

## 4. Experimente und Ergebnisse

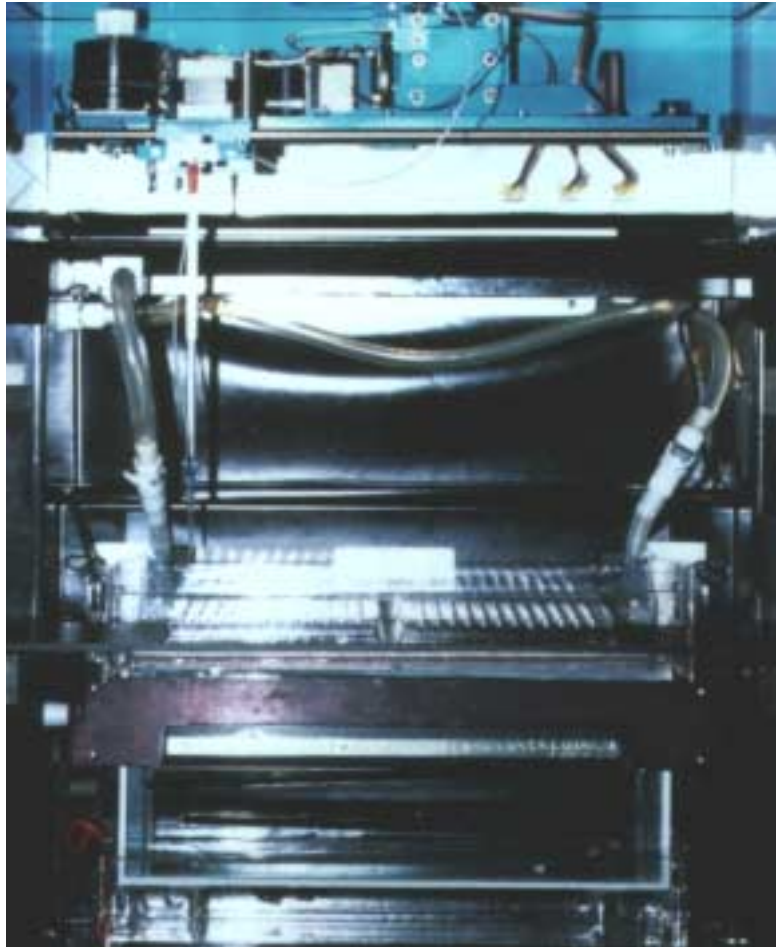
Die fluoreszente DNA-Sequenz- und -Fragmentanalyse ist wie viele Systeme, deren Leistungsfähigkeit von mehreren, sehr verschiedenartigen Komponenten abhängen, von der Ausgereiftheit jeder einzelnen Komponente und einem gutem Zusammenspiel aller abhängig. Eine dieser Komponenten, welche die Qualität der Messdaten bestimmen, ist die Beladung der Trenngele. Um die Anzahl der Proben pro Gel zu erhöhen, geht der Trend zu immer höher auflösenden Detektionssystemen. Die Probenauftragsflächen müssen verringert werden, um diese effizient zu nutzen. Diese kleinen Flächen sind den Standardverfahren der Gelbeladung nicht mehr zugänglich. Deshalb musste nach einem neuartigen Weg gesucht werden, diese hochauflösenden Detektionssysteme wirksam zu nutzen. Die erste Ausführungsform einer neuartigen Methode zum Beladen von Trenngelen mit DNA wird im Kapitel 4.2, deren Analyse, Optimierung, Automatisierung und Anwendbarkeit auf ein anderes Messsystem, in den Kapiteln 4.3 - 4.8 beschrieben.

### 4.1 Pneumatische Methode zum Beladen von Gelen mit DNA

Liegen die Photodioden, wie im Falle der kommerziell erhältlichen A.L.F.-Sequenzereinheiten (A.L.F. steht für: Automated Laser Fluorescence), 4mm weit auseinander und sind 2mm breit, so bietet sich eine pneumatische Methode zum Beladen der Gele an. Das in diesem Kapitel beschriebene System wurde in Zusammenarbeit mit der elektronischen und der mechanischen Werkstatt sowie dem technischen Zeichenbüro des EMBL entwickelt (Abbildung 4.2).

Die Probenlösung wird mit einem Dosiersystem der Firma Hamilton durch Unterdruck aus den Taschen einer 96 Proben Mikrotiter-Platte in Pipettenspitzen (Durchmesser Spitze: 1mm) aufgenommen. Die Probenflüssigkeit wird dann mit einem Dreiaachsen-Schrittmotorsystem der Firma Isel in die Probentaschen des Trenngels einer umgebauten A.L.F.-Sequenzereinheit transportiert und dort durch Überdruck abgegeben.

Diese Einheit wurde über Tastaturprogrammierung so eingerichtet, dass nach dem Beladen der Geltaschen, die Elektrophorese und Datenaufnahme gestartet wird. Hierbei wurde ein Vorteil der „On-Line“ Sequenzier-Geräte ausgenutzt, der bei kurzen Läufen auftritt, die Wiederbeladbarkeit der Gele. Nach der Elektrophorese wird der Lauf automatisch über die Tastatursteuerung angehalten und die Gele werden erneut automatisch beladen. Dieser Vorgang wird wiederholt, bis die Proben der beiden Mikrotiter-Platten vollständig analysiert sind. Das System wurde zur automatischen Fragmentanalyse eingesetzt.

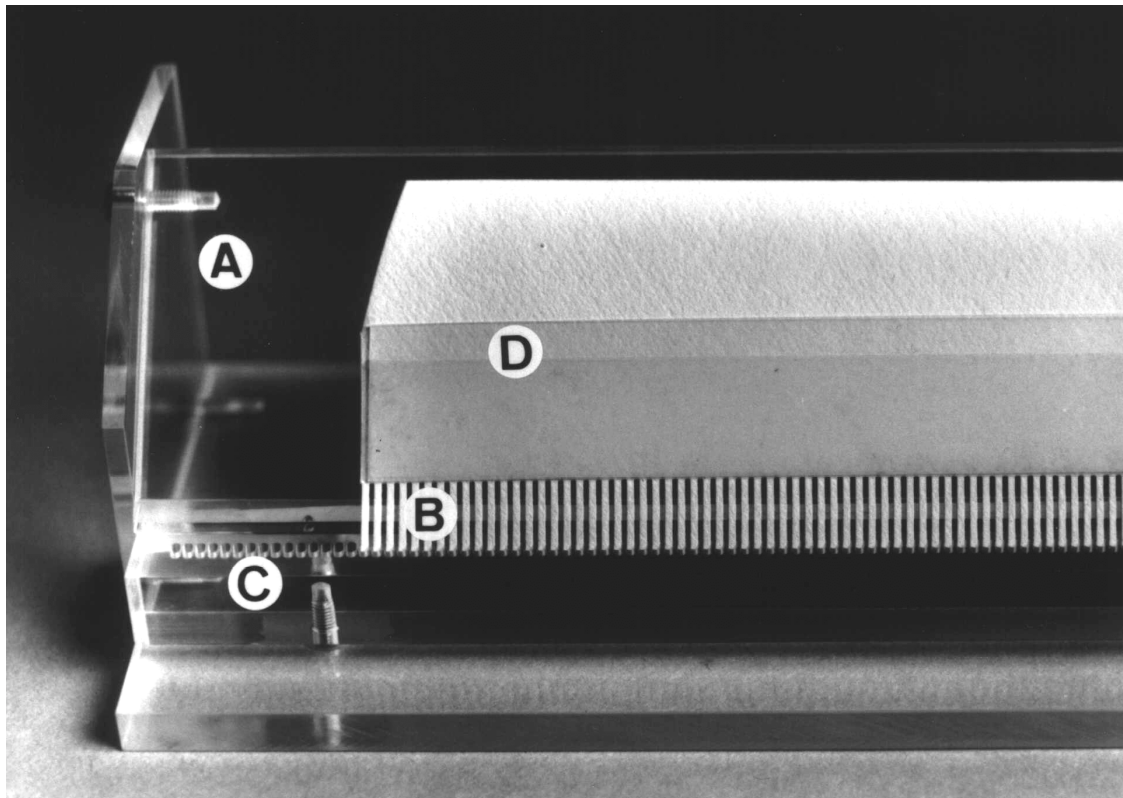


**Abbildung 4.1:** Der am EMBL entwickelte automatische Gel-Beladungsroboter für eine A.L.F-Sequenziereinheit. Der Aufbau besteht aus einem Dosiersystem der Firma Hamilton und einem Dreiaachsen-Schrittmotorsystem der Firma Isel. Diese Einheit wurde über Tastaturprogrammierung so eingerichtet, dass nach der Beladung der Geltaschen, die Elektrophorese und Datenaufnahme gestartet wird. Hierbei wurde ein Vorteil der „On-Line“ Sequenzier-Geräte ausgenutzt, der bei kurzen Läufen auftritt, die Wiederbeladbarkeit der Gele. Nach der Elektrophorese wird der Lauf automatisch über die Tastatursteuerung angehalten und die Gele werden erneut automatisch beladen. Dieser Vorgang wird wiederholt bis die Proben der beiden Mikrotiter-Platten vollständig analysiert sind.

## **4.2 Methode zum Beladen von Photodioden Arrays mit 0,8 mm weiten Bildpunkten mittels poröser Membranen**

Basierend auf dem Grundgedanken der Übertragung von DNA aus einer Probenaufbereitungsvorrichtung (z.B. Mikrotiter-Platte) zu einer Probenanalysevorrichtung (DNA-Sequenziereinheit) mittels einer festen Phase, konnte nach der ersten Entwicklungsphase ein System vorgestellt werden, das mehr als 200 Spuren eines 30 cm breiten Geles parallel beladen konnte. Die Beladung des Trenngeles geht über Membran-DNA Komplexe vor sich. Die flüssigen Proben (Sequenzreaktionen) werden aus einer Mikrotiterplatte (Probenaufbereitungsplatte) auf das zum Trenngel weisende Ende einer Membran aufgebracht. Die Proben werden durch Kapillarkräfte in die Membran aufgenommen. Dieser Membran-DNA Komplexe wird dann mit dem Trenngel elektrisch leitend verbunden. Durch das Anlegen eines äußeren elektrischen Feldes wandern die DNA-Moleküle aus diesem Komplex in das Trenngel.

Leider breiteten sich nach den Auftragen der Standardprobenvolumina (2 µl) die DNA-Moleküle sehr stark seitlich aus. Damit die Detektoren effektiv genutzt werden konnten, musste diese seitliche Ausbreitung minimiert werden. Ein Ansatz war die räumliche Trennung zwischen den Spuren. Diese wurde durch maschinell gefräste Zwischenräume (Zähne) erreicht. Die Dimensionen der Zähne sind: Breite 1 mm, Länge 8 mm und der Raum zwischen den Zähnen 0,6 mm (durch die Dicke des kreisrunden Sägeblattes vorgegeben). Aus diesem Grunde wurden bei der Auswahl der Membranen sehr großer Wert auf hohe mechanische Stabilität gelegt. Darüber hinaus wurde das Probenvolumen nach der Sequenzreaktion maximal eingedampft, um ein Ineinanderlaufen der Proben über den Zähnen zu verhindern. Hierzu wurde die Probenlösung (2 µl) mit einem Roboter in die Löcher eines Plexiglas-Blockes transferiert und danach der leichter flüchtige Wasseranteil verdampft. Die Standardprobe konnte somit bis auf 1 µl eingedampft werden. Danach werden die Zähne des Membrankammes in die Probentaschen des Plexiglasblockes eingeführt. Die Probenlösung wird durch Kapillarkräfte in die Poren der Membran aufgenommen (Abbildung 4.2).



**Abbildung 4.2:** Die Taschen (C) eines Plexiglasblockes (A) dienen der Vorlage der DNA-Probenlösung. In diesen Taschen wird das Probenvolumen durch Verdampfung von 2 auf 1  $\mu\text{l}$  reduziert, um eine Vermischung der unterschiedlichen Proben über den Zähnen zu verhindern. Danach werden die Zähne (B) der porösen und hydrophilen Membran in die Taschen eingeführt. Die Probenflüssigkeit mit den DNA-Molekülen wandert durch Kapillarkräfte in die Zähne der porösen Membran. Optional kann ein Polyesterstreifen (D), zur mechanischen Verstärkung, an den Membrankamm angebracht werden.

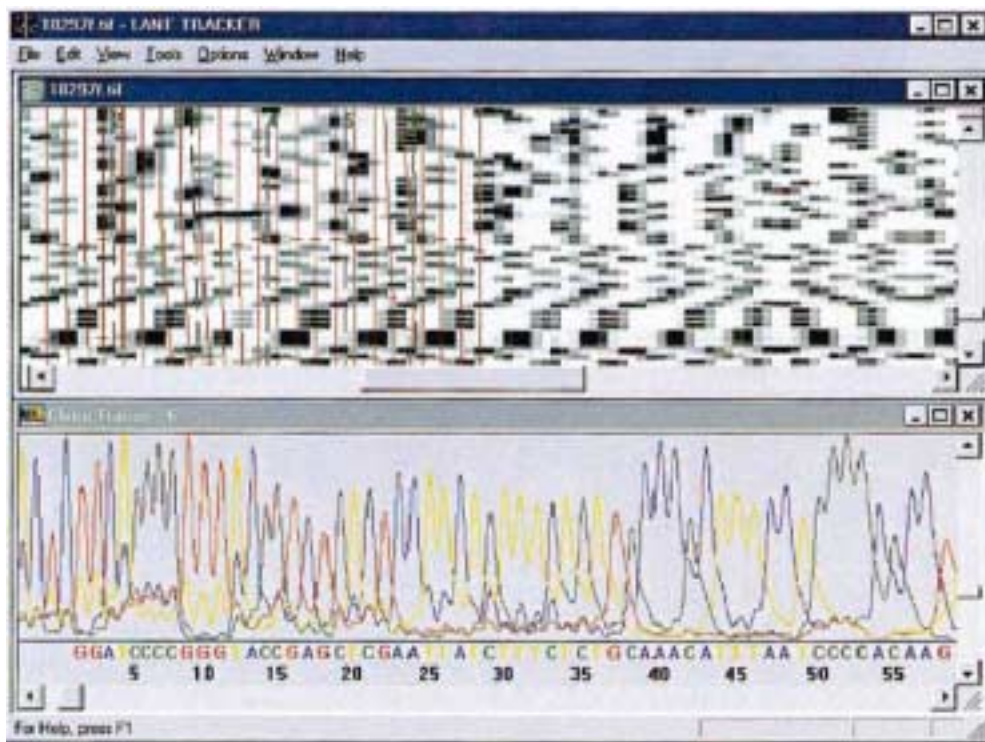
Die, mechanisch stabilste der getesteten Membranmaterialien, die gleichfalls noch eine gute elektrophoretische Auflösung zeigt, war die Membran "MV Cellulose Mischester" der Firma "Macherey & Nagel". Um eine gerade und gleichmäßige Kontaktstelle mit dem Gel zu erhalten, wird vor der Polymerisation der Gellösung ein Polyesterplatzhalter ungefähr 5mm in den Glasplattensatz eingeführt. Dieser Platzhalter wird nach der Polymerisation der Gellösung unter Erhalt einer geraden und gleichmäßigen Kontaktstelle mit dem Gel entfernt. Der Membrankamm wird danach mit deionisiertem Wasser gesättigt, um zum einen den Hauptteil des äußeren elektrischen Feldes im Membrankamm abfallen zu lassen, zum anderen zum leichteren Einführen in den mit deionisiertem Wasser aufgefüllten Schlitz zwischen den Glasplatten (Abbildung 4.3).



