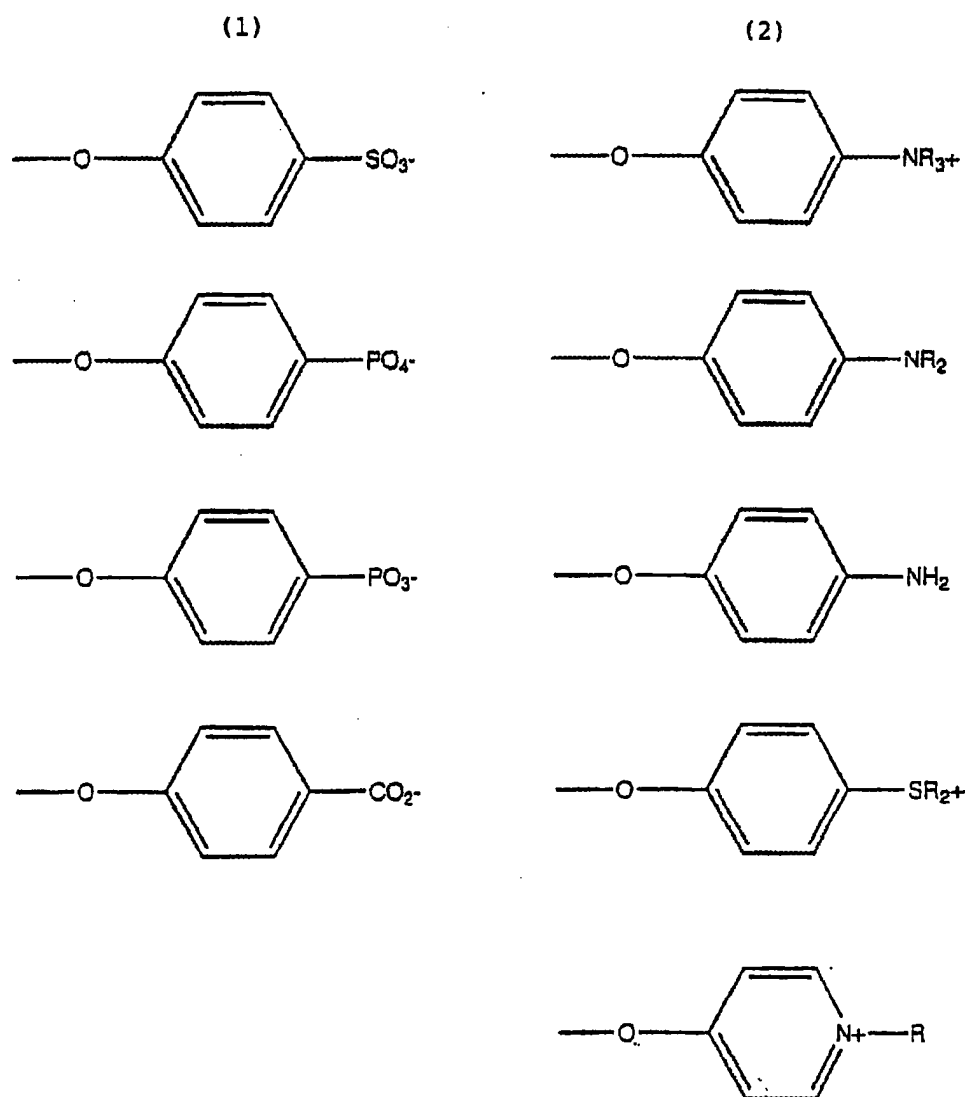
FIGUR 7



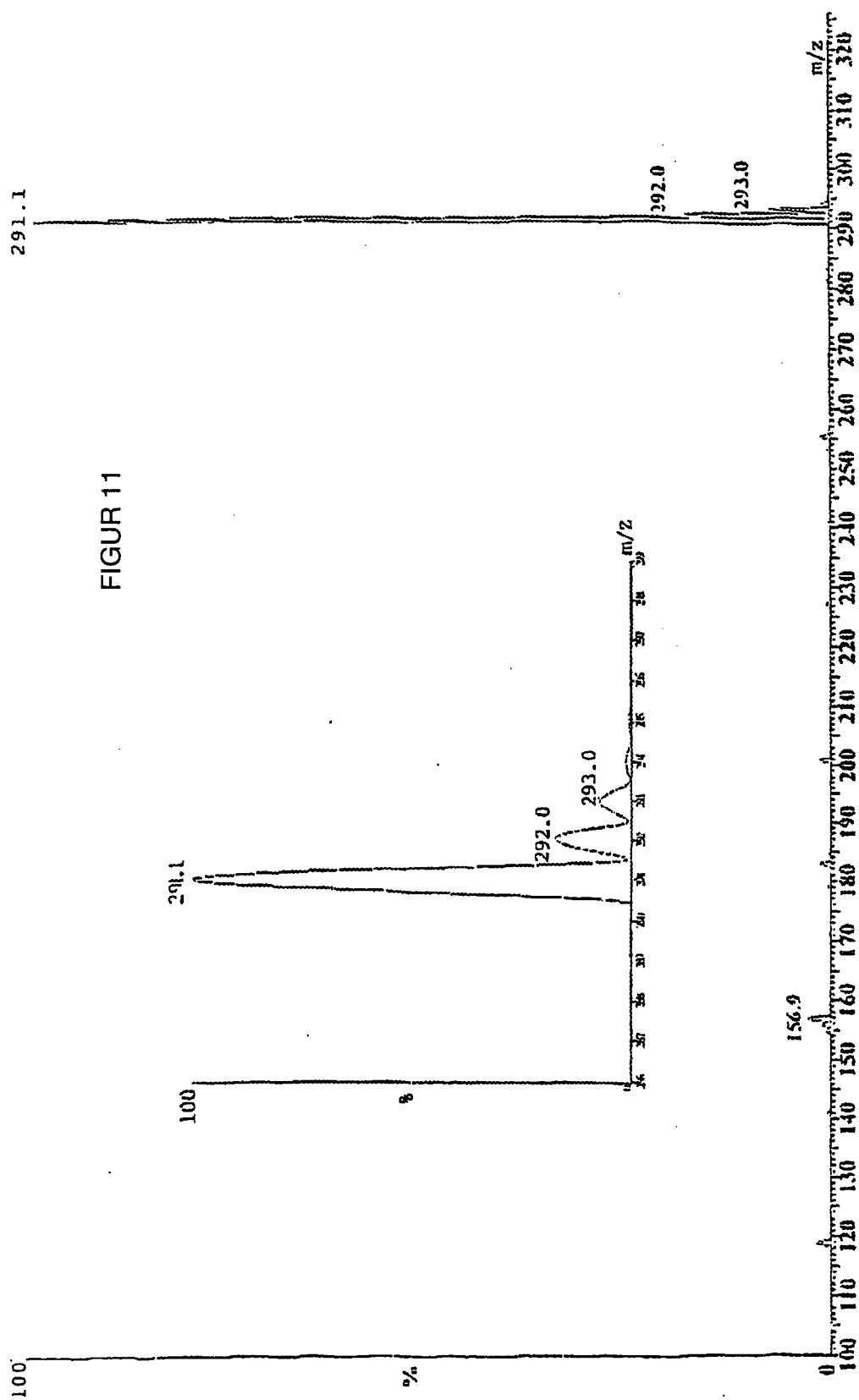
FIGUR 8



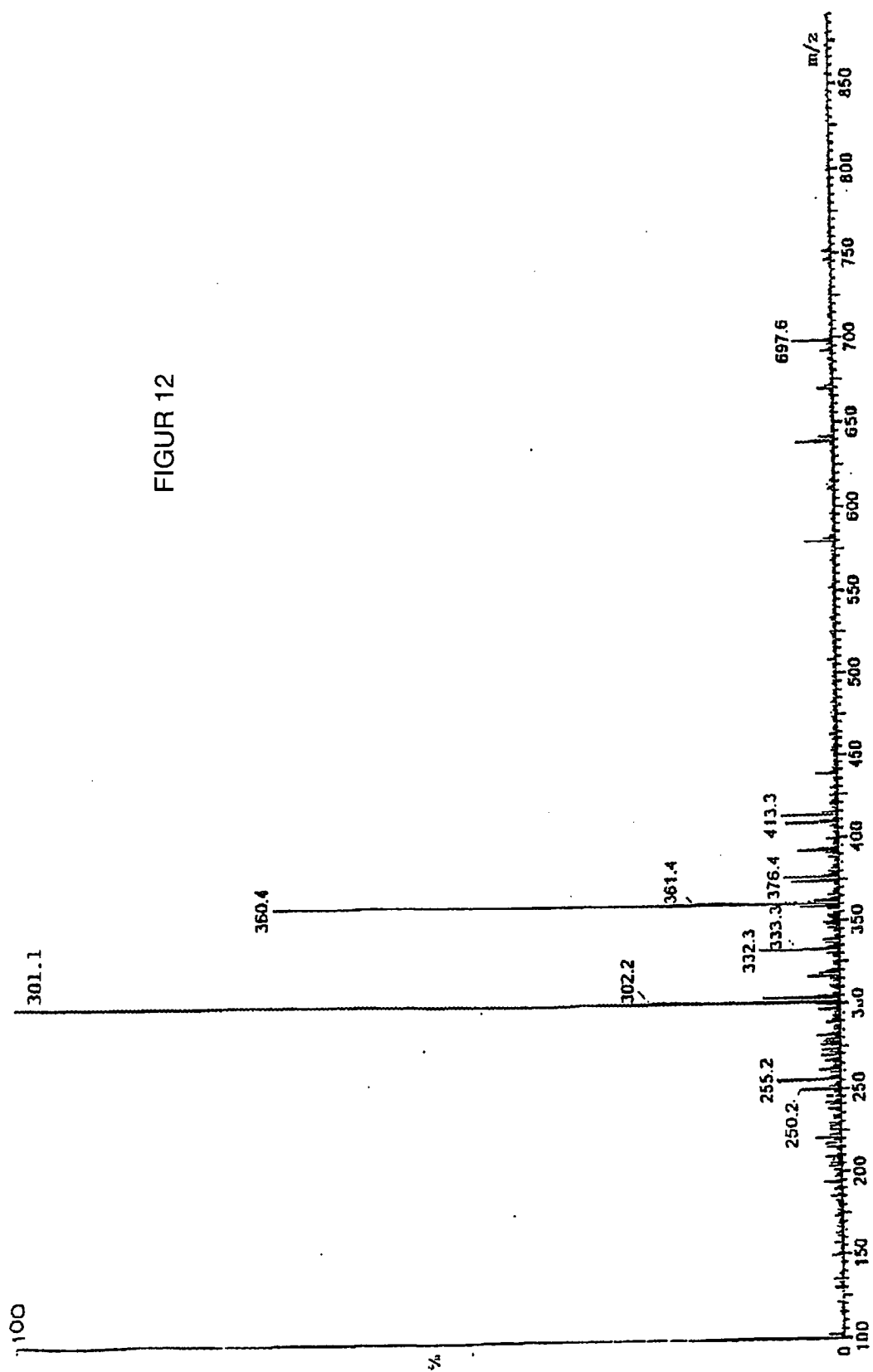
