



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 38 296 T2** 2009.03.19

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 070 142 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 38 296.3**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US99/04246**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 909 649.8**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1999/045148**
(86) PCT-Anmeldetag: **25.02.1999**
(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **10.09.1999**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **24.01.2001**
(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **05.03.2008**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **19.03.2009**

(51) Int Cl.⁸: **C12Q 1/68** (2006.01)
C12P 19/34 (2006.01)
B01D 15/08 (2006.01)
G01N 30/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
36767 **06.03.1998** **US**

(73) Patentinhaber:
**GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway,
N.J., US**

(74) Vertreter:
**Hammonds LLP Rechtsanwälte Patentanwälte,
80539 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:
MANSFIELD, Elaine S., Sunnyvale, CA 94086, US;
ZHAO, Lian-She, San Diego, CA 92123, US;
VAINER, Marina, Fremont, CA 94539, US;
KAUTZER, Curtis R., San Jose, CA 95124, US

(54) Bezeichnung: **METHODE ZUR VERWENDUNG EINER QUALITÄTSMASSZAHL ZUR FESTSTELLUNG DER QUALITÄT VON BIOCHEMISCHEN AUFTRENNUNGEN**

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

TECHNISCHES GEBIET

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich im Allgemeinen auf eine Methode für biochemische Trennungen und im Besonderen auf die Verwendung von Qualitätsmaßzahlen, um die Qualität der Trennung von DNA-Fragmenten zu beurteilen.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Biochemische Trennungen spielen eine wichtige Rolle bei der analytischen Untersuchung zahlloser komplexer Proben aus Biologie, Umwelt und Industrie. Trennungsverfahren enthüllen die Bestandteilkomponenten in einer Probe und werfen so etwas Licht auf unser Verständnis von der Natur und der Reinheit der Dinge. Bei Trennungsmethoden handelt es sich schlichtweg um Werkzeuge, durch welche wir die Menge an Informationen vergrößern, die über komplexe Gemische verfügbar sind, und durch welche wir die Qualität dieser Informationen verbessern. Die komplexesten Gemische, vor allem jene biochemischen Ursprungs, enthalten ähnliche zugrundeliegende Strukturen und gemeinsame funktionelle Gruppen. Folglich ist es schwer, wenn nicht unmöglich, die Bestandteile zu identifizieren oder zu quantifizieren, solange sie im Gemisch verbleiben. Durch das Trennen der Bestandteile aus einem Gemisch kann deren Identifikation erfolgen, z. B. durch Detektieren einer physikalischen Eigenschaft, etwa Lichtabsorptionsvermögen, Größe, Massenmarkierung, Vorhandensein einer Farbmarkierung, etc..

[0003] Biochemische Trennungsverfahren kommen in einer Vielzahl von Biowissenschaften und verwandten Industrien zum Einsatz, einschließlich: Nährwertanalyse von Lebensmitteln bezüglich Protein-, Fettsäure- und Kohlenhydratgehalt; Analyse von Lebensmitteln bezüglich Toxinen, z. B. bakterielle Kontamination oder Schalentiergifte; Proteinanalyse, einschließlich Gelelektrophorese und Proteinreinigung; Trennung von Kohlenhydraten, Trennung von Oligonukleotiden und einzelnen Molekülen, z. B. Nukleotiden, Aminosäuren, Zuckern und biogenen Aminen; Trennung und Analyse von Pestiziden und anderen synthetischen organischen Molekülen; Analyse von Heil- und Arzneimitteln; klinische Profilerstellung, z. B. Serumproteinanalyse; forensische Analyse und Analyse von Sprengstoffen; Serumanalyse bezüglich organischen Säuren, Zyanid, verwandten Verbindungen sowie Verbindungen zur chemischen Kriegsführung; Harnuntersuchung auf Metaboliten von Arzneimitteln; Analyse von Neurotransmittern, wie z. B. Katecholamine und Epinephrin; Trennung und Analyse von Lipoproteinen, Trennung und Analyse von Vitaminen; Herstellung oder Reinigung monoklonaler Antikörper; und Protein-Digest-Sequencing oder -Strukturanalyse. Selbstverständlich ist diese Liste nicht erschöpfend und dazu gedacht, die große Anzahl von Anwendungsmöglichkeiten und diverse Nutzen von Trennungsmethodologien aufzuzeigen.

