

Wie die Kapillarelektrophorese das menschliche Genom sequenzierte**

Norman J. Dovichi* und Jianzhong Zhang

1. Einführung in die DNA-Sequenzierung

Da die Erforschung der Sequenz des menschlichen Genoms nun im Wesentlichen vollständig ist, scheint es uns angemessen einen Überblick darüber zu geben, wie wir an diesem Punkt in der Geschichte der Wissenschaft angelangt sind. Im Jahr 1953 haben Watson und Crick die Struktur der DNA veröffentlicht und damit die zentrale Rolle der DNA zur Speicherung der genetischen Information bestätigt.^[1] Einige Jahre später waren die genetischen Grundlagen zur Beschreibung der Translation der DNA in Proteine vollständig bekannt.^[2]

Die enge Beziehung zwischen der Gen- und der Proteinsequenz war eine starke Motivation um Methoden für die DNA-Sequenzbestimmung zu entwickeln. Die DNA-Sequenz würde nicht nur Einblicke in die Mutation und Evolution gewähren, sondern könnte auch ein verkürztes Verfahren zur Bestimmung der Proteinsequenz liefern. Bis 1976 konnte man die DNA-Sequenz nur mit arbeitsintensiven, klassischen chemischen Methoden ermitteln. Sangers „Plus-und-Minus“-Methode von 1976 war der erste Schritt in der Sequenzierungschemie, die 1977 die Bestimmung der 5375 Basen umfassenden Sequenz des Bakteriophagen Φ X174 ermöglichte.^[3] Zwei weitere, viel elegantere Sequenzierungsmethoden wurden 1977 veröffentlicht: Sangers Kettenabbruchmethode sowie die chemische Spaltung nach Maxam und Gilbert.^[4, 5] Sanger und Gilbert erhielten 1990 gemeinsam den Nobelpreis für die Entwicklung von Methoden zur DNA-Sequenzierung.

Die Biologen verfolgten die DNA-Sequenzierung mit großem Enthusiasmus, und es entstanden mehrere kleine Firmen zur manuellen Sequenzbestimmung von Viren, Genen

und Genmarkern. 1981 wurde GenBank als öffentliche Datenbank für DNA-Sequenzinformationen gegründet.^[6, 7] Abbildung 1 zeigt die Anzahl an Basen, die in GenBank seit ihrer Gründung aufgenommen wurden, zusammen mit einigen wichtigen Meilensteinen in der Geschichte der Sequenzierung. Von 1984 bis 1999 hat die Geschwindigkeit, mit der Daten in GenBank gespeichert wurden, exponentiell zugenommen, wobei die Verdopplungszeit ungefähr zwei Jahre beträgt.

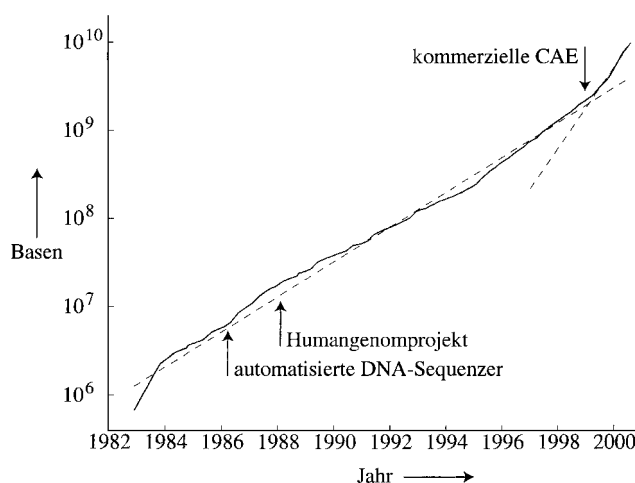


Abbildung 1. Zahl der Basen in DNA-Sequenzen, die in GenBank gespeichert sind. Die Ausgleichsgeraden in der halb-logarithmischen Auftragung (gestrichelt) wurden nach der Methode der kleinsten Quadrate ermittelt; die Werte stiegen bis 1999 exponentiell an mit einer Verdopplungszeit von 2 Jahren. Seitdem hat die Größe von GenBank mit einer sechsmonatigen Verdopplungsgeschwindigkeit zugenommen.

Geräte zur automatisierten Multikapillarelektrophorese (CAE, „capillary array electrophoresis“) standen ab 1999 zur Verfügung, was zu einer explosionsartigen Zunahme der Geschwindigkeit führte, mit der DNA-Sequenzen in GenBank veröffentlicht wurden, bis zu einer Verdopplungsrate von sechs Monaten im Jahr 2000. Diese Geräte wurden in großen Fabriken mit automatischem Probendurchsatz und riesigen EDV-Anlagen für die Bioinformatik eingesetzt. Die Industrialisierung der DNA-Sequenzierung hatte eine atemberaubende Wirkung auf die Biologie. Innerhalb von zwei Wochen werden derzeit mehr DNA-Sequenzen in GenBank abgespeichert als im gesamten Jahr 1995. Wenn die Daten in GenBank mit den Sequenzen in kommerziellen Datenbanken

[*] Prof. N. J. Dovichi,^[+] Dr. J. Zhang^[+]
Department of Chemistry, University of Alberta
Edmonton, Alberta T6G 2G2 (Canada)
Fax: (+1) 780-492-8231
E-mail: norm.dovichi@ualberta.ca

[+] Ab dem 1. Januar 2001:
Department of Chemistry, University of Washington
Seattle, WA 98195-1700 (USA)
Fax: (+1) 206-685-8665
E-mail: dovichi@chem.washington.edu

[**] Dieser Beitrag basiert auf einem Vortrag, gehalten auf der Analytica 2000 in München (Deutschland), anlässlich der Verleihung des Heinrich-Emanuel-Merck-Preises.

vereinigt werden, wird die Menge an bekannten DNA-Sequenzen am Ende dieses Jahres zehnmal größer sein als zu Beginn dieses Jahres.