FIGUR 9



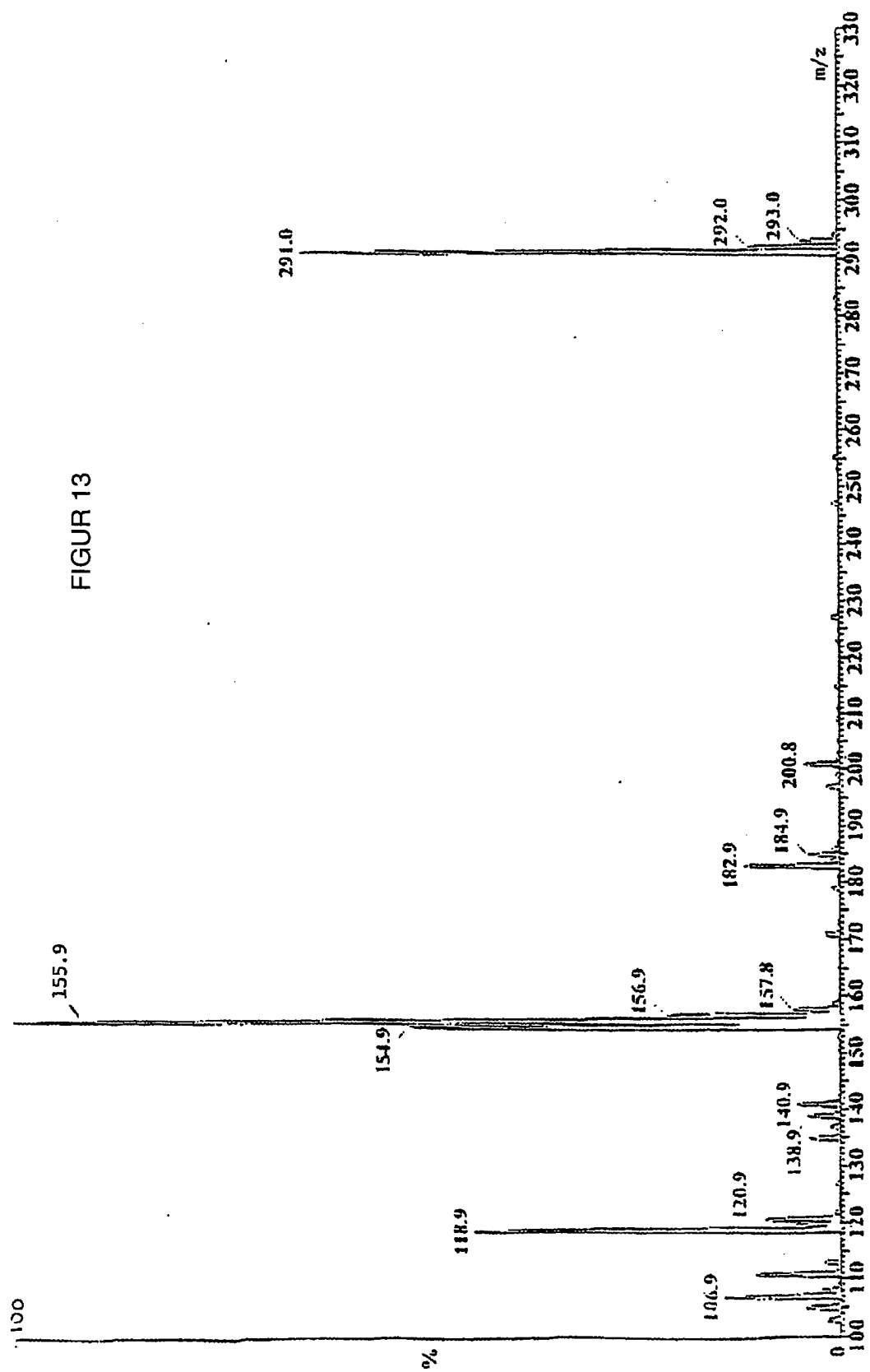
FIGUR 10

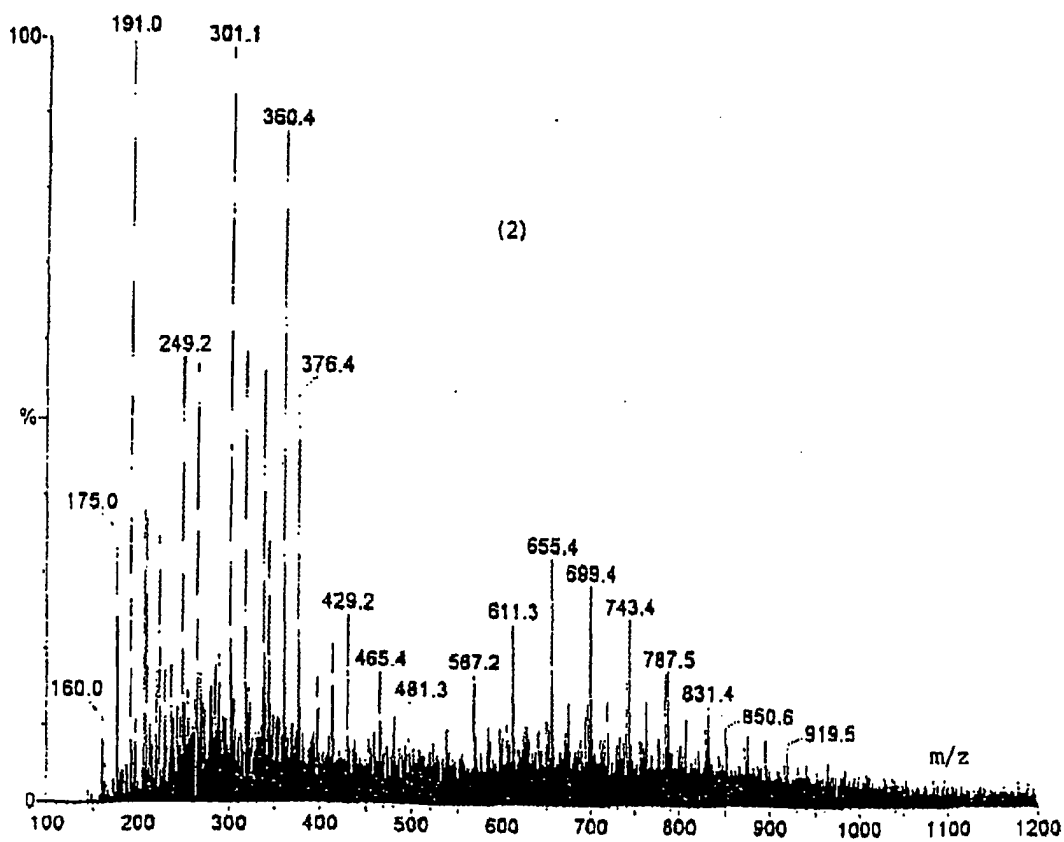