[0004] Die manuelle Überprüfung der aus einem Trennungsverfahren hervorgehenden Trennungsdaten stellt einen arbeitsintensiven und zeitraubenden Aufwand dar. Sie erweist sich aufgrund der eintönigen Wiederholung des Prozesses als fehlerträchtig und unterliegt inkonsistenten Ergebnissen bedingt durch ihre Abhängigkeit von der subjektiven menschlichen Interpretation der Daten. Dies gilt gemeinhin für alle Trennungsdaten, und zwar ungeachtet der Quelle der Daten, also ungeachtet dessen, ob die Daten aus einer elektrophoretischen Trennung oder einem chromatographischen Prozess stammen, sowie ungeachtet der Art der biochemischen Analyten, die untersucht werden.

[0005] Eine der gängigsten Anwendungen biochemischer Trennung besteht in der DNA-Analyse, und eine der größten Unternehmungen in diesem Bereich stellt die Humangenominitiative dar. Projekte zur genetischen Analyse können die Bestimmung, Analyse und Durchsicht von Tausenden, ja sogar Millionen von DNA-Genotypen erfordern. Beispielsweise sind Schätzungen zufolge bis zu einer Million Genotypen erforderlich, um mehrere Gene betreffende Erkrankungen, wie z. B. Diabetes oder Herzleiden, zu kartieren.

[0006] Die Genkartierung spielt eine wesentliche Rolle im Prozess der Genentdeckung. Ausgerüstet mit neuen genetischen Markern und Karten, sind Forscher dazu bereit, mit rasender Geschwindigkeit neue Gene zu lokalisieren. Jene genetischen Marker, deren Einsatz in der Genkopplungsanalyse am gängigsten ist, sind hochinformativ Mikrosatelliten-Polymorphismen. Gegenwärtig werden diese 2-, 3- und 4-Rasenpaar(bp)-Repeats mittels manueller Überprüfung und Scoring von Elektropherogrammprofilen genotypisiert, die auf Slab-Gel-Elektrophoresesystemen erzeugt werden. Beispielsweise offenbaren Mansfield, u. a. ein Verfahren zur automatischen Berechnung der Längen von DNA-Fragmenten auf Grundlage einer Initialuntersuchung der Trennungsdaten durch den Forscher (David C. Mansfield, u. a.: „Automation of Genetic Linkage Analysis Using Fluorescent Microsatellite Markers“, Genomics, Band 24, S. 225–233, 1994). Obgleich die endgültige Analyse

mittels Computer erfolgt, wird nach wie vor ein initialer Screening-Schritt vom Forscher vorgenommen.

[0007] Der Zweck dieses initialen Screenings besteht darin, aus der automatisierten Analyse Profile von Durchläufen zu eliminieren, die vom Benutzer als qualitativ nicht akzeptabel erachtet wurden. Ein schlechter Durchlauf kann von einer Vielzahl von Fehlerquellen herrühren. Beispielsweise würden sich aus Verunreinigungen in der Probe oder nicht detektierbaren DNA-Levels schlechte Trennungsdaten ergeben. Fällt die genetische Probe hingegen gut aus, können die Bedingungen des Trennungslaufs beeinträchtigt worden sein, etwa durch das Vorhandensein einer schlechten Trennungsmatrix oder eines nicht richtig kontrollierten elektrischen Feldes. Der Benutzer hat die Profile zu überprüfen und eine Beurteilung zu treffen, ob die Daten für die weitere Analyse verwendbar sind oder ob der Durchlauf wiederholt werden muss. Die Technik von Mansfield, u. a. stellt diesen Schritt nicht automatisch zur Verfügung und verlässt sich stattdessen darauf, dass der Forscher eine manuelle Durchsicht aller Daten vornimmt. Überdies ist es bei der Technik von Mansfield, u. a. sowie bei weiteren gemeinhin angewandten Methoden im Falle eines guten Trennungslaufs noch immer erforderlich, dass der Forscher bestimmte Informationen aus den Trennungsdaten herauszieht und diese Informationen in den Computer eingibt.

