



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 60 2004 004 891 T2 2007.10.31**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 620 572 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **60 2004 004 891.7**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US2004/014566**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **04 751 790.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2004/104547**

(86) PCT-Anmeldetag: **10.05.2004**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **02.12.2004**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **01.02.2006**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **21.02.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **31.10.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C12Q 1/68 (2006.01)**
C12P 19/34 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

431708 08.05.2003 US

(73) Patentinhaber:

Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Calif., US

(74) Vertreter:

**Bosch, Graf von Stosch, Jehle
Patentanwalts-gesellschaft mbH, 80639 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

DE, FR, GB, IT

(72) Erfinder:

**KORDUNSKY, Igor, Newton, Massachusetts
02461-1816, US; GOLDMAN, Jeffrey A., Acton,
Massachusetts 01720, US; FINNEY, Michael J.,
San Francisco, California 94114, US**

(54) Bezeichnung: **SYSTEME UND VERFAHREN ZUM FLUORESZENZNACHWEIS MIT EINEM BEWEGLICHEN NACHWEISMODUL**

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

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

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein Fluoreszenzerkennungs- bzw. -detektionssysteme und insbesondere ein Fluoreszenzerkennungs- bzw. -detektionssystem mit einem beweglichen Exzitations-/Detektions-Modul zur Verwendung mit einem Thermocycler.

[0002] Thermocycler sind in der Technik bekannt. Diese Vorrichtungen werden in einer Reihe von Verfahren zur Erzeugung und Erkennung von verschiedenen Molekülen von Interesse, z.B. Nukleinsäuresequenzen, in der Forschung, auf dem Gebiet der Medizin und der Industrie verwendet. Verfahren, die mit herkömmlichen Thermocyclern durchgeführt werden können, schließen die Verstärkung von Nukleinsäuren unter Verwendung von Verfahren wie der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ein, sind aber nicht darauf beschränkt. Solche Verstärkungsverfahren werden verwendet, um die Menge der Target-Sequenz, die in einer Nukleinsäureprobe vorhanden ist, zu erhöhen.

[0003] Es sind auch zahlreiche Verfahren zur Erfassung des Vorhandenseins und/oder der Konzentration eines Target-Moleküls in einer Probe, die von einem Thermocycler bearbeitet wird, bekannt. Beispielsweise kann eine fluoreszierende Markierung angewendet werden. Eine fluoreszierende Markierung (oder eine fluoreszierende Sonde) ist im Allgemeinen eine Substanz, die, wenn sie durch ein geeignetes elektromagnetisches Signal oder eine entsprechende Strahlung stimuliert wird, die Strahlung absorbiert und ein Signal aussendet (im Allgemeinen Strahlung, die beispielsweise anhand der Wellenlänge von der stimulierenden Strahlung unterschieden werden kann), das andauert, solange die stimulierende Strahlung fortgesetzt wird, d.h. sie fluoresziert. Einige Arten von fluoreszierenden Sonden sind allgemein so ausgelegt, dass sie nur in Anwesenheit eines Target-Moleküls (z.B. einer spezifischen Nukleinsäuresequenz) aktiv sind, so dass eine Fluoreszenzantwort von einer Probe die Anwesenheit des Target-Moleküls anzeigt. Andere Arten von fluoreszierenden Sonden erhöhen ihre Fluoreszenz proportional zur Menge der doppelsträngigen DNA, die in der Reaktion vorhanden ist. Diese Sondentypen werden in der Regel verwendet, wenn die Verstärkungsreaktion nur mit dem Target-Molekül ablaufen soll.

[0004] Fluorometrie beinhaltet die Behandlung einer Probe, welche die fluoreszierende Markierung oder Sonde enthält, mit stimulierender (auch als anregend bezeichneter) Strahlung, wie einer Lichtquelle von geeigneter Wellenlänge, wodurch die Sonde angeregt wird und Fluoreszenz bewirkt. Die emittierte Strahlung wird mittels eines geeigneten Detektors, wie einer Photodiode, eines Photomultiplikators, einer ladungsgekoppelten Vorrichtung (charge-cou-

pled device, CCD) oder dergleichen erfasst.

[0005] Fluorometer zur Verwendung mit Fluoreszenz-markierten Proben sind in der Technik bekannt. Eine Art von Fluorometer ist ein optischer Reader, wie beispielsweise von Andrews et al. im US-Patent Nr. 6,043,880 beschrieben. Eine Probenplatte, die eine Anordnung von Proben enthält, wird in den optischen Reader eingebracht, der die Proben Exzitations- bzw. Anregungslicht aussetzt und die emittierte Strahlung erfasst. Die Nützlichkeit von optischen Readers ist durch die Notwendigkeit begrenzt, die Probenplatte aus dem Thermocycler zu entfernen, wodurch es schwierig ist, den Fortschritt der Verstärkung zu überwachen.

[0006] Eine Verbesserung vereinigt den optischen Reader mit einem Thermocycler, so dass die Probenplatte analysiert werden kann, ohne sie aus dem Thermocycler zu entnehmen oder den PCR-Prozess zu unterbrechen. Beispiele für solche kombinierten Vorrichtungen sind im US-Patent Nr. 5,928,907, im US-Patent Nr. 6,015,674, im US-Patent Nr. 6,043,880, im US-Patent Nr. 6,144,448, im US-Patent Nr. 6,337,435 und im US-Patent Nr. 6,369,863 beschrieben. Solche kombinierten Vorrichtungen sind in verschiedenen Anwendungen nützlich, die z.B. im US-Patent Nr. 5,210,015, im US-Patent Nr. 5,994,056, im US-Patent Nr. 6,140,054 und im US-Patent Nr. 6,174,670 beschrieben sind.

[0007] Die heutigen Fluorometer leiden an verschiedenen Nachteilen. Beispielsweise werden in einigen der heutigen Konstruktionen verschiedene Lichtquellen und Detektoren für verschiedene Probenvertiefungen in der Anordnung vorgesehen. Variationen unter den Lichtquellen und/oder Detektoren führen zu Variationen in der erfassten Fluoreszenzantwort von einer Vertiefung zur nächsten. Alternativ dazu kann bzw. können die Lichtquelle und/oder der Detektor in optischer Kommunikation mit mehr als einer der Vertiefungen, mit unterschiedlichen optischen Wegen zu und/oder von jeder Vertiefung angeordnet sein. Aufgrund der verschiedenen optischen Wege variiert die erfasste Fluoreszenzantwort von einer Probenvertiefung zur nächsten. Um diese Variationen auszugleichen, muss die Antwort für jede Probenvertiefung individuell kalibriert werden. Mit zunehmender Zahl von Probenvertiefungen in einer Anordnung wird dies zu einer zunehmend zeitraubenden Aufgabe, und Kalibrierungsfehler können erhebliche Fehler in anschließenden Messungen bewirken.

[0008] Außerdem sind die heutigen Fluorometer im Allgemeinen so ausgelegt, dass die Lichtquellen und Detektoren feste Teile des Instruments darstellen. Dadurch wird die Möglichkeit des Experimentators, ein Fluorometer für unterschiedliche Zwecke anzupassen, beschränkt. Beispielsweise erfordert die Erfassung einer anderen fluoreszierenden Markierung

im Allgemeinen die Verwendung einer anderen Lichtquelle und/oder eines anderen Detektors. Viele der heutigen Fluorometer machen es dem Experimentator schwer, Lichtquellen oder Detektoren umzukonfigurieren, wodurch die Verschiedenheit der fluoreszierenden Markierungen, die verwendet werden können, beschränkt ist.

[0009] Es ist auch schwierig, gleichzeitige Messungen einer Reihe von unterschiedlichen fluoreszierenden Markierungen, die in einer Probe (oder in unterschiedlichen Proben) vorhanden sein können, durchzuführen. Wie oben beschrieben, schließen Experimentatoren, um die Daten, die in einem Assay erhalten werden, zu maximieren, häufig fluoreszierende Markierungsmittel ein, die unterschiedliche Exzitations- und/oder Emissionswellenlängen aufweisen. Jedes Markierungsmittel ist dafür ausgelegt, sich an eine andere Target-Sequenz zu binden, was im Prinzip ermöglicht, dass mehrere Target-Sequenzen in der gleichen Probe erfasst werden können. Heutige Fluorometer erleichtern solche Multimarkierungsexperimente jedoch nicht. Viele Fluorometer sind für eine einzige Kombination aus Exzitations- und Emissionswellenlängen ausgelegt. Andere liefern mehrere Lichtquellen und Detektoren, um die Erfassung von mehreren Markierungen zu ermöglichen, diese Konstruktionen ermöglichen jedoch häufig die Sondierung nur jeweils einer einzigen Markierung gleichzeitig, da die Exzitationswellenlänge einer Markierung die Emissionswellenlänge einer anderen Markierung überlagern könnte; Exzitationslicht, das in den Detektor gelangt, würde zu unrichtigen Ergebnissen führen. Die Sondierung mehrerer Markierungen kann im Allgemeinen nicht parallel durchgeführt werden, wodurch der Prozess der Datensammlung verlangsamt wird.

[0010] Daher wäre ein verbessertes Fluorometer für einen Thermocycler, das diese Nachteile überwindet, erstrebenswert.

KURZE ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0011] Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung liefern eine Fluoreszenzerfassung in einer Thermocycler-Vorrichtung. Gemäß einem Aspekt der Erfindung schließt eine Fluoreszenzerfassungsvorrichtung zur Analysierung von Proben, die sich in einer Vielzahl von Vertiefungen in einem Thermocycler befinden, eine Trägerstruktur, die an dem Thermocycler zu befestigen ist, und ein Erkennungs- bzw. Detektionsmodul ein, das beweglich an der Trägerstruktur angebracht werden kann. Das Detektionsmodul schließt einen Exzitationslichtgenerator und einen Emissionslichtdetektor ein, die beide im Detektionsmodul untergebracht sind. Wenn die Trägerstruktur an dem Thermocycler befestigt ist und das Detektionsmodul an der Trägerstruktur angebracht ist, kann das Detektionsmodul bewegt werden, so dass es in

optischer Kommunikation mit verschiedenen aus der Vielzahl von Vertiefungen positioniert werden kann.

[0012] Gemäß einem anderen Aspekt der Erfindung kann das Detektionsmodul zwei oder mehr Exzitationslichtgeneratoren und zwei oder mehr Emissionslichtgeneratoren einschließen, die so angeordnet sind, dass zwei oder mehr Exzitations-/Detektions-Paare gebildet werden. In einer Ausführungsform werden die Exzitations-/Detektions-Paare so angeordnet, dass jedes Exzitations-/Detektions-Paar gleichzeitig in optischem Kontakt mit einer anderen aus der Vielzahl von Vertiefungen positioniert werden kann. In einer alternativen Ausführungsform werden Exzitations-/Detektions-Paare so angeordnet, dass, wenn ein erstes von den Exzitations-/Detektions-Paaren in optischem Kontakt mit einer der Vielzahl von Vertiefungen positioniert wird, kein anderes der Exzitations-/Detektions-Paare in optischem Kontakt mit irgendeiner aus der Vielzahl von Vertiefungen steht. In einigen Ausführungsformen wird das Detektionsmodul abnehmbar an der Trägerstruktur befestigt, wodurch der Nutzer in die Lage versetzt wird, das Detektionsmodul durch ein anderes Detektionsmodul zu ersetzen.

[0013] Gemäß einem anderen Aspekt der Erfindung wird ein Verfahren zur Erfassung des Vorhandenseins eines Target-Moleküls in einer Lösung geschaffen. Eine Vielzahl von Proben wird hergestellt, wobei jede Probe eine Fluoreszenzsonde enthält, die dafür ausgelegt ist, sich an ein Target-Molekül zu binden. Jede Probe wird in jeweils eine von den mehreren Probenvertiefungen eines Thermocycler-Instruments gelegt, wobei das Thermocycler-Instrument ein Detektionsmodul aufweist, das beweglich darin angebracht ist, wobei das Detektionsmodul einen Exzitations-/Detektionskanal einschließt, der Exzitations-/Detektionskanal einen Exzitations-/Detektionsgenerator einschließt, der im Detektionsmodul untergebracht ist, und einen Emissionslichtdetektor, der in dem Detektionsmodul untergebracht ist. Das Thermocycler-Instrument wird verwendet, um eine Reaktion zu stimulieren, und die Probenvertiefungen werden abgetastet, um eine Fluoreszenzantwort zu erfassen, indem das Detektionsmodul bewegt wird und der Exzitations-/Detektionskanal aktiviert wird. Während der Abtastung wird das Detektionsmodul bewegt, so dass der Exzitations-/Detektionskanal nacheinander in optischer Kommunikation mit jeder aus der Vielzahl von Probenvertiefungen positioniert wird. Wenn das Detektionsmodul mehrere Exzitations-/Detektions-Paare oder -kanäle einschließt, können die Kanäle parallel oder hintereinander aktiv sein.

