

3. Praktischer Messaufbau

Der Messaufbau setzt sich aus drei Hauptkomponenten, und zwar der *Beladung des Trenngels*, der *Elektrophorese* und der *Datenerfassung*, zusammen (Abbildung 3.1).

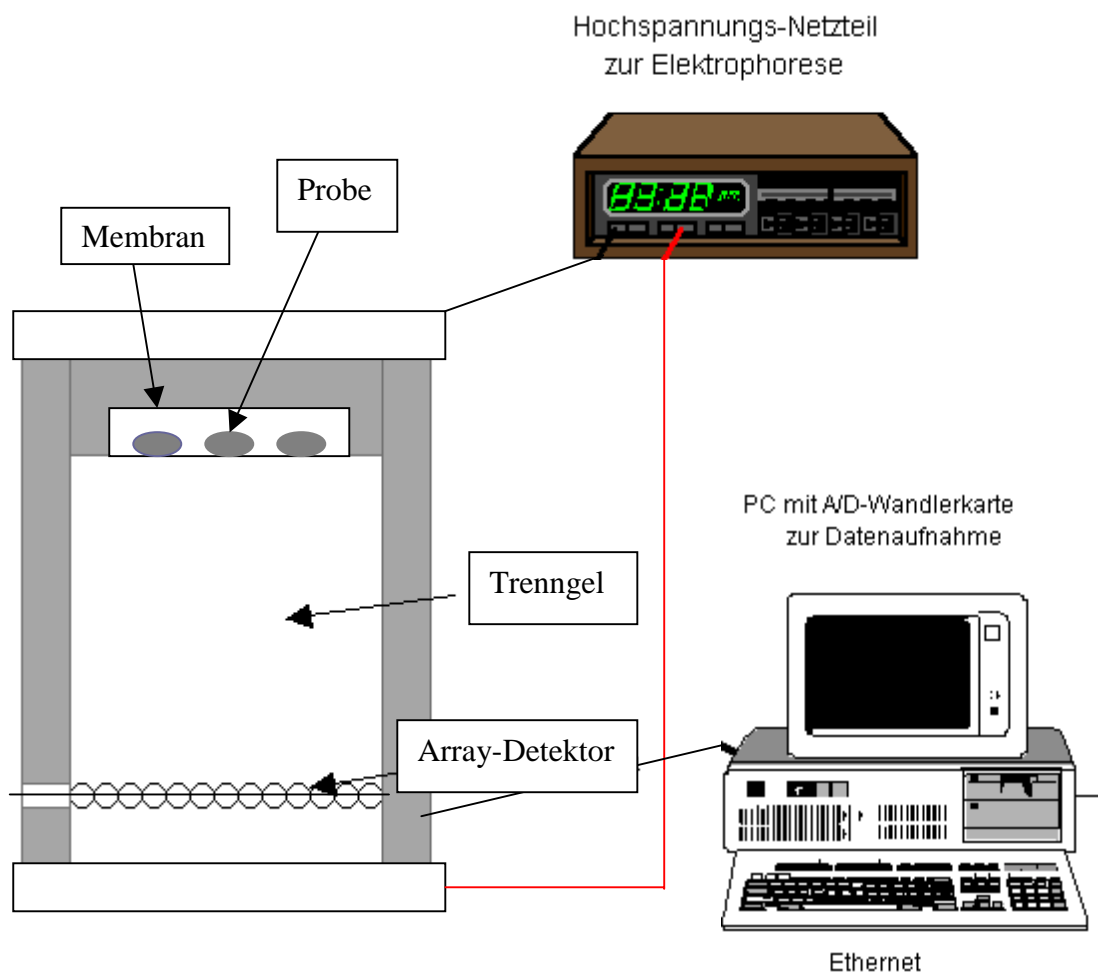


Abbildung 3.1: Der Messaufbau: Der Membran-DNA Komplex wird mit dem Trenngel elektrisch leitfähig verbunden. Danach wird das äußere elektrische Transferfeld eingeschaltet. Die DNA wandert aus der Membran in das Gel und wird darin der Größe nach aufgetrennt. Sobald die DNA-Moleküle den He/Ne-Laser erreichen, werden die Cy5-Moleküle durch das Licht eines He/Ne-Lasers (rot) bei 633 nm angeregt und die Emissionssignale bei 665 nm durch ein Photodioden-Array detektiert und digitalisiert. Die laterale Weite der Pixel des Photodioden-Arrays ist entweder 0,8 oder 0,2 mm.

