

SUMMARY

The LDR-TaqMan SNP genotyping method was elaborated and patented [Borodina et al., 2004; EP03019521]. The method is based on the ligation detection reaction (LDR), which is performed directly on genomic DNA. During the LDR, the biallelic state of an SNP locus is converted into the bimarker state of ligated detector oligonucleotides. The state of the markers is then determined by the 5'-nuclease assay (TaqMan) with universal fluorescent probes. The technology is sensitive, has high discrimination power, needs no locus-specific optimization and is applicable both for individual and multiplex SNP analyses.

To transfer the technology to scientific partners, the following additional tasks were solved:

- a method for cost-effective synthesis of long (60-120nt) oligonucleotides with block structure was developed and patented [Borodina et al., 2003; PCT/EP 2004/003921];
- a procedure for DNA isolation from plant material and saliva on home-made silica spin-columns was established [Borodina et al., 2003a];
- enzymes required for the method (thermostable Pfu DNA ligase and hot start Taq DNA polymerase) were cloned and expressed.

The LDR-TaqMan method was applied for SNP genotyping of human and *Arabidopsis thaliana* DNA samples:

- a kit for genotyping of 9 clinically important human SNPs was prepared and used for determination of allele frequencies of these SNPs in two East European populations (Ukrainians and Belorussians, 216 DNA samples) [Kozhekbaeva et al., 2004];
- a 138-loci genotyping kit for *Arabidopsis thaliana* accessions Columbia (Col-0) and C24 was prepared and tested in the blind genotyping of 10 plants.

A comparison of the LDR-TaqMan genotyping results with those obtained by conventional methods (sequencing, RFLP, SNaPshot, Amplifluor [Rickert et al., 2004]) demonstrated the efficiency and reliability of the LDR-TaqMan procedure.

Ready-to-use genotyping kits (including enzymes, buffers and sets of detector oligonucleotides) were transferred to collaborators in Golm (Germany) and Moscow (Russia).

ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der Arbeit wurde die LDR-TaqMan SNP-Genotypisierungsmethode entwickelt und patentiert [Borodina et al., 2004; EP03019521]. Die Methode basiert auf der direkt mit genomischer DNA durchgeführten Ligationsdetektionsreaktion (LDR). Abhängig vom allelischen Zustand des SNP Locus wird eine korrespondierende Markersequenz in das Ligationsprodukt integriert. Die Markersequenz wird im folgenden 5'-Exonukleaseassay (TaqMan) durch universelle Sonden identifiziert. Die Methode ist sensitiv, hat ein hohes Diskriminierungsvermögen, bedarf keiner lokusspezifischen Optimierung und ist in Single- als auch Multiplexanalysen anwendbar.

Um die Technologie unseren wissenschaftlichen Partnern zur Verfügung zu stellen, wurden folgende Aufgaben gelöst:

- die kosteneffiziente Synthese langer (60 – 120nt) Oligonukleotide mit Blockstruktur [Borodina et al., 2003; PCT/EP 2004/003921];
- Entwicklung einer effektiven Methode zur DNA Isolation aus pflanzlichem Material und Speichel in Silica basierten Säulen [Borodina et al., 2003a];
- Klonierung und Expression von für die Methode benötigten Enzymen (thermostabile Pfu DNA Ligase und HotStart-DNA Polymerase).

Die LDR-TaqMan Methode wurde zur SNP-Genotypisierung von humanen und *Arabidopsis thaliana* Proben verwendet:

- ein Genotypisierungskit für 9 klinisch bedeutenden humanen SNPs wurde angefertigt und zur Bestimmung der Allelfhäufigkeit dieser SNPs in zwei Osteuropäischen Populationen verwendet (Ukrainer und Weißrussen – 216 DNA Proben) [Kozhekbaeva et al., 2004];
- ein 138-Loci Genotypisierungskit für *Arabidopsis thaliana* der Ökotypen Columbia (Col-0) und C24 wurde angefertigt und in einem Genotypisierungsversuch mit 10 Pflanzen getestet.

Der Vergleich der Genotypisierungsergebnisse mit den Ergebnissen von kommerziellen Produkten (Sequenzierung, PDRF, SnaPshot, Amplifluor [Rickert et al., 2004]) bestätigte die Effizienz und Zuverlässigkeit der LDR-TaqMan Methode. Daraufhin wurden gebrauchsfertige Genotypisierungskits (Enzyme, Puffer und lokusspezifische Oligonukleotide) Partnern in Golm (Deutschland) und Moskau (Russland) zur Verfügung gestellt.