[0014] Die folgende ausführliche Beschreibung ermöglicht zusammen mit der begleitenden Zeichnung ein besseres Verständnis der Natur und der Vorteile der vorliegenden Erfindung.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNG

[0015] **Fig. 1** ist eine perspektivische Darstellung einer Thermocycler-Vorrichtung gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung;

[0016] **Fig. 2** ist eine Explosionsdarstellung einer Deckelanordnung für eine Thermocycler-Vorrichtung gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung;

[0017] **Fig. 3** ist eine Ansicht von unten auf eine Fluorometeranordnung für eine Thermocycler-Vorrichtung gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung;

[0018] **Fig. 4** ist eine Ansicht von oben auf ein Detektionsmodul gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung;

[0019] **Fig. 5A-B** sind Ansichten von unten auf Detektionsmodule gemäß alternativer Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung.

[0020] **Fig. 6** ist eine schematische Darstellung eines Exzitations-/Detektions-Paars für ein Detektionsmodul gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung;

[0021] **Fig. 7** ist ein Blockschema, das elektrische Verbindungen für eine Deckelanordnung für eine Thermocycler-Vorrichtung gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung darstellt; und

[0022] **Fig. 8** ist ein Ablaufschema für ein Anwendungsverfahren für einen Thermocycler mit einem Fluoreszenzdetektionssystem gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0023] Ein Ausführungsbeispiel für eine Vorrichtung der vorliegenden Erfindung wird nun mit Bezug auf die begleitende Zeichnung beschrieben, wobei gleiche Bezugszahlen entsprechende Teile bezeichnen. Es werden auch Verfahren zur Verwendung der Vorrichtung beschrieben. Es sei darauf hingewiesen, dass die hierin gezeigten und beschriebenen Ausführungsformen erläuternd sind und die Erfindung nicht beschränken.

I. Vorrichtungsbeispiel

[0024] **Fig. 1** ist eine perspektivische Darstellung einer Thermocycler-Apparatur **100** gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung. Die Apparatur **100** besteht aus einer Grundeinheit **110** und einer Deckelanordnung **112**. Die Grundeinheit **110**, die von herkömmlichem Design sein kann, stellt Leis-

tungs- und Steuerfunktionen für ein Thermocycle-Verfahren über herkömmliche elektronische Komponenten (nicht dargestellt), wie programmierbare Prozessoren, Taktgeber und dergleichen, bereit. Die Grundeinheit **110** stellt auch eine Benutzerschnittstelle **116** bereit, die eine Tastatur **118** und einen LCD-Bildschirm **120** einschließen kann, die es dem Nutzer ermöglichen, den Betrieb des Thermocycler zu steuern und zu überwachen. Die Grundeinheit **110** ist über ein Stromkabel **121** mit einer externen Leistungsquelle (z.B. 120 V Standard-Wechselstrom) verbunden. Einige Beispiele für die Grundeinheit **110** schließen die DNA Engine[®]-, Dyad[™]- und Tetrad[™]-Thermocycler ein, die von MJ Research Inc., einem Inhaber der vorliegenden Anmeldung, verkauft werden.

[0025] Die Deckelanordnung **112** schließt eine Probeneinheit und eine Fluoreszenzerfassungsapparatur ein, die in einen Deckel **122** integriert sind; diese Komponenten werden nachstehend beschrieben. Der Deckel **122** weist einen Griff **124** auf, um seine Anbringung und Entfernung von der Grundeinheit **110** zu erleichtern, sowie Lüftungslöcher **126**. Der Deckel **122** sorgt für eine optische und thermische Isolierung der Komponenten innerhalb der Deckelanordnung **112**.

[0026] **Fig. 2** ist eine Explosionsansicht des Inneren der Deckelanordnung **112**. Dargestellt sind eine Probeneinheit **202**, eine Deckelheizung **204** und eine Fluorometeranordnung **206**. Die Probeneinheit **202** enthält eine Anzahl von Probenvertiefungen **210**, die in regelmäßigem Muster (z.B. als Raster von 8 × 12) angeordnet sind. In einer Ausführungsform hält jede Probenvertiefung **210** ein abnehmbares Reaktionsgefäß (nicht dargestellt), wie ein Röhrchen, das eine zu prüfende Nukleinsäureprobe enthält, zusammen mit den geeigneten PCR-Reaktanten (Puffern, Primern und Sonden, Nukleotiden usw.), die mindestens eine fluoreszierende Markierung oder -sonde einschließen, die in der Lage ist, sich an eine Target-Nukleinsäuresequenz zu binden oder auf andere Weise auf deren Vorhandensein anzusprechen. Die Reaktionsgefäße sind vorteilhafterweise mit transparenten Probenabdeckungen (nicht dargestellt) versehen, die fest auf die Gefäße passen, um eine Kreuzkontamination der Proben oder ein Verschütten während des Hantierens zu verhindern. Die Reaktionsgefäße können auch auf andere Weise verschlossen werden, einschließlich der Verwendung von Folien, wie Microseal[®] B (Hersteller MJ Research Inc.), Wachsprodukten wie Chill-out[™] (Hersteller MJ Research Inc.) oder Mineralöl. In einer alternativen Gestaltung wird ein abnehmbares Probentablett (nicht dargestellt), das eine oder mehrere verschiedene Proben an Stellen hält, die den Probenvertiefungen **210** entsprechen, verwendet. Das Probentablett kann ebenfalls auf jede der oben beschriebenen Weisen verschlossen werden.

[0027] Die Probeneinheit **202** schließt auch Heizelemente (z.B. thermoelektrische Vorrichtungen, die den Peltier-Effekt nutzen), Wärmetauscherelemente, elektrische Verbindungselemente, um die Heizelemente mit einer Grundeinheit **110** zu verbinden, und mechanische Verbindungselemente ein. Diese Komponenten (nicht dargestellt) können von herkömmlichem Design sein. Die Probeneinheit **202** liefert auch elektrische Verbindungen für eine Deckelheizung **204** und eine Fluorometeranordnung **206** über Mehrfachverdrahtungskabel **212**, die lösbar an den Verbindern **214** angebracht sind.

[0028] Die Deckelheizung **204** weist durchgehende Löcher **220** auf, die in Form und Abstand zu den Probenvertiefungen **210** passen, sowie elektronisch gesteuerte Heizelemente (nicht dargestellt). Die Deckelheizung **204** ist mit einem Deckel **122** verbunden. Der Verbindungsmechanismus (nicht dargestellt) ist günstigerweise beweglich (z.B. kann die Deckelheizung **204** mittels eines Gelenks am Deckel **122** befestigt sein), um Zugang zur Fluorometeranordnung **206** zu ermöglichen, wenn der Deckel **122** von der Probeneinheit **202** entfernt wird. Wenn der Deckel **122** an der Probeneinheit **202** angebracht wurde, halten Träger **224** die Deckelheizung **204** an Ort und Stelle. Untere Abschnitte **226** der Träger **224** sind günstigerweise so gestaltet, dass sie die Deckelheizung **204** an die Probeneinheit **202** drücken, wodurch die Gefahr einer Verdampfung der Probe während des Betriebs der Vorrichtung **100** verringert wird. Diese Kompression ermöglicht auch die Verwendung unterschiedlich großer Reaktionsgefäße. Die Deckelheizung **204** wird verwendet, um die Temperatur der Probenabdeckungen (oder anderer Verschlüsse) der Reaktionsgefäße der Probenvertiefungen **210** zu steuern, um zu verhindern, dass es während des Thermocycle-Betriebs zu einer Kondensation an den Abdeckungen kommt.

[0029] Die Deckelheizung **204** schließt günstigerweise ein oder mehrere Kalibrierungselemente **222** ein, die zwischen ausgewählten Löchern **220** oder an anderen Stellen abseits von den Löchern angeordnet sind, beispielsweise in der Nähe des Rands der Deckelheizung **204**. Die Kalibrierungselemente **222** liefern eine bekannte Fluoreszenzantwort und können verwendet werden, um Fluoreszenzdetektoren in der Fluorometeranordnung **206** zu kalibrieren. Die Kalibrierungselemente **222** können z.B. aus einer fluoreszierenden Beschichtung auf einem Glas- oder Kunststoffsubstrat gefertigt sein oder sie können aus einem Kunststoff, der mit einem Farbstoff imprägniert ist, aus fluoreszierendem Glas oder einem fluoreszierenden Kunststoff, wie Polyetherimid (PEI), bestehen. Filter mit neutraler Dichte oder andere Arten von Filtern können über das fluoreszierende Material gelegt werden, um eine Sättigung der Fluoreszenzdetektoren zu vermeiden. Generell kann jedes Material verwendet werden, vorausgesetzt, seine Fluoreszenzei-

genschaften sind unter Einwirkung von Licht (Photo-Bleichung) und Wärme dauerhaft ausreichend stabil. Der Einfluss der Temperatur auf die Fluoreszenzantwort wird günstigerweise so weit wie in der Praxis möglich minimiert. Wenn mehrere Kalibrierungselemente **222** vorgesehen sind, können unterschiedliche Materialien für unterschiedliche Kalibrierungselemente verwendet werden. In einer alternativen Ausführungsform kann die Deckelheizung **204** weggelassen werden und die Kalibrierungselemente **222** können an der Oberfläche der Probeneinheit **202** angeordnet werden.

[0030] Die Probeneinheit **202** und die Deckelheizung **204** können von herkömmlichem Design sein. Beispiele für geeignete Designs schließen Proben-einheit- und Deckelheizungskomponenten der verschiedenen Alpha™-Module ein, die von MJ Research, Inc., einem Inhaber der vorliegenden Anmeldung, verkauft werden.

[0031] Die Fluorometeranordnung **206** schließt einen Trägerrahmen oder eine Plattform **230** ein, der bzw. die fest im Deckel **122** befestigt ist. An der Unterseite des Trägerrahmens **230** ist eine Zubringereinrichtung **232** beweglich angebracht, die ein Detektionsmodul **234** hält. Die Zubringereinrichtung **232** ist in zwei Dimensionen beweglich, um das Detektionsmodul **234** durch die entsprechenden Löcher **220** in der Deckelheizung **204** in optische Kommunikation mit unterschiedlichen Probenvertiefungen **210** in der Probeneinheit **202** zu positionieren. Der Trägerrahmen **230** und die Träger **224** sind günstigerweise so bemessen, dass das Detektionsmodul nahe an der Deckelheizung **204** gehalten wird, wenn der Deckel **122** in der Grundeinheit **110** positioniert und geschlossen wird; der Fachmann weiß, dass diese Anordnung den Lichtverlust zwischen den Probenvertiefungen und dem Detektionsmodul verringert.

[0032] [Fig. 3](#) ist eine Ansicht von unten auf die Fluorometeranordnung **206** und zeigt eine bewegliche Befestigung der Zubringereinheit **232** und des Detektionsmoduls **234**. In dieser Ausführungsform werden Verschiebetische, die von Schrittmotoren angetrieben werden, verwendet, um die Zubringereinrichtung **232**, an der das Detektionsmodul lösbar befestigt ist, in eine gewünschte Position zu bewegen. Genauer sind an der Trägerplattform **230** ein x-Achsen-Schrittmotor **302** und eine Leitspindel **304** befestigt. Der Schrittmotor **302** wirkt so, dass er die Leitspindel **304** dreht, wodurch ein Verschiebetisch **306** in x-Richtung (durch einen Pfeil dargestellt) bewegt wird. Begrenzungsschalter **308** sind günstigerweise vorgesehen, um die Bewegung der Verschiebetische **306** auf einen geeigneten Bereich zu begrenzen, der groß genug ist, um eine Platzierung des Detektionsmoduls **234** in optischen Kontakt mit einer beliebigen Vertiefung zu ermöglichen und gleichzeitig zu verhindern, dass der Verschiebetisch **306** andere Systemkompo-

nenen, wie einen Schrittmotor **302**, berührt.