**Abbildung 4.3:** Die zahnförmigen Membran-DNA Komplexe (A) werden elektrisch leitend mit dem Trenngel verbunden. Nach dem Anlegen eines äußeren elektrischen Transferfeldes (10V/cm) wandern die negativ geladenen DNA-Moleküle aufgrund der Coulomb-Kraft aus den Zähnen in das Trenngel.

Die Zähne des Membrankammes (A), die die zu analysierenden DNA-Moleküle beinhalten, werden in direkten Kontakt mit dem Trenngel gebracht oder im Abstand von wenigen Millimetern von ihm platziert. Aus den Zähnen wandern die negativ geladenen DNA-Moleküle, nach dem Anlegen eines äußeren elektrischen Transferfeldes (10V/cm), durch Coulomb-Kraft in das Trenngel. Die sich daraus für ein Photodiodenarray mit 0,8 mm breiten Bildpunkten ergebenden Resultate werden in Abbildung 4.4 gezeigt. Es konnten 50 Klone (200 Spuren) pro fluoreszenten Farbstoff auf einem 30 cm breiten Trenngel analysiert werden. Die maximale Leselänge pro Klon betrug 1000 Basen.





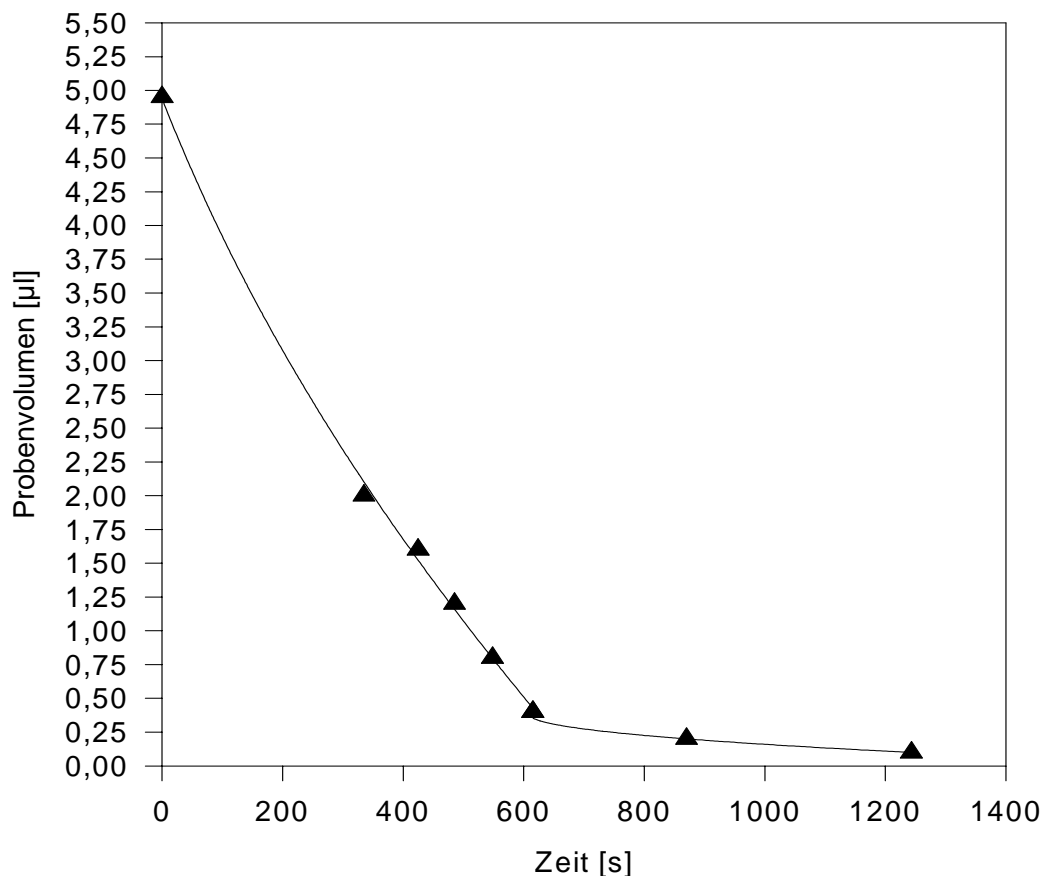
**Abbildung 4.4:** Ein Ausschnitt der Resultate, die mit der Membranbeladungsmethode und 0,8 mm breiten Photodioden erzielt wurden. Das Pseudoautoradiogramm ist oben dargestellt, das Sequenzchromatogramm unten. In diesem Lauf konnten 50 Klone (200 Spuren) pro fluoreszentem Farbstoff auf einem 30 cm breiten Trenngel analysiert werden. Die maximale Leselänge betrug 1000 Basen.

### 4.3 Abhängigkeit der elektrophoretischen (vertikalen) Auflösung und des integrierten Fluoreszenzsignals vom Probenvolumen

In diesem Kapitel wird die sich aus theoretischen Betrachtungen ergebende Abhängigkeit der elektrophoretischen Auflösung und des integrierten Fluoreszenzsignals vom Probenvolumen untersucht. Das integrierte Fluoreszenzsignal ergibt sich aus dem Integral der Photodiode maximaler Intensität einer Spur und jeweils der Hälfte der Integrale der nächsten Nachbarphotodioden. Es wurde ein Testsystem, das aus zwei 50 und 100 Nukleotiden langen Oligomeren besteht eingeführt, um probenspezifischen Schwankungen aus dem Wege zu gehen. Beide Nukleotide sind mit dem Fluorophor, Indodicarboncyanin (Cy5), markiert. Um die gleichen Bedingungen, u.a. Salzkonzentrationen, wie bei einer Sequenzierprobe herzustellen, wurden die selben Komponenten wie bei einer Sequenzreaktion addiert.

### 4.3.1 Methode zur Herstellung kleiner Probenvolumina (0,1 µl)

Um die Abhängigkeit der elektrophoretischen Auflösung und des integrierten Fluoreszenzsignals zu untersuchen, musste ein Protokoll entwickelt werden, das es erlaubt, kleine Probenvolumina herzustellen. Dieses Protokoll ermöglicht die gezielte Evaporation großer Probenvolumina durch Verwendung der unterschiedlichen Flüchtigkeiten der Einzelkomponenten der Probe (Siedepunkt Wasser: 100° C bei 1013 mbar, Siedepunkt Formamid: 210° C bei 1013 mbar). Es erlaubt die reproduzierbare Herstellung von Volumina zwischen 0,1 und 0,2 Mikrolitern. Abbildung 4.5 zeigt die Abhängigkeit des Probenvolumens von der Verdampfungszeit (Verdampfungstemperatur 75° C).



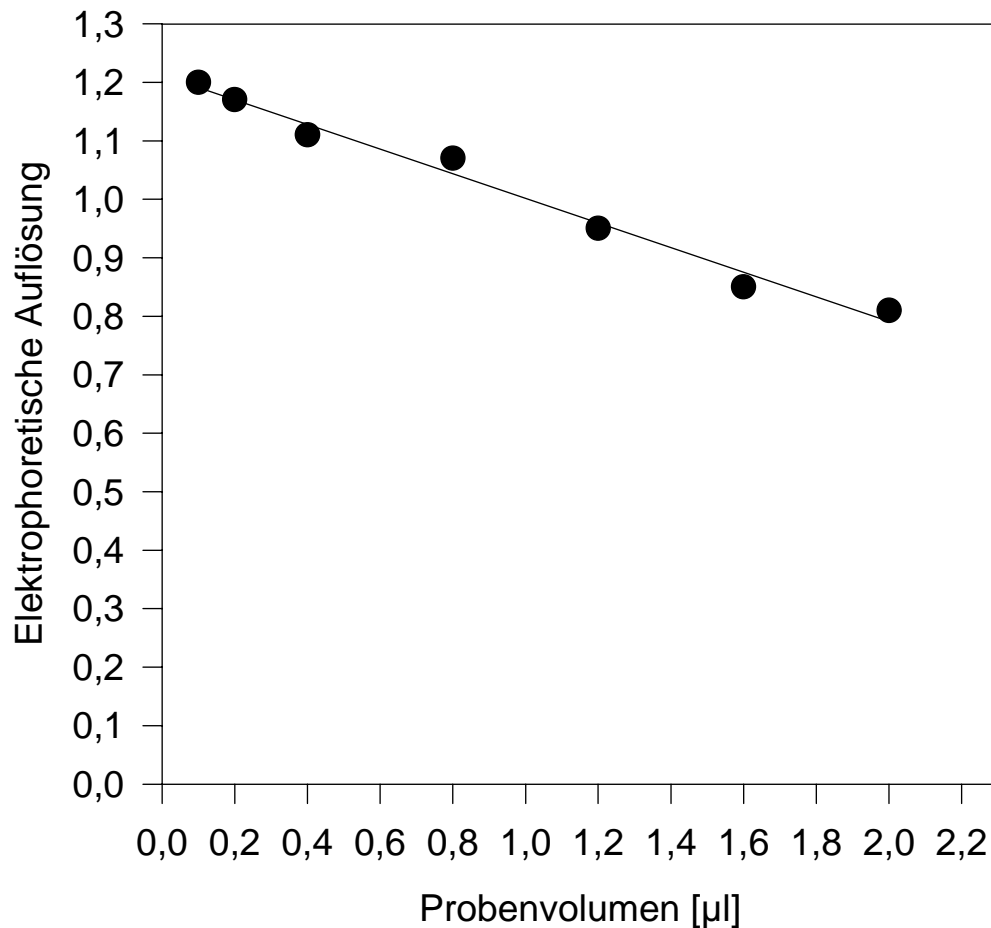
**Abbildung 4.5: Abhängigkeit des Probenvolumens von der Verdampfungszeit.**

Hierbei wird deutlich, dass bis 600 Sekunden nach dem Start der Evaporation die relativ schnelle Verdampfung des Wassers dominiert (600 Sekunden für 4,6 µl Probenflüssigkeit), danach die träge Verdampfung des Formamids (ebenfalls ungefähr 600 Sekunden für 0,3 µl). Das Ausgangsvolumen betrug 5 µl.

### **4.3.2 Elektrophoretische Auflösung in Abhängigkeit vom Probenvolumen**

Um die Abhängigkeit der elektrophoretischen (vertikalen) Auflösung von der räumlichen Ausdehnung der DNA-Moleküle in der Membran zu untersuchen, wurden Experimente mit der Membran Cellulose Mischester (Typ: MV) von der Firma "Macherey&Nagel" durchgeführt. Hierbei wurde eine definierte Menge der Größenmarker (einzelnsträngige 50 und 100 Nukleotide lange Oligomere) zu einer verdünnten Formamid/Dextran-Blau-Lösung gegeben. Gleichfalls wurden, um gleiche Bedingungen wie bei einer Sequenzreaktion zu schaffen, Puffer, Nukleotide und Enzym addiert. Aus diesem Ansatz wurden jeweils 5 µl auf die Taschen einer Mikrotiter-Platte verteilt. Die Proben wurden bei 75 °C für unterschiedliche Zeitintervalle evaporiert. Die unterschiedlichen Probenvolumina, mit allerdings der gleichen Anzahl fluoreszent markierter DNA-Moleküle, wurden dann entnommen und auf die Membran aufgebracht. Abbildung 4.6 zeigt die Abhängigkeit der elektrophoretischen Auflösung vom auf die Membran aufgetragenen Probenvolumen.





**Abbildung 4.6:** Abhängigkeit der elektrophoretischen (vertikalen) Auflösung vom aufgetragenen Probenvolumen.

Es zeigt sich eine lineare Abhängigkeit. Je kleiner die Probenvolumina, desto besser die elektrophoretische Auflösung. Die beste elektrophoretische Auflösung (1,2) konnte bei einem Probenvolumen von 0,1 µl erreicht werden.

Das Ergebnis zeigt eine bessere elektrophoretische Auflösung für kleinere auf die Membran aufgetragene Probenvolumina. Die ursprünglich nach der Sequenzierung aufgetragenen 2 µl zeigen eine um mehr als 30% schlechtere elektrophoretische Auflösung als das auf 0,1 µl reduzierte Probenvolumen.

### 4.3.3 Integriertes Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit vom Probenvolumen

Für Probenvolumina zwischen 0,2 und 0,4  $\mu\text{l}$  ergibt sich ein Maximum für das integrierte Fluoreszenzsignal (Abbildung 4.7). Der Abfall bei 0,1  $\mu\text{l}$  ist wahrscheinlich auf Rückstände des hochviskosen DNA/Formamid-Gemisches in der Mikrotiterplatte und der Pipettenspitze zurückzuführen. Der sehr starke Abfall von 0,2 auf 0,4  $\mu\text{l}$  lässt sich mit dem bis dahin vorhandenen Wasseranteil (siehe auch Abbildung 4.5) und der dadurch geringeren Viskosität der Probenlösung erklären. Deshalb breitet sich die Probenlösung weiter in horizontaler Richtung aus und verlässt damit teilweise den Integrationsbereich einer Spur (dieser ergibt sich aus einem vollen Anteil des mittleren Bildpunkts und jeweils einem halben Anteil des benachbarten Bildpunkts).