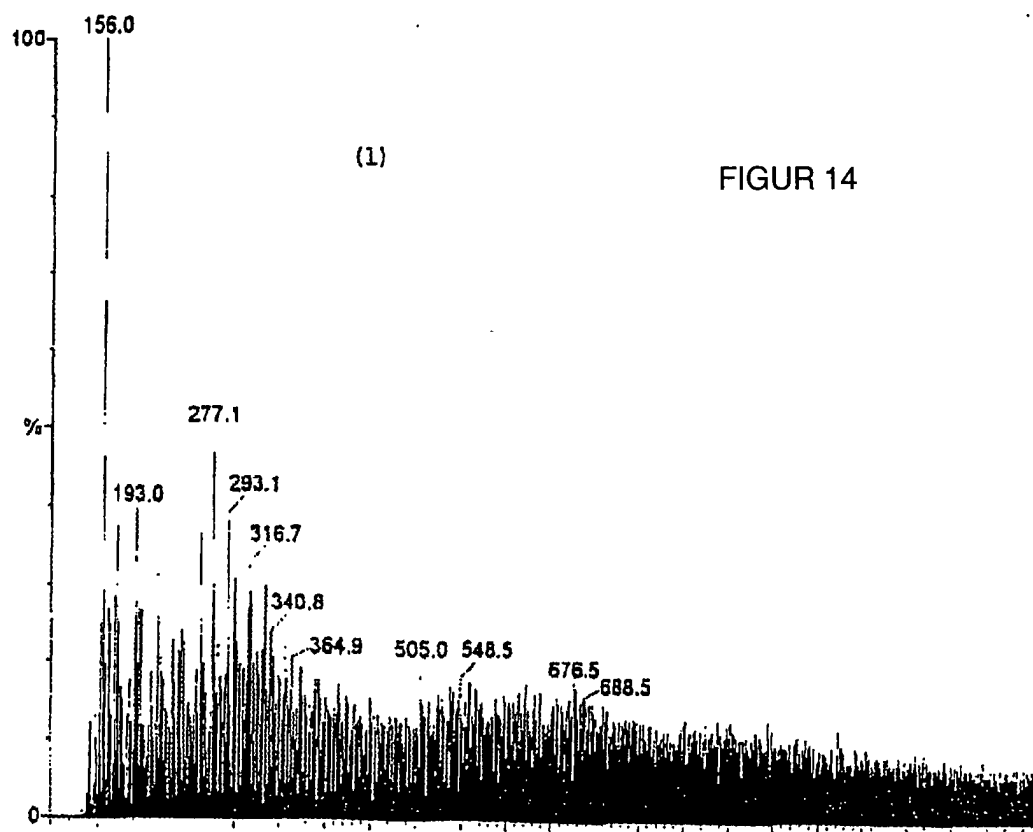


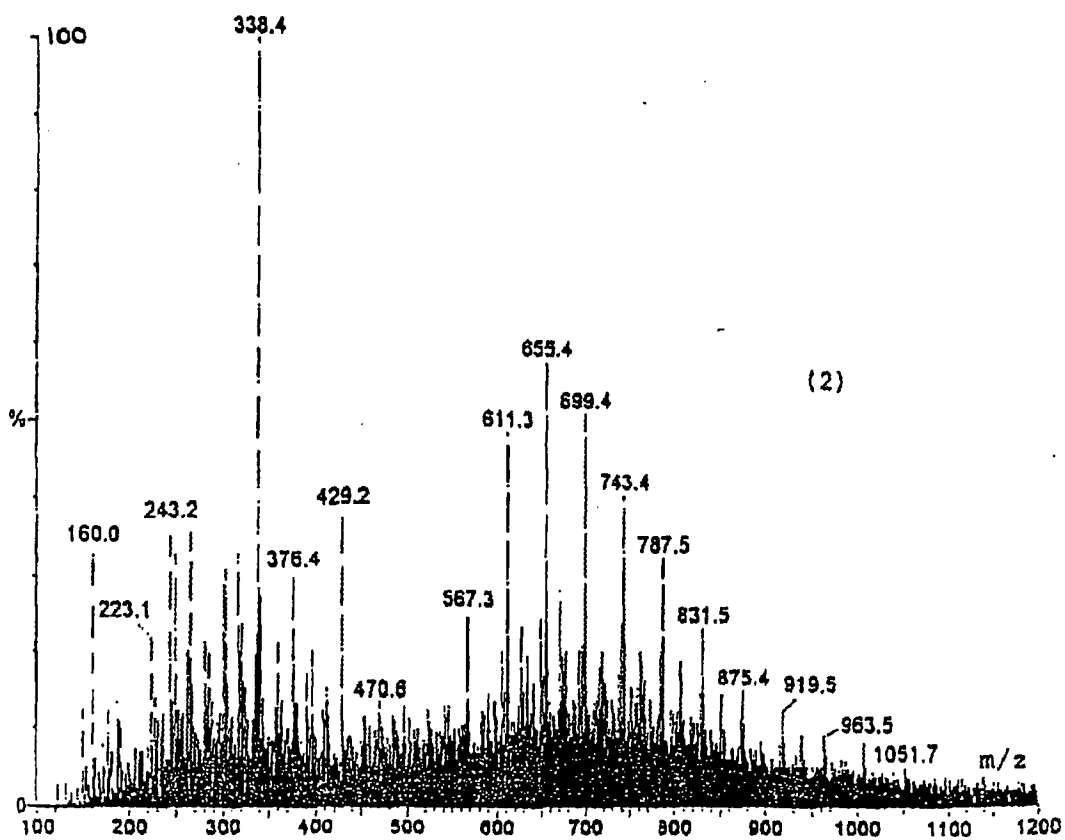
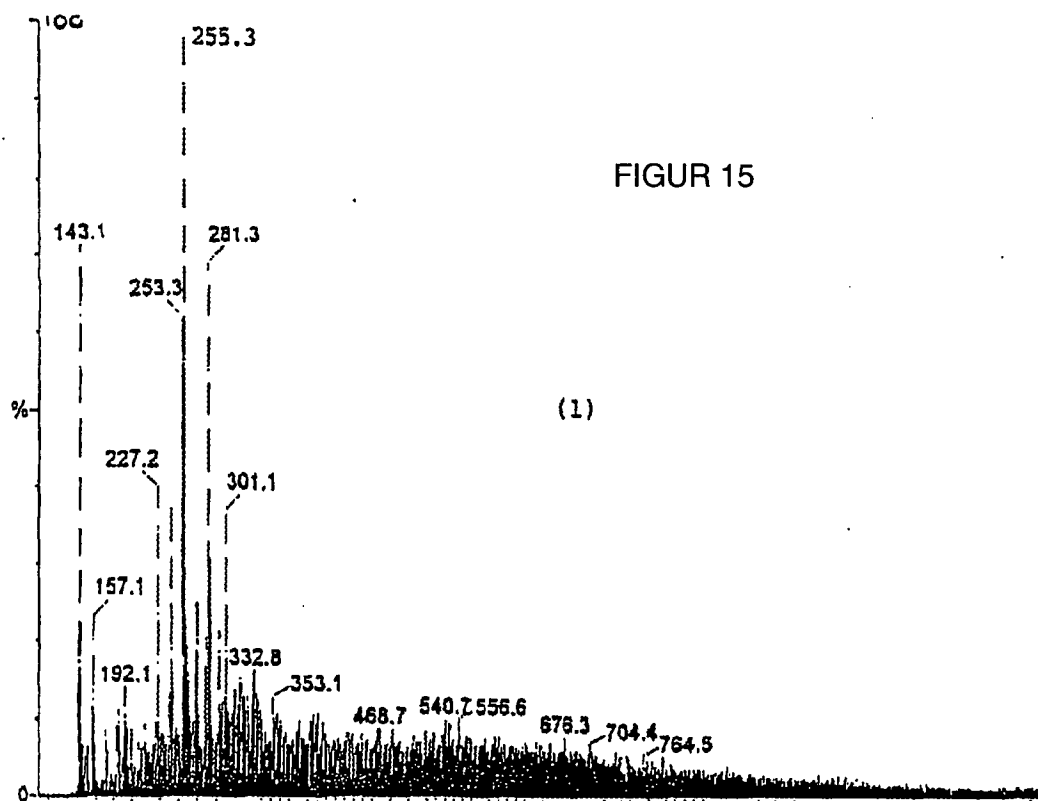
FIGUR 12