[0033] Der Verschiebetisch **306** weist einen y-Achsen-Schrittmotor **316** und eine Leitspindel **318** auf, die daran befestigt ist. Der Schrittmotor **316** wirkt so, dass er die Leitspindel **318** dreht, wodurch die Zubringereinheit **232** in y-Richtung (durch einen Pfeil angezeigt) bewegt. Begrenzungsschalter **320** sind günstigerweise vorgesehen, um die Bewegung der Zubringereinheit **232** auf einen geeigneten Bereich zu begrenzen, der groß genug ist, um zu ermöglichen, dass das Detektionsmodul **234** in optischen Kontakt mit einer beliebigen Vertiefung platziert wird, während gleichzeitig verhindert wird, dass die Zubringereinheit **232** andere Systemkomponenten, wie einen Schrittmotor **316**, berührt.

[0034] Schrittmotoren **302**, **316**, Leitspindeln **304**, **318** und Begrenzungsschalter **308**, **320** können im Allgemeinen von herkömmlichem Design sein. Natürlich können auch andere bewegliche Befestigungen an ihre Stelle treten. Beispielsweise können anstelle der direkten Verbindung der Motoren mit den Leitspindeln indirekte Verbindungen, wie Kettenantriebe oder Riemenantriebe, verwendet werden. Kettenantriebe, Riemenantriebe oder andere Antriebsmechanismen können auch verwendet werden, um das Detektionsmodul ohne Leitspindeln zu positionieren, z.B. durch Befestigen eines Verschiebetisches an der Kette, dem Riemen oder einem anderen Antriebsmechanismus. Andere Arten von Motoren, wie Servomotoren oder lineare Motoren, können ebenfalls verwendet werden. Unterschiedliche Antriebsmechanismen können für unterschiedliche Freiheitsgrade verwendet werden.

[0035] Die Zubringereinheit **232** hält ein Detektionsmodul **234** über Verbinder **330**, **331**. Die Verbinder **330**, **331**, deren Design variieren kann, sind so gestaltet, dass sie das Detektionsmodul **234** an der Unterseite der Zubringereinrichtung **232** tragen und ausrichten. Die Verbinder sind günstigerweise so ausgelegt, dass sie eine leichte Einführung und Entfernung des Detektionsmoduls **234** ermöglichen, um den Austausch des Detektionsmoduls zu erleichtern. In einer Ausführungsform sorgen Verbinder **330** für die Befestigung eines zylindrischen Elements (nicht dargestellt), das einen Rand des Detektionsmoduls **234** schwenkbar hält, während Verbinder **331** Kugelkolben einschließen, die auf der Zubringereinrichtung **232** angebracht sind und in entsprechende Aufnahmen im Detektionsmodul **234** eingeführt werden können. Elektrische Verbindungen (nicht dargestellt) zwischen der Zubringereinheit **232** und dem Detektionsmodul **234** können ebenfalls vorgesehen sein, wie nachstehend beschrieben.

[0036] **Fig. 4** ist eine Ansicht von oben auf ein Detektionsmodul **234**. Das Detektionsmodul **234** schließt Formstücke **420** ein, die mit entsprechenden

Verbindern **330** an der Unterseite der Zubringereinrichtung **232** verkuppelt werden, wodurch das Detektionsmodul **234** in einer solchen Position festgehalten wird, dass es sich mit der Zubringereinheit **232** bewegt. Das Detektionsmodul **234** schließt auch einen elektrischen Verbinder **424** ein, der mit einem entsprechenden elektrischen Verbinder an der Unterseite der Zubringereinrichtung **232** verkuppelt wird, wodurch eine Steuerung und die Auslesung von Signalen, die an das Detektionsmodul **234** geliefert werden und von diesem erhalten werden, möglich sind.

[0037] **Fig. 5A** ist eine Ansicht von unten auf das Detektionsmodul **234** und zeigt vier Öffnungen **502**, **504**, **506**, **508** für vier unabhängig gesteuerte Exzitations-/Detektions-Fluoreszenzkanäle (auch als „Exzitations-/Detektions-Paare“ bezeichnet), die innerhalb des Körpers des Detektionsmoduls **234** angeordnet sind. Beispiele für Exzitations-/Detektionskanäle werden nachstehend beschrieben. Der Abstand der Öffnungen **502**, **504**, **506**, **508** entspricht dem Abstand der Probenvertiefungen **210**. Wenn die Öffnung **502** in optischer Kommunikation mit einer der Probenvertiefungen **210** angeordnet wird, befinden sich somit die Öffnungen **504**, **506** und **508** in optischer Kommunikation mit einer jeweils anderen Probenvertiefung **210**. Die Öffnungen **502**, **504**, **506**, **508** können einfach Löcher durch die Unterseite des Detektionsmoduls **234** sein, oder sie können aus einer beliebigen Substanz bestehen, die einen hohen Grad an Durchlässigkeit für die Exzitations- und Detektionslicht-Wellenlängen ihrer jeweiligen Kanäle aufweist.

[0038] **Fig. 5B** ist eine Ansicht von unten auf ein Detektionsmodul **234'** gemäß einer alternativen Ausführungsform der Erfindung. In dieser Ausführungsform sind vier Öffnungen **512**, **514**, **516**, **518** vorgesehen, aber sie sind versetzt angeordnet, so dass jeweils nur eine Öffnung gleichzeitig in optischer Kommunikation mit einer der Probenvertiefungen stehen kann. Diese Gestaltung ist nützlich, um eine gegenseitige Störung der Exzitations-/Detektions-Paare zu verringern.

[0039] **Fig. 6** ist eine schematische Darstellung einer Gestaltung von optischen Elementen für einen Exzitations-/Detektionskanal (oder ein Exzitations-/Detektions-Paar) **600** gemäß einer Ausführungsform der Erfindung. Das Detektionsmodul **231** kann ein oder mehrere Exzitations-/Detektions-Paare **600** einschließen, die jeweils einen unabhängigen Fluoreszenzerfassungs kanal liefern. Das Exzitations-/Detektions-Paar **600** ist innerhalb von lichtundurchlässigen Wänden **602** angeordnet, die für optische Isolierung gegen anderen Exzitations-/Detektions-Paare, die im Detektionsmodul **234** enthalten sein können, ebenso wie gegen externe Lichtquellen sorgen. Ein Exzitationslichtweg **604** schließt eine Licht emittierende Diode (LED) oder andere Lichtquelle **606**, einen Filter **608**, eine Linse **610** und einen Strahlteiler **612** ein. Ein Detektionslichtweg **620**

schließt einen Strahlteiler **612**, einen Filter **624**, eine Linse **626** und eine Photodiode oder einen anderen Photodetektor **628** ein. Der Strahlteiler **612** ist günstigerweise so ausgewählt, dass er für Licht der Exzitationswellenlänge hoch durchlässig ist und für Licht der Detektions- (Fluoreszenzantwort-) Wellenlänge hoch reflektiv ist.

[0040] Die Komponenten des Exzitationslichtwegs **604** sind so angeordnet, dass sie Exzitationslicht der gewünschten Wellenlänge in eine Reaktionsgefäß **616** lenken, das in einer Probenvertiefung **210** eines Probenblocks **202** gehalten wird. Die gewünschte Wellenlänge hängt von den speziellen fluoreszierenden Markierungsmitteln ab, die im Reaktionsgefäß **616** enthalten sind und wird durch Auswahl einer geeigneten LED **606** und eines geeigneten Filters **608** gesteuert. Für eine optische Kommunikation zwischen dem Exzitations-/Detektions-Paar **600** und dem Reaktionsgefäß **616** ist durch eine Öffnung **502** in der lichtundurchlässigen Wand **602** und ein Loch **220** durch die Deckelheizung **204** gesorgt, wie oben beschrieben. Um die Lichtdurchlässigkeit zum und vom Exzitations-/Detektions-Paar **600** zu maximieren, wird der Abstand zwischen der Öffnung **502** und der Deckelheizung **204** während des Betriebs günstigerweise klein gehalten.

[0041] Exzitationslicht, das in das Reaktionsgefäß **616** gelangt, regt die darin enthaltene fluoreszierende Markierung oder Sonde an, die fluoresziert, wodurch Licht einer anderen Wellenlänge erzeugt wird. Ein Teil dieses Lichts verlässt das Reaktionsgefäß **616** auf dem Detektionslichtweg **620** und gelangt durch die Öffnung **502**. Der Strahlteiler **612** lenkt einen erheblichen Teil des fluoreszierenden Lichts durch den Filter **624**, der die Exzitationsfrequenz herausfiltert, und die Linse **626**, die das Licht auf die aktive Oberfläche der Photodiode **628** bündelt. Die Photodiode **628** erzeugt ein elektrisches Signal als Antwort auf das einfallende Licht. Dieses elektrische Signal wird auf einem Auslesesignalweg **630** an eine Schalttafel **634** übertragen, die das Signal zum Auslesen an den elektrischen Verbinder **424** leitet. Die Schalttafel **634** und/oder der Signalweg **630** können auch andere Komponenten einschließen, wie Vorverstärker, um das elektrische Signal von der Photodiode **628** zu formen und zu verfeinern.

[0042] Die LED **606** und die Photodiode **628** können durch Signale gesteuert werden, die über einen Verbinder **424** empfangen werden, wie durch jeweilige Steuersignalwege **636**, **638** angezeigt. Steuersignale für die LED **606** können die Funktion haben, die LED **606** zu gewünschten Zeiten zu aktivieren und zu deaktivieren, einen Gain-Parameter anzupassen usw.

[0043] Zwar ist in [Fig. 6](#) ein Exzitations-/Detektions-Paar **600** dargestellt, aber es sei klargestellt,

dass eine Ausführungsform des Detektionsmoduls **234** beliebig viele solcher Paare enthalten kann, von denen jedes günstigerweise von den anderen optisch isoliert ist und eine eigene Öffnung für die optische Kommunikation mit den Probenvertiefungen hat (z.B. Öffnungen **504**, **506**, **508** von [Fig. 5](#)). Die verschiedenen Exzitations-/Detektions-Paare werden unabhängig voneinander gesteuert und unabhängig voneinander ausgelesen, aber ihre jeweiligen Steuer- und Auslesewege können alle mit der Schalttafel **634** verbunden sein.

[0044] Die Gestaltung der Exzitations-/Detektions-Paare kann von der dargestellten abweichen, und die Exzitations-/Detektions-Paare können zusätzliche Komponenten, weniger Komponenten oder jede Kombination von gewünschten Komponenten enthalten. Die Optik kann so modifiziert werden, wie es für eine spezielle Anwendung geeignet ist (z.B. kann der optische Weg in Ausführungsformen, wo keine Deckelheizung **204** enthalten ist, kürzer sein), und es kann jede Zahl und Kombination von Komponenten einschließlich von Linsen, Strahlteilern, Spiegeln und Filtern, verwendet werden, wobei dies jedoch keine Einschränkung bedeutet. Zwar liefern LEDs eine kompakte und zuverlässige Lichtquelle, aber andere Arten von kohärenten und inkohärenten Lichtquellen, wie Laserdioden, Blitzlichter usw., sind nicht von vorneherein ausgeschlossen. Ebenso sind die Detektoren nicht auf Photodioden beschränkt; es kann stattdessen jede Art von Photodetektor verwendet werden, einschließlich von Photovervielfachern und ladungsgekoppelten Vorrichtungen (CCDs).

[0045] Jedes Exzitations-/Detektions-Paar ist günstigerweise als eigenständige Anordnung gestaltet, die nur externe elektrische Verbindungen benötigt, um funktionieren zu können. Da die Länge der optischen Exzitations- und Detektionswege sich von Versuch zu Versuch nicht unterscheidet, ist es günstig, die verschiedenen optischen Komponenten für jedes Exzitations-/Detektions-Paar **600** während der Herstellung innerhalb des Detektionsmoduls **234** fest anzubringen und zu optimieren, so dass weitere Anpassungen während des Betriebs nicht nötig sind.

[0046] [Fig. 7](#) ist ein Blockdiagramm, das elektrische Verbindungen für die Deckelanordnung **112** darstellt. Eine Hauptplatine **702** ist in der Deckelanordnung **112** befestigt. Die Hauptplatine **702** schließt einen primären Signalprozessor **704**, eine Schrittmotor-Antriebseinheit **706**, eine Verbindung **708** für elektrische Leistung und eine Verbindung **710** für einen externen Rechner (z.B. einen Personal Rechner oder PC) ein. Die Hauptplatine **702** liefert auch Verbinder **214** für Kabel **212**, die für eine Übertragung von elektrischen Signalen zum und vom Deckel **122** sorgen.