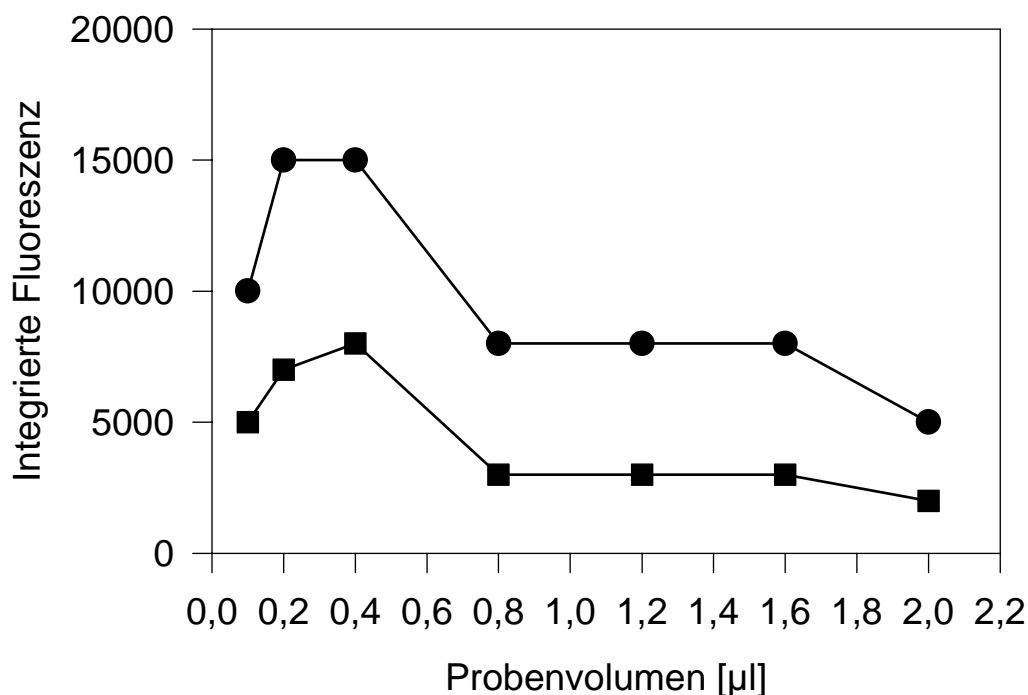


Abbildung 4.7: Das integrierte Fluoreszenzsignal der 50 (oben) und 100 (unten) Nukleotide langen Oligomere in Abhängigkeit vom Probenvolumen. Es ergibt sich bei beiden ein Maximum für Probenvolumina zwischen 0,2 und 0,4  $\mu\text{l}$ .

Fazit ist, dass die angestrebte maximale vertikale Auflösung, wie theoretisch erwartet, bei kleinen Volumina erreicht wird. Das Maximum befindet sich in dieser Messreihe bei 0,1µl und dürfte noch darunter liegen. Leider ist die gemessene DNA-Abgabe in das Gel bei diesem Volumen geringer als bei 0,2 und 0,4µl. Dieser Nachteil lässt sich aber durch das vollständige Auftragen der Sequenzreaktion ausgleichen.

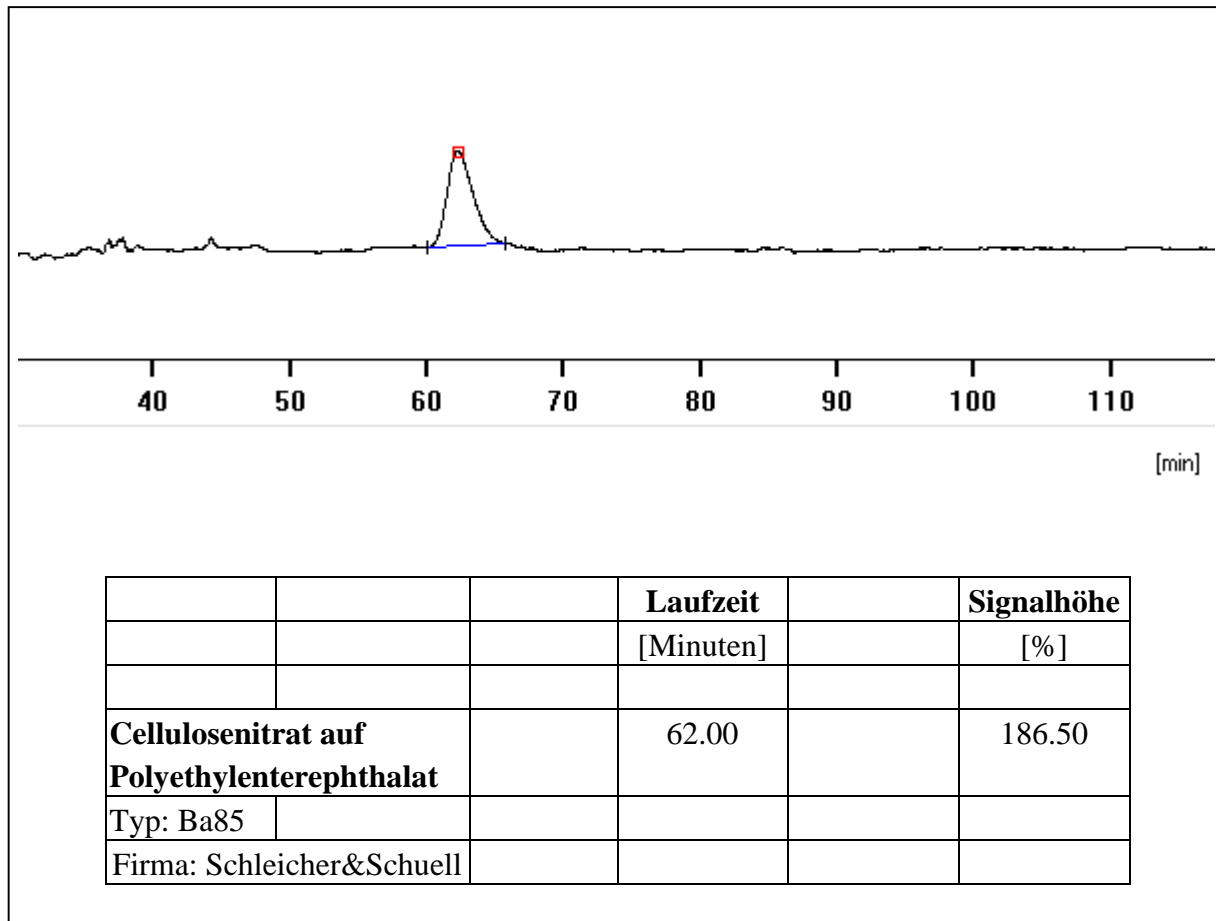
#### **4.4 Erweiterte Auswahl geeigneter Membranen**

Es zeigten sich bereits nach der ersten Entwicklungsphase (4.2) große Unterschiede in der elektrophoretischen Auflösung unterschiedlicher Membrantypen, die sich nur auf deren unterschiedliche Zusammensetzung zurückführen ließen. Deshalb wurde in dieser Versuchsreihe eine Vielzahl unterschiedlicher Membrantypen auf durch Verunreinigungen verursachte Untergrundänderungen, die elektrophoretische Auflösung und das integrierte Fluoreszenzsignal untersucht. Da die in dieser Arbeit vorgestellte Anwendung von Membranen eher zwischen den herkömmlichen Anwendungsgebieten der Chromatographie und Filtrierung liegt, wurden keine Vorgaben an die Auswahl der Typen gemacht.

##### **4.4.1 Messungen der, durch unterschiedliche Membranen verursachten Änderung des Untergrundes des Messaufbaus**

Durch Messungen der durch unterschiedliche Membranen verursachten Änderung des Untergrundes des Messaufbaus, lassen sich solche Membranen ausschließen, die diesen in unerwünschter Art und Weise erhöhen. Hierzu wurden die Membranen mit dem Gel leitend verbunden, die Elektrophorese gestartet und die Datenaufnahme über einen für die DNA-Sequenzierung relevanten Zeitbereich durchgeführt. Durch das elektrische Transferfeld wurden aus einigen Membranen Stoffe freigesetzt, die nach der Migration durch das Gel im Laserstrahl Fluoreszenzlicht abstrahlten. Ausschlossen wurden Signale, die den systematischen Untergrund um mehr als 10 % erhöhen und solche, die um mehr als 50 Minuten nach dem Beginn der Elektrophorese auftreten. Dieser Zeitrahmen wird durch die Migrationsgeschwindigkeit der kleinsten DNA-Fragmente bis zum Laserstrahl und dadurch den eigentlichen Beginn der DNA-Sequenzierung festgelegt. Im Folgenden wird exemplarisch die graphische und die analytische Auswertung einer den fluoreszenten Untergrund des Messaufbaus in unerwünschter Art und Weise erhöhenden Membran

dargestellt. Die Messergebnisse der restlichen Membrane werden in den darauf folgenden Tabellen dargestellt.



**Abbildung 4.8:** Die graphische und tabellarische Darstellung einer unerwünschten Änderung des Untergrundes des Messaufbaus. Die in diesem Beispiel betrachtete Membran, Cellulosenitrat auf Polyethylenterephthalat, setzt negativ geladene Stoffe frei, die nach der Migration im Gel durch das Anregungslicht eines He/Ne-Lasers bei 633nm nach 62 Minuten Laufzeit ein Zusatzsignal von 186,5%, im Vergleich zum systembedingten Untergrund, erzeugen.

#### 4.4.2 Messungen bei 488 nm (Argon Laser) Anregungswellenlänge

			<b>Laufzeit</b>		<b>Signalhöhe</b>
			[Minuten]		[%]
<b>Cellulosenitrat auf Polyethylenterephthalat</b>			50,17		124,56
Typ: Ba85			52,63		183,03
Firma: Schleicher&Schuell			60,47		194,08
<b>Glasfaser auf Polyaethylenterephthalat</b>			50,27		51,23
Typ: GF 52			57,7		52,39
Firma: Schleicher&Schuell			63,93		87,18
			64,7		92,82
			65,57		96,29
			66,9		110,95
			67,63		116,21
			68,5		120,68
			69,23		126,82
			70,23		130,78
			79,43		10,74
			81,43		10,78
<b>Polytrap</b>			50,43		42,88
Typ: PE 396			53,13		75,85
			58,63		56,83
			61,47		24,88
<b>Kongorotpapier</b>			55,03		316,84
Firma: Schleicher&Schuell			62,33		44,46
			71		279,9
<b>Polysulfone</b>			62,07		25,03
Typ: HAT Tuffrin			96,13		34,64
Firma: Pall					

#### 4.4.3 Messungen bei 633 nm (He/Ne-Laser) Anregungswellenlänge

			<b>Laufzeit</b>		<b>Signalhöhe</b>
			[Minuten]		[%]
<b>Cellulosenitrat auf Polyethylenterephthalat</b>			62.00		186.50
Typ: Ba85					
Firma: Schleicher&Schuell					
<b>Glasfaser auf Polyethylenterephthalat</b>			59.93		14.81
Typ: GF 52					
Firma: Schleicher&Schuell					

Mit dieser relativ einfachen Methode ließen sich einige den Untergrund des Messaufbaus in unerwünschter Weise beeinträchtigenden Membranen im Vorfeld aufwendiger Messungen ausschließen.

#### 4.4.4 Erweiterte Auswahl geeigneter Membranen durch Messung der elektrophoretischen Auflösung und des integrierten Fluoreszenzsignals

Die Elektrophoreseparameter wurden so gewählt, dass die Auflösung im Bereich zwischen Oligomer 50 und Oligomer 100 maximal wird. Das elektrische Transferfeld besitzt einen Wert von 10V/cm, das aufgetragene Probenvolumen betrug 0.2 µl. Für die im Weiteren verwendete Trennstrecke von 50 cm ergaben sich die folgenden tabellarisch dargestellten Ergebnisse.

**R<sub>s</sub>: Elektrophoretische Auflösung****F50: Integriertes Fluoreszenzsignal des 50 Nukleotide langen Oligomers****F100: Integriertes Fluoreszenzsignal des 100 Nukleotide langen Oligomers**

Membran	R <sub>s</sub>	F50	F100	Bemerkungen
Celluloseacetat	1.8	21000	9000	brüchig
Firma: Schleicher&Schuell				
Typ: 251/0				
Cellulosemischester	1.4	29000	9000	
Firma: Macherey-Nagel				
Typ: CM (weiß)				
Cellulosemischester	1.3	29000	7000	
Firma: Macherey-Nagel				
Typ: MV (weiß)				
Unterstützt mit Polyester				
Cellulosenitrat	1.3	28000	8000	leicht entzündbar
Firma: Schleicher&Schuell				
Typ: Optitran BA-S85				
Glasfaser				extrem
Firma: Sartorius				verschmierte
Bestellnr.: 13430—25—M				Signale
Nylon 6.6				keine Signale
Firma: Pall				
Typ: Biodyne B				
Nylon 6.6	1.5	30000	10000	
Firma: Pall				
Typ: Biodyne A				
Nylon 6.6	1.5	30000	10000	
Firma: Pall				
Typ: Ultipor NX				
Nylon				keine Signale
Firma: Schleicher&Schuell				
Typ: Super Charge				



Nylon 6.6	1.4	30000	10000	
Firma: Pall				
Typ: Biodyne C				
Nylon 6.6	1.4	30000	8000	
Firma: Roche				
Polyester				keine Signale
Firma: Macherey&Nagel				
Typ: PE				
Polyethersulfon (PES)	1.8	27000	13000	
Firma: Pall				
Typ: Z-Bind				
Polytetrafluorethylen (PTFE)	1,2	27000	3000	
Firma: Macherey&Nagel				
Typ: TE				
Polyvinylidendifluorid (PVDF)				keine Signale
Firma: Pall				
Typ: Aquarius P				
Hand-Kontrolle	1,9	23000	6000	