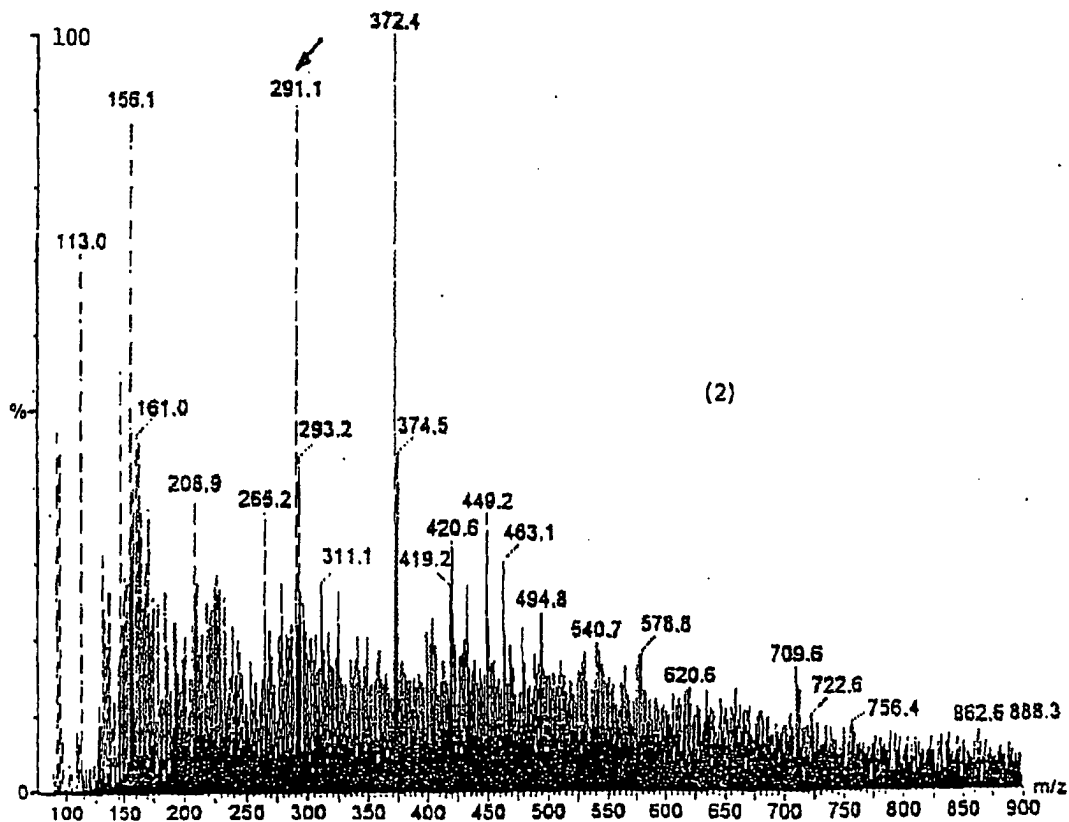
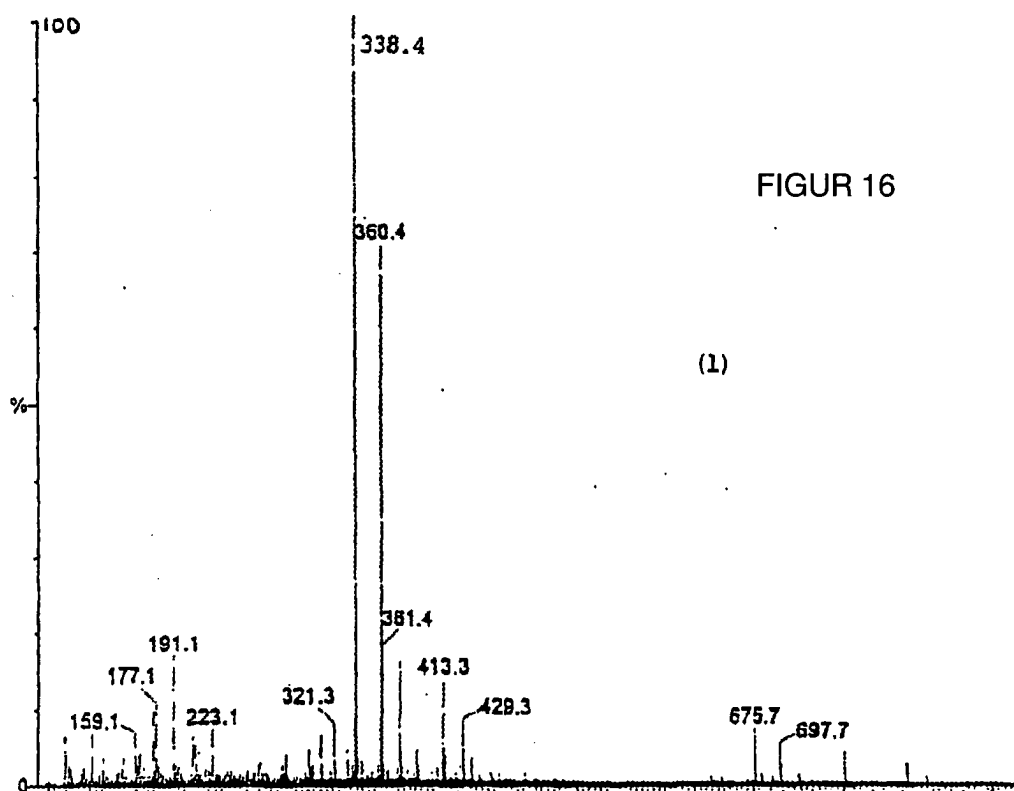