[0047] Der Deckel **122** schließt eine sekundäre Platine **720** ein, welche die Kommunikation zwischen der

Hauptplatine **702** und den Schrittmotoren **302**, **316** ebenso wie einer Zubringereinrichtung **232** erleichtert. Die sekundäre Platine **720** schließt Verbinder **722** für Kabel **212**, einen Verbinder **724**, der ein Kabel **726** mit der Zubringereinrichtung **232** verbindet, und Verbinder **732** und **734** für Kabel **736**, **738**, die für Steuersignale zu den x- und y-Schrittmotoren **302**, **316** sorgen, ein. Leitwege (nicht dargestellt) in der sekundären Platine **720** richten geeignete Signalverbindungen zwischen den verschiedenen Verbindern ein.

[0048] Das Kabel **726** wird verwendet, um Steuersignale für das Detektionsmodul **234** zu übermitteln, wie die Aktivierung und Deaktivierung einzelner Lichtquellen, und um Signale von den Photodetektoren zu empfangen, die im Detektionsmodul **234** enthalten sind. Der elektrische Verbinder **730** ist an der Zubringereinrichtung **232** vorgesehen, um Signale zum und vom Detektionsmodul **234** weiterzugeben. Der elektrische Verbinder **730** nimmt das Verbindergegenstück **424** an der Oberseite des Detektionsmoduls **234** auf, wenn das Detektionsmodul **234** an der Zubringeranordnung **232** befestigt wird. In einer alternativen Ausführungsform kann das Kabel **726** direkt am Detektionsmodul **234** angebracht werden.

[0049] Wie oben angegeben, liefert die Hauptplatine **702** eine Verbindung **710** zu einem externen Rechner (nicht dargestellt). Der externe Rechner kann verwendet werden, um die Bewegung der Zubringereinrichtung **232** und die Funktion des Detektionsmoduls **234** zu steuern, ebenso wie für die Auslesung und Analyse von Fluorometriedaten, die vom Detektionsmodul **234** erhalten werden.

[0050] Wie oben beschrieben, ist das Detektionsmodul **234** so ausgelegt, dass es eigenständig ist und von der Zubringereinrichtung **232** abgenommen werden kann. Dies ermöglicht eine Umgestaltung des Fluorometriesystems, mit dem ein Experimentator in der Lage ist, Detektionsmodule nach Wunsch zu verändern, um unterschiedliche Messungen durchzuführen. Beispielsweise können unterschiedliche Detektionsmodule für unterschiedliche fluoreszierende Markierungsmittel (oder Mittelkombinationen) optimiert werden. Falls der Experimentator einen anderen Wirkstoff untersuchen möchte, kann er das geeignete Detektionsmodul einfach installieren. Die Installation ist eine Sache der Befestigung des elektrischen Verbinders **424** und des mechanischen Verbinders **420** an der Oberseite des gewünschten Detektionsmoduls **234** an entsprechenden Verbindern an der Unterseite der Zubringereinrichtung **234**. In einigen Ausführungsformen sind die Verbinder so entworfen, dass die elektrische Verbindung automatisch zustande kommt, wenn die mechanische Verbindung hergestellt wird. Wie oben angegeben, ist die Deckelheizung **204** günstigerweise beweglich angebracht, so dass die Fluoreszenzanordnung **230** zugänglich

ist, wodurch die Experimentatoren die Detektionsmodule wechseln können.

[0051] Es sei klargestellt, dass die hierin beschriebene Vorrichtung der Erläuterung dient und dass Variationen und Modifikationen möglich sind. Beispielsweise kann die Grund- und Probeneinheit als integriertes System entworfen sein oder weiter in noch kleinere modulare Komponenten geteilt sein. Die Fluorometeranordnung muss nicht am Deckel befestigt oder anderweitig an diesem integriert sein, solange sie in einer festen Position relativ zu den Probenvertiefungen befestigt werden kann. Jeder Mechanismus kann verwendet werden, um das Detektionsmodul beweglich zu machen, um es mit anderen Detektionsmodulen in optische Kommunikation zu positionieren, und ist nicht auf Verschiebetische oder Schrittmotoren beschränkt. Das Detektionsmodul kann beliebig viele (eines oder mehrere) der Exzitations-/Detektions-Paare einschließen, die als unabhängige Erfassungskanäle fungieren können, und es können unterschiedliche Paare dafür ausgelegt sein, die gleiche Fluoreszenzsonde oder verschiedene Fluoreszenzsonden zu erfassen. In einer alternativen Ausführungsform schließt das Detektionsmodul eine Reihe von Exzitations-/Detektions-Paaren mit optischen Fenstern ein, die so angeordnet sind, dass sie einer Reihe der Probenanordnung entsprechen, und das Detektionsmodul wird in einer Richtung beweglich gemacht, um verschiedene Kolonnen der Anordnung abzutasten.

[0052] Der externe Rechner ist ebenfalls optional und jede seiner Funktionen kann in die Thermocycler-Vorrichtung integriert sein; umgekehrt können Steuerfunktionen des Thermocycler so implementiert sein, dass sie im externen Rechner durchgeführt werden, wodurch eine einzige Steuervorrichtung für die gesamte Apparatur vorgesehen wird. In einer Ausführungsform wird der externe Rechner verwendet, um die Position des Detektionsmoduls **234** mit Bezug auf die Probenvertiefungen und die Funktionen der Lichtquelle(n) und des Detektors bzw. der Detektoren zu steuern. Darüber hinaus kann jeder externe Rechner eine für einen speziellen Zweck ausgelegte Steuer- und Signalverarbeitungsvorrichtung ebenso wie ein Universal-Rechner, beispielsweise ein PC, sein.

II. Anwendungsverfahren

[0053] Die hierin beschriebene Apparatur kann verwendet werden, um die Menge des Verstärkungsprodukts, das in einer Verstärkungsreaktion erzeugt wird, durch Erfassen der Fluoreszenzmenge zu erfassen. Es können verschiedene Verstärkungsverfahren verwendet werden, um Target-Sequenzen, die in DNA- oder RNA-Proben vorhanden sind, zu quantifizieren. Solche Verfahren, welche die enzymatische Synthese von Nukleinsäure-Amplikons (Kopien), die eine Sequenz enthalten, die zu der verstärk-

ten Sequenz komplementär ist, beinhalten, sind in der Technik bekannt und werden in großem Umfang angewendet. Sie schließen, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein, die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), RT-PCR, die Strangverdrängungsamplifikation (strand displacement amplification, SDA), auf Transkription basierende Verstärkungsreaktionen, Ligasekettenreaktion (ligase chain reaction, LCR) und andere ein (siehe z.B. Dieffenbach & Dveksler, PCR Primer: A Laboratory Manual, 1995; die US-Patente Nr. 4,683,195 und 4,683,202; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et al., Hrsg, 1990; Walker et al., Nucleic Acids Res. 20(7): 1691-6, 1992; Walker, PCR Methods Appl3(1): 1-6, 1993; Phyffer et al., J. Clin. Microbiol. 34: 834-841, 1996; Vuorinen et al., J. Clin. Microbiol. 33:1856-1859, 1995; Compton, Nature 350 (6313): 91-2, 1991; Lisby, Mol. Biotechnol. 12(1): 75-99, 1999; Hatch et al., Genet. Anal 15(2): 35-40, 1999; und Iqbal et al., Mol. Cell Probes 13(4): 315-320, 1999). Die Nukleinsäureverstärkung ist besonders von Vorteil, wenn die Menge der Target-Sequenz, die in einer Probe vorhanden ist, sehr gering ist. Durch Verstärkung der Target-Sequenz und Erfassung des synthetisierten Amplikons kann die Empfindlichkeit eines Assays gewaltig verbessert werden, da weniger Kopien der Target-Sequenz zu Anfang des Assays nötig sind, um die Erfassung von Nukleinsäure in der Probe, die zu dem Organismus oder Virus von Interesse gehört, besser gewährleisten zu können.

[0054] Die Messung des Verstärkungsprodukts kann durchgeführt werden, nachdem die Reaktion abgeschlossen wurde, oder in Echtzeit (d.h. im Wesentlichen kontinuierlich). Falls eine Messung eines akkumulierten verstärkten Produkts durchgeführt wird, nachdem die Verstärkung abgeschlossen wurde, dann können Detektionsreagentien (z.B. Fluoreszenzsonden) nach der Verstärkungsreaktion hinzugefügt werden. Alternativ dazu können der Reaktion vor oder während der Verstärkungsreaktion Sonden hinzugefügt werden, wodurch die Messung des verstärkten Produkts entweder nach deren Abschluss oder in Echtzeit möglich ist. Falls verstärkte Produkte in Echtzeit gemessen werden, kann die anfängliche Kopienzahl durch Bestimmen der Zykluszahl, bei der das Signal einen Schwellenwert überschreitet, und Rückprojizieren auf die anfängliche Kopienzahl geschätzt werden, wobei eine exponentielle Verstärkung angenommen wird.

A. Fluoreszenzsonden

[0055] Es sind eine Reihe von Formaten verfügbar, die Fluoreszenzsonden nutzen. Diese Formate basieren häufig auf Fluoreszenzresonanz-Energieübertragung (fluorescence resonance energy transfer, FRET) und schließen Molecular Beacon und TagMan[®]-Sonden ein. FRET ist eine streckenabhängige Interaktion zwischen einem Donor- und einem Ak-

zeptormolekül. Die Donor- und Akzeptormoleküle sind Fluorophore. Falls die Fluorophore Exzitations- und Emissionsspektren aufweisen, die einander überlagern, dann wird die Anregung des Donor-Fluorophors in großer Nähe (in der Regel etwa 10-100 Angström) auf das Akzeptor-Fluorophor übertragen. Infolgedessen ist die Lebensdauer des Donormoleküls verkürzt und seine Fluoreszenz wird gelöscht, während die Fluoreszenzintensität des Akzeptormoleküls verstärkt und depolarisiert wird. Wenn die Exzitationszustandsenergie des Donors auf einen Nicht-Fluorophorakzeptor übertragen wird, wird die Fluoreszenz des Donors ohne anschließende Emission von Fluoreszenz durch den Akzeptor gelöscht. In diesem Fall fungiert der Akzeptor als Löschungsreagens.

[0056] Ein auf FRET basierendes Format für Echtzeit-PCR verwendet DNA-Sonden, die als "Molecular Beacons" bezeichnet werden (siehe z.B. Tyagi et al., Nat. Biotech. 16: 49-53, 1998; US-Patent Nr. 5,925,517). Molecular Beacons weisen eine Haarnadelstruktur auf, wobei der Quencher-Farbstoff und der Reporter-Farbstoff am Ende des Haarnadelstiels in innigem Kontakt miteinander stehen. Nach Hybridisierung mit einer komplementären Sequenz wird die Schleife der Haarnadelstruktur doppelsträngig und zwingt den Quencher- und den Reporter-Farbstoff auseinander, wodurch ein fluoreszierendes Signal erzeugt wird. Ein verwandtes Detektionsverfahren nutzt Haarnadel-Primer als die fluorogene Sonde (Nazarenko et al., Nucl. Acid Res. 25: 2516-2521, 1997; US-Patent Nr. 5,866,336; US-Patent Nr. 5,958,700). Die PCR-Primer können so ausgelegt sein, dass nur dann ein fluoreszierendes Signal erzeugt wird, wenn der Primer eine lineare Struktur annimmt, d.h. in ein PCR-Produkt eingebaut wird.

[0057] Verstärkungsprodukte können auch in Lösung unter Verwendung eines fluorogenen 5'-Nuklease-Assay, eines TagMan-Assay, erfasst werden. Siehe Holland et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88: 7276-7280, 1991; US-Patente Nr. 5,538,848, 5,723,591 und 5,876,930. Die TagMan-Sonde ist so ausgelegt, dass sie eine Sequenz im gewünschten PCR-Produkt hybridisiert. Das 5'-Ende der TagMan-Sonde enthält einen fluoreszierenden Reporter-Farbstoff. Das 3'-Ende der Sonde ist blockiert, um eine Sondenextension zu verhindern, und enthält einen Farbstoff, der die Fluoreszenz des 5'-Fluorophors löscht. Während der anschließenden Verstärkung wird die fluoreszierende 5'-Markierung abgespalten, falls eine Polymerase mit 5'-Exonukleaseaktivität in der Reaktion vorhanden ist. Die Exzision des 5'-Fluorophors führt zu einer Zunahme der Fluoreszenz, die erfasst werden kann.