[0008] Eine Trennungsmethode, die einen mit-wandernden Standard (MW-Marker) nutzt, ist aus US 5580728 bekannt.

[0009] Es besteht Bedarf für eine Methode zur automatisierten Entscheidungsfällung während bestimmter Phasen in der Analyse einer biochemischen Probe. Insbesondere ist es wünschenswert, die Analyse der Trennungsdaten so zu automatisieren, dass eine Entscheidung hinsichtlich einer nachfolgenden Vorgehensweise im analytischen Prozess getroffen werden kann. Ferner ist es wünschenswert, die Qualität eines Trennungslaufs sicherzustellen, bevor der Übergang zum nächsten Schritt erfolgt.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0010] Ein Verfahren zum Durchführen eines Trennungs-Assays mit einer biochemischen Probe umfasst das Vornehmen eines Trennungslaufs mit der Probe, um Trennungsdaten zu erzeugen. Die Daten werden analysiert, um eine Qualitätsmaßzahl hervorzubringen, welche die Qualität des Trennungslaufs anzeigt. Daraufhin wird die Qualitätsmaßzahl zur Auswahl eines nachfolgenden Schritts im Assay benutzt, also zur Auswahl, ob im Assay der Übergang zu einem nächsten Schritt erfolgt oder ob eine Wiederholung des Trennungslaufs vorgenommen wird. Die Qualitätsmaßzahl beruht auf einer Messung der Auflösung der Probenpeaks in den Daten und auf dem Signal-zu-Rausch-Verhältnis der Daten. Des Weiteren liegt der Qualitätsmaßzahl eine Messung des Grads der Linearität der Referenzpeaks des mit-wandernden Größenbestimmungsstandards zugrunde. Die Leistung eines mit-wandernden Quantisierungs- oder Identifikationsstandards ließe sich ebenfalls in Trennungen verwenden.

[0011] In einem besonderen Beispiel für die Methode umfasst eine genetische Analyse das Auswählen und Amplifizieren einer DNA-Probe. Das amplifizierte Produkt wird zwecks Markierung maßgeblicher Zielsequenzen gelabelt. Ein elektrophoretischer Trennungslauf wird durchgeführt, der das Detektieren von Signalen einschließt, welche die Bestandteilekomponenten des amplifizierten Materials anzeigen. Die Sammlung von Signalen (Peaks), deren Stärke im Verlauf der Zeit variiert, stellt die Trennungsdaten dar. Diese Daten werden anschließend analysiert, um eine Qualitätsmaßzahl hervorzubringen, die repräsentativ für die Auflösungsleistung (Qualität) des Trennungslaufs ist.

[0012] Als nächstes wird die Qualitätsmaßzahl mit zwei Schwellenwerten verglichen, deren Festlegung erfolgt, um zwischen Trennungen mit hoher, marginaler oder niedriger Qualität zu unterscheiden. Ein erster Indikator wird hervorgebracht, falls die Qualitätsmaßzahl unter einen ersten Schwellenwert fällt, und in ähnlicher Weise wird ein zweiter Indikator hervorgebracht, falls die Qualitätsmaßzahl unter einen zweiten Schwellenwert fällt (zwecks Unterscheidung marginaler und schlechter Proben). Somit handelt es sich beim ersten und zweiten Indikator jeweils um FAIL- und REVIEW-Indikatoren. Im Fall der Erzeugung eines FAIL-Indikators wird ein erneuter Durchlauf mit der Probe ausgeführt, wohingegen eine manuelle Beurteilung der Trennungsdaten vorgenommen wird, wenn der REVIEW-Indikator erzeugt wird. Falls die Qualitätsmaßzahl den zweiten Schwellenwert übertrifft, setzt sich die genetische Analyse mit dem nächsten Schritt im Prozess fort, typischerweise einem Allele-Calling-Schritt.

KURZBESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0013] [Fig. 1](#) ist ein Ablaufdiagramm, das die Schritte für einen erfindungsgemäßen Trennungs-Assay erläu-

tert.

[0014] [Fig. 2](#) stellt ein Ablaufdiagramm der Schritte einer beispielhaften Anwendung der vorliegenden Erfindung dar.

[0015] [Fig. 3](#) zeigt jene Terme, welche die Qualitätsmaßzahl umfassen.

[0016] [Fig. 4](#) ist eine schematische Darstellung eines typischen Elektropherogramms, welche veranschaulicht, wie die Berechnung der Peakauflösung erfolgt.

[0017] [Fig. 5A–Fig. 5B](#) stellen die Berechnung des S/N-Verhältnisses dar.

[0018] [Fig. 6](#) zeigt ein Schaubild eines Größenbestimmungsstandards, das erläutert, in welcher Weise die Informationen beim Bestimmen des Linearitätsindex verwendet werden.

[0019] [Fig. 7A](#) und [Fig. 7B](#) stellen die Erfindung bei Anwendung auf die Praxis der Analyse von DNA-Fragmenttrennungen dar. Trennungen von hoher Qualität ([Fig. 7A](#)) erzielen hohe Q-Bewertungen, wohingegen Proben von schlechter Qualität auf Grundlage ihrer niedrigeren Bewertungen aussortiert werden ([Fig. 7B](#)).

BESTER WEG ZUR AUSFÜHRUNG DER ERFINDUNG

[0020] Zunächst mit Blick auf das in [Fig. 1](#) dargestellte Ablaufdiagramm **100** umfasst der Arbeitsablauf eines erfindungsgemäßen Trennungs-Assays die folgenden Schritte: Eine biochemische Probe wird gewonnen und vorbereitet, Schritt **102**. Als nächstes wird ein Trennungsverfahren an der Probe durchgeführt, Schritt **104**. Die sich daraus ergebenden Trennungsdaten werden analysiert, um eine Qualitätsmaßzahl zu erstellen, Schritt **106**. Daraufhin wird die Qualitätsmaßzahl verwendet, um zu bestimmen, ob die Trennung wiederholt wird (Schritt **101**), ob die Trennungsdaten visuell überprüft werden (Schritt **103**) oder ob mit dem nächsten Schritt in der Analyse der Probe fortgefahren wird, Schritt **108**. Falls sich eine visuelle Überprüfung der Daten als angebracht erweist, wird auf Grundlage des Ergebnisses der visuellen Überprüfung eine weitere Entscheidung gefällt, nämlich ob eine Wiederholung des Trennungsschritts erfolgt (Schritt **105**) oder ob zum nächsten Schritt im analytischen Prozess übergegangen wird, Schritt **108**.

[0021] Maßgeblich ist stets die Qualität des Trennungslaufs, weil die Zuverlässigkeit der nachfolgenden Schritte in der Analyse von der Qualität der Daten abhängt, die aus dem Trennungslauf gewonnen werden. Verfahren aus dem Stand der Technik erfordern ein Screening der Daten durch den Menschen, bevor diese einer Computeranalyse unterzogen werden. Die Entwicklung einer Qualitätsmaßzahl, deren Berechnung nachstehend im Einzelnen erläutert ist, verschafft ein standardisiertes Kriterium, durch das die Güte bzw. die Qualität des initialen Trennungslaufs beurteilt wird. Überdies erlaubt die Qualitätsmaßzahl den Einsatz einer computerbasierten Analyse für ein erstes Durchsehen der voluminösen Daten, die in bestimmten Anwendungen ohne Interaktion mit dem Menschen erzeugt werden können, womit der Prozess des Analysierens der Daten automatisiert wird; z. B. beinhaltet das Humangenomprojekt das Analysieren von Milliarden von Basenpaaren humaner DNA oder von Millionen von Genotypen, die zum Kartieren der Gensequenzen notwendig sind.