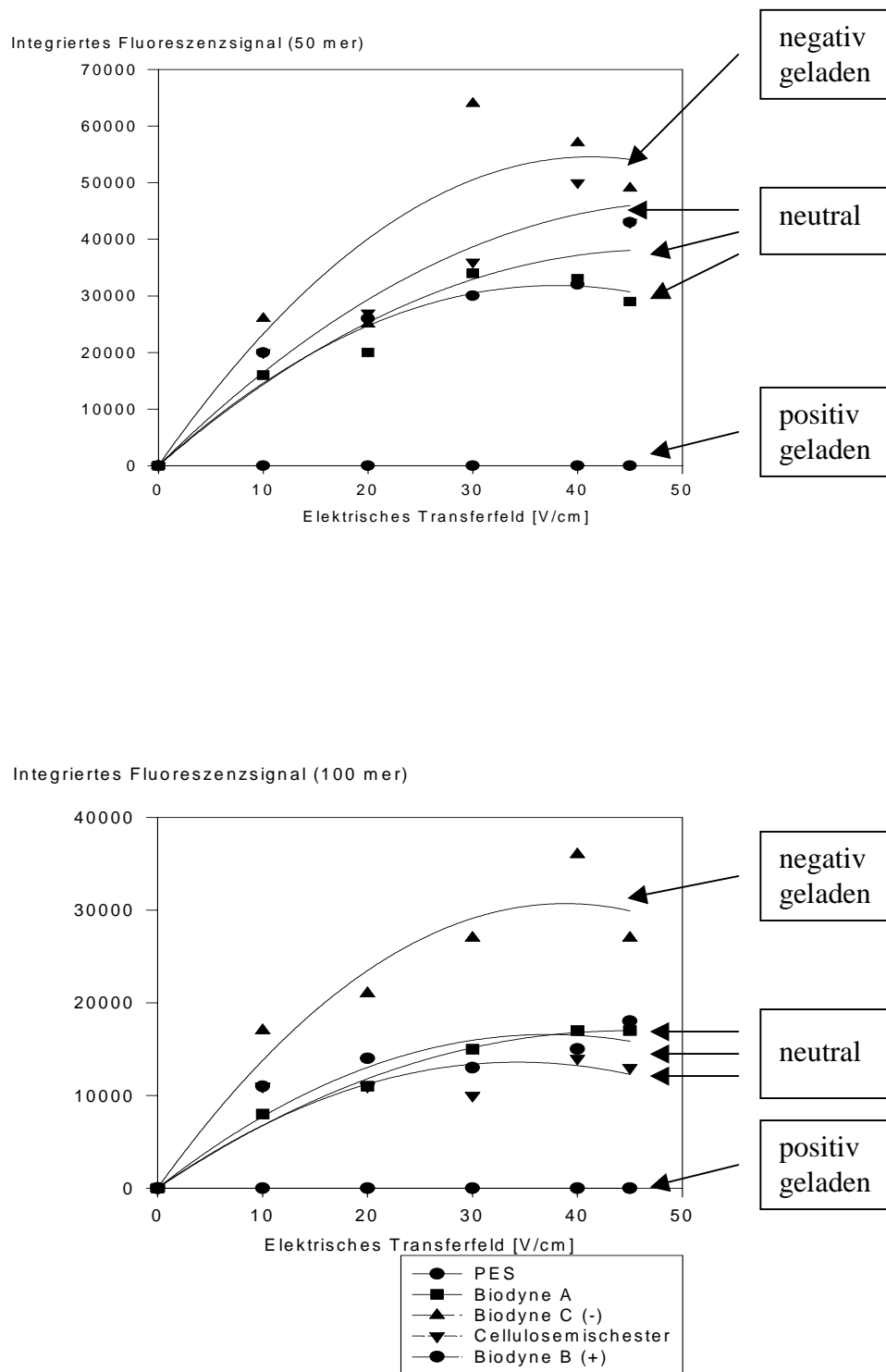
- Von den Membranen, die die besten Resultate zeigen, sind vier Cellulosederivate, zwei basieren auf Nylon 6.6. Die Membran mit den besten Ergebnissen, ist eine auf Polyethersulfon basierende Membran. Diese Membranen erscheinen bei der Aufnahme der Probenlösung hydrophil. Die chemischen Strukturen zeigen, dass sie sowohl hydrophile als auch hydrophobe Gruppen aufweisen. Sie besitzen keine oder negative Oberflächenladungen. Dass die Hand-Kontrolle ein geringeres integriertes Fluoreszenzsignal als manche Membran aufweist, lässt sich durch die Schwierigkeiten, ein so kleines Volumen (0,2 µl) direkt in Probentaschen zu laden erklären.

#### **4.5 Abhängigkeit des integrierten Fluoreszenzsignals und der elektrophoretischen Auflösung von der Stärke des elektrischen Transferfeldes**

Im Rahmen dieser Experimente wurde die Abhängigkeit des integrierten Fluoreszenzsignals (Abbildung 4.9) und der elektrophoretischen Auflösung (Abbildung 4.10) von der Stärke des elektrischen Transferfeldes untersucht. Diese Tests wurden mit fünf sich in ihrer Zusammensetzung unterscheidenden Membrantypen durchgeführt. Das Ziel war es die elektrophoretische Auflösung und das integrierte Fluoreszenzsignal zu erhöhen, darüber hinaus aber auch Aufschlüsse über die Wechselwirkungen zwischen den Membranen und der DNA zu erhalten. Die Untersuchungen wurden wieder mit den 50 und 100 Nukleotiden langen, Cy5 markierten Oligomeren durchgeführt. Das verwendete Probenvolumen war 0,2 µl. Das Produkt aus der Stärke des elektrischen Transferfeldes und der angelegten Zeit wurde konstant bei 8100 (V/cm)·s gehalten. Danach wurde die Elektrophorese gestartet. Bei den Messungen zur Abgabe von DNA aus der Membran in das Gel durch Diffusion wurde 2 Stunden lang der Kontakt zwischen dem Membran-DNA Komplex und dem Gel hergestellt. Danach wurde die Membran entfernt und die Elektrophorese gestartet.

#### **4.5.1 Integriertes Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit von der Stärke des elektrischen Transferfeldes**

- Die in diesen Experimenten eingesetzte Membran BiodyneB, mit positiven Oberflächenladungen, gibt selbst bei der höchsten verwendeten elektrischen Feldstärke (45 V/cm) keine DNA in das Gel ab. Die Coulomb-Anziehungskraft der DNA-Moleküle an die Membran ist zu stark, um sie mit den hier verwendeten elektrischen Feldern von dieser zu lösen.
- Die nach außen neutralen Membranen Polyethersulfone (Z-Bind), Nylon 6.6 (amphoter, Biodyne A), Celluloseacetat, Cellulosemischester und Cellulosenitrat bilden zwischen 30 und 45 V/cm des elektrischen Transferfeldes ein Plateau der Abgabe von DNA in das Gel aus.
- Die - negative Oberflächenladungen besitzende - Membran Nylon 6.6 (Biodyne C) zeigt ebenfalls eine Plateauausbildung zwischen 30 und 45 V/cm, gibt allerdings am meisten DNA in das Gel ab.
- Die Diffusion scheidet ebenfalls als Ursache der Abgabe von DNA in das Gel aus, da selbst bei zweistündigem Kontakt von Membran-DNA Komplex und Gel ohne externes elektrisches Feld keine messbare Abgabe von DNA in das Gel erfolgte.



**Abbildung 4.9:** Das integrierte Fluoreszenzsignal der 50 (oben) und 100 (unten) Nukleotide langen Oligomere in Abhängigkeit vom elektrischen Transferfeld. Die Membran Biodyne B gibt, bedingt durch die Coulomb-Anziehung der negativ geladenen DNA-Moleküle, an die positiv geladene Oberfläche der Membran keine DNA in das Gel ab. Die Membran Biodyne C, mit negativen Oberflächenladungen, gibt, bedingt durch die Coulomb-Abstoßung, am meisten DNA in das Gel ab. Die DNA-Abgabe der Membranen mit ausgeglichener Oberflächenladung liegt dazwischen. Alle Membranen gehen zwischen 30 und 45 V/cm in die Sättigung der Abgabe über.

### 4.5.2 Elektrophoretische Auflösung für unterschiedlich starke elektrische Transferfelder

Mit zunehmender elektrischer Feldstärke verschlechtert sich bis auf die Membran Biodyne A die elektrophoretische Auflösung für alle getesteten Membranen. Bei der Membran Biodyne A bleibt die Auflösung bei allen elektrischen Feldstärken nahezu konstant. Die beste elektrophoretische Auflösung ergibt sich bei 10 V/cm.

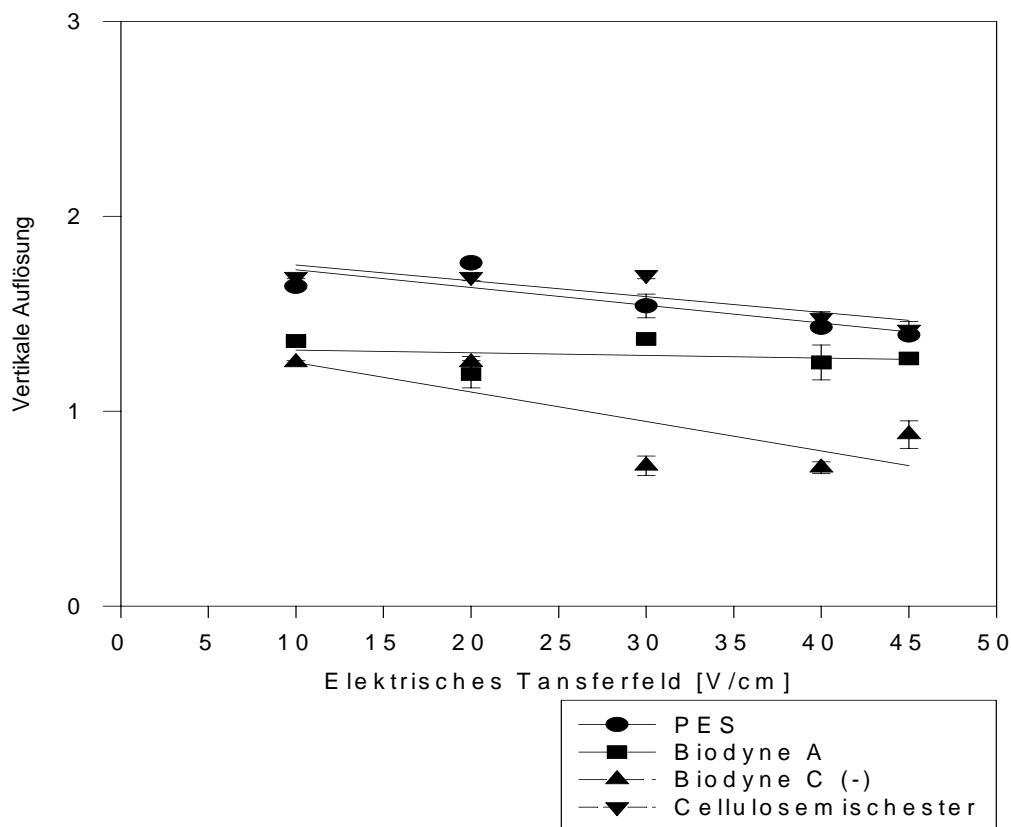


Abbildung 4.10: Abhängigkeit der elektrophoretischen (vertikalen) Auflösung von der Stärke des elektrischen Transferfeldes.

Es zeigt sich, dass mit zunehmender elektrischer Feldstärke, die elektrophoretische Auflösung abnimmt. Dieses Resultat ergibt sich für alle getesteten Membranen, außer der Membran Biodyne A, deren Auflösung bei allen elektrischen Feldstärken nahezu konstant bleibt.

#### **4.6 Simulation des Migrationsweges der DNA aus der Membran in das Gel zur Optimierung der Membrangeometrie für die Membran Polyethersulfon (PES) durch Berechnung der elektrischen Feldlinien**

Nachdem die vorausgegangenen Untersuchungen zeigten, dass die Membran Polyethersulfon (PES) "Biodyne Z" der Firma Pall von allen untersuchten Membranen die besten Resultate erzielte, wurde sie weiteren Untersuchungen unterzogen. Da es darüber hinaus gelungen war, das Probenvolumen - bei gleichbleibender Menge fluoreszent markierter DNA-Moleküle - stark einzuengen und somit die laterale Ausbreitung der Probe zu minimieren, konnte man sich vorstellen, die Membranen einfacher, das heißt ohne gefräste Zähne herzustellen. In diesem Falle würde die Membran geradlinig zur Gel-Eintrittsfläche geschnitten und die Probe nur räumlich versetzt auf unterschiedliche Stellen der Membran appliziert. Dies würde die Herstellung des Membrankammes wesentlich vereinfachen. Da sich durch diese Änderung die das elektrische Feld beim Eintritt der DNA-Moleküle in das Gel bestimmenden Parameter ändern, wurden diese beiden Membrankamm-Geometrien theoretisch wie auch praktisch untersucht. In diese Untersuchungen wurde auch die manuelle Standardbeladungsmethode einbezogen.

Bei der theoretischen Bestimmung des Eintritts der DNA-Moleküle in das Gel wurde der Feldlinienverlauf nach dem Einschalten des externen elektrischen Feldes simuliert. Dies wurde mit dem Programm Quickfield der Firma "Tera Analysis" durchgeführt, das basierend auf der Methode der finiten Elemente die elektrischen Felder nach der Eingabe der Randbedingungen berechnet. Zur Erläuterung der Diagramme soll noch gesagt werden, dass die Länge der Pfeile proportional zur elektrischen Feldstärke ist. Die praktischen Versuche wurden wieder mit den Cy5 markierten 50 und 100 Basen langen Oligomeren durchgeführt. Die Elektrophoresebedingungen waren die gleichen wie bei den Membrantests. Um den Eingabeparameter der räumlichen Ausdehnung der DNA-Probenlösung nach ihrer Applikation auf die Membranen zu bestimmen wurden die DNA-Moleküle auf der Membran mit einem Gel-Scanner bei 655 nm Anregungswellenlänge visualisiert.

#### 4.6.1 Bestimmung der spezifischen Widerstände, der in die Simulation eingehenden Geometrien

Die Messungen der Leitfähigkeiten, der in die Simulation eingehenden Geometrien wurde, mit zwei unterschiedlichen Verfahren durchgeführt.

1. Mit dem Leitfähigkeitsmessgerät HI 8733 der Firma "Hanna Instruments" wurden die spezifischen Widerstände der in die Simulationen eingehenden Lösungen und Gele bestimmt.