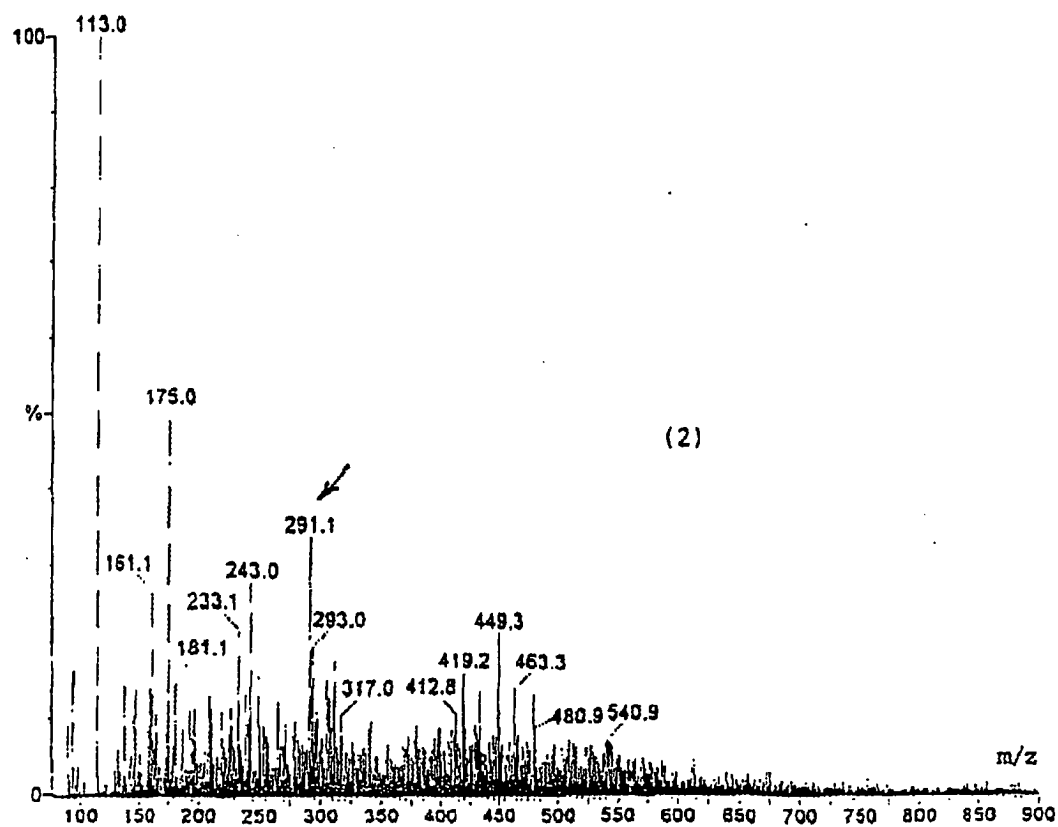
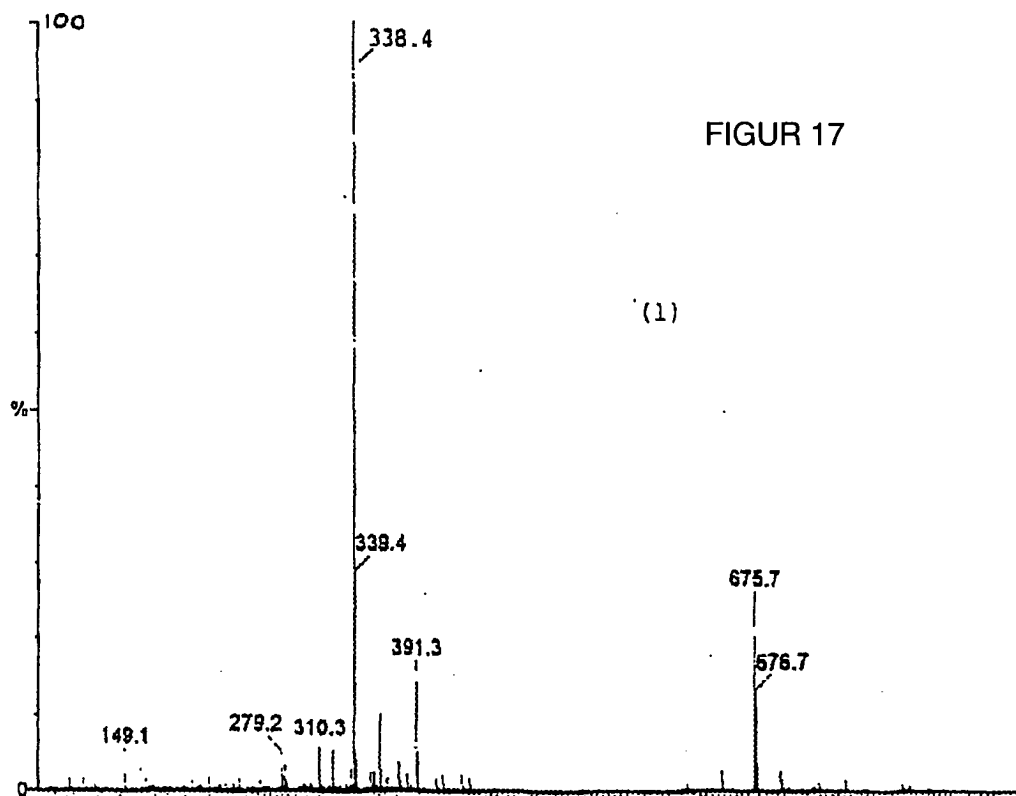
FIGUR 13

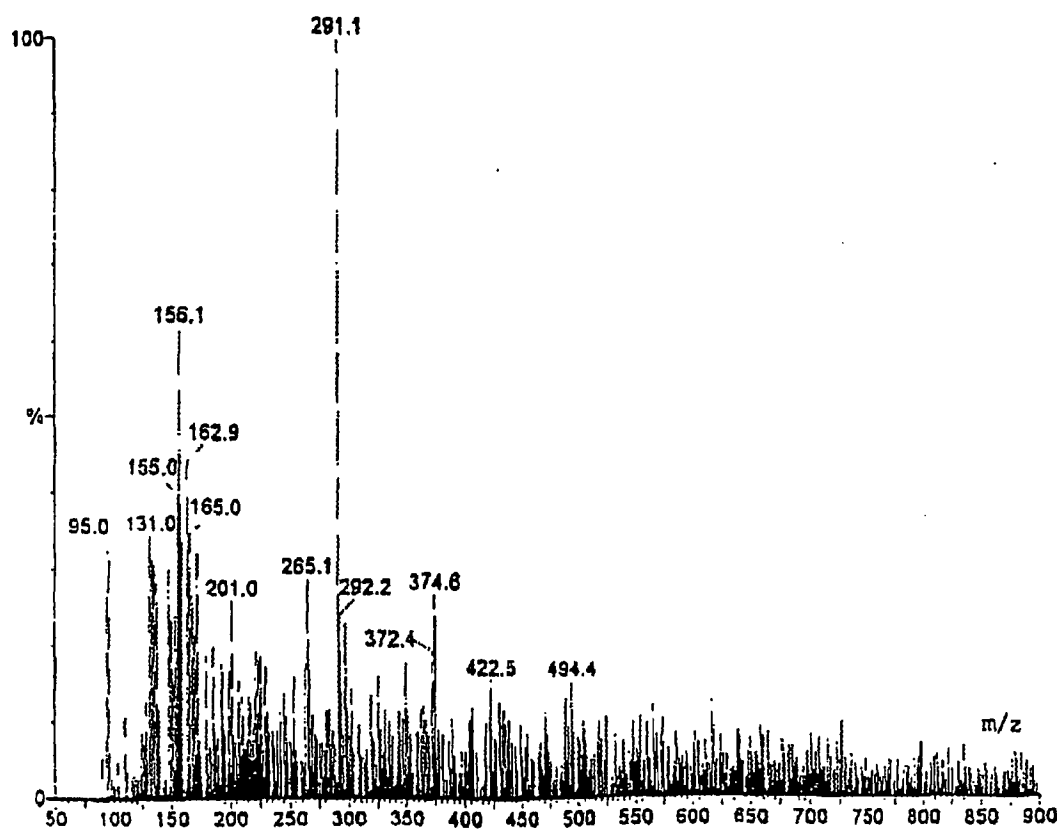
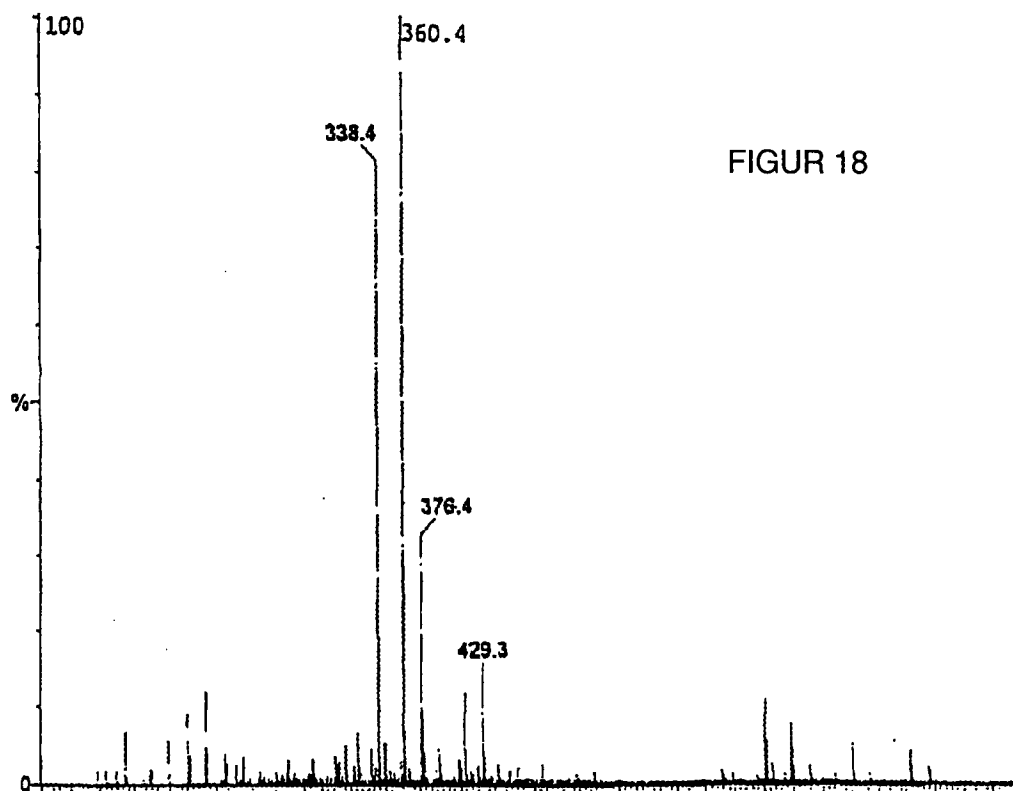