[0022] Wie ersichtlich, ist die Art der biochemischen Probe, die einer Analyse unterzogen wird, nicht erheblich, da die Erfindung die Anwendung einer Qualitätsmaßzahl zur Beurteilung der Qualität des Trennungslaufs und zur Steuerung des Arbeitsablaufs des analytischen Prozesses in den Mittelpunkt stellt. Beispielsweise lässt sich das analytische Verfahren der vorliegenden Erfindung für die folgenden Zwecke einsetzen: Analysieren von Lebensmitteln bezüglich des Protein-, Fettsäure- und Kohlenhydratgehalts; Auftrennen von Kohlenhydraten, Oligonukleotiden und individuellen Molekülen, z. B. von Nukleotiden, Aminosäuren, Zuckern und biogenen Aminen; Auftrennen und Analysieren von Pestiziden und anderen synthetischen organischen Molekülen; Analysieren von Heil- und Arzneimitteln; Analysieren von forensischen Verbindungen und Sprengstoffverbindungen; Analysieren von Serum bezüglich organischen Säuren, Cyanid und verwandten Verbindungen sowie von Verbindungen zur chemischen Kriegsführung; Vornehmen von Urinalyse bezüglich der Metaboliten von Arzneistoffen; usw.. Die der Erfindung zugrundeliegenden Prinzipien gelten für alle Trennungsprozesse oder -Assays.

[0023] Die Trennungsdaten, die durch die verschiedenen bekannten Trennungstechniken produziert werden, ähneln sich bezüglich ihres Inhalts und lassen sich somit problemlos der Verarbeitung in Schritt **106** unterziehen. Beispielsweise ergeben sich aus kapillar-elektrophoretischen Trennungen Daten, welche detektierte Signale (etwa Emissionen fluoreszent gelabelter Analyte) als Funktion der Elutionszeit aufzeichnen. Der Zeitpunkt

des Auftretens jedes Peaks in den Daten steht in Bezug zur Masse des entsprechenden Analyts. Bei der Gel-Slab-Elektrophorese umfassen die Daten die Detektion von Analyten entlang einem Trennungsweg in einem Gel. Hierbei zeichnen die Daten detektierte Signale als Funktion der Entfernung von einem Anfangspunkt auf dem Gel entlang dem Trennungsweg auf. In diesem Fall bezieht sich die Entfernung eines Peakwerts vom Anfangspunkt auf die Größe der elektrischen Ladung auf dem entsprechenden Analyt. Die Trennung von Analyten erfolgt gemeinhin auf Grundlage irgendeiner ihrer physischen Eigenschaften, etwa der molekularen Masse oder der elektrischen Ladung. In ähnlicher Weise basieren die während der Trennung detektierten Signale auf irgendeiner physischen Eigenschaft der Analyte. Beispielsweise handelt es sich im Fall elektrophoretischer Trennungen bei der Detektionseigenschaft um Fluoreszenz, die den Analyten durch die Verwendung fluoreszenter Labels verliehen wird.

[0024] In Übereinstimmung mit der Erfindung bestehen die Entscheidungsschritte **101** und **103** im Erzeugen eines ersten und zweiten Indikators, die den Benutzer bei seiner Entscheidung über die richtige nachfolgende Verfahrensweise unterstützen. So wird in Schritt **101**, falls die Qualitätsmaßzahl in einen ersten Wertbereich fällt, ein FAIL-Indikator erzeugt, der den Benutzer darüber in Kenntnis setzt, dass ein bestimmter Durchlauf als qualitativ niedrig eingestuft worden ist. In einem solchen Fall ist es wahrscheinlich, dass sich der Benutzer für einen erneuten Trennungslauf entscheidet, wie die vom Entscheidungskästchen **101** ausgehende gestrichelte Linie anzeigt. In ähnlicher Weise wird in Schritt **103**, falls die Qualitätsmaßzahl in einen zweiten Wertbereich fällt, ein REVIEW-Indikator erzeugt, um dem Benutzer mitzuteilen, dass eine manuelle Durchsicht der Daten für den entsprechenden Durchlauf notwendig ist. Der Benutzer kann die Daten, die typischerweise in Form eines Schaubilds, etwa eines Elektropherogramms, vorliegen, visuell überprüfen und entscheiden, ob ein erneuter Durchlauf zweckmäßig ist. Schließlich wird für jene Durchläufe, deren Qualität als akzeptabel eingestuft wird, ein PASS-Indikator erzeugt, um den Benutzer darüber zu informieren, dass bei der Analyse der Übergang zum nächsten Schritt im Datenanalyseprozess erfolgen kann, Schritt **108**.