Die Entwicklung von DNA-Sequenziergeräten, die auf der CAE basieren, und ihr Einsatz in Sequenzierfabriken hat die Biologie für immer verändert. In diesem Beitrag wollen wir die Geschichte des Sequenzierers nachzeichnen, der diese Revolution möglich gemacht hat.

2. Sangers DNA-Sequenzierung

In den frühen 80er Jahren verwendeten die meisten Wissenschaftler das Sequenzierungsverfahren von Maxam und Gilbert, vor allem deswegen, weil die Reagentien für die Sanger-Methode noch nicht überall zur Verfügung standen. Die Vermarktung von Didesoxynucleotiden und die Entwicklung von automatisierten DNA-Sequenzierern ermöglichte die praktische Anwendung der Sanger-Sequenzierung. Heute basieren praktisch alle DNA-Sequenzierungen auf dem Sanger-Verfahren.

Im Sprachgebrauch der DNA-Sequenzierung bezeichnet man das DNA-Stück mit unbekannter Sequenz als „Templat“. Zur Sequenzierung eines einzelsträngigen Templats mit der Sanger-Methode wird ein ca. 20 Basen langer Primer synthetisiert, der zu einem bestimmten Abschnitt des Templats komplementär ist. Der Primer wird mit dem Templat vermischt, wobei beide miteinander unter Bildung eines kurzen Abschnitts doppelsträngiger DNA hybridisieren, der von einer DNA-Polymerase als Startpunkt für die Kettenverlängerung erkannt wird. Dieses Enzym verlängert die Primersequenz durch Anfügen neuer Nucleotidtriphosphate an das 3'-Ende des Primers und synthetisiert so ein zum Templat komplementäres DNA-Fragment.

Der Schlüssel zur Sanger-Sequenzierung ist die Zugabe kleiner Mengen an Didesoxyadenosintriphosphat zum Reaktionsgemisch. Aufgrund der vorhandenen Triphosphatgruppe kann dieses Reagens in den wachsenden Strang eingebaut werden, ihm fehlt aber eine Hydroxygruppe an der 3'-Position des Zuckers, sodass keine weiteren Nucleotide an das Didesoxynucleotid angefügt werden können und es somit zum Kettenabbruch kommt. Am Ende der Reaktion erhält man eine Vielzahl von Produkten, die alle mit der Primersequenz starten, komplementär zur Templatsequenz sind und beim Einbau eines Didesoxyadenosins (ddA) enden, aber je nach Einbauposition des ddA unterschiedliche Längen haben. Diese Reaktionsprodukte bezeichnet man als Sequenzleitern (sequencing ladders). Ähnliche Sequenzleitern werden aus dem Templat mit Didesoxycytidin, Didesoxyguanosin und Didesoxythymidin erzeugt. Die Originalmethode von Sanger wurde bis jetzt im Wesentlichen beibehalten, außer dass heutzutage verbesserte Enzyme eingesetzt werden.

In Sangers Originalmethode werden die Sequenzleitern auf einem Polyacrylamidgel in vier nebeneinanderliegenden Reihen entsprechend der Fragmentgröße aufgetrennt. In den Reaktionsgemischen wurde radioaktiver Phosphor eingesetzt und die Fragmente durch Autoradiographie detektiert. Dabei wurde ein Film auf das Gel gelegt und der radioaktive Zerfall der markierten DNA erzeugte dunkle

Banden auf dem Film (Abbildung 2). Ein geübter Techniker schaute sich diese Autoradiogramme genau an, bestimmte anhand des Bandenmusters die DNA-Sequenz und gab die Daten in einen Computer ein. Man benötigte ungefähr 12 Stunden für die Elektrophorese, weitere 12 Stunden für die Autoradiographie und viele Stunden um die Sequenz zu lesen, eine fehleranfällige und ermüdende Übung.

Abbildung 2 zeigt einen kleinen Ausschnitt aus dem Bild eines Sequenzgels, bei dem zwei Proben in benachbarten Reihen analysiert werden (im Originalgel wurden zwölf Proben analysiert). Der in der Abbildung dargestellte Sequenzabschnitt umfasst ungefähr 50 Basen, während das gesamte Gel für jede Probe eine Sequenz aus einigen hundert Basen generieren würde. Die kleinsten Fragmente wandern am schnellsten und erscheinen am Ende des Gels. Die Sequenz von Probe 1 beginnt mit CGACCACCACCCCGAGGTT...