[0058] Zusätzlich zum Haarnadel- und 5'-Nuklease-PCR-Assay wurden auch andere Formate entwickelt, die den FRET-Mechanismus nutzen. Beispiels-

weise wurden einzelsträngige Primer durch Verknüpfung zweier Farbstoffe, um ein Donor/Rezeptor-Farbstoffpaar zu bilden, modifiziert, so dass die Fluoreszenz des ersten Farbstoffs durch den zweiten Farbstoff gelöscht wird. Dieser Signalprimer enthält eine Restriktionsstelle (US-Patent Nr. 5,846,726), die es dem geeigneten Restriktionsenzym ermöglicht, den Primer einzuschneiden, wenn er an ein Target hybridisiert ist. Diese Spaltung trennt die beiden Farbstoffe, und es zeigt sich eine Änderungen der Fluoreszenz aufgrund der abnehmenden Löschung. Nicht-Nukleotidverknüpfungsmittel zur Kopplung von Oligonukleotiden an Liganden wurden ebenfalls beschrieben (US-Patent Nr. 5,696,251).

[0059] Andere Verstärkungsreaktionen, die mittels Fluoreszenzablesung überwacht werden können, sind diejenigen, die durch Messen der Menge an DNA-bindendem Farbstoff, der an das Verstärkungsprodukt gebunden ist, quantifiziert werden. Solche Assays nutzen fluoreszierende Farbstoffe, z.B. Ethidiumbromid oder SYBR Green I (Molecular Probes, Inc., Eugene, Oreg.; US-Patente Nr. 5,436,134 und 5,658,751), die erhöhte Fluoreszenz zeigen, wenn sie in DNA eingefügt werden (siehe US-Patente Nr. 5,994,056 und 6,171,785). Die Verwendung von SYBR Green I für diesen Zweck ist auch in Morrison et al. (Biotechniques 24, 954–962, 1998) beschrieben. Eine Zunahme der Fluoreszenz reflektiert eine Zunahme der Menge an doppelsträngiger DNA, die durch die Verstärkungsreaktion erzeugt wird.

[0060] Andere Fluoreszenzsonden schließen anorganische Moleküle, mehrmolekulare Mischungen aus organischen und/oder anorganischen Molekülen, Kristalle, Heteropolymere und dergleichen ein. Beispielsweise können CdSe-CdS-Kern/Schale-Nanokristalle, die von einer Kieselerdeschale umschlossen sind, leicht derivatisiert werden, um an ein biologisches Molekül gekoppelt zu werden (Bruchez et al. (1998) Science, 281: 2013–2016). Ebenso wurden hoch-fluoreszente Quantenpunkte (mit Zinksulfid verkapptes Cadmiumselenid) auf zweckmäßige Weise mit Biomolekülen zur Verwendung in einer ultrasensitiven biologischen Erfassung gekoppelt (Warren und Nie (1998) Science, 281: 2016–2018).

[0061] Multiplex-Assays können ebenfalls unter Verwendung der Apparatur **100** durchgeführt werden. Multiplex-PCR resultiert in einer Verstärkung von mehreren Polynucleotidfragmenten in derselben Reaktion. Siehe z.B. PCR PRIMER, A LABORATORY MANUAL (Dieffenbach, Hrsg. 1995) Cold Spring Harbor Press, Seiten 157–171. Beispielsweise können verschiedene Target-Schablonen hinzugefügt werden und parallel im selben Reaktionsgefäß verstärkt werden. Multiplex-Assays beinhalten in der Regel die Verwendung von unterschiedlichen fluoreszierenden Markierungen, um die unterschiedlichen Target-Sequenzen zu erfassen, die verstärkt werden.

B. PCR-Bedingungen und -Komponenten

[0062] Beispiele für PCR-Reaktionsbedingungen umfassen in der Regel entweder zwei- oder dreistufige Zyklen. Die zweistufigen Zyklen weisen einen Denaturierungsschritt auf, gefolgt von einem Hybridisierungs-/Verlängerungs-Schritt. Dreistufige Zyklen umfassen einen Denaturierungsschritt, gefolgt von einem Hybridisierungsschritt, gefolgt von einem separaten Verlängerungsschritt. Die Polymerasereaktionen werden unter Bedingungen inkubiert, unter denen die Primer an die Target-Sequenzen hybridisieren und durch Polymerase verlängert werden. Die Bedingungen des Verstärkungsreaktionszyklus werden so gewählt, dass die Primer besonders mit der Target-Sequenz hybridisieren und verlängert werden.

[0063] Eine erfolgreiche PCR-Verstärkung verlangt eine hohe Ausbeute, eine hohe Selektivität und eine gesteuerte Reaktionsrate in jedem Schritt. Ausbeute, Selektivität und Reaktionsrate hängen im Allgemeinen von der Temperatur ab, und die optimale Temperatur hängt von der Zusammensetzung und der Länge des Polynucleotids, den Enzymen und anderen Komponenten im Reaktionssystem ab. Darüber hinaus können für unterschiedliche Schritte unterschiedliche Temperaturen optimal sein. Die optimalen Reaktionsbedingungen können abhängig von der Target-Sequenz und der Zusammensetzung des Primers variieren. Thermocycler wie die Apparatur **100** sorgen für die notwendige Steuerung der Reaktionsbedingungen, um den PCR-Prozess für einen bestimmten Assay zu optimieren. Beispielsweise kann die Apparatur **100** durch Auswahl der aufrecht zu erhaltenden Temperaturen, der Zeitdauer für jeden Zyklus, der Zahl der Zyklen usw. programmiert werden. In einigen Ausführungsformen können Temperaturgradienten so programmiert werden, dass verschiedene Probenvertiefungen bei verschiedenen Temperaturen gehalten werden können, usw.

[0064] Fluoreszierende Oligonucleotide (Primer oder Sonden), die über Basen verknüpfte oder endverknüpfte Fluore und Quencher enthalten, sind in der Technik bekannt. Sie können beispielsweise von Life Technologies (Gaithersburg, Md.), Sigma-Genosys (The Woodlands, Tex.), Genset Corp. (La Jolla, Calif.) oder Synthetic Genetics (San Diego, Calif.) bezogen werden. Basisch verknüpfte Fluore werden durch Postsynthese-Modifikation von Oligonucleotiden, die mit reaktiven Gruppen synthetisiert werden, die mit Basen verknüpft werden, in die Oligonucleotide eingebaut. Der Fachmann erkennt, dass eine große Zahl unterschiedlicher Fluorophore verfügbar ist, einschließlich solcher von kommerziellen Quellen, wie Molecular Probes, Eugene, Oreg. und anderer Fluorophore, die dem Fachmann bekannt sind. Geeignete Fluorophore schließen die folgenden ein: Fluorescein, Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), Carboxytetrachloro-Fluorescein (TET), NHS-Fluorescein,

5- und/oder 6-Carboxy-Fluorescein (FAM), 5- (oder 6-) Iodoacetamido-Fluorescein, 5-[[2- (und 3-5-(Acetylmercapto)succinyl]amino]-Fluorescein (SAMSA-Fluorescein) und andere Fluorescein-Derivate, Rhodamin, Lissamin-Rhodamin B Sulfonylchlorid, Texas Red-Sulfonylchlorid, 5- und/oder 6-Carboxy-Rhodamin (ROX) und andere Rhodamin-Derivate, Coumarin, 7-Aminomethyl-Coumarin, 7-Amino-4-methylcoumarin-3-essigsäure (AMCA) und andere Coumarin-Derivate, BODIPY™-Fluorophore, Cascade Blue™-Fluorophore, wie 8-Methoxypyren-1,3,6-trisulfonsäure-Trinatriumsalz, Lucifer Yellow-Fluorophore, wie 3,6-Disulfonat-4-aminonaphthalimid, Phycobiliprotein-Derivate, Alexa Fluor-Farbstoffe (erhältlich von Molecular Probes, Eugene, Oreg.) und andere Fluorophore, die dem Fachmann bekannt sind. Für eine allgemeine Auflistung geeigneter Fluorophore siehe auch Hermanson, G.T., BIOCON-JUGATE TECHNIQUES (Academic Press, San Diego, 1996).

[0065] Die Primer für die Verstärkungsreaktionen werden nach bekannten Algorithmen entworfen. Beispielsweise können Algorithmen, die in im Handel erhältlicher oder kundenspezifischer Software implementiert sind, verwendet werden, um Primer zur Verstärkung von Target-Sequenzen zu entwerfen. In der Regel weisen die Primer eine Länge von mindestens 12 Basen, häufiger von 15, 18 oder 20 Basen auf. Primer sind in der Regel so entworfen, dass alle Primer, die an einer bestimmten Reaktion beteiligt sind, Schmelztemperaturen aufweisen, die sich innerhalb von 5 °C und am stärksten bevorzugt innerhalb von 2 °C voneinander unterscheiden. Primer werden ferner so entworfen, dass eine Primerisierung mit sich selbst oder untereinander vermieden wird. Die Primerkonzentration sollte ausreichen, um sich an die Menge der Target-Sequenzen zu binden, die verstärkt werden, um für eine exakte Feststellung der Menge an verstärkter Frequenz zu sorgen. Der Fachmann wird erkennen, dass die Höhe der Konzentration des Primers entsprechend der Bindungsaffinität der Primer ebenso wie der Menge der zu bindenden Sequenzen variiert. Typische Primerkonzentrationen liegen im Bereich von 0,01 µM bis 0,5 µM.

[0066] Der Fachmann wird ferner erkennen, dass es günstig ist, Pufferbedingungen zu entwerfen, die die Funktion aller Reaktionen von Interesse ermöglichen. Somit können Pufferbedingungen so entworfen werden, dass die Verstärkungsreaktion ebenso wie jede enzymatische Reaktion, die mit der Erzeugung von Signalen von Sonden zusammenhängt, unterstützt werden. Ein spezieller Reaktionspuffer kann auf seine Fähigkeit, verschiedene Reaktionen zu unterstützen, dadurch getestet werden, dass die Reaktionen sowohl individuell als auch in Kombination getestet werden. Die Konzentration der Komponenten der Reaktion, wie Salz oder Magnesium, kann die Fähigkeit der Primer oder der Erfassungssonden, sich

an die Target-Nukleinsäure zu binden, ebenfalls beeinflussen. Diese können entsprechend in der Technik bekannten Anleitungen, z.B. Innis et al., oben, angepasst werden.

C. PCR-Verfahrensbeispiel

[0067] [Fig. 8](#) ist ein Ablaufschema für ein Nukleinsäureverstärkungs- und -messverfahren **800** unter Verwendung der Apparatur **100**. In diesem Beispiel steuert die Apparatur **100** ein PCR-Verstärkungsverfahren und erfasst das Vorhandensein von mehreren Target-Sequenzen in den Nukleinsäureproben.

[0068] In Schritt **802** werden Reaktionsgefäße **616** vorbereitet. Die Vorbereitung beinhaltet die Einbringung von Reaktionskomponenten in die Gefäße und die Verschließung der Gefäße, um ein Verschütten oder eine gegenseitige Kontaminierung zu verhindern. Die Reaktionskomponenten schließen Puffer, Target-Nukleinsäure, geeignete Primer und Sonden, Nukleotide, Polymerasen, ebenso wie optionale zusätzliche Komponenten ein. In einer Ausführungsform sind vier fluoreszierende Sonden enthalten, die jeweils dafür ausgelegt sind, eine andere Target-Sequenz zu erfassen, und ein bestimmtes Reaktionsgefäß kann eine oder mehrere der fluoreszierenden Sonden einschließen. Jede Sonde antwortet günstigerweise auf Licht einer jeweils anderen Einfallswellenlänge und emittiert Licht einer jeweils anderen Wellenlänge.

[0069] In Schritt **806** wird ein Detektionsmodul **234** an der Zubringereinrichtung **232** angebracht. Wie oben beschrieben, kann das Detektionsmodul **234** jede Zahl von Detektionskanälen (d.h. von Exzitations-/Detektions-Paaren) einschließen. In einer Ausführungsform schließt das Detektionsmodul **234** vier Detektionskanäle ein. Jeder Kanal ist für eine andere der fluoreszierenden Sonden, die in den Reaktionsgefäßen **616** enthalten sind, optimiert.