[0025] Nun wird ein spezifisches Beispiel für einen erfindungsgemäßen Trennungs-Assay angeführt, um den Kontext für eine Erläuterung der Qualitätsmaßzahl zu liefern. Allerdings ist zu beachten, dass sich die Umsetzung der Erfindung weder auf irgendeine bestimmte Trennungsmethode, noch auf irgendeine bestimmte Klasse zu analysierender Verbindungen beschränkt.

[0026] Mit Blick auf [Fig. 2](#) ist der Arbeitsablauf für die Genfragmentanalyse in Ablaufdiagramm **200** veranschaulicht. Dieses Verfahren findet Einsatz bei der Erstellung von Genkopplungskarten, die ein erster Schritt in Richtung des Endziels darstellt, das in der Identifizierung aller Gene der humanen DNA besteht.

[0027] Zuerst wird eine Probe von Polynukleotiden (z. B. DNA, cDNA und die verschiedenen Formen von RNA) gewonnen, Schritt **202**. Als nächstes werden mithilfe eines als Amplifikation bekannten Verfahrens Kopien von der Probe erstellt, Schritt **204**. Die Amplifikation des genetischen Materials lässt sich durch eine beliebige aus einer Anzahl von Techniken erzielen, einschließlich in-vivo-Cloning und Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Vorzugsweise kommt PCR zum Einsatz, weil sich mit diesem Verfahren innerhalb kurzer Zeit hohe Ausbeuten erzielen lassen. Daraufhin werden Zielsequenzen im amplifizierten Produkt gelabelt (Schritt **206**), indem fluoreszierend gelabelte Primer oder Substrate bereitgestellt werden, und es erfolgt die enzymatische Synthese von DNA unter Verwendung von PCR oder einem anderen Amplifikationsverfahren. Dann werden die daraus resultierenden gelabelten Amplifikationsprodukte in Übereinstimmung mit der Größe der Bestandteilkomponenten einem Assay unterzogen, Schritt **208**. Es sind bereits zahlreiche elektrophoretische Verfahren bekannt, einschließlich Slab-Gel-Elektrophorese, Kapillarelektrophorese und Kapillar-Array-Elektrophorese.

[0028] Jeder Trennungslauf mit der gelabelten Probe umfasst einen mit-wandernden Größenbestimmungsstandard mit DNA-Fragmenten (Marker) bekannter Größe. Ein eindeutiges Label wird benutzt, um die Fragmente im DNA-Größenbestimmungsstandard von den Komponenten der Amplifikationsprodukte zu unterscheiden. Eine gängige Technik besteht in der Verwendung unterschiedlicher fluoreszierender Tags, und zwar eines für den Größenbestimmungsstandard und eines für die Amplifikationsprodukte. Während das Material durch die Kapillaren oder das Stab-Gel wandert, wird eine Anregungsquelle verwendet, um bei den Tags Fluoreszenz hervorzurufen. Die daraus hervorgehenden Emissionen werden durch einen in der Nähe befindlichen Detektor aufgefangen, der ein Signal erzeugt, das die Intensität der detektierten Fluoreszenz repräsentiert, und die sich daraus ergebenden Messungen werden zusammen mit einer Zeitbasis gespeichert, um Trennungsdaten zur Verfügung zu stellen, welche die Intensität von Variationen als Funktion der Zeit darstellen.