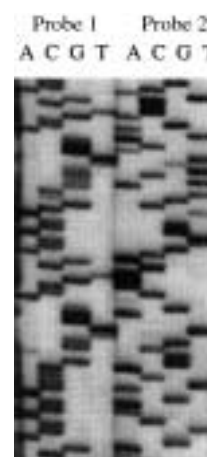


Abbildung 2. Ein von einem DNA-Sequenzierungsgel angefertigtes Autoradiogramm. Zwei Proben wurden in der Sequenzierungsreaktion nach Sanger eingesetzt. Jede Probe erzeugte vier Sequenzleitern, die in nebeneinander liegenden Reihen auf dem Polyacrylamid-Plattengel voneinander getrennt sind.

2.1. Automatisierte DNA-Sequenzierung

1986 berichteten Smith und Hood über wichtige Verbesserungen in Sangers Methode, wobei die radioaktiven Marker durch Fluoreszenzmarker, die autoradiographische Detektion durch Detektion der laserinduzierten Fluoreszenz und die manuelle Dateninterpretation durch computergestützte Datenanalyse ersetzt wurden.^[8] Bei ihrer Methode wurde ein Primer synthetisiert, in vier Ansätze aufgeteilt und jeder Ansatz mit einem von vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Jeder farbstoffmarkierte Primer wurde in einer Sequenzierungsreaktion mit einem der Didesoxynucleotide eingesetzt. Die Reaktionsprodukte wurden vereinigt und in einer einzigen Reihe eines Sequenzgels analysiert. Die Detektion der laserinduzierten Fluoreszenz erfasst die DNA-Fragmente, wenn sie bis ans Gelende gewandert sind, und die endständigen Nucleotide werden anhand ihrer Fluoreszenz identifiziert. Die Methode von Smith und Hood wurde 1987 von Applied Biosystems vermarktet.

Abbildung 3 zeigt die unbearbeiteten Daten, die durch dieses Sequenzierungsverfahren erzeugt werden; die Fluoreszenz jedes DNA-Fragments erzeugt einen Peak mit einer bestimmten spektralen Signatur. Das Spektrum jedes Farbstoffs ist recht breit und erzeugt ein Signal auf mehreren Spektralkanälen. Durch eine einfache Matrixinversion werden die Spektraldaten in Farbstoffwerte umgewandelt, und diese Information dient zur Identifizierung jedes Sequenzfragments.

Ein eleganteres Verfahren, bei dem ein Satz fluoreszenzmarkierter Didesoxynucleotide die chemische Grundlage für

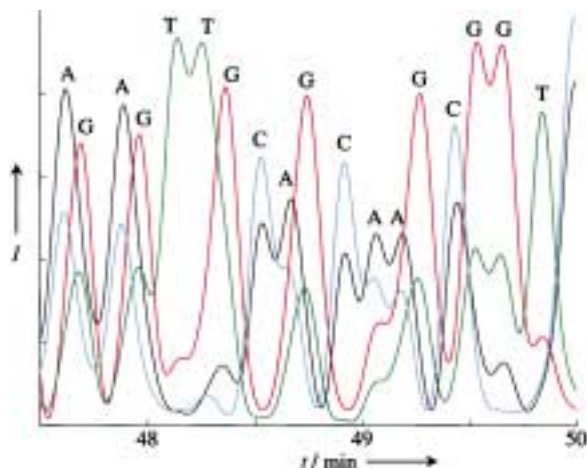


Abbildung 3. Daten aus der Vier-Farben-DNA-Sequenzierung für die Basen 376–393 von M13mp18. Der Primer wurde mit vier verschiedenen Fluoreszenzmarkern markiert und dann in der Sanger-Sequenzierung eingesetzt. Nach der Synthese der vier Sequenzleitern wurden die Reaktionsprodukte vereint und in einer einzigen Elektrophoresekapillare aufgetrennt. Ein Fluoreszenzdetektor empfängt die laserinduzierten Signale auf vier Spektralkanälen, die als Vier-Farben-Kurven aufgezeichnet werden.

den automatisierten Sequenzierer bildet, wurde von Prober bei DuPont entwickelt.^[9] Die markierten Didesoxynucleotide werden zusammen in einer einzigen Sequenzierungsreaktion eingesetzt, was die Synthese der DNA-Sequenzleitern vereinfacht. Die Fragmente werden in einer einzigen Reihe eines Sequenzgels aufgetrennt und anhand der Fluoreszenz der farbstoffmarkierten Didesoxynucleotide identifiziert. DuPont hat diese Technologie für kurze Zeit vermarktet, dann aber die Lizenz an Applied Biosystems verkauft.

Ein vereinfachtes System wurde von Ansorge entwickelt, das auf einem einzigen Fluoreszenzmarker und der Auftrennung der Fragmente in vier Reihen eines automatisierten Sequenzierers beruht. Diese Technologie wurde von Pharmacia vermarktet.^[10]

Die Einführung dieser automatisierten DNA-Sequenzierer war ein wichtiges Ereignis in der Biotechnologie. Eine Gruppe visionärer Biologen erkannte, dass diese neue Technologie die Sequenzierung sehr großer DNA-Sequenzen ermöglichen würde. Zwei Jahre nach Smith und Hoods Veröffentlichung über einen automatisierten DNA-Sequenzierer, wurde im Jahr 1988 das Humangenomprojekt gestartet.^[11] Das kühne Ziel des Genomprojekts lag in der Bestimmung der Primärstruktur einer Reihe von Molekülen mit einem Gesamtmolekulargewicht von 2×10^{12} Da, und diese Aufgabe sollte mit Hilfe kommerzieller, automatisierter Sequenzierer bis zum Jahr 2005 beendet werden. Die National Institutes of Health der Vereinigten Staaten haben den Großteil an öffentlichen Finanzmitteln für das Humangenomprojekt erbracht, das zu einem internationalen Projekt mit globaler Verteilung herangewachsen ist. Die Wellcome Foundation in Großbritannien leistete eine beträchtliche Unterstützung für das Humangenomprojekt. 1999 wurde Celera auf dem privaten Sektor zu einer wichtigen Firma, die bei sehr großen Sequenzierungsprojekten aktiv ist.