Die für die spezifischen Leitfähigkeiten  $\chi$  [S/m] erhaltenen Werte wurden gemäß  $\rho = 1/\chi$  in den jeweiligen spezifischen Widerstand  $\rho$  [ $\Omega$  m] umgerechnet.

2. Der spezifische Widerstand der mit der jeweiligen Lösung gestättigten Polyethersulfon Membran wurde mit dem Multimeter ME32 der Firma "Conrad" bestimmt. Aus dem gemessenen Widerstand  $R$  [ $\Omega$ ] errechnet sich der spezifische Widerstand  $\rho = F \cdot R/D$ . Hierbei ist  $F$  die Fläche der Messelektroden und  $D$  die Dicke der Membran.

*Spezifische Widerstände  $\rho$  mit dem Leitfähigkeitsmessgerät HI 8733 bestimmt:*

$\rho$  (1 X TBE): 10,0  $\Omega$  m

$\rho$  (0,6 X TBE): 11,5  $\Omega$  m

$\rho$  (Gel A): 14,2  $\Omega$  m

$\rho$  (Gel B): 13,2  $\Omega$  m

$\rho$  (DNA Probe): 4,2  $\Omega$  m  
(auf 0,2  $\mu$ l einedampft)



*Spezifischer Widerstand  $\rho$  von Polyethersulfon (Literaturwert):*

$\rho$  (PES):  $2,9 \cdot 10^{14} \Omega \text{ m}$

*Spezifischer Widerstand  $\rho$  von Polyethersulfon (gemessen):*

$\rho$  (Gesättigt in 0,6xTBElow):  $4,2 \cdot 10^4 \Omega \text{ m}$

$\rho$  (Gesättigt in 1,0xTBElow):  $2,1 \cdot 10^4 \Omega \text{ m}$

$\rho$  (Gesättigt in Sequenzreaktion):  $1,7 \cdot 10^4 \Omega \text{ m}$   
(auf 0,2  $\mu\text{l}$  einedampft)

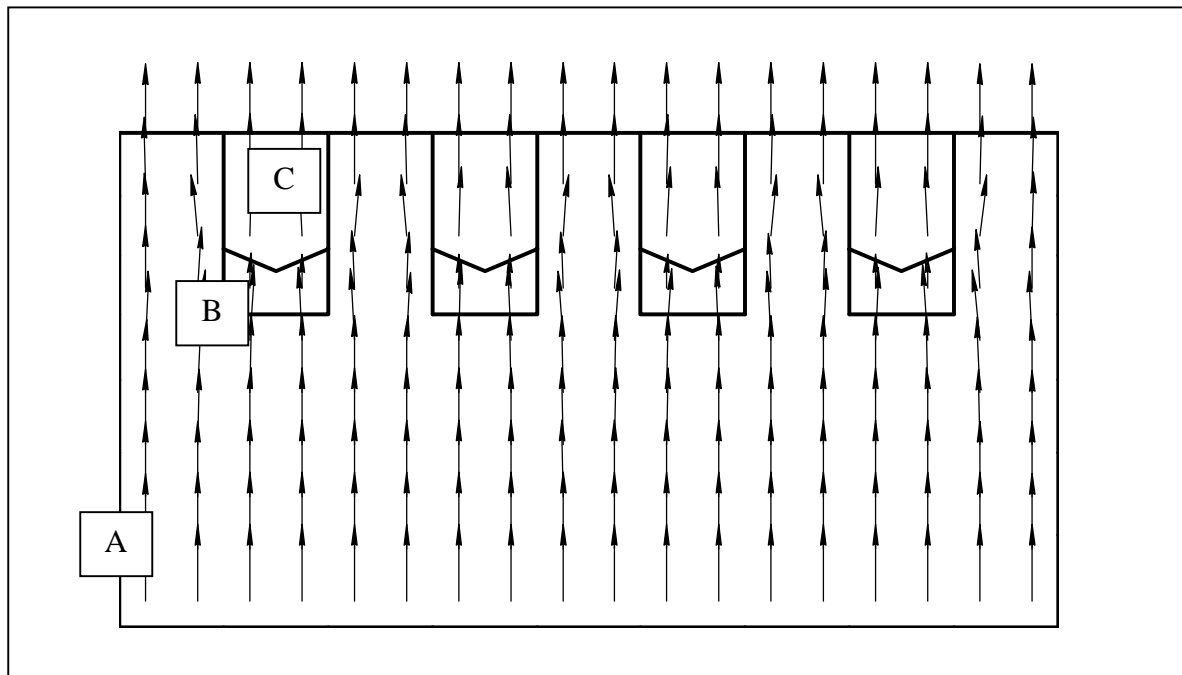
$\rho$  (Gesättigt in Test DNA):  $2,1 \cdot 10^4 \Omega \text{ m}$   
(auf 0,2  $\mu\text{l}$  einedampft)

#### **4.6.2 Simulationen der Standardmethode zur Beladung von Gelen mit DNA**

Die Abbildung 4.11 zeigt den elektrischen Feldlinienverlauf im Startzonenbereich der Standardmethode (Handbeladung der DNA in Probenfächer im Gel). Der Bereich (A) entspricht dem Gel, (B) der DNA-Probenlösung und (C) dem Pufferbereich. Die horizontale Ausdehnung der Probenfächer beträgt 1,6 mm.

Erst wird die Probe leicht konzentriert, um dann wieder leicht gespreizt zu werden. Insgesamt zeigt die Simulation einen nahezu parallelen Eintritt der DNA-Moleküle in das Gel.

Dieses Ergebnis lässt sich auch intuitiv erwarten, unterscheiden sich doch die spezifischen Widerstände  $\rho$  des Puffers zwischen den Zäunen ( $11,5 \Omega \text{ m}$ ), dem Gel ( $14,2 \Omega \text{ m}$ ) und der Probenlösung ( $4,2 \Omega \text{ m}$ ) nur unwesentlich.



**Abbildung 4.11:** In dieser Abbildung sind die elektrischen Feldlinien der Eintrittsphase der DNA in das Gel, unter Standardbedingungen (die DNA-Probenlösung befindet sich in Geltaschen) dargestellt. Der Bereich (A) entspricht dem Gel, (B) der DNA-Probenlösung und (C) dem Pufferbereich. Die Probe wird beim Eintritt in das Gel erst minimal konzentriert, um dann wieder minimal gespreizt zu werden

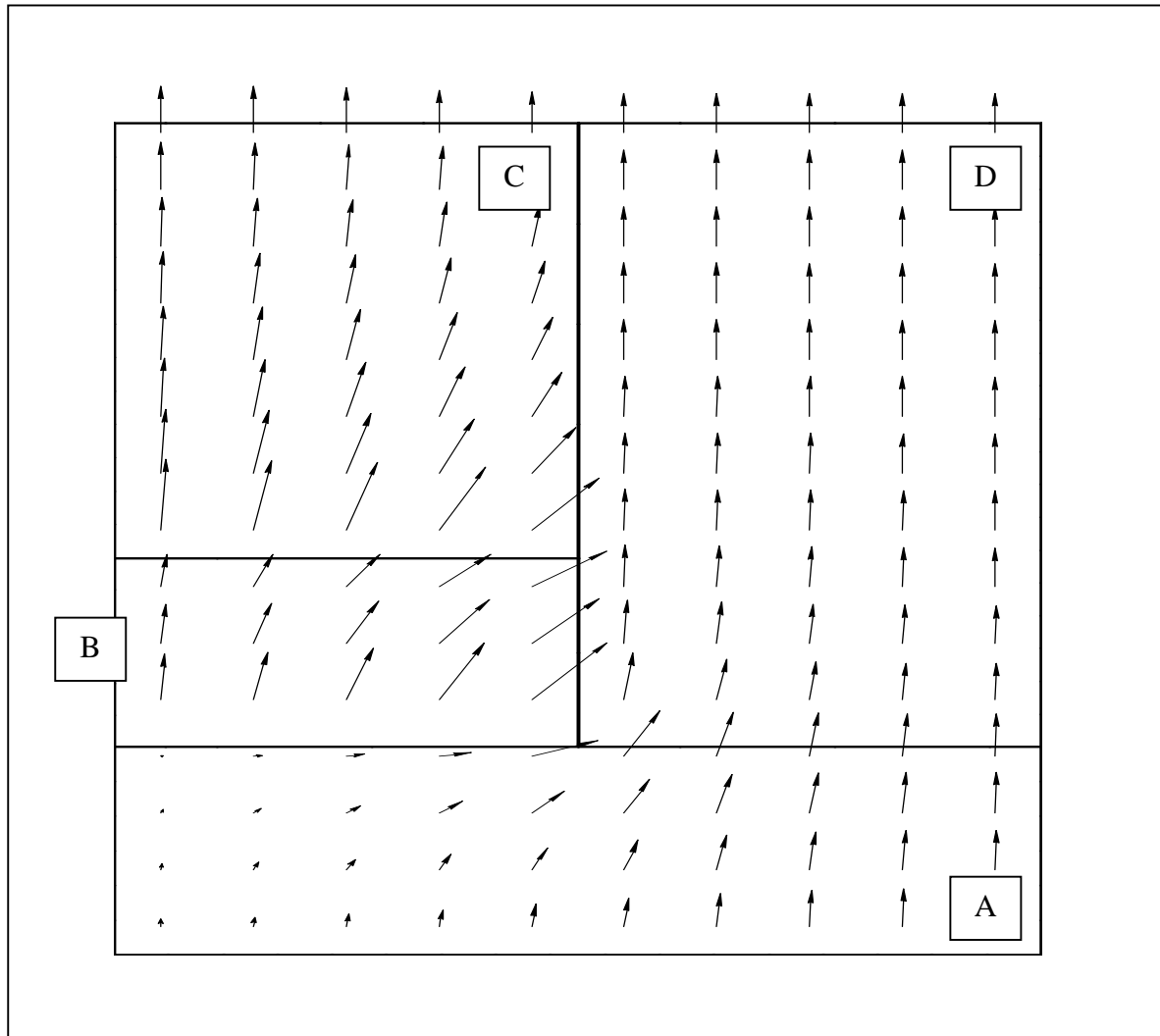
#### 4.6.3 Simulation der Seitenansicht eines Geles mit Membrankamm

Dieses Modell wurde bei den elektrischen Feld-Simulationen in die Betrachtungen aufgenommen, da eine frontale Ansicht des Ladebereiches alleine keine vollständige physikalische Aussage erlauben würde. Dies kommt daher, dass anders als bei der Standardmethode, der Raum zwischen den Glasplatten bei der Membranmethode nicht vollständig mit der Membran ausgefüllt ist.

Die Abbildung 4.12 zeigt die Seitenansicht des elektrischen Transferfeldes des Startzonenbereiches für diese Anordnung. Der Bereich (A) entspricht dem Gel (horizontale Ausdehnung: 0,3mm), (B) der mit Probenlösung gesättigten Membran Polyethersulfon (Dicke: 0,16mm), (C) der mit Puffer gesättigten Membran und (D) dem Pufferbereich (0,14mm).

Das Ergebnis zeigt beim Eintritt der DNA-Moleküle in das Gel eine Konzentrierung an der linken Seite der Glasplatte, was sich vorteilhaft auf die elektrophoretische Auflösung

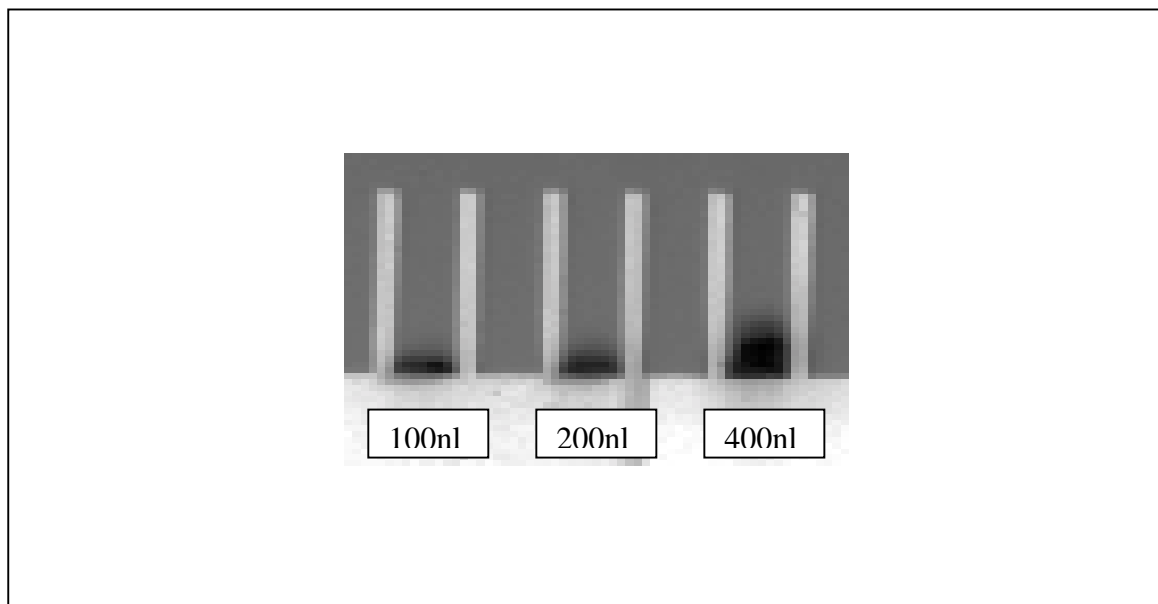
auswirken sollte, da die DNA-Moleküle einem geringeren Temperaturgradienten über die horizontale im Gel ausgesetzt sind.



**Abbildung 4.12:** Darstellung der elektrischen Feldlinien der Eintrittsphase der DNA-Moleküle aus dem Membran-DNA Komplex in das Gel (Seitenansicht). Der Bereich (A) entspricht dem Gel (horizontale Ausdehnung: 0,3 mm), (B) der mit Probenlösung gesättigten Membran Polyethersulfon (Dicke: 0,16 mm), (C) der mit Puffer gesättigten Membran und (D) dem Pufferbereich (0,14 mm). Das Ergebnis zeigt eine Konzentrierung der DNA-Moleküle an der linken Seite der Glasplatte, was sich vorteilhaft auf die elektrophoretische Auflösung auswirken sollte, da die DNA-Moleküle einem geringeren Temperaturgradienten über die Geldicke ausgesetzt sind.