[0029] Anhand der Trennungsdaten wird eine Qualitätsmaßzahl Q berechnet, Schritt **210**. Die Qualitätsmaßzahl zeigt die Qualität des Trennungslaufs an und verschafft dem Forscher eine quantitative Basis zum Auswählen der anschließenden Verfahrensweise. Wie aus [Fig. 2](#) hervorgeht, wird die Qualitätsmaßzahl Q mit zwei

Gruppen von Bereichen verglichen, Schritte **201** und **203**. In diesem Beispiel wird der Durchlauf mit einem FAIL-Indikator markiert, falls die errechnete Maßzahl für einen bestimmten Durchlauf in den Bereich von 0,0 bis 0,2 fällt, Schritt **212**. Falls hingegen die berechnete Maßzahl in den Bereich von 0,2 bis 0,5 fällt, wird der Durchlauf mit einem REVIEW-Indikator markiert, Schritt **214**. Und wenn die berechnete Maßzahl größer oder gleich 0,5 ist, geht das System zum nächsten Schritt im Prozess über.

[0030] Wie nachstehend dargestellt, handelt es sich bei der Qualitätsmaßzahl, um eine reelle Zahl zwischen 0,0 und 1,0. So sind die in den Schritten **201** und **203** verwendeten Bereiche durch zwei Schwellenwertgrenzen, nämlich 0,2 und 0,5, festgelegt. Ein Trennungslauf mit einer berechneten Qualitätsmaßzahl, welche unter dem ersten Schwellenwert von 0,2 liegt, zeigt an, dass die einem Assay unterzogene Probe in irgendeiner Weise beeinträchtigt worden ist, etwa durch die Einbringung von Kontaminanten, durch unsachgemäße Vorbereitung der Probe oder durch eine kontaminierte Trennungsmatrix. Für Proben, deren Durchläufe eine FAIL-Indikation aufweisen, ist die Durchführung eines erneuten Durchlaufs wahrscheinlich. Die gestrichelte Linie, die von Schritt **212** des Ablaufdiagramms **200** ausgeht, verweist darauf, dass möglicherweise eine neue Probe vorbereitet werden muss oder dass einfach mit der selben Probe ein erneuter Durchlauf erfolgen kann, wobei die Entscheidung darüber dem Forscher obliegt.

[0031] Eine Probe, deren Qualitätsmaßzahl zwar unter dem zweiten Schwellenwert von 0,5, aber nicht unter dem ersten Schwellenwert von 0,2 liegt, besitzt geringe Qualität. Allerdings zeigt die Maßzahl an, dass die Probe nichtsdestoweniger zumindest ein paar Loci enthalten kann, die sich in einem nachfolgenden Schritt des Prozesses genotypisieren lassen. Deshalb sind die Daten für derartige Durchläufe manuell vom Forscher zu evaluieren (Schritt **216**) zwecks Bestimmung (Schritt **205**), ob sich ein erneuter Durchlauf als zweckmäßig erweist oder ob die Daten im nächsten Verarbeitungsschritt verwendbar sind. Schließlich ruft eine Qualitätsmaßzahl, die über dem zweiten Schwellenwert liegt, einen PASS-Indikator hervor, was bedeutet, dass mit den Daten zum nächsten Schritt des Prozesses übergegangen werden kann. Bei dieser besonderen Anwendung der Erfindung werden die Daten automatisch zu einer Allele-Calling-Analyse weitergeleitet (Schritt **220**), in der die Allele anhand der Daten identifiziert werden. Eine Vielzahl von Allele-Calling-Algorithmen ist bekannt, von denen jeder in Verbindung mit der Erfindung anwendbar ist.

[0032] Die Schwellenwerte sind vom Benutzer festlegbar und können vom Forscher nach Wunsch modifiziert werden. Dies gibt dem Forscher die Möglichkeit, die Qualitätsstufe der Trennungsläufe maßgenau an jede gegebene experimentelle Situation anzupassen.