3. Hochdurchsatz-DNA-Sequenzierung

Die konventionelle DNA-Auftrennung wird mit Glasplatten durchgeführt, die mit einer ca. 200 μm dicken Schicht aus quervernetztem Polyacrylamid bedeckt sind, wobei die Anfertigung dieser Gele zeitaufwendig und arbeitsintensiv ist. Die Platten werden voneinander getrennt, altes Polymer entfernt und mit geeigneten Abstandshaltern (Spacern) wieder zusammengefügt. Eine Mischung aus monomerem Acrylamid, einem wässrigen Puffer und 8 M Harnstoff wird zwischen die Platten gegossen, um dort zu polymerisieren. Wenn die Polymerisation beendet ist, wird das Plattengel in die Elektrophoresekammer platziert, die Probe in die am oberen Gelende gebildeten Löcher pipettiert, die Elektroden angeschlossen und die DNA-Fragmente aufgetrennt. Auf einem einzigen Gel werden gleichzeitig zwischen 16 und 96 Proben aufgetrennt.

Die Dicke der Plattengele begrenzt die Geschwindigkeit, mit der die DNA aufgetrennt werden kann. Aufgrund der schlechten Wärmeableitung eines dicken Gels ist die Stärke des elektrischen Feldes, das zur DNA-Auftrennung genutzt werden kann, begrenzt. Der Temperaturanstieg bei hohen Feldstärken führt zur Verzerrung und schließlich zum Kochen des Sequenzgels und somit zu dessen Zerstörung. Bei einem mittelstarken elektrischen Feld, wie es bei konventionellen Plattengelen zur Anwendung kommt, ist der Zeitaufwand für die Trennung der Sequenzfragmente sehr hoch.

3.1. Die DNA-Sequenzierung mit der Kapillarelektrophorese

Die Grundsteine für die Kapillarelektrophorese wurden von S. Hjerten im Jahr 1960,^[12] von F. Everaerts in den späten 70ern^[13] und von J. Jorgenson und K. Lukacs in den frühen 80ern gelegt.^[14,15] Die Arbeit von Jorgenson und K. Lukacs war besonders wichtig, da er die Elektrophorese als instrumentelle Technik behandelte und die Kapillarelektrophorese in die analytische Chemie einführte.

Die Kapillarelektrophorese wird mit Kapillaren durchgeführt, die normalerweise einen Innendurchmesser von 50 μm und einen Außendurchmesser von 150 bis 350 μm haben und ungefähr 30 cm lang sind. Die Kapillaren sind aus hochreinem Quarzglas hergestellt, ähnlich dem für die Faseroptik verwendeten.

Die Gerätetechnik für die Kapillarelektrophorese ist recht einfach (Abbildung 4). Die Kapillare enthält ein Siebmateriale, das die Trennung der DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe ermöglicht. Die Kapillare wird mit der Probe beladen, indem die Kapillare und eine Elektrode in die Probenlösung eintauchen und für kurze Zeit ein elektrischer Strom an die Kapillare angelegt wird, sodass die DNA-Fragmente in die Kapillarenspitze wandern können. Wenn die Beladung beendet ist, wird die Probenlösung durch Puffer ersetzt und das elektrische Feld wieder angelegt um die DNA-Fragmente durch die Kapillare zu befördern. Ein laserinduzierter Fluoreszenzdetektor am Ende der Kapillare empfängt

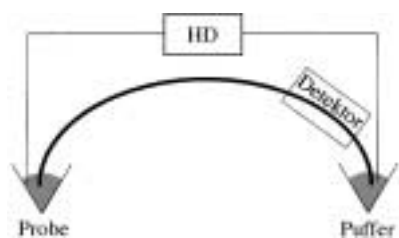


Abbildung 4. Ein Einzelkapillarelektrophoresegerät. Eine Kapillare aus Quarzglas wird für die Auftrennung verwendet. Ein Ende der Kapillare taucht in die Probenlösung oder den Pufferbehälter, während das andere Ende durch einen Detektor läuft, bevor es in einen mit Puffer gefüllten Behälter gestellt wird. Über Platinelektroden wird eine Hochspannung (HD) angelegt. Das Kapillarenende, an dem die Hochspannung anliegt, befindet sich in einer Kammer, die mit einer Sicherungssperre ausgestattet ist.

das Fluoreszenzsignal auf vier verschiedenen Spektralkanälen um die Fluoreszenzsignatur der vier Farbstoffe aufzuschlüsseln.