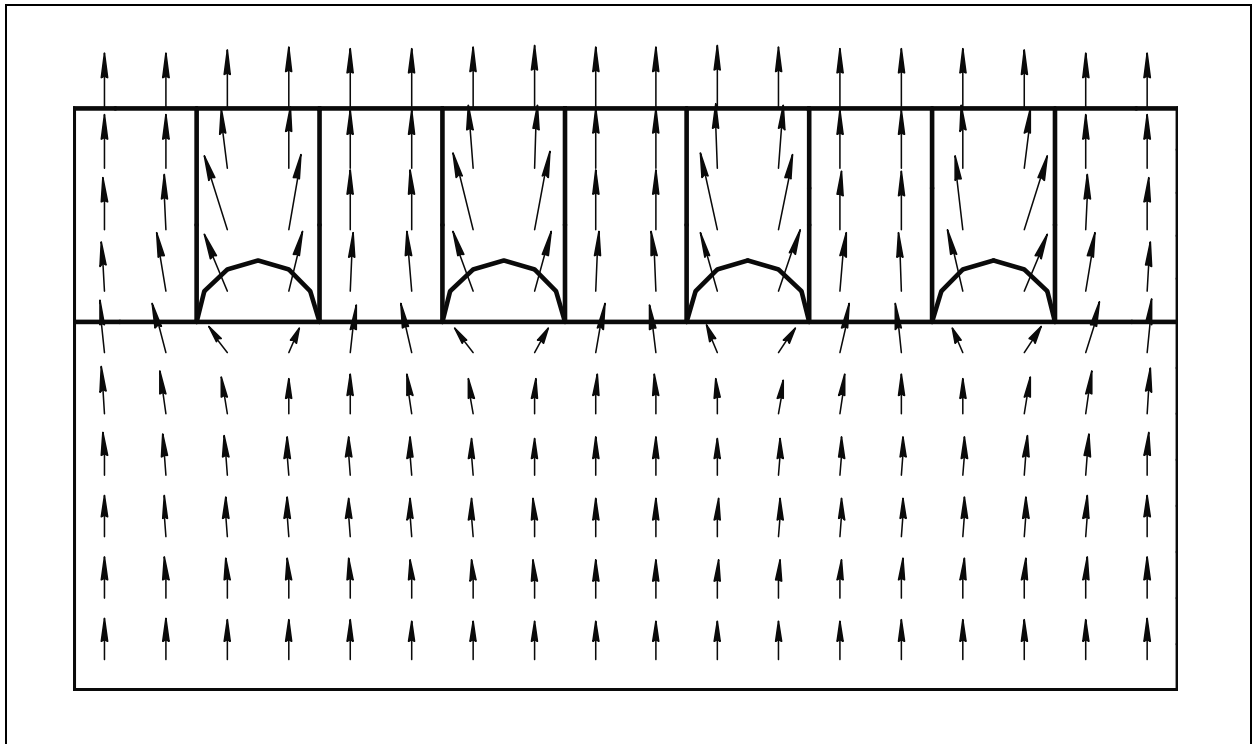
#### 4.6.4 Simulation der elektrischen Feldlinienverteilung der Eintrittsphase der DNA-Moleküle in das Gel für eine Polyethersulfon-Membran mit gefrästen Zähnen

Bei dieser Simulation wurde davon ausgegangen, dass die Probenlösung auf die Spitzen einer Polyethersulfon-Membran mit ausgefrästen Zähnen aufgebracht wurde. Um die Eingabeparameter zu komplettieren, musste die geometrische Ausdehnung der Probenlösung auf der Membran bestimmt werden. Diese Visualisierung der fluoreszent markierten DNA-Moleküle auf der Membran wurde mit einem Fuji-Scanner durchgeführt. Das Ergebnis wird in Abbildung 4.13 gezeigt. Bei diesen Versuchen wurden 63,1 pmol fluoreszent markierter Oligomere eingesetzt. Die horizontale Breite der Zähne ist 1,6 mm. Der Abstand zwischen den Zähnen beträgt 0,5 mm und Zahnlänge 6 mm.



**Abbildung 4.13:** Durch die Aufnahmen mit einem Fuji-Scanner, konnte die geometrische Verteilung der DNA-Moleküle auf der Polyethersulfon-Membran mit gefrästen Zähnen sichtbar gemacht werden. Es wurden von links nach rechts 63.1 pmol fluoreszenter Moleküle in 100, 200 und 400nl Probenlösung auf die Zahnspitzen einer Polyethersulfon-Membran (Dicke 0,16 mm) aufgetragen. Die horizontale Breite der Zähne beträgt 1,6mm, der Abstand zwischen den Zähnen 0,5mm und die Zahnlänge 6 mm.

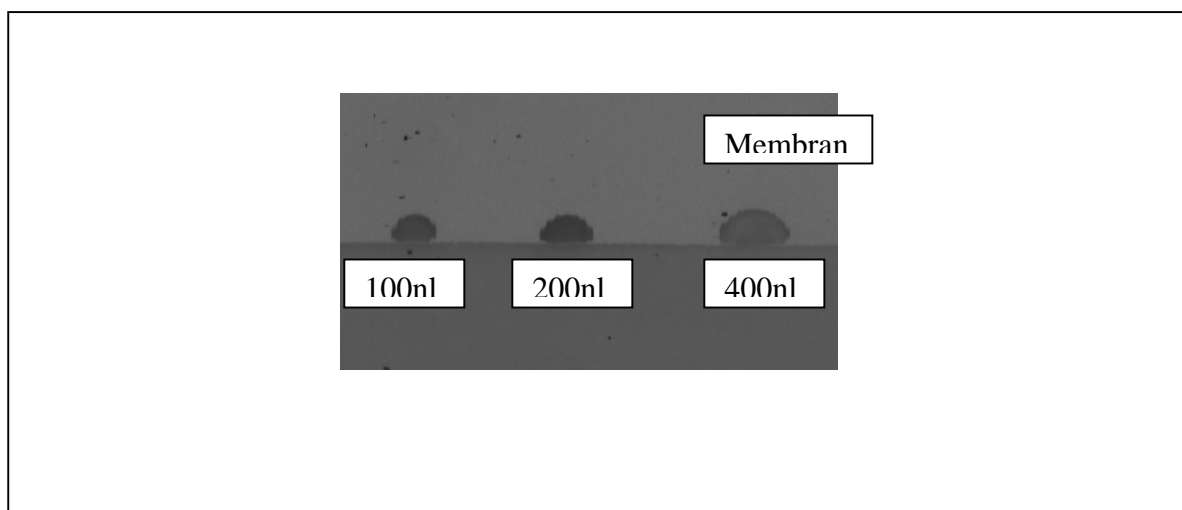
Es zeigt sich, dass sich die Probe von dem Probenauftragungspunkt (Mitte der Zahnspitze) aus halbmondförmig ausbreitet. Mit den Vorgaben der spezifischen Widerstände und räumlichen Ausdehnung der Probenlösung auf der Membran konnte die Bewegung der DNA-Probe aus der Membran in das Gel simuliert werden (Abbildung 4.14). Es zeigt sich eine sehr starke Zentrierung der Probe in der Gel-Eintrittsphase. Diese starke Zentrierung sollte sich positiv auf die horizontale Auflösung der Detektion auswirken. Diese Vorhersage konnte später experimentell bestätigt werden.



**Abbildung 4.14:** In dieser Darstellung werden die elektrischen Feldlinien der Eintrittsphase der DNA Moleküle in das Gel um die Polyethersulfon-Membran mit gefrästen Zähnen gezeigt. Es zeigt sich eine starke horizontale Zentrierung der Probe in der Geleintrittsphase. Diese starke Zentrierung sollte sich positiv auf die horizontale Auflösung der Detektion auswirken.

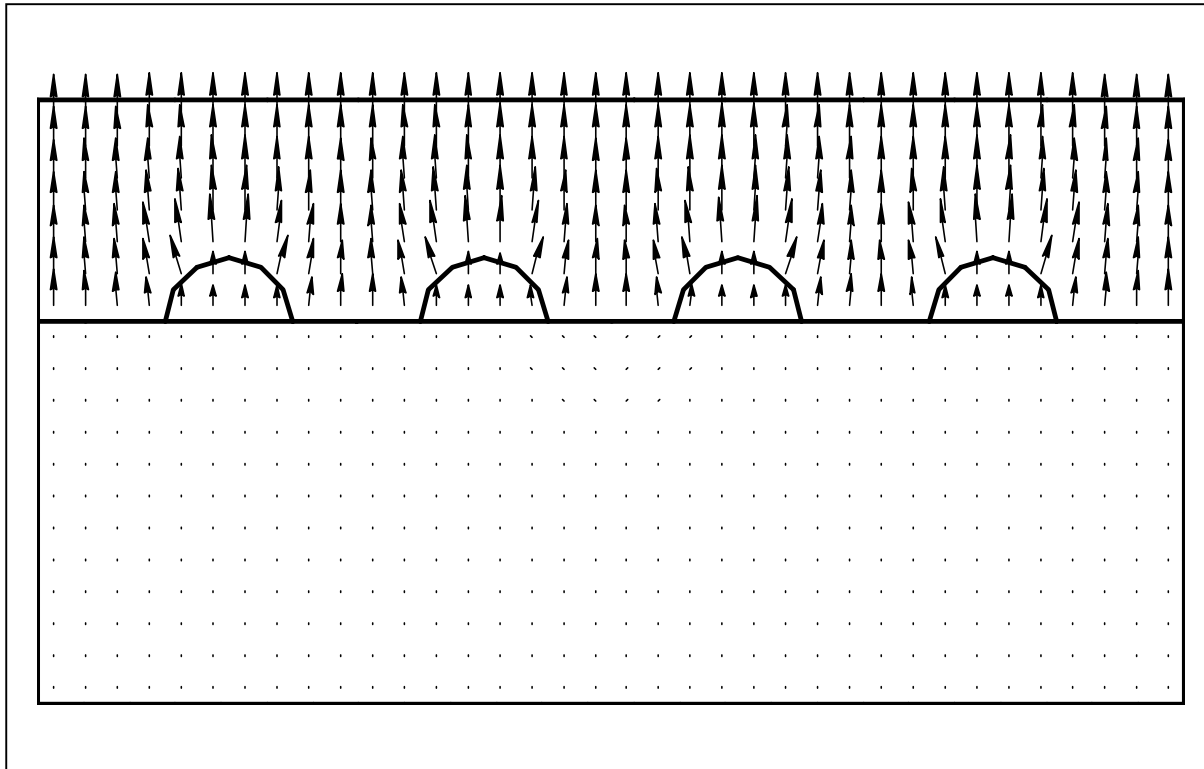
#### 4.6.5 Simulation der elektrischen Feldlinienverteilung der Eintrittsphase der DNA-Moleküle in das Gel für eine Polyethersulfon-Membran ohne gefräste Zähne

Die Versuche mit dem Fuji-Scanner sollten in diesem Fall nicht nur Aufschlüsse über die Geometrie der Ausbreitung der Probenlösung auf der Membran bringen, sondern auch das Volumen vorgeben, mit dem die späteren praktischen Versuche durchgeführt werden. Dieses sollte, um die späteren praktischen Messungen vergleichen zu können, nach dem Auftragen der Probenlösung auf die Membran die gleiche räumliche Ausdehnung, wie die horizontale Weite der gefrästen Zähne haben.



**Abbildung 4.15:** Durch die Aufnahmen mit einem Fuji-Scanner, konnte die geometrische Verteilung der DNA-Moleküle, auf der „zahnlosen“ Polyethersulfon-Membran, sichtbar gemacht werden. Es wurden von links nach rechts 63.1 pmol fluoreszenter Moleküle in 100, 200 und 400 nl Probenlösung auf eine Polyethersulfon Membran aufgetragen. Daraus ergaben sich horizontale Ausdehnungen von 28, 32 und 44 Pixeln, was bei 50  $\mu\text{m}$  Pixelweite, 1,4 mm, 1,6 mm und 2,2 mm entspricht.

Das auf die Membran aufgebrachte Probenvolumen von  $0,2\ \mu\text{l}$  entspricht gerade der räumlichen Ausdehnung der Zahnbreite der gefrästen Zähne. Die Abbildung 4.16 zeigt die Simulation des Verlaufs der elektrischen Feldlinien um eine „zahnlose“ Polyethersulfon-Membran. Es zeigt sich eine weniger starke Zentrierung der Probe in der Gel-Eintrittsphase, als bei der Membran mit ausgefrästen Zähnen.



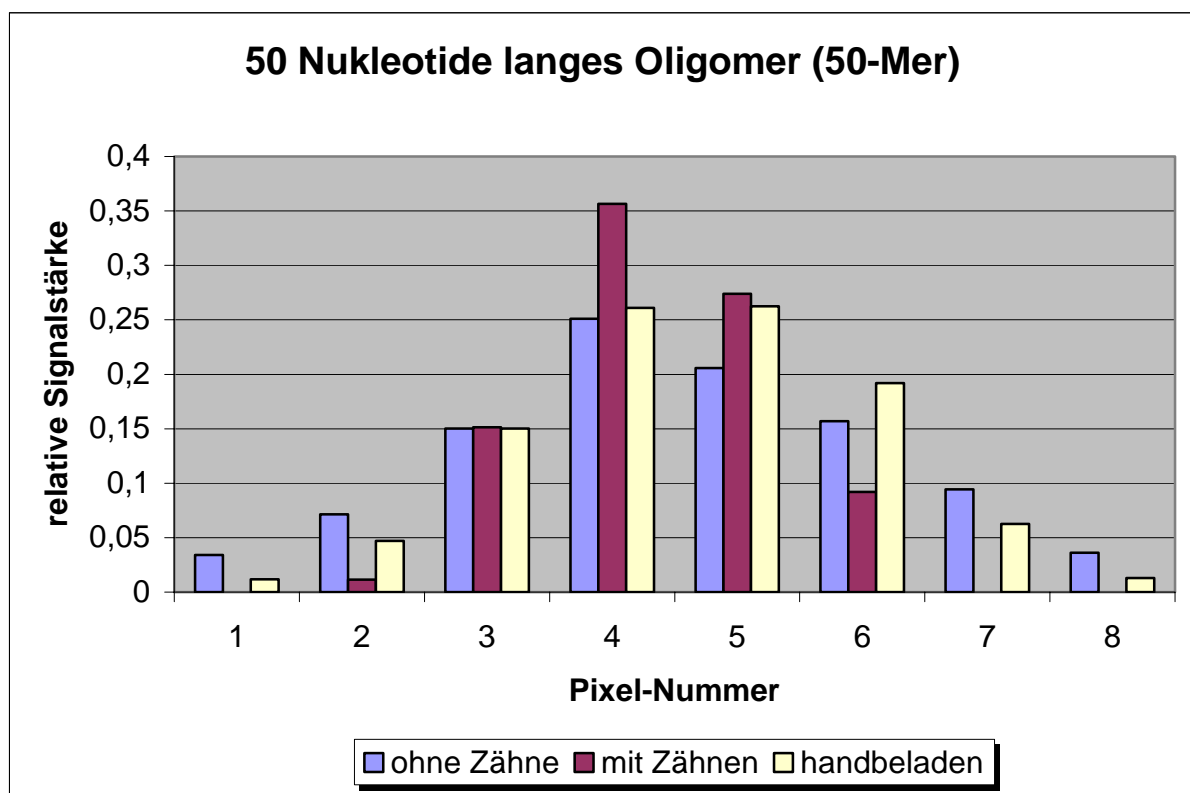
**Abbildung 4.16:** Diese Darstellung zeigt die elektrischen Feldlinien um eine „zahnlose“ Polyethersulfon-Membran. Es zeigt sich eine weniger starke horizontale Zentrierung der Probe in der Gel-Eintrittsphase, als bei der Membran mit ausgefrästen Zähnen. Dieses Resultat konnte experimentell bestätigt werden.