[0070] In Schritt **808** werden die Reaktionsgefäße **616** in Probenvertiefungen **210** der Probeneinheit **202** gegeben. In Schritt **810** wird die Deckelanordnung **112** geschlossen und in der Grundeinheit **110** positioniert.

[0071] In Schritt **812** wird jeder Kanal des Detektionsmoduls **234** kalibriert. Die Kalibrierung wird durch Betätigen von Schrittmotoren **302**, **316**, um das Detektionsmodul **234** so zu positionieren, dass mindestens einer seiner Kanäle in optischer Kommunikation mit einer Kalibrierungsstelle **222** steht, durchgeführt. Wie oben beschrieben, liefert jede Kalibrierungsstelle eine bekannte Fluoreszenzantwort. Somit können Kalibrierungsmessungen verwendet werden, um anschließende Probenmessungen hinsichtlich Variationen und Schwankungen der Detektorantwort zu korrigieren. In der Technik sind zahlreiche Kalibrierungs-

verfahren bekannt. Wenn das Detektionsmodul **234** mehrere Kanäle aufweist, kann jeder Kanal unabhängig von den anderen kalibriert werden.

[0072] In Schritt **814** wird ein PCR-Zyklus durchgeführt. Im Allgemeinen beinhaltet Schritt **814** den Betrieb der Grundeinheit **110**, um die Temperatur der Probeneinheit **202** zu regulieren, wodurch die Reaktionsgefäße für eine gewünschte Zeitdauer bei gewünschten Temperaturen gehalten werden, um einen zweistufigen oder dreistufigen PCR-Zyklus durchzuführen. Die Grundeinheit **110** kann über eine Benutzerschnittstelle **116** oder einen externen Rechner gesteuert werden.

[0073] In Schritt **816** tastet und fragt eine Fluorometeranordnung **206** die Reaktionsgefäße **616** ab. Der Betrieb der Fluorometeranordnung **206** wird günstigerweise durch einen externen Rechner gesteuert und mit dem Betrieb der Grundeinheit **110** synchronisiert, so dass Messungen als korrespondierend mit jeweiligen Zeitpunkten im PCR-Verfahren identifiziert werden können.

[0074] Genauer werden in Schritt **816a** Schrittmotoren **302**, **316** oder andere Bewegungsvorrichtungen betätigt, um ein Detektionsmodul **234** so zu positionieren, dass jeder der vier Detektorkanäle über optische Fenster **502**, **504**, **506** bzw. **508** in optischer Kommunikation mit einer jeweils anderen der Probenvertiefungen **210** steht. In Schritt **816b** wird die LED oder eine andere Lichtquelle für jeden Kanal aktiviert (für eine kurze Zeit aufleuchten gelassen), um Fluoreszenz zu stimulieren. In einer Ausführungsform werden LEDs unterschiedlicher Kanäle parallel betrieben; in einer alternativen Ausführungsform werden sie nacheinander betätigt, um zu vermeiden, dass reflektiertes LED-Licht von einem Kanal falsche Signale im Photodetektor eines anderen Kanals bewirkt.

[0075] In Schritt **816c** wird die resultierende Fluoreszenz durch die entsprechende Photodiode oder einen anderen Detektor des Kanals erfasst und wird an den externen Rechner ausgelesen. Die Detektoren können auf verschiedene Weise ausgelesen werden. Beispielsweise kann ein Peak-Signal erfasst werden, das Signal kann über ein Zeitintervall integriert werden, oder die Abnahme des fluoreszierenden Signals nach Deaktivierung der LED kann gemessen werden.

[0076] Die Schritte **816a** – **c** werden vorzugsweise wiederholt, wobei die Position des Detektionsmoduls jedes Mal geändert wird, so dass jeder Kanal des Detektionsmoduls **234** schließlich jede der Probenvertiefungen **210** abfragt. In einer Ausführungsform dauert die Abtastung und Abfragung von vier Kanälen für etwa 96 Probenvertiefungen etwa 15 Sekunden. Der externe Rechner führt vorzugsweise ein Programm

(z.B. das von MJ Research, Inc., verkaufte Opticon Monitor-Programm) durch, das es dem Betrachter ermöglicht, Messdaten in graphischer und/oder Tabellenform zu sehen, während sie gesammelt werden. Solche Programme sind in der Technik bekannt. Ein Beispiel schließt das von MJ Research, Inc., verkaufte Opticon Monitor™-Programm ein.

[0077] Die Schritte **814** und **816** können für jede Zahl von Reaktionszyklen wiederholt werden. Der Durchschnittsfachmann wird erkennen, dass Echtzeit-Fluoreszenzmessungen des Verfahrens **800** verwendet werden können, um das Vorhandensein jeder Target-Sequenz zu erfassen und zu quantifizieren. Solche Messungen können auch für Zwecke wie die Bestimmung von Reaktionsraten und die Anpassung von Reaktionsparametern für einen verbesserten Wirkungsgrad, ebenso wie für die Bestimmung, wann keine weiteren Reaktionszyklen in einem bestimmten Experiment mehr nötig sind (z.B. wann eine ausreichende Menge an Target-Sequenz erzeugt wurde), verwendet werden.

[0078] Es sei klargestellt, dass das Verfahren **800** der Erläuterung dient und dass Variationen und Modifikationen möglich sind. Die als hintereinander ablaufend beschriebenen Schritte können auch parallel durchgeführt werden, die Reihenfolge der Schritte kann variiert werden, und die Schritte können modifiziert oder kombiniert werden. Beispielsweise können Fluoreszenzmessungen an jeder Stelle während eines PCR-Zyklus durchgeführt werden, können mehrmals während jedes PCR-Zyklus durchgeführt werden (einschließlich einer im Wesentlichen kontinuierlichen Abtastung der Probenvertiefungen) oder können erst nach einer bestimmten Zahl von PCR-Zyklen durchgeführt werden. Jede Zahl von unterscheidbaren fluoreszierenden Sonden kann in einem einzigen Reaktionsgefäß verwendet werden, und das Detektionsmodul kann so ausgelegt sein, dass es mindestens so viele Kanäle einschließt wie Sonden verwendet werden. In einigen Ausführungsformen schließt das Detektionsmodul mehrere Kanäle ein, die für die gleiche Sonde optimiert sein. Dies kann die Abtastdauer verkürzen, da nur einer diese Kanäle verwendet werden muss, um eine bestimmte Probenvertiefung abzufragen.

[0079] Wie oben beschrieben, sind außerdem in einer alternativen Ausführungsform die verschiedenen Kanäle des Detektionsmoduls **234** so angeordnet, dass, wenn einer seiner Kanäle in optischer Kommunikation mit der Probenvertiefung **210** steht, andere Kanäle dies nicht tun. Diese Anordnung ermöglicht einen „Flyover“-Betriebsmodus, in dem das Detektionsmodul **234** während eines Abtastdurchgangs über die Vertiefungen im Wesentlichen kontinuierlich bewegt wird. Gegenseitige Störungen der Kanäle sind reduziert, da jeweils nur eine Probenvertiefung gleichzeitig Anregungslicht empfängt.

Schlussfolgerung

[0080] Zwar wurde die Erfindung mit Bezug auf bestimmte Ausführungsformen beschrieben, aber der Fachmann erkennt, dass zahlreiche Modifikationen möglich sind. Beispielsweise kann die hierin beschriebene Fluoreszenzerfassungsanordnung für die Verwendung mit einer großen Vielfalt von Thermocycler-Systemen ausgelegt sein und kann Probenvertiefungen aus jeder Richtung (z.B. von oben oder von unten) abfragen, je nach dem Design des jeweiligen Instruments. Außerdem kann das System dafür ausgelegt sein, einen großen Bereich von Molekülen von biologischem Interesse, die durch eine fluoreszierende Markierung oder -sonde identifiziert werden können, zu erfassen; es ist nicht auf Nukleinsäuren oder irgendein bestimmtes Verstärkungsverfahren beschränkt.

Patentansprüche

1. Fluoreszenz-Erkennungsvorrichtung zum Analysieren von Proben, die sich in einer Vielzahl von Vertiefungen in einem Thermocycler befinden, wobei die Vorrichtung aufweist: eine Trägerstruktur, die an dem Thermocycler befestigt ist; und ein Erkennungsmodul, das bewegbar an der Trägerstruktur anbringbar ist, wobei das Erkennungsmodul aufweist: eine Exzitationslicht-Erzeugungsvorrichtung, die sich in dem Erkennungsmodul befindet; und eine Emissionslicht-Erkennungsvorrichtung, die sich in dem Erkennungsmodul befindet; wobei, wenn die Trägerstruktur an dem Thermocycler befestigt und das Erkennungsmodul an der Trägerstruktur angebracht ist, das Erkennungsmodul so bewegbar ist, dass es in optische Verbindung mit verschiedenen der Vielzahl von Vertiefungen gebracht wird.
2. Fluoreszenz-Erkennungsvorrichtung nach Anspruch 1, wobei das Erkennungsmodul eine Vielzahl von Exzitationslicht-Erzeugungsvorrichtungen und eine Vielzahl von Emissionslicht-Erkennungsvorrichtungen aufweist, die so angeordnet sind, dass sie eine Vielzahl von Exzitations-/Erkennungspaaren bilden.
3. Fluoreszenz-Erkennungsvorrichtung nach Anspruch 2, wobei jede Emissionslicht-Erkennungsvorrichtung so konfiguriert ist, dass sie unterschiedliche Wellenlängenbereiche erkennt.
4. Fluoreszenz-Erkennungsvorrichtung nach Anspruch 2, wobei jede Exzitationslicht-Erzeugungsvorrichtung so konfiguriert ist, dass sie Licht unterschiedlicher Wellenlängenbereiche erzeugt.
5. Fluoreszenz-Erkennungsvorrichtung nach Anspruch 2, wobei die Vielzahl von Exzitations-/Erkennungspaaren so angeordnet ist, dass jedes Exzitations-/Erkennungspaar gleichzeitig mit unterschiedlichen der Vielzahl von Vertiefungen in optischen Kontakt bringbar sind.
6. Fluoreszenz-Erkennungsvorrichtung nach Anspruch 2, wobei die Vielzahl von Exzitations-/Erkennungspaaren so angeordnet sind, dass, wenn ein erstes Exzitations-/Erkennungspaar in optischen Kontakt mit einem der Vielzahl von Vertiefungen gebracht wird, ein anderes Exzitations-/Erkennungspaar nicht in optischem Kontakt mit einem der Vielzahl von Vertiefungen steht.
7. Fluoreszenz-Erkennungsvorrichtung nach Anspruch 1, wobei das Erkennungsmodul abnehmbar an der Trägerstruktur angebracht ist, wodurch es dem Benutzer ermöglicht wird, das Erkennungsmodul durch ein anderes Erkennungsmodul zu ersetzen.
8. Fluoreszenz-Erkennungsvorrichtung nach Anspruch 1, die des Weiteren aufweist: ein Kalibrierungselement, das so angeordnet ist, dass das Erkennungsmodul so bewegbar ist, dass es mit dem Kalibrierungselement in optische Verbindung bringbar ist, wobei das Kalibrierungselement eine bekannte Fluoreszenzantwort bereitstellt.
9. Fluoreszenz-Erkennungsvorrichtung nach Anspruch 8, wobei sich das Kalibrierungselement zwischen zwei oder mehreren der Vielzahl von Vertiefungen befindet.
10. Fluoreszenz-Erkennungsvorrichtung nach Anspruch 1, wobei das Positionieren des Erkennungsmoduls in Bezug auf die Vertiefungen von einem externen Rechner gesteuert wird.
11. Fluoreszenz-Erkennungsvorrichtung nach Anspruch 8, wobei sich das Kalibrierungselement in einem Bereich an der Peripherie der Vielzahl von Vertiefungen befindet.
12. Fluoreszenz-Erkennungsvorrichtung nach Anspruch 1, wobei der Betrieb der Exzitationslicht-Erzeugungsvorrichtung und der Emissionslicht-Erkennungsvorrichtung von einem externen Rechner gesteuert wird.
13. Verfahren zum Erkennen der Anwesenheit eines Target-Moleküls in einer Lösung, wobei das Verfahren umfasst: Vorbereiten einer Vielzahl von Proben, die jeweils eine fluoreszierende Sonde enthalten, die an ein Target-Molekül bindbar ist; Platzieren jeder Probe in einem entsprechenden der Vielzahl von Proben-Vertiefungen eines Thermocyclers, wobei der Thermocycler ein Erkennungsmodul

aufweist, das bewegbar darin angebracht ist, wobei das Erkennungsmodul einen Exzitations-/Erkennungskanal aufweist, wobei der Exzitations-/Erkennungskanal eine Exzitationslicht-Erzeugungsvorrichtung aufweist, die sich in dem Erkennungsmodul befindet, und eine Emissionslicht-Erkennungsvorrichtung, die sich in dem Erkennungsmodul befindet; Stimulieren einer Reaktion unter Verwendung des Thermocyclers; und Abtasten der Vielzahl von Proben-Vertiefungen, um eine Fluoreszenzantwort zu erkennen, indem das Erkennungsmodul bewegt und der Exzitations-/Erkennungskanal aktiviert wird, wobei während des Schritts des Abtastens das Erkennungsmodul so bewegt wird, dass der Exzitations-/Erkennungskanal nacheinander mit jeder der Vielzahl von Proben-Vertiefungen in optische Verbindung gebracht wird.

des Schritts des Abtastens das Erkennungsmodul im Wesentlichen ständig in Bewegung ist.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei das Target-Molekül eine Nukleinsäuresequenz ist.