Durch den kleinen Innendurchmesser der Kapillare wird die elektrische Erwärmung auf ein zu vernachlässigendes Maß reduziert, weshalb sehr starke elektrische Felder verwendet werden können, die eine sehr schnelle Auftrennung der DNA-Fragmente ermöglichen.^[16] Bei hohen Feldstärken wird aber das Phänomen der einseitigen Reptationsbewegung beobachtet, das die Auftrennung längerer Sequenzfragmente beeinträchtigt.^[17] Ein Kapillarelektrophoresegerät kann mit doppelt so hoher Geschwindigkeit arbeiten wie die besten Plattengel-Instrumente.

Ungeachtet der Möglichkeit der Anwendung starker elektrischer Felder für die Elektrophorese sind die hohe Flexibilität und der einfache Einbau in ein automatisches Gerät die wichtigsten Eigenschaften der Kapillaren. Es ist eher die Vereinfachung durch Automation als grundlegende thermische Eigenschaften, die zur erfolgreichen Entwicklung von Sequenzierungsgeräten geführt haben. Der Zeitaufwand für die Bedienung eines Plattengel-Sequenzierers war das größte Problem für die DNA-Sequenzierung im Großmaßstab. Nun kann ein Techniker Dutzende von Instrumenten gleichzeitig bedienen, indem er jede Maschine mit den Sequenzfragmenten enthaltenden Mikrotiterplatten belädt und gelegentlich die Reagentien wieder auffüllt.

1990 berichtete Swerdlow, als er Student bei Gesteland an der University of Utah war, über den ersten auf der Kapillarelektrophorese basierenden DNA-Sequenzierer, der flexible Kapillaren aus Quarzglas verwendete. Diese wurden schließlich Standard in der DNA-Sequenzierung.^[18]

Im selben Jahr kam Swerdlow als Gaststudent zu uns an die University of Alberta. Zu dieser Zeit arbeiteten wir gerade an der ersten Veröffentlichung über die Anwendung eines Hüllstrom-Küvetten-detektors zur DNA-Sequenzierung mittels Kapillarelektrophorese (Abbildung 5).^[19] Diese Küvette, eine modifizierte Form einer Durchfluscytometerküvette, erwies sich als außerordentlich effizienter Fluoreszenzdetektor. Die Küvette hat eine Durchflusskammer von ca. 175 μm , die durch ein Quarzstück von ca. 1 mm läuft. Die Trennkapillare passt genau in die Durchflusskammer. In den Raum von der Kapillare und des Küvettenfensters wird ein Puffer mit sehr geringer Geschwindigkeit gepumpt, und der so

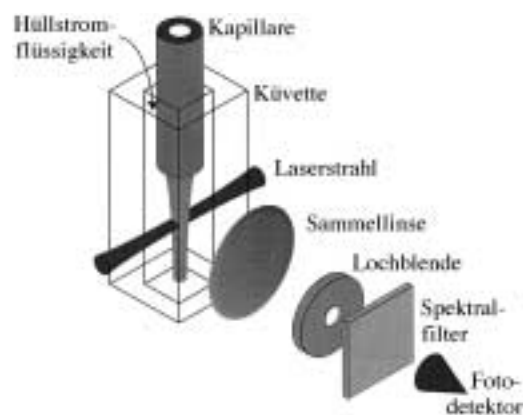


Abbildung 5. Hüllstromküvette mit einer Kapillare. Eine Kapillare aus Quarzglas befindet sich in einer quadratischen Durchflusskammer aus Quarz mit einem hochwertigen optischen Fenster. Hüllstromflüssigkeit wird in den Zwischenraum zwischen Kapillare und dem Fenster gepumpt und zieht die zu analysierende Probe in einem dünnen Strom in die Mitte der Durchflusskammer. Ein Laserstrahl wird unter die Kapillarenschleife auf den Probenstrom fokussiert. Das Fluoreszenzlicht wird durch eine Linse gesammelt, spektral gefiltert, durch eine Lochblende geleitet und mit einem Fotomultiplier detektiert.

erzeugte Strom zieht die DNA-Fragmente als dünne Filamente in die Mitte der Durchflusskammer. Da das Küvettenfenster eine ausgezeichnete optische Qualität hat, wird die Lichtstreuung, die bei Fluoreszenzmessungen zur Hintergrundstrahlung führt, praktisch eliminiert. Mit dieser Küvette konnten nach kapillarelektrophoretischer Auftrennung unter Verwendung sorgfältig entwickelter Sammellinsen und eines Niedrigenergie-Helium-Neon-Anregungslasers Einzelmoleküle von β -Phycoerythrin detektiert werden.^[20]

1993 erkannte Karger von der Northeastern University, dass quervernetztes Polyacrylamid als Matrix für die DNA-Sequenzierung mit der Kapillarelektrophorese nicht besonders geeignet ist, da die Kapillare nur einmal verwendet werden kann. Er berichtete über die Verwendung von unvernetztem Polyacrylamid zur Auftrennung.^[21] Diese Matrix kann nach jedem Gebrauch aus der Kapillare herausgepumpt und durch neues Material ersetzt werden, ohne dass dabei auch die Kapillare ausgetauscht werden muss.