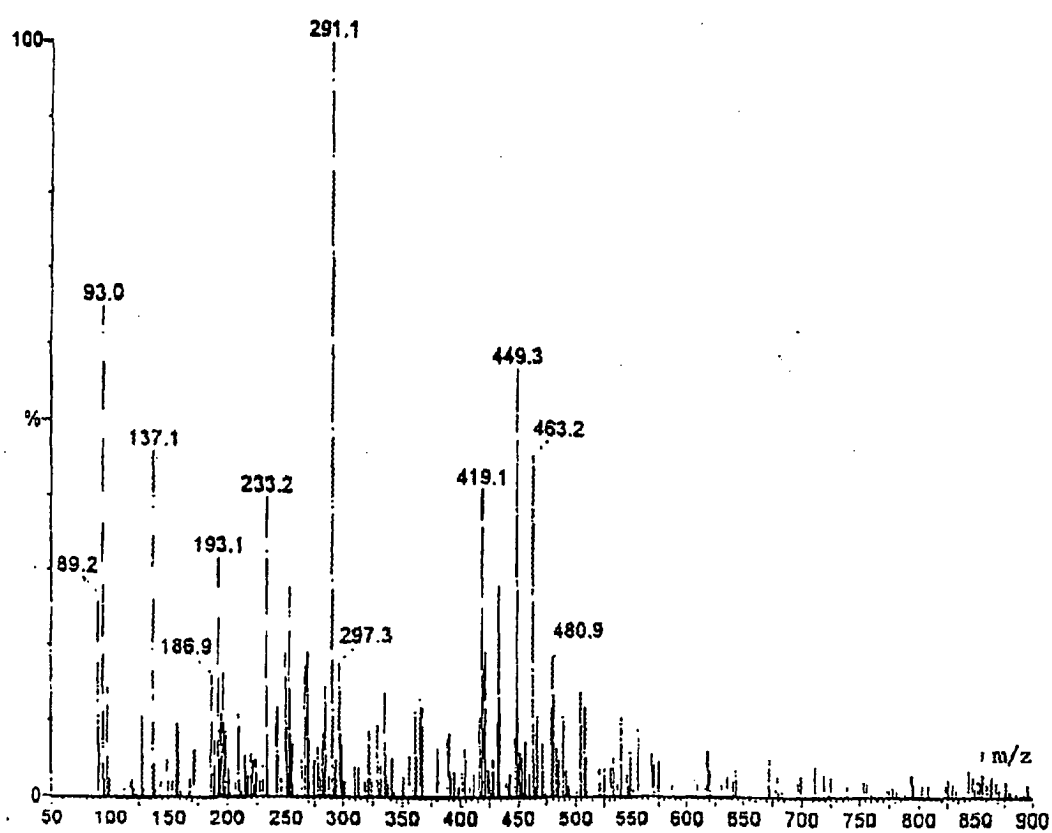
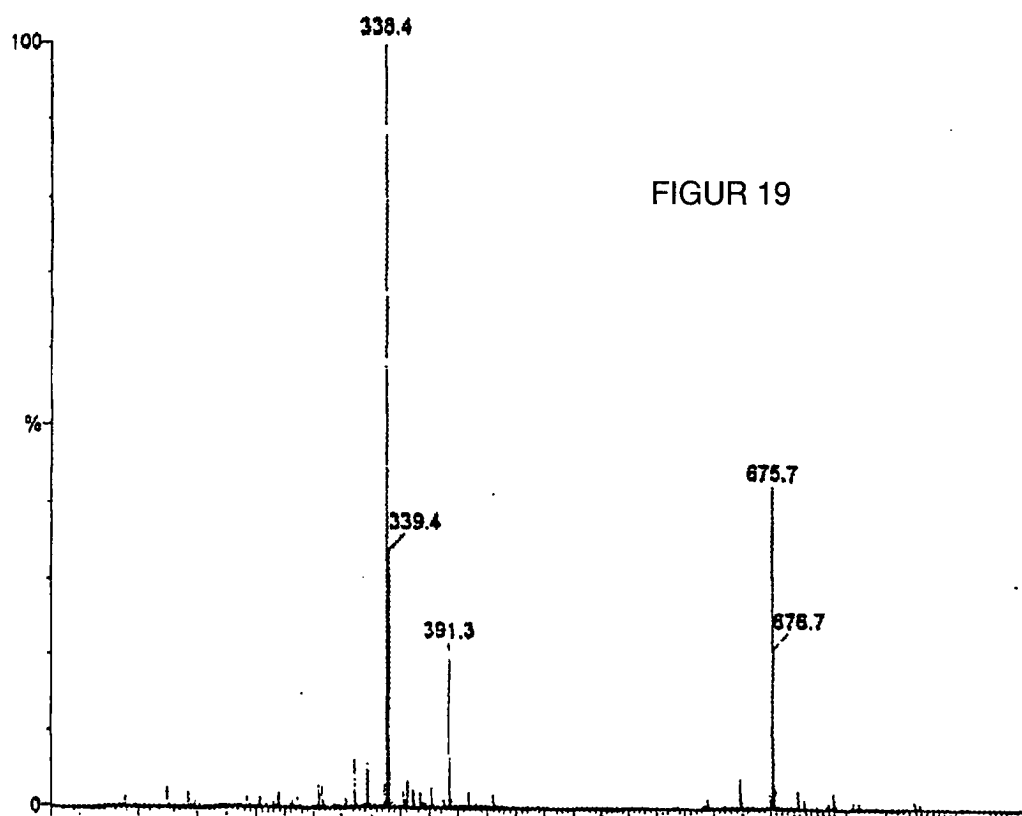