Die *Beladung des Trenngels* geschieht über Membran-DNA Komplexe. Die flüssigen Proben (Sequenzreaktionen) werden aus einer Probenaufbereitungs-Vorrichtung auf das zum Tenngel weisende Ende einer Membran aufgebracht und danach durch Kapillarkräfte in die Membran aufgenommen. Diese Membran-DNA Komplexe werden dann mit dem Trenngel in Kontakt gebracht. Durch das Anlegen eines äußeren elektrischen Feldes wandern die DNA-Moleküle aus diesem Komplex in das Trenngel. Die Untersuchung dieser Membran-DNA Komplexe in äußeren elektrischen Feldern ist das Thema dieser Arbeit und wird in dem Abschnitt Experimente und Ergebnisse ausführlich beschrieben. Die Untersuchten Membranen und deren Eigenschaften werden im Abschnitt Materialien und Methoden beschrieben.

Die *Elektrophorese* (siehe auch Abschnitt 2: Grundlagen), gewährleistet die Trennung der DNA-Moleküle und damit den Erhalt der Sequenz-Information. Sie erfolgt in dem Trenngel (Zusammensetzung siehe Abschnitt 6: Materialien und Methoden), das durch die Polymerisation flüssigen Acrylamids, durch die Zugabe zweier Katalysatoren und nach dem Gießen zwischen zwei Glasplatten geringer Eigenfluoreszenz (Handelsbezeichnung Optiwhite B 270 oder gefloatetes Borosilicat-Glas der Firma Schott in Jena), gewonnen wird. Die zwei Glasplatten sind durch zwei Plastikplatzhalter (Typische Dicke: 0,1-0,3mm) getrennt. Eine dieser Glasplatten, die sogenannte Thermo-Platte, ist eine Konstruktion aus zwei im Abstand von 5 mm geschlossen miteinander verklebten Glasplatten. Zwischen den Glasplatten sind in regelmäßigen Abständen Glas-Stäbe zur Stabilisierung gegen den Druck des zirkulierenden Wassers mit Silikonmasse eingeklebt. Das bei 45°C gehaltene, zirkulierende Wasser soll zum einen denaturierende Bedingungen im Gel schaffen, zum anderen eine über die Gelbreite gleichbleibende Temperatur, die wiederum ein gleichförmiges Laufverhalten der DNA-Moleküle gewährleistet. An das Trenngel wird nach der Zugabe des Laufpuffers in zwei Plexiglaskammern, mit einem Hochspannungs-Netzteil eine Spannung angelegt (Typischerweise zwischen 1200 und 2400V für ein 60 cm langes Gel). Dadurch baut sich im Trenngel ein äußeres elektrisches Feld auf (20-40V/cm). Dieses elektrische Feld bewirkt die Wanderung der negativ geladenen DNA-Moleküle durch das Gel und ihre größenabhängige Auftrennung. Die kurzen DNA-Fragmente kommen zuerst am Laserstrahl an. Durch diesen werden die Fluoreszenzfarbstoffe, der markierten DNA-Moleküle angeregt. Der Laserstrahl wird seitlich durch ein Glasplättchen in das Gel eingekoppelt. Im Gel wird der Laserstrahl zwischen den beiden Glasplatten wie in einem Lichtleiter geführt, wobei er jeweils an den Grenzflächen zwischen Gel und Glas reflektiert wird. Da der Brechungsindex des Geles mit $n_{\text{Gel}} = 1,45$ geringer ist als der der verwendeten Glasplatten von $n_{\text{Glas}} = 1,5$ ist die Bedingung für Totalreflexion jedoch nicht erfüllt. Bei nicht-planaren Glasplatten treten also mehrfache Reflexionen auf, wobei jedesmal ein Teil der Strahlung in die Glasplatten eindringt und dort durch Streuung und Glas-Fluoreszenz den Strahlungs-Hintergrund erhöht.