#### 4.6.6 Messungen der Eintrittsphase der DNA-Moleküle in das Gel

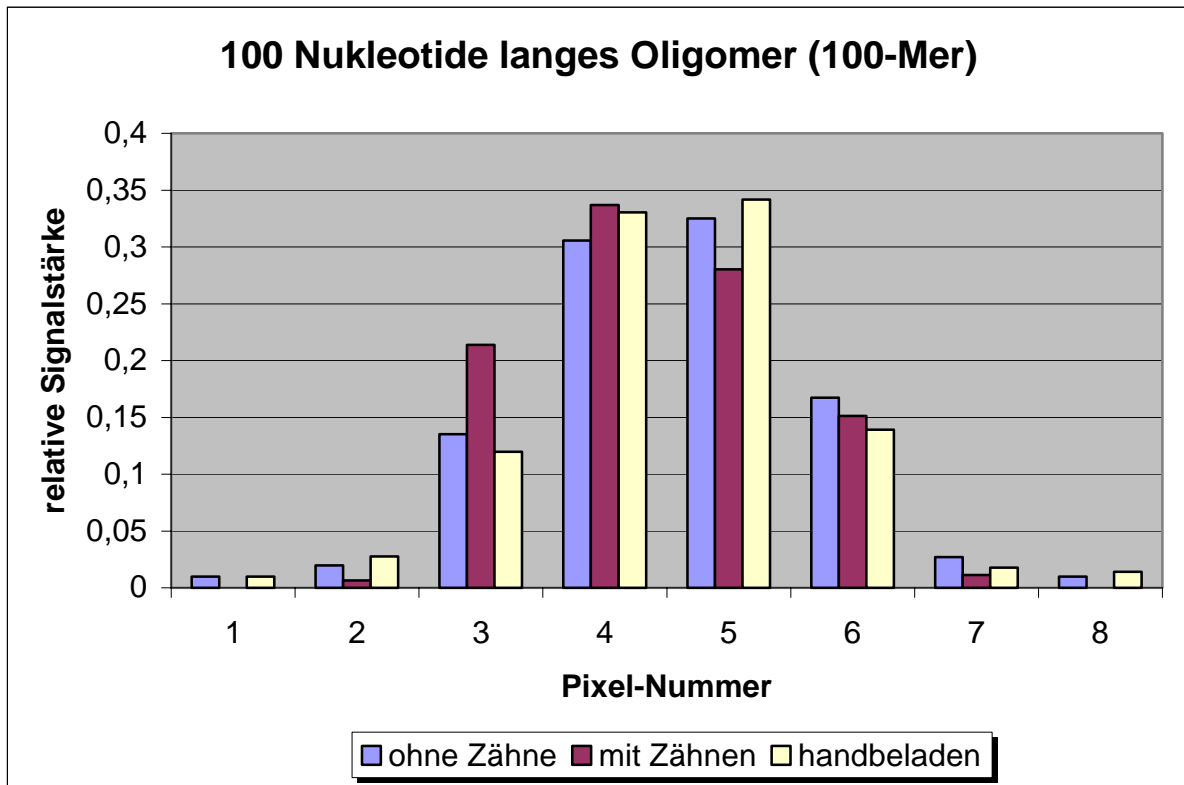
Die Messungen der Eintrittsphase der DNA-Moleküle in das Gel ergaben die gleichen Resultate, wie sie durch die Simulationen vorhergesagt wurden. Die schwächere Signalstärke der Handbeladung lässt sich mit den Schwierigkeiten der Beladung dieser kleinen Volumina auf die kleinen Probenauftragsflächen erklären.



Die Abbildungen 4.18 und 4.19 zeigen die relative Signalstärke (Ordinate) pro jeweiligem Pixel (Abszisse) für das 50, beziehungsweise 100 Nukleotide lange Oligomer. Es zeigt sich, wie durch die Simulation vorhergesagt, dass sich die DNA-Moleküle beim Eintritt in das Gel bei der Membran mit gefrästen Zähnen weniger stark ausbreiten, als bei der Standardmethode der Gelbeladung und der Membran ohne gefräste „Zähne“. In den Pixeln 1 und 8 sind bei der Membran mit gefrästen Zähnen keine Signale mehr detektierbar. Beim 50-Mer ist bereits in Pixel 7 kein Signal mehr detektierbar.



**Abbildung 4.18:** Diese Graphik zeigt, das relative integrierte Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit von der Pixel-Nummer für das 50 Nukleotide lange Oligomer (50-Mer). Es zeigt sich, wie durch die Simulation vorhergesagt, dass die Membran mit Zähnen die geringste laterale Ausbreitung der DNA-Moleküle bewirkt.



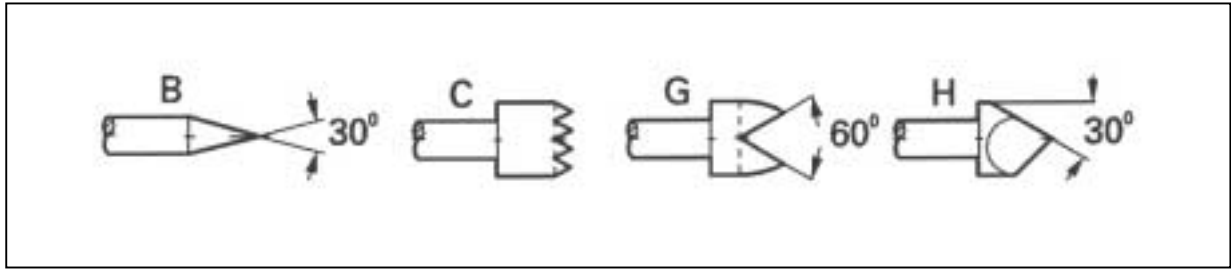
**Abbildung 4.19:** Diese Graphik zeigt das relative integrierte Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit von der Pixel-Nummer für das 100 Nukleotide lange Oligomer (100-Mer). Es zeigt sich, wie durch die Simulation vorhergesagt, dass die Membran mit Zähnen die geringste laterale Ausbreitung der DNA-Moleküle bewirkt. In den Pixeln 1 und 8 sind bei der Membran mit gefrästen Zähnen keine Signale mehr detektierbar. Der Effekt ist allerdings nicht so ausgeprägt wie bei den 50-Meren.

## **4.7 Automatisierung der Aufnahme von kleinen Probenvolumina (0,1 µl) aus Mikrotiterplatten und deren Abgabe auf Membranen**

In diesem Kapitel wird die Automatisierung der Probenaufnahme aus einer Mikrotiter-Platte und deren Abgabe auf eine Membran beschrieben. Es musste eine Art des Probentransfers gefunden werden, die in reproduzierbarer Art und Weise hochviskose Proben im Volumenbereich von 0,1-0,2 µl aus einer Mikrotiter-Platte aufnimmt und wieder auf eine Membran abgibt. Die getesteten aktiven Systeme arbeiten bei diesen kleinen Volumina nicht mehr reproduzierbar. Zu diesen Systemen gehört die Methode der Probenaufnahme durch Unterdruck und der Abgabe durch Überdruck, wie sie in Kapitel 4.1 eingesetzt wurde. Es wurde ebenfalls ein System, das auf dem Piezo-Effekt beruht, getestet. Dieses System kann kleinere Volumina bis in den Nanoliter-Bereich applizieren. Allerdings muss gewährleistet sein, dass die Probe aus mehreren Mikrolitern Lösung (3-5 µl) aufgenommen wird, was bei unserem Probenansatz nicht der Fall ist (1µl). Ist die Probenaufnahme erfolgreich, kann das System mehrfach die gleiche Probe und das selbe Volumen an einen vorbestimmten Ort applizieren. Ein weiteres Problem trat bei unterschiedlichen Proben, wie es die DNA Sequenzierung voraussetzt, auf. Da die Oberfläche der einzelnen Proben sehr oft geringfügig unterschiedlich ist, was sich dann in unterschiedlichen Abgeberichtungen bemerkbar macht, ist dieses System für einen ständigen Wechsel der Probe nicht brauchbar.

### **4.7.1 Der Probentransfer**

Die Entscheidung fiel schließlich auf eine passive Art des Probentransfers. Es zeigte sich, dass Spitzen, die normalerweise zur Qualitätsprüfung von Platinen eingesetzt werden, die größte Reproduzierbarkeit beim Transfer dieser kleinen, viskosen Volumina besitzen (Firma Bürklin). Diese Spitzen sind mit integrierter Federung erhältlich, was sowohl die Justierung der Mikrotiterplatte als auch die Abgabe auf die Membran erleichtert. In der Abbildung 4.20 werden vier unterschiedliche Spitzenformen gezeigt. Die Form H konnte in sehr reproduzierbarer Art und Weise Probenvolumina von 0,1 µl aus den Taschen einer Mikrotiter-Platte aufnehmen und anschließend wieder auf eine Membran abgeben.



**Abbildung 4.20:** Die gefederte Spitze mit der Form H der Firma "Bürklin" (Bestellnummer: 12H1818) konnte in reproduzierbarer Art und Weise Probenvolumina von 0,1 µl aus den Taschen einer Mikrotiter-Platte aufnehmen und anschließend auf eine Membran abgeben.

#### 4.7.2 Das Robotersystem

Der ausgewählte Roboter der Firma Gesim (Abbildungen 4.21, 4.22) besteht aus drei Schrittmotoren mit den folgenden Spezifikationen:

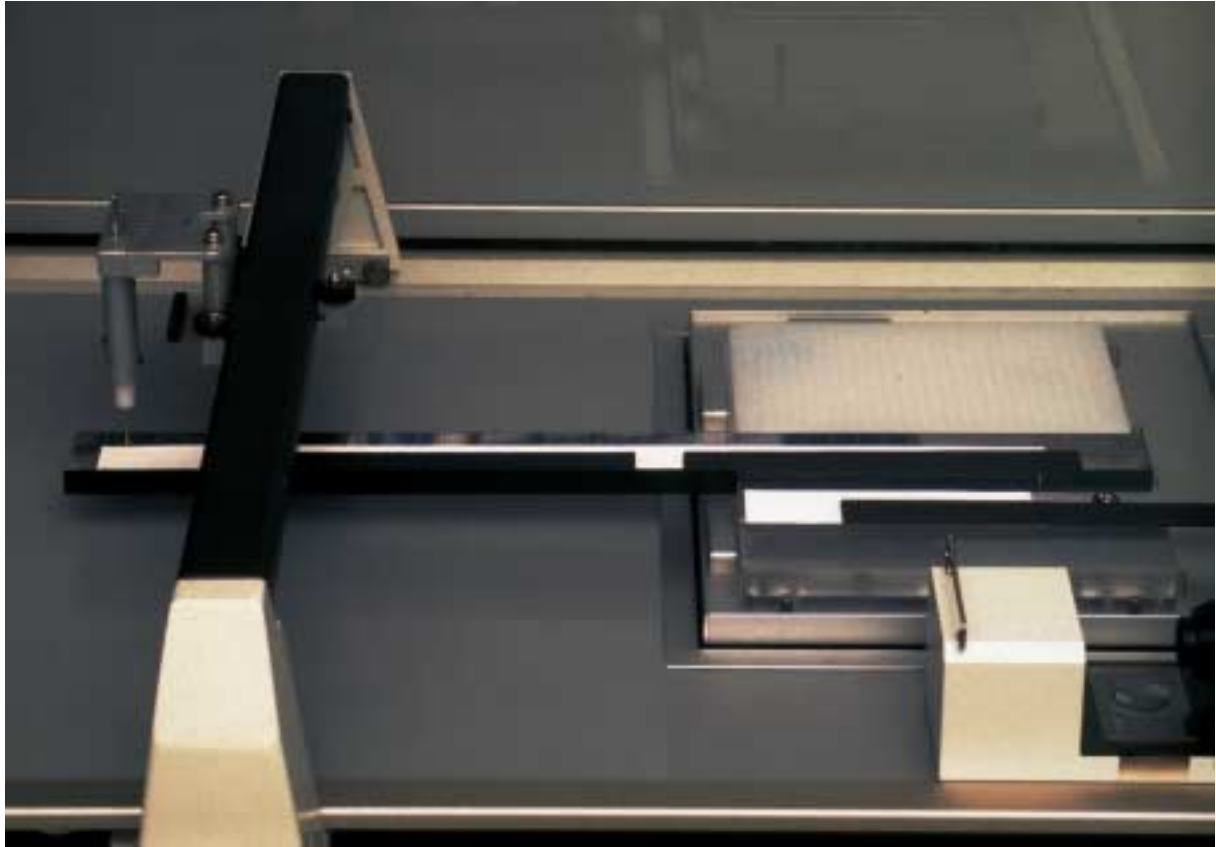
	Fahrbereiche	Auflösung
X – Richtung	0.....+390mm	50µm
Y – Richtung	0.....+267mm	50µm
Z – Richtung	0.....+30mm	1µm

	Geschwindigkeiten	Wiederholgenauigkeit
X – Richtung	42cm/s	+/- 50µm
Y – Richtung	42cm/s	+/- 50µm
Z – Richtung	10-15 mm/s	+/- 100µm

Zur Anpassung an die Spitzenformen wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Steinbrenner eine spezielle Nadelhalterung konstruiert. Die Halterung für die Membranablage wurde in der mechanischen Werkstatt des EMBL gefertigt.