15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei die Reaktion eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist.

16. Verfahren nach Anspruch 13, wobei der Schritt des Abtastens umfasst:
Positionieren des Erkennungsmoduls so, dass der Exzitations-/Erkennungskanal mit einer der Proben-Vertiefungen in optischer Verbindung steht;
kurzes Aktivieren der Exzitationslicht-Erzeugungsvorrichtung des Exzitations-/Erkennungskanals;
Erkennen einer Fluoreszenzantwort unter Verwendung der Emissionslicht-Erkennungsvorrichtung des Exzitations-/Erkennungskanals; und
Neupositionieren des Erkennungsmoduls, so dass der Exzitations-/Erkennungskanal mit einer anderen Proben-Vertiefung in optischer Verbindung steht.

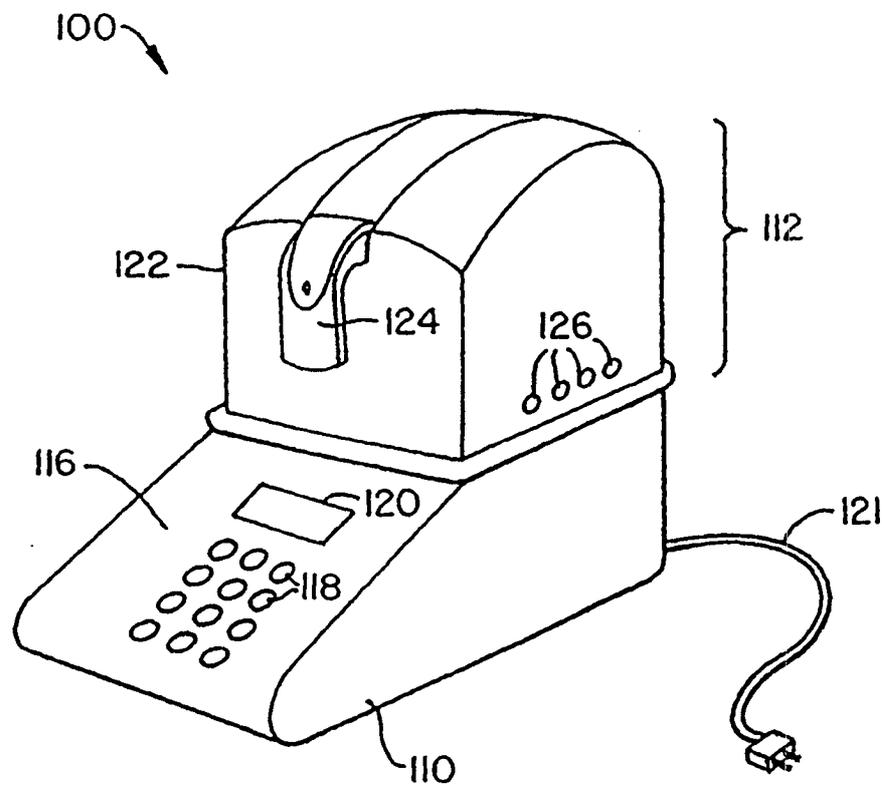
17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei das Erkennungsmodul wenigstens zwei Exzitations-/Erkennungskanäle aufweist.

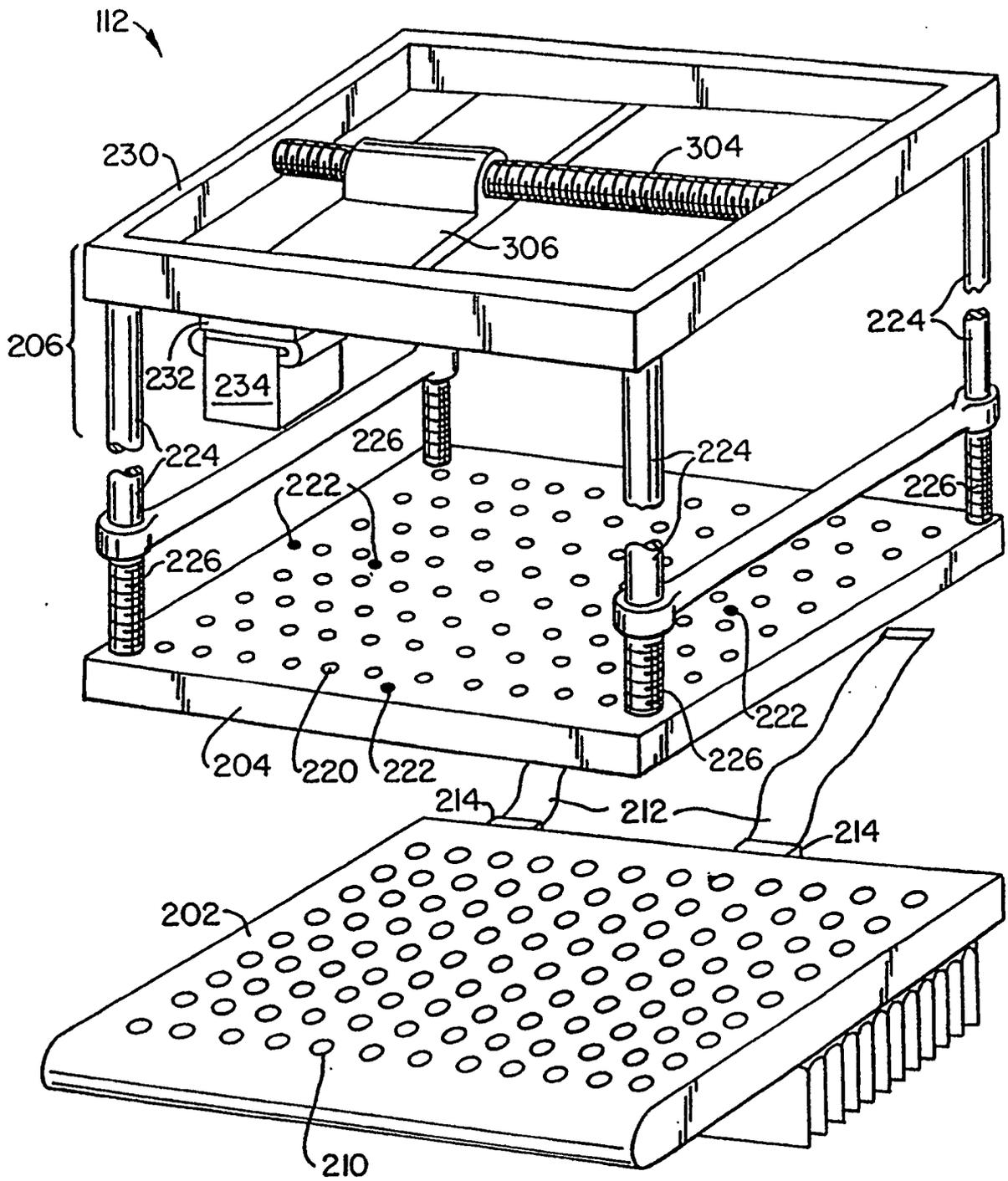
18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei, wenn das Erkennungsmodul so positioniert wird, dass ein erster seiner Exzitations-/Erkennungskanäle mit einer der Proben-Vertiefungen in optischer Verbindung steht, ein zweiter seiner Exzitations-/Erkennungskanäle mit einer anderen Proben-Vertiefung in optischer Verbindung steht.

19. Verfahren nach Anspruch 17, wobei, wenn das Erkennungsmodul so positioniert wird, dass ein erster seiner Exzitations-/Erkennungskanäle mit einer der Proben-Vertiefungen in optischer Verbindung steht, ein zweiter seiner Exzitations-/Erkennungskanäle nicht mit einer Proben-Vertiefung in optischer Verbindung steht.