Das unvernetzte Material hat eine relativ geringe Viskosität, sodass es mit mäßigem Druck in die Kapillare gepumpt werden kann. Allerdings gab man zu bedenken, dass die Viskosität der Matrix bei höheren Temperaturen abfallen könnte und somit die Matrix durch Elektroosmose aus der Kapillare herausgedrückt würde. Hohe Temperaturen sind aber für die Auftrennung wichtig, da nur dann die DNA denaturiert. Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Strängen führen zur Bildung von Haarnadelstrukturen in der DNA, die bei der Elektrophorese anomale Laufmuster zur Folge haben und somit die Sequenzierungsgenauigkeit beeinträchtigen.

Wir haben den Temperatureffekt auf die Auftrennung der DNA-Fragmente in quervernetztem und unvernetztem Polyacrylamid in der Kapillarelektrophorese bei hohen Feldstärken untersucht.^[22–23] 1995 haben wir über die erste kapillarelektrophoretische Auftrennung von DNA-Sequenzen bei 60 °C mit unvernetztem Polymer berichtet.^[24] Diese

Temperatur war hoch genug um Sequenzierungsartefakte zu eliminieren und eine qualitativ hochwertige Sequenzierung zu erhalten. Wir haben auch gezeigt, dass die Leselänge mit der Temperatur zunahm, was die genaue Auftrennung von DNA-Fragmenten mit großer Leselänge ermöglicht.

3.2. Multikapillarelektrophorese

Während die Kapillarelektrophorese die herkömmliche Plattengelelektrophorese leistungsmäßig übertrifft, bringt ein Gerät mit einer einzigen Kapillare keine signifikanten Vorteile gegenüber einem Plattengelsystem mit vielen Reihen. Durch die gleichzeitige Auftrennung mehrerer Proben produziert ein Plattengelsystem viel mehr Daten, als es ein Einzelkapillarengerät je könnte.

Um einen vergleichbaren Durchsatz wie bei konventionellen Elektrophoresesystemen zu bekommen, muss man mit einer Reihe von Kapillaren arbeiten. 1990 präsentierten Zagurski und McCormick die erste Multikapillarelektrophorese zur DNA-Sequenzierung.^[25] Der Detektor des Gerätes tastet die gesamten Kapillaren ab und nimmt nacheinander von jeder Kapillare das Fluoreszenzsignal auf. Dieses allgemeine Verfahren zum Scannen der gesamten Kapillarenanordnung wurde von anderen Gruppen übernommen. Diese Methode leidet nur unter dem eingeschränkten Nutzungsgrad: Während eine Kapillare vom Detektor abgefragt wird, wandert die DNA auch in den anderen Kapillaren weiter, sodass die meiste DNA nicht detektiert wird. Dies kann ein ernsthaftes Problem sein. Wenn beispielsweise in einem System mit 96 Kapillaren jede Kapillare nur zu 1 % der Zeit abgefragt wird, gehen 99 % der DNA verloren ohne detektiert zu werden.^[26]

Die leistungsfähigeren Multikapillarsequenzierer basieren auf einer kontinuierlichen Überwachung jeder Kapillare. Zwei Geräte sind von besonderem Interesse, eines aus dem Labor von Kambara bei Hitachi und das andere aus unserer Gruppe.^[27–32] Beide Geräte haben eine Hüllstromküvette zur gleichzeitigen Fluoreszenzdetektion einer linearen Anordnung von Kapillaren als Basis (Abbildung 6). Durch die Zwischenräume zwischen den Kapillaren wird Hüllflüssigkeit gepumpt, die die DNA-Fragmente als einzelne Ströme (ein Strom pro Kapillare) mitzieht. Ein Laserstrahl wird auf die Küvette fokussiert und streift unterhalb der Kapillarenspitzen entlang (Abbildung 4), sodass eine Fluoreszenzanregung in allen Kapillaren gleichzeitig erfolgt. Von der Vorderseite aus betrachtet erzeugt der Detektor einen Satz von Fluoreszenzpunkten, wobei je ein Punkt unterhalb jeder Kapillare entsteht und die Punkte durch den äußeren Durchmesser der Kapillaren voneinander getrennt sind. Diese Detektionsküvette nutzt das Laserlicht effizient aus. Da der Hüllstrom sehr transparent ist, gibt es keine Unterbrechung des Laserstrahls, wenn er die Küvette durchquert; zur gleichzeitigen Bestrahlung der Proben aus allen Kapillaren wird ein Niedrigenergie-Laserstrahl verwendet. Ein optisches System bildet die Fluoreszenz von jeder Kapillare auf einer CCD-Kamera oder einem Fotodiodenarray ab. Auf diesem Weg wird die Fluoreszenz von jeder Kapillare kontinuierlich aufgezeichnet, und der Nutzungsgrad des Gerätes nähert sich 100 %.