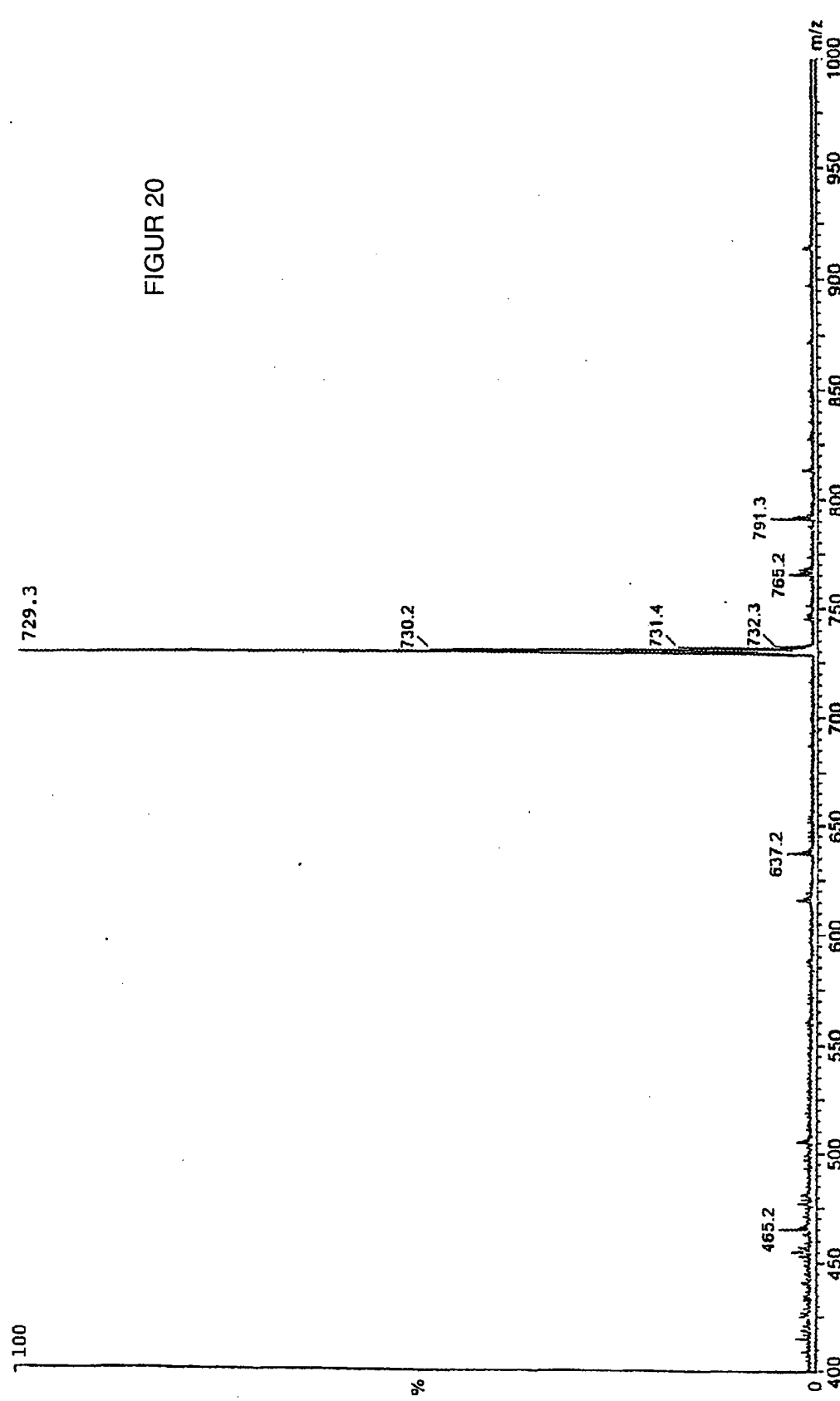




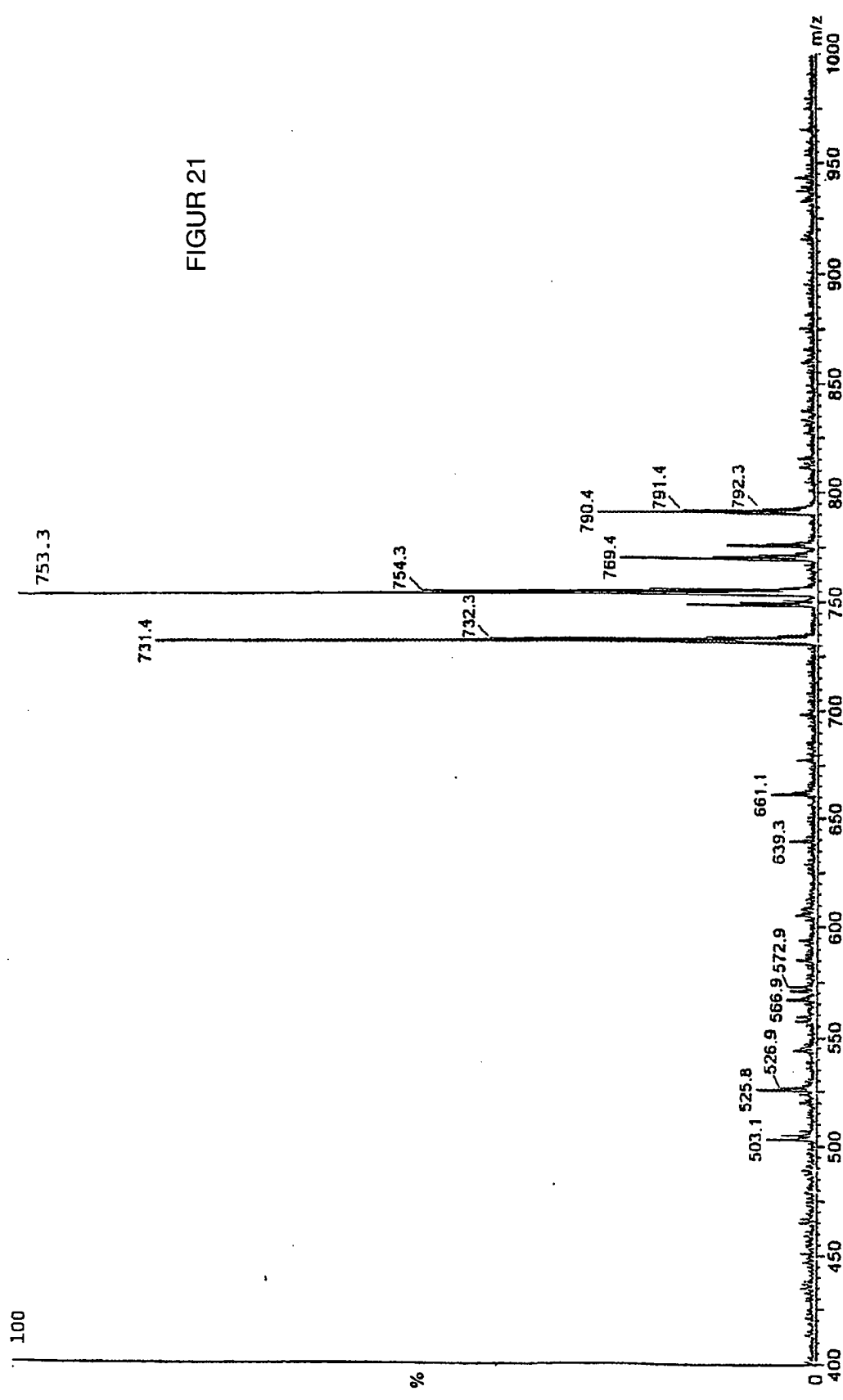




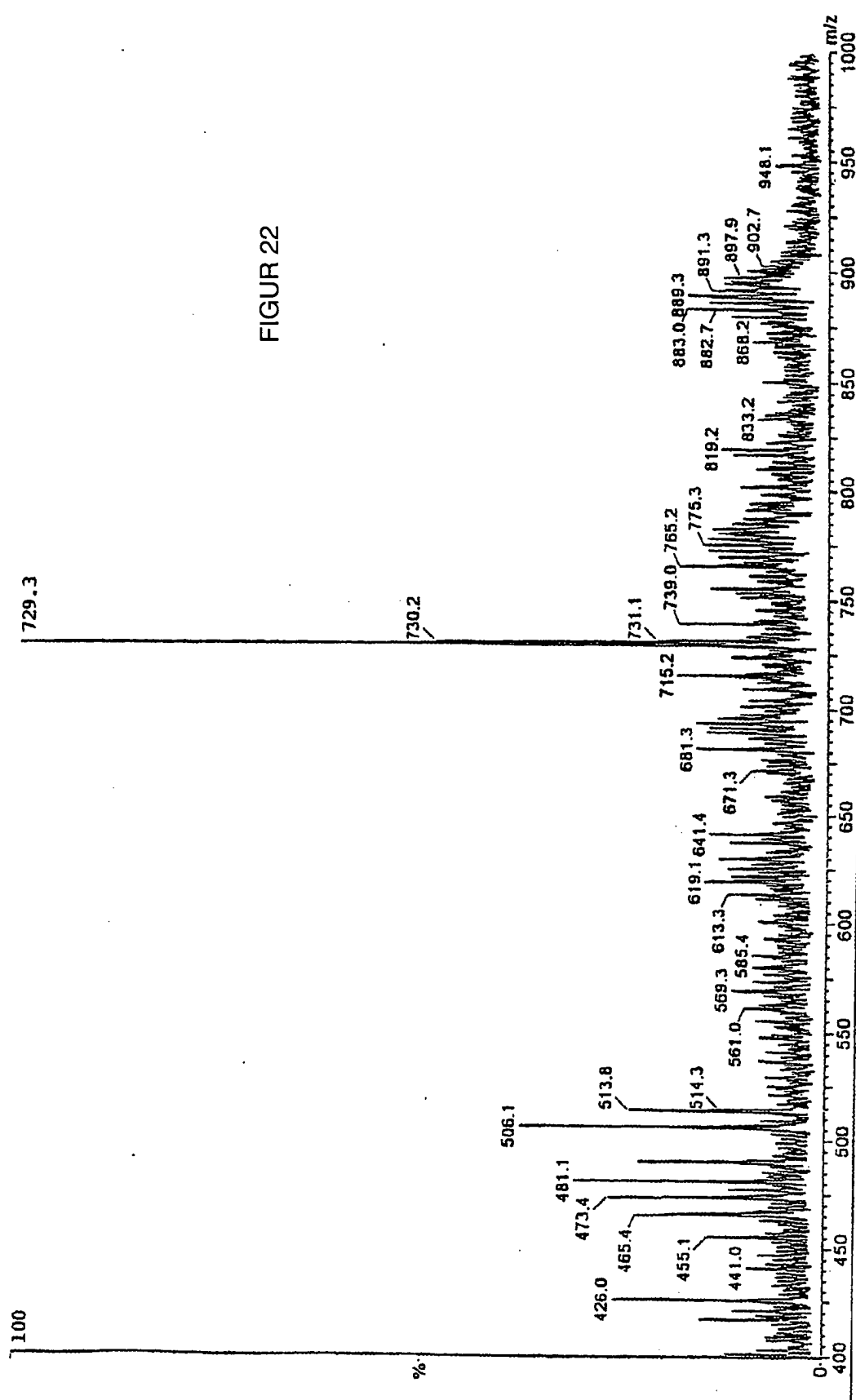
FIGUR 20



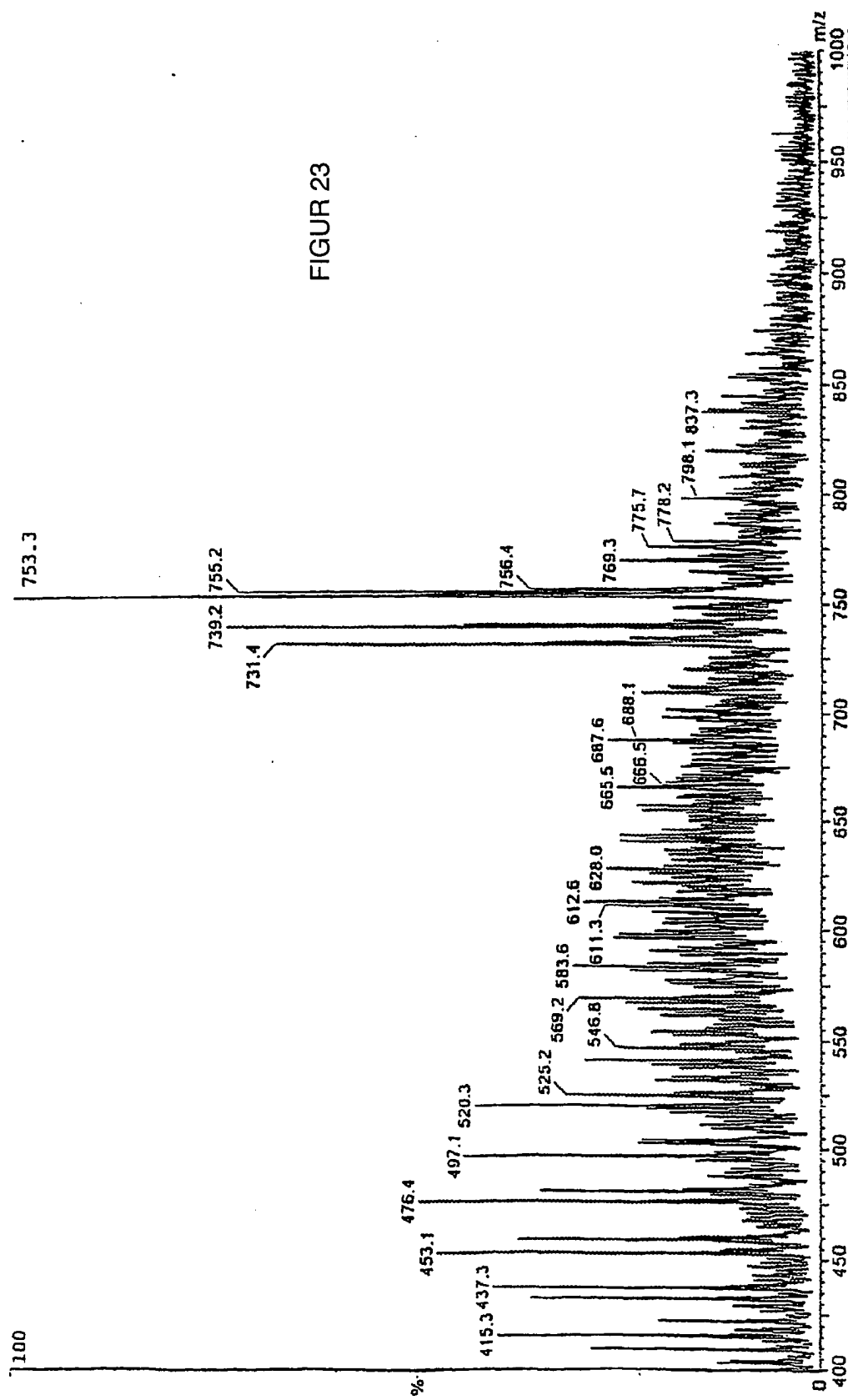
FIGUR 21



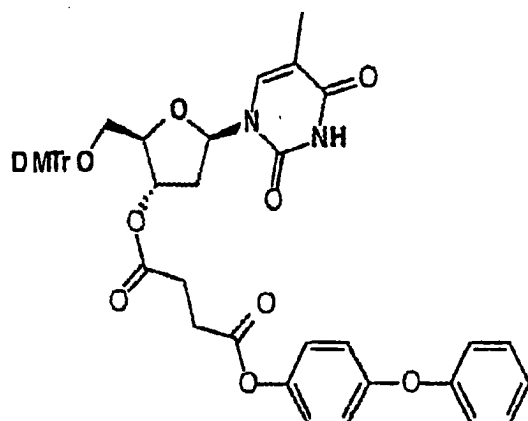