20. Verfahren nach Anspruch 16, wobei während

Anhängende Zeichnungen





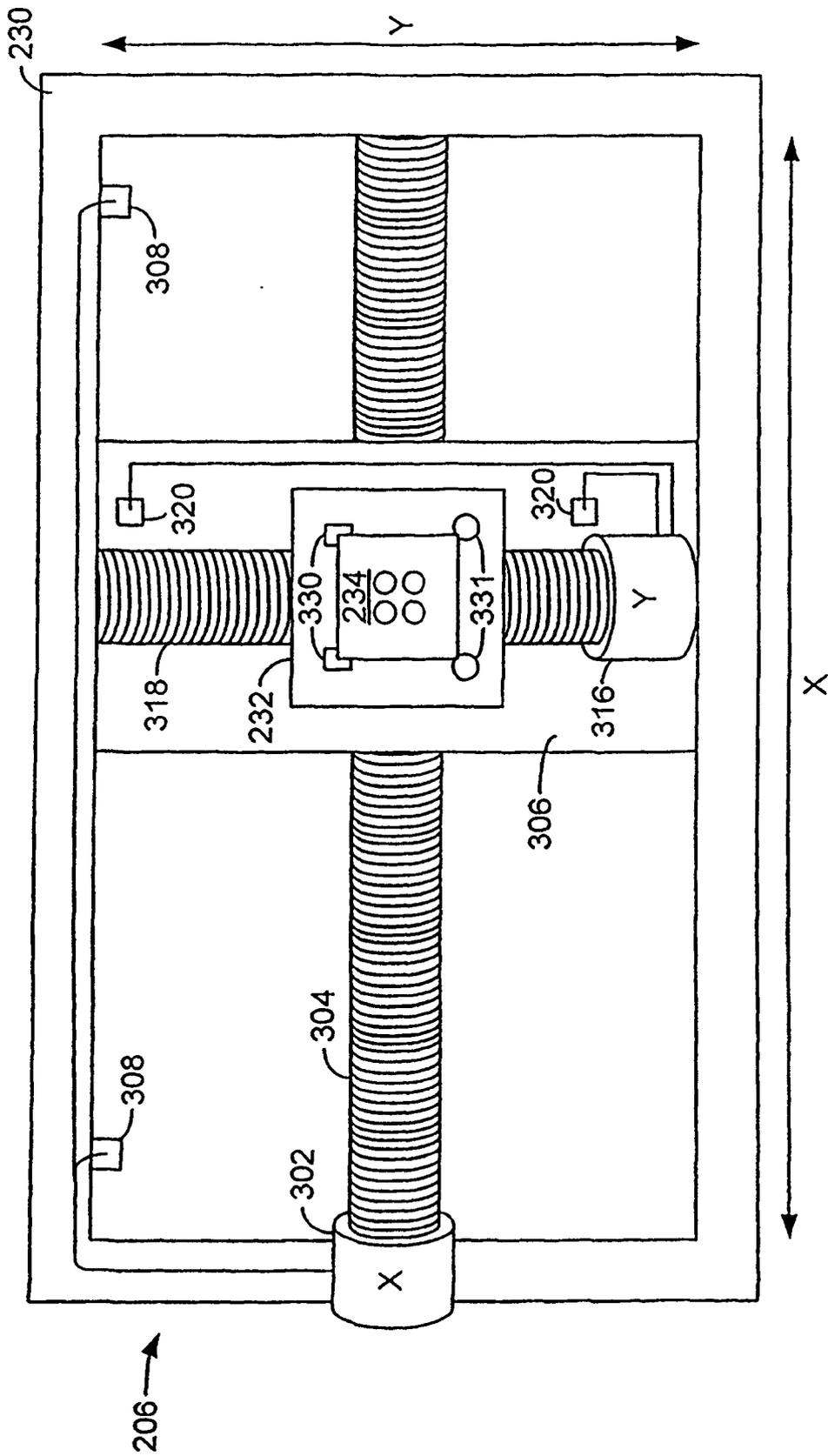


FIG. 3

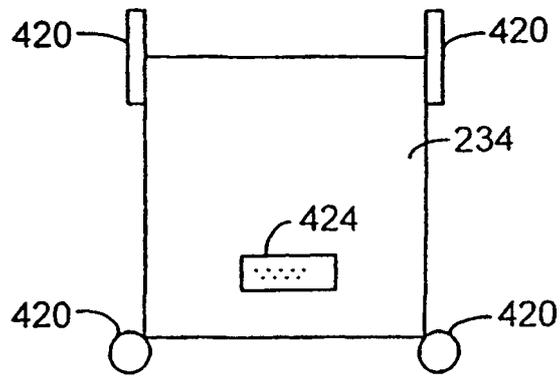


FIG. 4

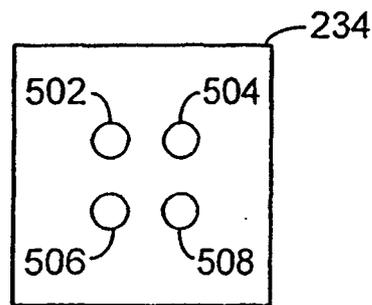


FIG. 5A

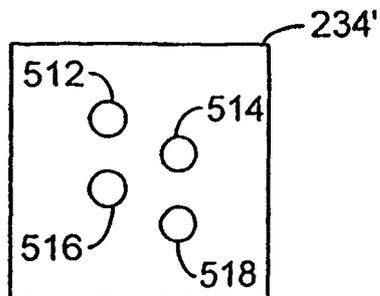


FIG. 5B

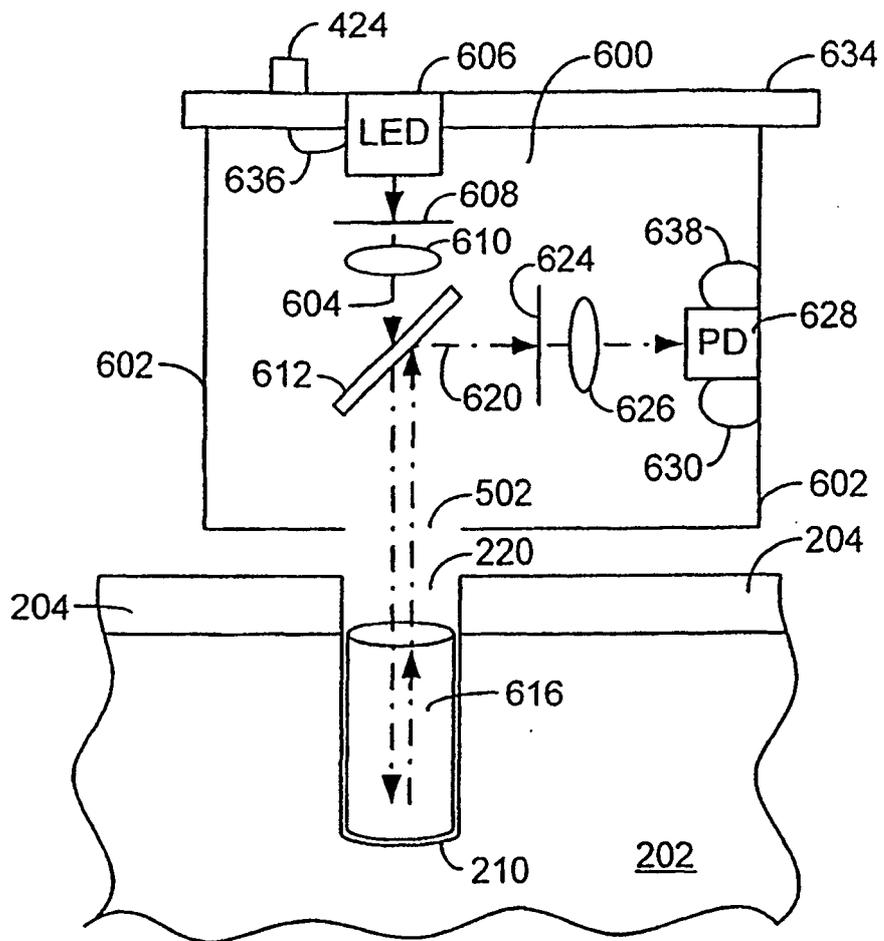


FIG. 6

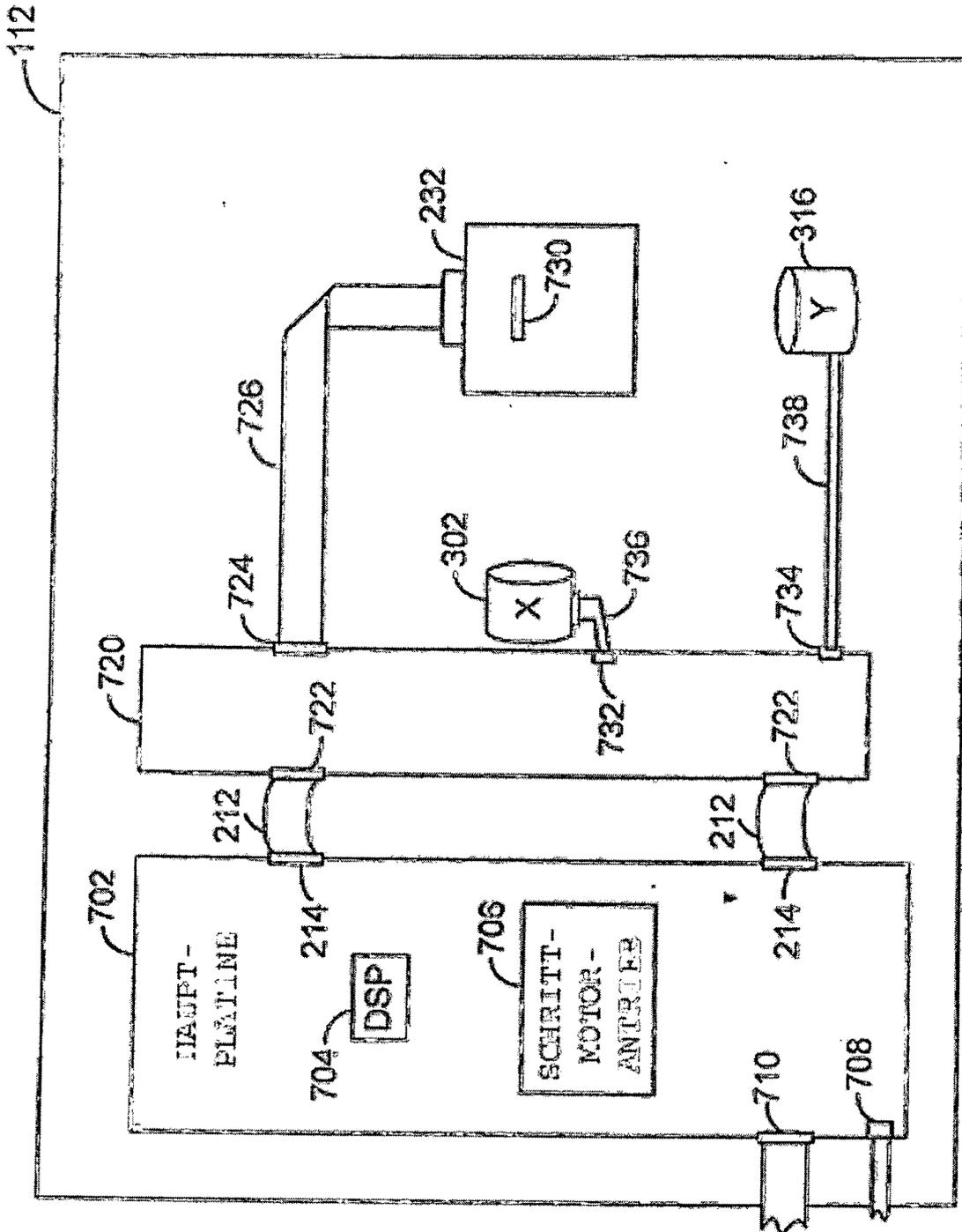


FIG. 7

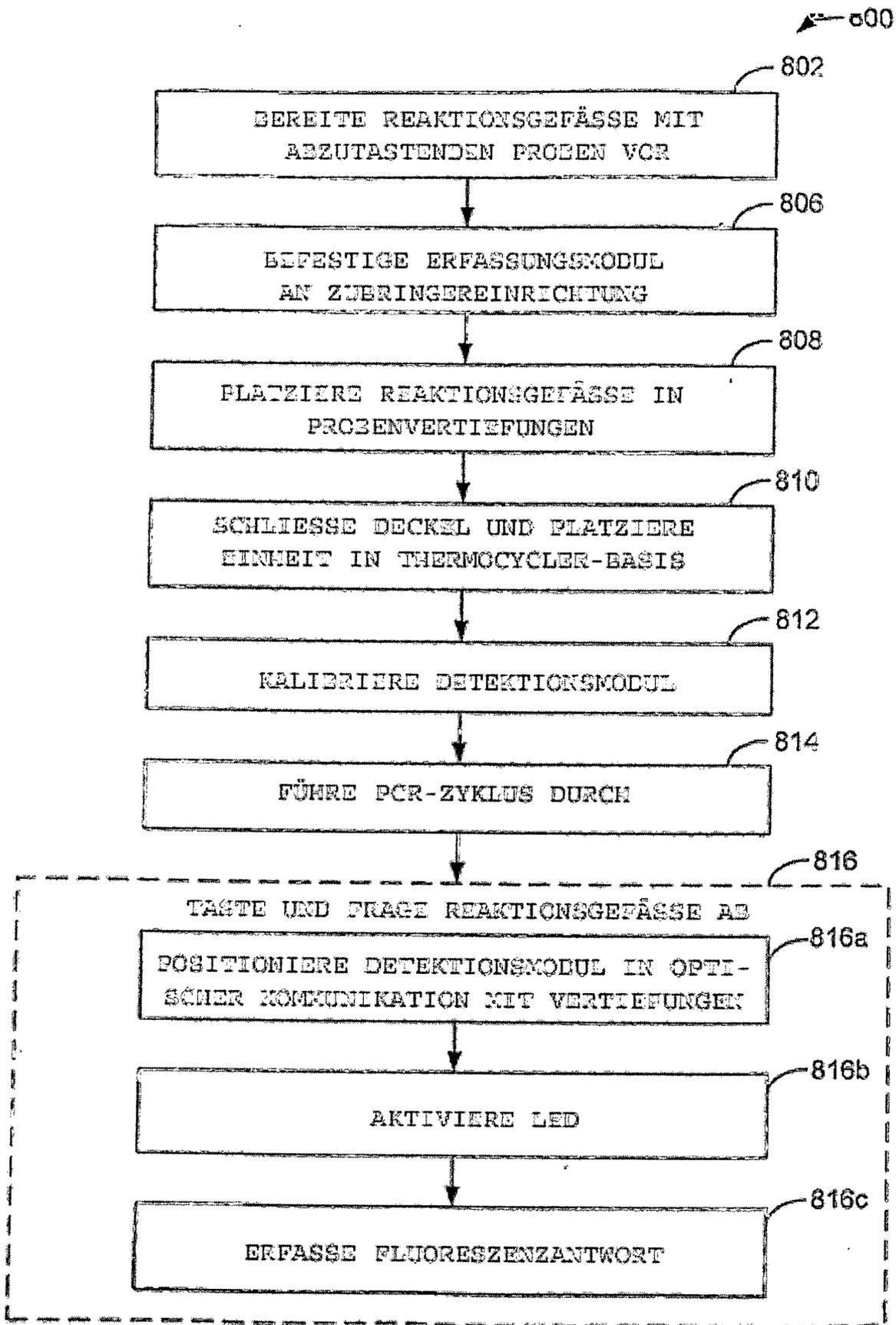


FIG. 8