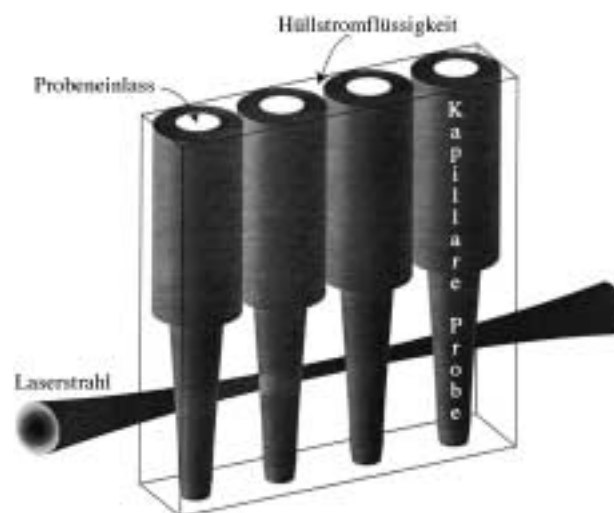


Abbildung 6. Lineare Multikapillarelektrophorese mit der Hüllstromküvette. Die Kapillaren sind in einer rechteckigen Durchflusskammer aus Glas linear angeordnet. Hüllstromflüssigkeit zieht die zu analysierende Probe in einem dünnen Strom in die Mitte der Durchflusskammer, wobei jede Kapillare einen Strom erzeugt. Ein Laserstrahl wird unter die Kapillarenspitzen auf die Probenströme fokussiert. Die Fluoreszenzsignale werden durch eine Linse gesammelt, spektral gefiltert und entweder mit einem Fotodiodenarray oder einer CCD-Kamera detektiert.

Die Lizenz für das Multikapillarelektrophoresegerät mit der Hüllstromküvette wurde an Applied Biosystems verkauft und als „3700 DNA Sequencer“ vermarktet. Das Gerät arbeitet mit 96 Kapillaren zur Auftrennung und hat 8 Ersatzkapillaren. Ein Roboter sorgt für einen schnellen Transfer der Proben von einer 96er-Mikrotiterplatte zu einem Einspritzblock, an dem die Kapillaren mit den Proben beladen werden. Der Probenauftrag, der Austausch der Siebmatrix, die Elektrophorese, die Datenerfassung und die Basenerkennung erfolgen automatisch, sodass das Gerät 24 Stunden ohne Unterbrechung laufen kann.

Das Multikapillarelektrophoresegerät soll eine zehnfache Steigerung des Sequenzierungsdurchsatzes gegenüber automatisierten Plattengel-Sequenzierern erreichen.^[33] Diese Schätzung ist wahrscheinlich zu niedrig. Die vierfache Steigerung in der Sequenzierungsgeschwindigkeit innerhalb der letzten Jahre (Abbildung 1) ist das Ergebnis von einigen Tausenden automatisierten Sequenzierern, die von einigen Zehntausenden automatisierten Plattengelelektrophoresegeräten ersetzt wurden.

4. Zusammenfassung

Die großen Fortschritte in der DNA-Sequenzierung liegen in der Entwicklung der Schrotschuss(shotgun)-Sequenzierung im Großmaßstab,^[34] von vollautomatisierten DNA-Sequenzierern und leistungsstarken EDV-Systemen.^[35] Dieser Beitrag konzentriert sich auf die letzte Generation der vollautomatisierten DNA-Sequenzierer, deren Grundlage die Multikapillarelektrophorese (CAE) bildet.

Das Humangenomprojekt ist das ehrgeizigste und wichtigste Projekt in der Geschichte der Biologie. Es hat die vollständige genetische Blaupause des menschlichen Lebens

hervorgebracht und wird wichtige Einblicke in die Gesundheit und Entwicklung der Menschen liefern. Die große Mehrheit dieser Sequenz wurde mit Hochdurchsatz-DNA-Sequenzern bestimmt, deren Grundlage die CAE, mit einer Hüllstromküvette ist.

Wir befinden uns an der Schwelle zu einer neuen Ära in der Biologie, die auf Informationen über das Genom basiert, die vor zwei Jahrzehnten noch unvorstellbar waren. Im Jahr 1980 konnte die Sequenzierung eines kleinen Gens noch die Grundlage einer vollständigen Doktorarbeit sein. Durch die Entwicklung von leistungsstarken analytischen Geräten ist es nun möglich die Aufklärung der Sequenz eines Prokaryonten in wenigen Wochen und die eines Wirbeltiers in weniger als einem Jahr zu vervollständigen. Diese wissenschaftliche Revolution ist nur durch technische Verbesserungen bei den analytischen Geräten zur DNA-Sequenzierung möglich geworden.

Danksagung

Es ist sicherlich aufschlussreich, die Historie zur Finanzierung dieser Arbeiten zu dokumentieren. Von 1989 bis 1992 haben wir fünf Anträge bei örtlichen, nationalen und internationalen Institutionen eingereicht; alle wurden abgelehnt. Unser erster erfolgreicher Antrag zur DNA-Sequenzierung wurde vom „Department of Energy (USA) Human Genome Program“ bewilligt, das unsere Arbeit von 1992 bis 1998 finanziell förderte. Weiterhin wurde unsere Arbeit von 1995 bis 1998 von SCIEX, einer Abteilung von MDS Inc., und vom „Natural Sciences and Engineering Research Council“ finanziell unterstützt. Von 1994 an erhielten wir außerdem vom „Canadian Bacterial Diseases Network“ und „Canadian Genetic Diseases Network“ Finanzmittel. Aufgrund des fehlenden kommerziellen Erfolges endete kürzlich die Finanzierung durch CBDN. Wir danken dem „Canadian Genetic Diseases Network“, unserer derzeitigen Finanzierungsquelle.