FIGUR 22



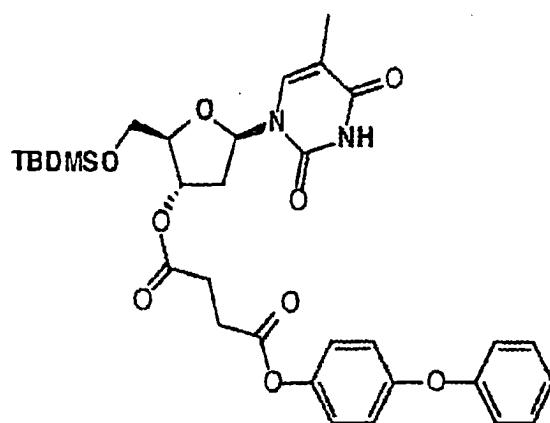
FIGUR 23



FT 9

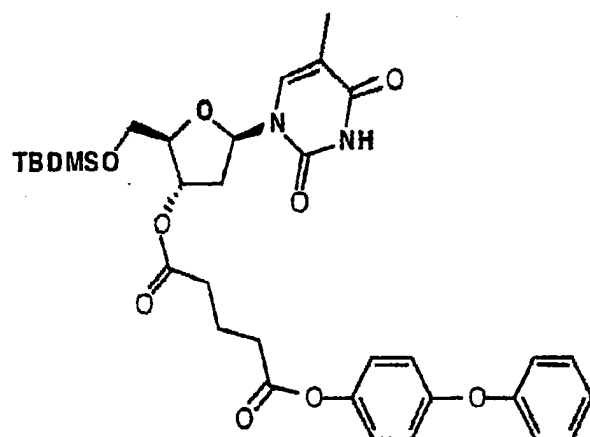


FT 17

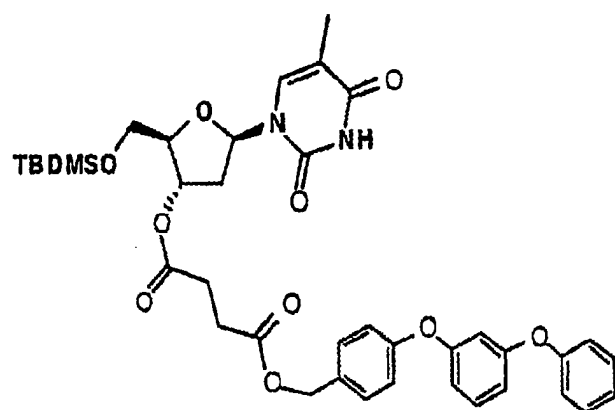


FIGUR 24

FT 18/1



FT23



FIGUR 25