**Abbildung 4.21:** In dieser Abbildung wird der Gesamtaufbau des Membran-Beladungsroboters gezeigt. Im Vordergrund befindet sich die Tastatur des Steuercomputers, dahinter der aktive Teil der Membranbeladung mit der Halterung der Mikrotiter-Platte, der Membranablage und der Transferspitze.

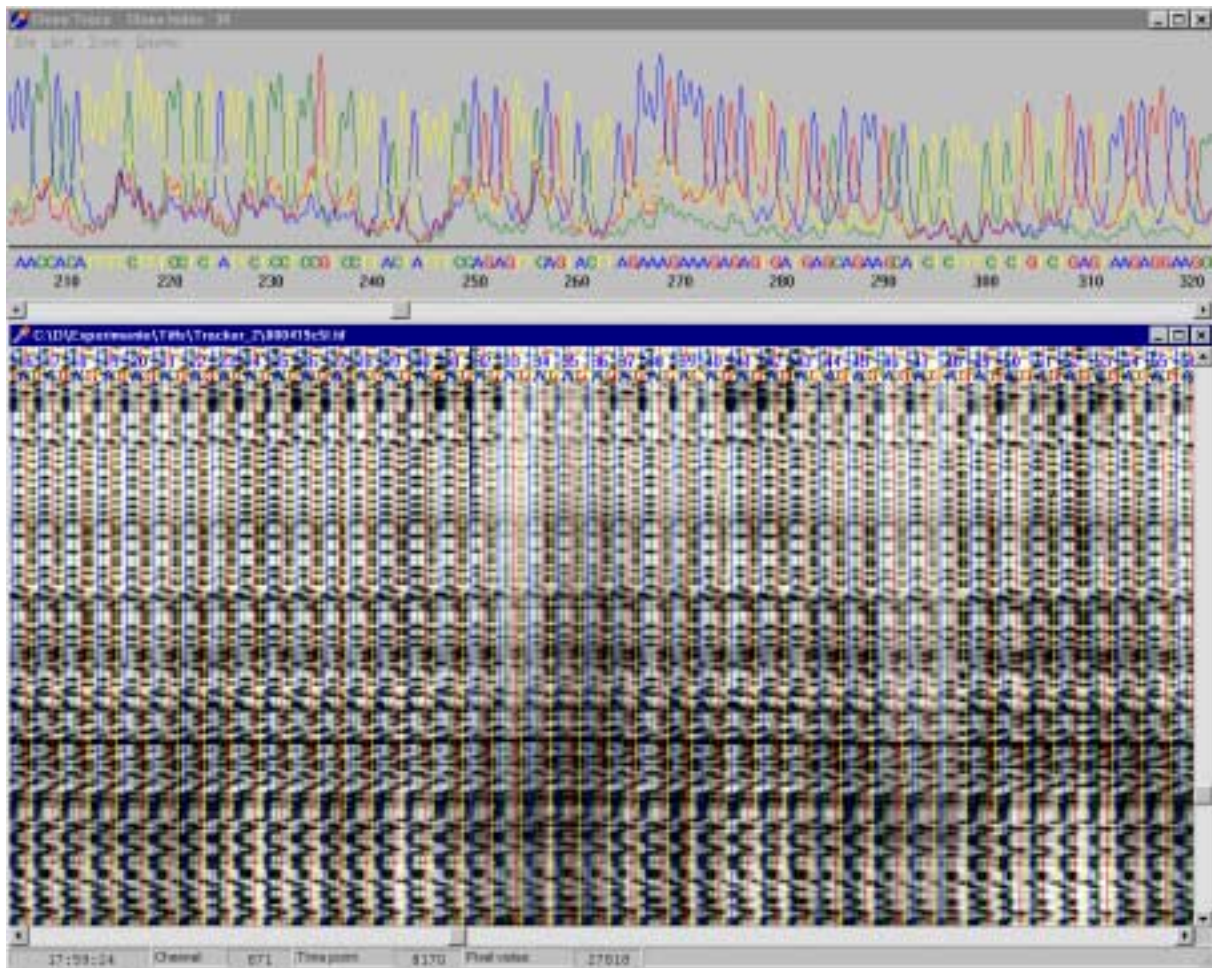


**Abbildung 4.22:** Der Bildausschnitt zeigt die Abgabe der Probe auf die Membran. Rechts die Mikrotiterplatte, in der sich die zu transferierenden Proben befinden.

## **4.8 Sequenzanalyse-Experiment auf dem Arakis-System**

In diesem Abschnitt werden die Resultate eines Sequenz-Analyse Experimentes mit der Membran Polyethersulfon (Zahnbreite: 0,5 mm, Abstand zwischen den Zähnen: 0,5 mm) auf dem Arakis-System mit 0,2 mm breiten Photodioden gezeigt. Die Proben wurden automatisch, mit der in Kapitel 4.6 beschriebenen Robotik, auf die Membran aufgebracht. Die Gelbreite betrug 30 cm. Der Markierungsfarbstoff war Cy5.5 (678 nm/ 703 nm). Als Anregungslichtquelle diente eine Laser-Diode (675 nm). Abbildung 4.23 zeigt das Sequenzierungsergebnis. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse ermöglichten auf dem Arakis-Sequenziersystem die Sequenz-Analyse von 75 Klonen (300 Spuren), bei einer durchschnittlichen Leselänge von 624 Basen. Die Gesamtbasenzahl betrug 46807 Basen.

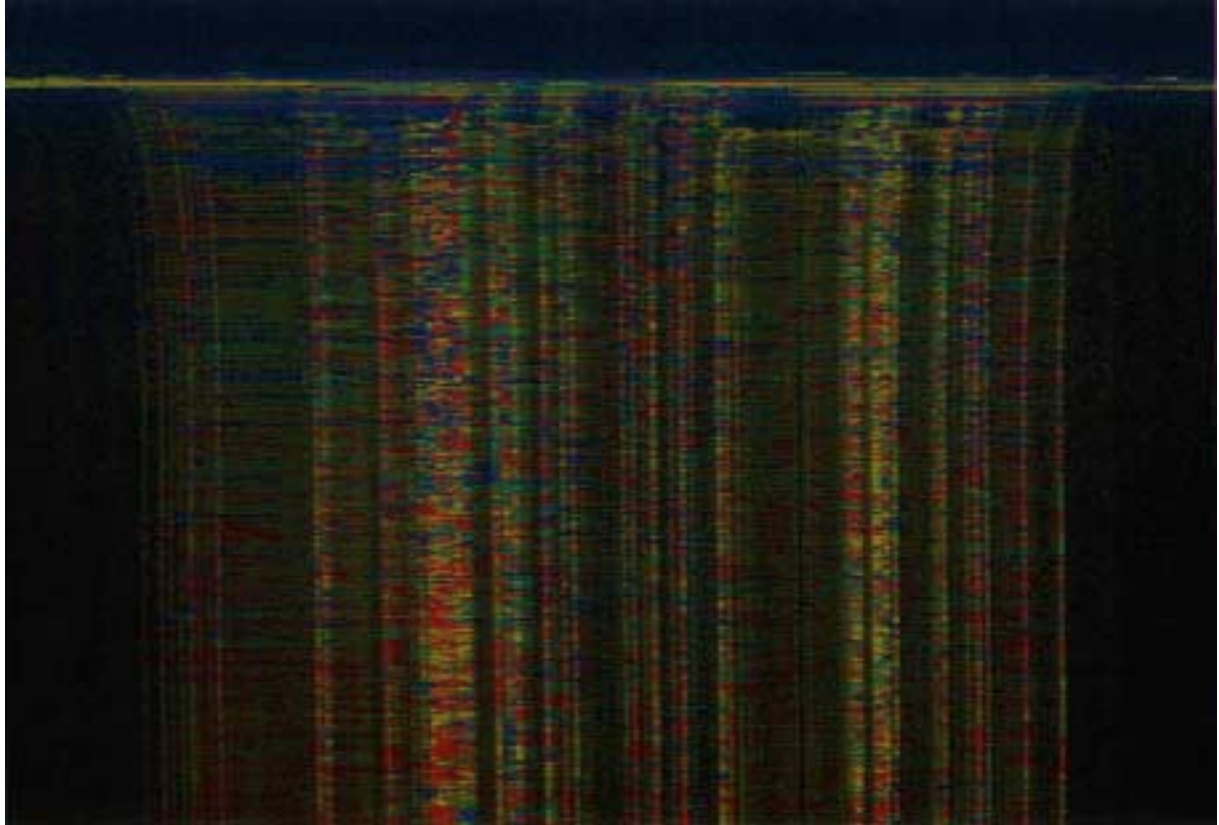




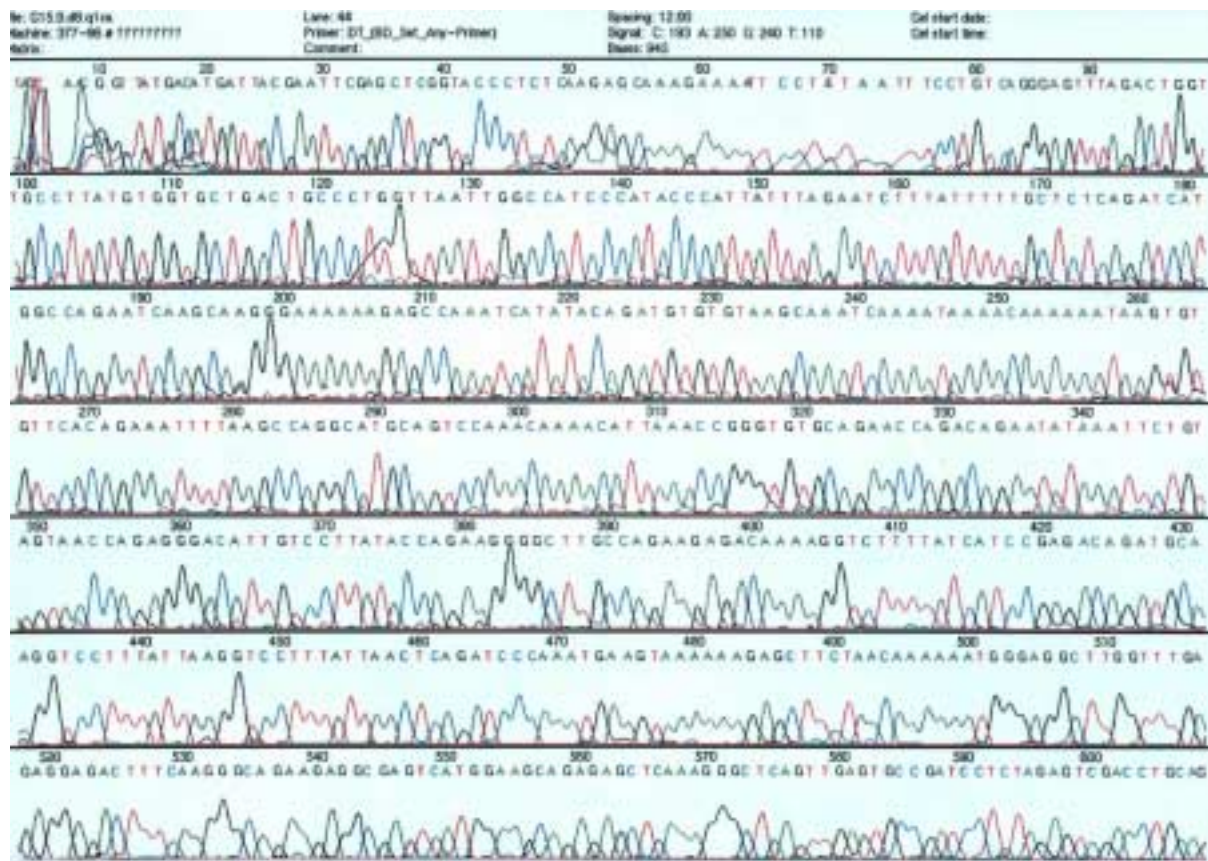
**Abbildung 4.23:** Die in dieser Arbeit gewonnenen Resultate ermöglichten auf dem Arakis-Sequenziersystem die Sequenzanalyse von 75 Klonen (300 Spuren). Die aktive Gelbreite betrug 30 cm, die Pixelbreite der Photodioden 0,2 mm. Die Pseudoautoradiogramm-Darstellung (unten) zeigt den fünften Teil einer Gesamtdatei. Oben ist das Sequenzchromatogramm eines Klonen, zwischen den Basen 206 und 323, dargestellt.

#### 4.9 Sequenzanalyse-Experiment auf dem ABI PRISM 377-System

Die Übertragbarkeit der Methode auf das Sequenzier-System ABI PRISM 377 der Firma "Applied Biosystems" (Foster City, CA) wurde in Zusammenarbeit mit dem Sanger-Center in Cambridge gezeigt. Das Gelbild der Beladung von 96 Klonen mit einer Polyethersulfon-Membran ist in Abbildung 4.24 gezeigt. Das zum Klon 44 gehörige Chromatogramm mit darüber liegendem Sequenzcode ist in Abbildung 4.25 dargestellt. Für diesen Klon konnte die Sequenz von 946 Nukleotiden bestimmt werden. Davon sind 609 Nukleotide graphisch dargestellt.



**Abbildung 4.24:** Das Gelbild eines Sequenzlaufes mit 96 Klonen auf einem ABI PRISM 377. Die Klone wurden mit der Membran Polyethersulfon in das Gel transferiert. Die einzelnen Klone laufen (links Klon 1 und rechts Klon 96), wie aneinandergereihte Perlenschnüre. Der Anfang des Laufes ist oben, das Ende unten.



**Abbildung 4.25:** Die Sequenzchromatogramm-Darstellung eines Klon auf einem ABI PRISM 377 mit darüber liegendem Sequenzcode. Die Ergebnisse wurden mit der Membranbeladungsmethode erzielt (Polyethersulfon). Für diesen Klon konnte die Sequenz von 946 Nukleotiden bestimmt werden. Davon sind 609 Nukleotide graphisch dargestellt.