- [1] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, 171, 964–967.
- [2] „The Genetic Code“: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **1966**, 31.
- [3] F. Sanger, G. M. Air, B. G. Barrell, N. L. Brown, A. R. Coulson, C. A. Fiddes, C. A. Hutchison, P. M. Slocumbe, M. Smith, *Nature* **1977**, 264, 687–695.
- [4] F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 74, 5463–5467.

- [5] A. M. Maxam, W. Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 74, 560–564.
- [6] D. A. Benson, M. S. Boguski, D. J. Lipman, J. Ostell, B. F. Ouellette, B. A. Rapp, D. L. Wheeler, *Nucleic Acids Res.* **1999**, 27, 12–7.
- [7] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- [8] L. M. Smith, J. Z. Sanders, R. J. Kaiser, P. Hughes, C. Dodd, C. R. Connell, C. Heiner, S. B. H. Kent, L. E. Hood, *Nature* **1986**, 321, 674–679.
- [9] J. M. Prober, G. L. Trainor, R. J. Dam, F. W. Hobbs, C. W. Robertson, R. J. Zagursky, A. J. Cocuzza, M. A. Jensen, K. Baumeister, *Science* **1987**, 238, 336–341.
- [10] W. Ansorge, B. S. Sproat, J. Stegemann, C. Schwager, *J. Biochem. Biophys. Methods* **1986**, 13, 315–317.
- [11] F. Collins, D. Galas, *Science* **1993**, 262, 43–46.
- [12] S. Hjerten, *Chromatogr. Rev.* **1967**, 9, 122–219.
- [13] F. E. P. Mikkers, F. M. Everaerts, T. P. E. Verheggen, *J. Chromatogr.* **1979**, 169, 11–20.
- [14] J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs, *Science* **1981**, 222, 266–272.
- [15] J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs, *Anal. Chem.* **1981**, 53, 1298–1302.
- [16] M. J. Rocheleau, N. J. Dovichi, *J. Microcolumn Sep.* **1992**, 4, 449–453.
- [17] J. L. Viovy, T. Duke, *Electrophoresis* **1993**, 14, 322–329.
- [18] H. Swerdlow, R. Gesteland, *Nucleic Acids Res.* **1990**, 18, 1415–1419.
- [19] H. Swerdlow, S. Wu, H. Harke, N. J. Dovichi, *J. Chromatogr.* **1990**, 516, 61–67.
- [20] D. Y. Chen, N. J. Dovichi, *Anal. Chem.* **1996**, 68, 690–696.
- [21] M. C. Ruiz-Martinez, J. Berka, A. Belenkii, F. Foret, A. W. Miller, B. L. Karger, *Anal. Chem.* **1993**, 65, 2851–2858.
- [22] H. Lu, E. Arriaga, D. Y. Chen, D. Figeys, N. J. Dovichi, *J. Chromatogr.* **1994**, 680, 503–510.
- [23] Y. Fang, J. Z. Zhang, J. Y. Hou, H. Lu, N. J. Dovichi, *Electrophoresis* **1996**, 17, 1436–1442.
- [24] J. Z. Zhang, Y. Fang, J. Y. Hou, H. J. Ren, R. Jiang, P. Roos, N. J. Dovichi, *Anal. Chem.* **1995**, 67, 4589–4593.
- [25] R. J. Zagursky, R. M. McCormick, *BioTechniques* **1990**, 9, 74–79.
- [26] X. C. Huang, M. A. Quesada, R. A. Mathies, *Anal. Chem.* **1992**, 64, 2149–2154.
- [27] N. J. Dovichi, J. Z. Zhang, US-A 5,439,578, **1995**.
- [28] S. Takahashi, H. Kambara, US-A 5,529,679, **1996**.
- [29] J. Z. Zhang, Dissertation, University of Alberta, **1994**.
- [30] H. Kambara, S. Takahashi, *Nature* **1993**, 361, 565–566.
- [31] J. Z. Zhang, K. O. Voss, D. F. Shaw, K. P. Roos, D. F. Lewis, J. Yan, R. Jiang, H. Ren, J. Y. Hou, Y. Fang, X. Puyang, H. Ahmadzadeh, N. J. Dovichi, *Nucleic Acids Res.* **1999**, 27, E36.
- [32] H. J. Crabtree, S. J. Bay, D. F. Lewis, L. D. Coulson, G. Fitzpatrick, D. J. Harrison, S. L. Delinger, J. Z. Zhang, N. J. Dovichi, *Electrophoresis* **2000**, 21, 1329–1335.
- [33] R. Preston, *The New Yorker* **2000**, 12. Juni, 66–83.
- [34] J. C. Venter, M. D. Adams, G. G. Sutton, A. R. Kerlavage, H. O. Smith, M. Hunkapiller, *Science* **1998**, 280, 1540–1542.
- [35] E. W. Myers, G. G. Sutton, A. L. Delcher, I. M. Dew, D. P. Fasulo, M. J. Flanagan, S. A. Kravitz, C. M. Mobarry, K. H. J. Reinert, K. A. Remington, E. L. Anson, R. A. Bolanos, H. H. Chou, C. M. Jordan, A. L. Halpern, S. Lonardi, E. M. Beasley, R. C. Brandon, L. Chen, P. J. Dunn, Z. Lai, Y. Liang, D. R. Nusskern, M. Zhan, Q. Zhang, X. Zheng, G. M. Rubin, M. D. Adams, J. C. Venter, *Science* **2000**, 287, 2196–2204.