Bis auf den Computer und die Peripheriegeräte sind alle Baugruppen des Systems in einen lichtdichten, vollständig gegen elektromagnetische Einstrahlungen abgeschirmten Blechschrank eingebaut. Zu den Peripheriegeräten gehören ein Wasserbad mit Zirkulationspumpe zur Thermostatisierung der Gelkassette und des Helium-Neon-Lasers sowie ein Hochspannungs-Netzteil zur Stromversorgung der Elektrophorese. Sie sind außerhalb des Schrankes angeordnet und zusammen mit dem Computer über entsprechende Steckverbindungen angeschlossen.

Fluoreszenz-Farbstoff	Absorptions-Maximum [nm]	Emissions-Maximum [nm]	Extinktions Koeffizient $\epsilon \cdot 10^3$ [cm ⁻¹ M ⁻¹]	Quanten-Ausbeute q	Anregungs-Lichtquelle
CY 5	648	665	250	0,28	He/Ne-Laser rot 633 nm
CY 5.5 (Indodicarbocyanin)	678	703	250	0,28	Laser-Diode rot 675 nm

Die verwendeten Fluoreszenz-Farbstoffe mit den Maxima des jeweiligen Anregungs- und Emissions-Spektrums und den gebräuchlichen Anregungs-Lichtquellen (Referenzen: Tsien & Waggoner, 1990; Haugland, 1992).

Die *Datenerfassung* bezieht die Auswahl der geeigneten Laser zur Anregung der fluoreszenten Farbstoffe, die Fokussierung der Laserstrahlen, die Abbildende Optik und den linearen Arraydetektor mit ein.

Der He/Ne-Laser für die Cy 5 Anregung:

Die Anregung des Cy5 Farbstoffes erfolgt mit einem He/Ne-Laser (siehe Theoretische Grundlagen). Ein wichtiger Aspekt für die Auswahl von Cy5, als Farbstoff mit dem der Großteil der Messungen durchgeführt wurde ist, dass rote He/Ne-Laser leistungsstabilisiert erhältlich sind. Des weiteren (im Gegensatz zur Anregung von Fluoreszein mit einem Argon-Laser) bleibt der Strahl über die gesamte Laufzeit positionstabil im Gel. Die für Cy5 verwendete Wellenlänge ist 633 nm. Die Ausgangsleistung liegt zwischen 3 und 5 mW.

Die Detektion von CY 5:

Zur Anregung des Farbstoffes CY 5 dient im Arakis-System ein Helium-Neon-Laser mit der Wellenlänge von $\lambda_{em} = 633$ nm (rot). Außerdem zeichnet sich CY 5 im Gegensatz zu den klassischen Farbstoffen Fluoreszein und TexasRed durch einen sehr hohen Extinktions-Koeffizienten von $\epsilon = 250 \cdot 10^3$ cm⁻¹M⁻¹ aus. Dieses Indocarbocyanin wird bei etwa

$\lambda_{\text{abs}} = 651 \text{ nm}$ angeregt und zeigt eine maximale Emission bei $\lambda_{\text{em}} = 674 \text{ nm}$. Herausragendes Merkmal ist außerdem seine hohe Photostabilität, d.h. geringe Neigung zum Ausbleichen.

Halbleiterlaser für die Cy 5.5 Anregung:

Kurz nach der Realisierung der ersten Laser wurde bereits 1961 über den ersten Halbleiterlaser berichtet. Die bedeutendsten Eigenschaften im Vergleich zu anderen Lasern sind: kleine Abmessungen, hoher Wirkungsgrad, Integrierbarkeit mit elektronischen Bauelementen und Herstellung durch die Halbleitertechnologie. Halbleiter- oder Diodenlaser werden direkt durch elektrischen Strom gepumpt. Bleisalz-Diodenlaser strahlen im mittleren Infrarot zwischen 3 und 30 μm . Laser aus III-V-Verbindungen, wie GaAs, strahlen im Gelben, Roten und nahen Infraroten zwischen 600 und 1700 nm. Solche Laser können kontinuierlich und gepulst bei Zimmertemperatur bis zu einigen mW und Wirkungsgraden bis 50% betrieben werden. In Halbleitern sind die Energiezustände nicht scharf, wie in Gasen, sondern durch breite Bänder gegeben. Der Laserübergang findet zwischen dem Leitungs- und dem Valenzband statt. Die Wellenlängen des Halbleiters hängen vom Bandabstand des Halbleiters ab. In binären Halbleitern aus zwei Komponenten hat der Bandabstand einen festen Wert, der bei GaAs 1,4eV beträgt, was einer Wellenlänge von 0,9 μm entspricht. Bei Halbleitern aus drei oder vier Komponenten kann durch das Mischungsverhältnis der Bandabstand variiert werden. Der beim Arakis-System, zur Anregung des Cy5.5-Farbstoffes verwendete Diodenlaser strahlt im Roten bei 675 nm ab.

Die Detektion von CY 5.5:

Der Farbstoff CY 5.5 ist ein Indodicarbocyanin; seine chemische Struktur ist der des oben beschriebenen Farbstoffs CY 5 sehr ähnlich. Analog zu CY 5 ist der Farbstoff mit mono- und bifunktionalen Gruppen erhältlich, was ihn sowohl für direkte Ankopplung an Sequenzierungs-Primer, als auch zur Markierung von Nukleotiden verwendbar macht. Er hat jedoch noch keine sehr weite Verbreitung auf dem Markt gefunden, so dass keine fertig markierten Primer und Nukleotide erhältlich sind. Wie alle Cyanin-Farbstoffe zeichnet sich CY 5.5 durch hohe Photo-Stabilität aus. Der Extinktions-Koeffizient beträgt $\epsilon = 250 \cdot 10^3 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, die Quantenausbeute liegt bei $q = 0,28$. Zur Anregung des CY 5.5 dient im Arakis-System ein Halbleiter-Laser der Emissions-Wellenlänge $\lambda_{\text{em}} = 675 \text{ nm}$. Diese Anregungs-Wellenlänge liegt noch innerhalb des spektralen Detektionsbereiches für CY 5,

Die Fokussierung der Laserstrahlen in das Gel:

Da der Durchmesser des Laserstrahls sich auf die elektroforetische Auflösung auswirkt, ist die Fokussierung des Laserlichts von größter Wichtigkeit. Im Strahlengang der

Anregungslaser befindet sich jeweils eine motorisch höhenverstellbare Plankonvex-Linse (Brennweite $f = 250$ mm). Die Linse ist zur Vermeidung von Reflexionsverlusten breitbandentspiegelt im Bereich der Anregungs-Wellenlängen von $\lambda = 400$ - 800 nm. Sie erfüllt gleich zwei Funktionen. Zum einen lässt sich durch vertikales Verschieben der Linsen die vertikale Richtung der Laserstrahlen verändern (zur Justierung auf die optische Achse der Detektoren), zum anderen wird durch sie das Laserlicht fokussiert.

Der lineare Arraydetektor:

Die Abbildung der fluoreszierenden DNA-Fragmente auf die Photodiodenzeile wird durch Gradienten-Index-Linsen vorgenommen, die eine 1-zu-1-Abbildung gewährleisten. Die einzelnen Module sind als Spezialanfertigung in Hybridbauweise ausgeführt und tragen jeweils 64 Photodioden auf einem gemeinsamen Chip mit der Breite von 2 Zoll (= 5,08 cm), zusammen mit den zugehörigen integrierenden Operations-Verstärkern. Die gesamte lichtempfindliche Fläche einer Detektor-Zeile ist somit 30,5 cm breit und 3 mm hoch, unterteilt in 384 Photodioden von 0,8 mm Breite. Die lichtunempfindliche Zone zwischen den einzelnen Photodioden ist jeweils 0,02 mm breit. Der gesamte lichtunempfindliche Bereich besitzt also eine Breite von $383 \cdot 0,02$ mm = 7,66 mm, das entspricht einem sehr geringen Anteil von nur 2,5 % an der gesamten Detektor-Fläche. Die Photodiodenbreite des Array-Detektors der letzten Generation, der im Abschlussversuch eingesetzt wurde, beträgt 0,2mm. Der Messbereich des Analog/Digital-Wandlers reicht von 0 bis +10 Volt, bei einer Auflösung von 16 Bit. Die Eingangs-Spannung von +10 Volt (entsprechend einer Voll-Aussteuerung des Detektor-Kanals) wird also in $2^{16} = 65.536$ Einheiten konvertiert. Eine dieser digitalen Einheiten entspricht somit einer Eingangs-Spannung von:

$$\frac{10 \text{ V}}{2^{16}} = \frac{10 \text{ V}}{65.536} = 1,526 \cdot 10^{-4} \text{ Volt}$$

Der dynamische Bereich des Detektors erstreckt sich von etwa 2-8 V Ausgangsspannung, das entspricht etwa 13.000 bis 52.000 digitalen Einheiten des A/D-Wandlers. Innerhalb dieses dynamischen Bereiches weist jedoch nur das Intervall von etwa 2,5-7 V eine lineare Kennlinie auf. Die Amplituden der zu messenden Fluoreszenz-Signale sollten in diesem Bereich liegen, um Verzerrungen der Signalpeaks durch Nichtlinearität der Detektion zu vermeiden. Bei zu langer Integrationszeit der Operationsverstärker kann ebenfalls der Bereich der Sättigung erreicht werden. Die Integrationsdauer bzw. das Intervall zur Auslesung der Messwerte muss also der Intensität des Fluoreszenzlichtes angepasst werden. In der Praxis wurde eine Integrationszeit von 0,64 sec gewählt.

Die Datenaufnahme erfolgt mit dem am EMBL entwickelten Programm DA-Array. Im Scan-Modus werden die aktuellen Messwerte aller 384 Detektor-Kanäle über ihrer Position

aufgetragen und mit zur Signalstärke proportionaler Höhe angezeigt. Im Autoradiogramm-Modus lassen sich die bisher aufgezeichneten Messwerte aller 384 Photodioden parallel als Graustufen auf dem Monitor abbilden. Diese Darstellungsart entspricht einem Radiogramm, auf dem die durchlaufenden Fragmente als Banden erscheinen. Die Messwerte werden für jeden der Fluoreszenz-Farbstoffe individuell als Quasi-Autoradiogramme im sogenannten Tagged Image File Format (TIFF) auf der internen Festplatte des Rechners aufgezeichnet. Das Datenvolumen für etwa 20 Stunden Laufzeit eines Detektors bei einem Messintervall von 2,5 Sekunden beträgt ungefähr:

$$384 \text{ Kanäle} \cdot 30.000 \text{ Datenpunkte} \cdot 16 \text{ Bit Dynamikumfang} \approx 180 \text{ Megabit}$$

Das entspricht einer Rohdaten-Menge von mehr als 22 Megabyte pro Sequenzierlauf und Fluorochrom. Die automatische Zuordnung der Detektions-Kanäle zu den jeweils vier Spuren eines Klons geschieht mit Hilfe des ebenfalls am EMBL entwickelten Programms „LaneTracker“ (Yxue Li *et al.*, 2000) unter Windows95-Betriebssystem. Dieses Programm ist in der Lage, auch unregelmäßig verlaufenden Bahnen der Fragmente im Quasi-Autoradiogramm zu folgen und die Spuren automatisch richtig den Klonen zuzuordnen. Damit ist auch bei den sehr engen Spurdichten, wie sie mit dem Arakis-System erreicht werden, eine Auswertung möglich.

Die Umsetzung der Signal-Intensitäten in Sequenz-Information erfolgt mit Hilfe eines integrierten Programm-Moduls (BaseCaller). Dieses findet mit geeigneten Algorithmen die Reihenfolge der Signal-Maxima und setzt sie in die Sequenz der entsprechenden Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin um. Zum Ausgleich von Fehlern in den Rohdaten und zur Bestimmung der Abstände zwischen unterschiedlichen Signalen wird das Programm „Gene Skipper“ verwendet (Schwager C. *et al.* 1996).