[0033] Die einem Trennungs-Assay zugrundeliegenden Schritte sind in [Fig. 1](#) umrissen und zeigen, dass die Verwendung einer Qualitätsmaßzahl problemlos in den Prozess eingegliedert wird. [Fig. 2](#) stellt eine typische Anwendung der Qualitätsmaßzahl in der Genanalyse dar. Die Erläuterungen wenden sich nun der Qualitätsmaßzahl an sich zu.

[0034] Mit Blick auf [Fig. 3](#) ist ersichtlich, dass die Qualitätsmaßzahl aus Termen besteht, die aus den Trennungsdaten abgeleitet sind. Zunächst wird ein Peakauflösungsterm, der ein Maß für die Gesamtauflösung der Probenpeaks darstellt, während des Trennungslaufs detektiert. Als nächstes wird ein Signal-zu-Rausch(S/N)-Verhältnis der detektierten Signale aus dem Trennungslauf gemessen. Bei Einbeziehung eines Größenbestimmungsstandards in den Durchlauf wird schließlich ein durch den Standard erzeugter Wanderungslinearitätsindex für Referenzpeaks berechnet. Daraufhin werden die Terme zwecks Erzeugung der Qualitätsmaßzahl Q kombiniert.

[0035] Zunächst wird der Peakauflösungsterm unter Bezugnahme auf [Fig. 4](#) behandelt, die eine schematische Darstellung eines Elektropherogramms ist, wobei Merkmale zwecks Erleichterung der Erläuterung überdeutlich abgebildet sind. Die vier Peaks A–D stellen Probenpeaks dar, die jeweils die Peakintensitäten I_2 , I_4 , I_1 und I_3 sowie die Detektionszeiten t_1 – t_4 aufweisen. Ferner zeigt [Fig. 4](#) die Bandbreiten W_1 – W_4 , gemessen bei der Hälfte der maximalen Intensitätsstufe jedes Peaks.

[0036] In Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung wird der Peakauflösungsterm durch Berechnen einer Auflösungsmaßzahl für jeden inneren Peak berechnet, d. h. für jene Peaks, bei denen es sich nicht um die Endpeaks (Peaks A und D) handelt. Die Auflösungsmaßzahl stellt in der vorliegenden Erfindung ein Maß dar, das die beiden Peaks berücksichtigt, die neben einem inneren Peak liegen. Im Vergleich dazu handelt es sich bei der Auflösung nach dem Stand der Technik um ein Maß für die Auflösung zwischen zwei Peaks. So umfasst die Auflösungsmaßzahl in Bezug auf jeden inneren Peak Daten aus dem Peak zu dessen Rechten und zu dessen Linken. Die allgemeine Gleichung lautet:

$$R = \frac{(t_n - t_{n-1})}{(w_n + w_{n-1})/2} + \frac{t_{n+1} - t_n}{(w_n + w_{n+1})/2} \quad (1)$$

[0037] Folglich lauten die zu den inneren Peaks B und C gehörenden Auflösungsmaßzahlen R_B und R_C wie folgt:

$$\begin{aligned} R_B &= \frac{t_2 - t_1}{(w_3 + w_1)/2} + \frac{t_3 - t_2}{(w_2 + w_3)/2} \\ R_{CV} &= \frac{t_3 - t_2}{(w_3 + w_2)/2} + \frac{t_4 - t_3}{(w_3 + w_4)/2} \end{aligned} \quad (2)$$

[0038] Was die Endpeaks A und D anbelangt, wird für die Auflösung die Standardberechnung eingesetzt:

$$R_A = \frac{t_2 - t_1}{(w_1 + w_2)/2}, \quad R_D = \frac{t_4 - t_3}{(w_4 + w_3)/2} \quad (3)$$

[0039] Schließlich wird der Peakauflösungsterm berechnet, indem der Durchschnitt der individuellen Auflösungsrechnungen ermittelt wird, also $(R_A + R_B + R_C + R_D)/4$.

[0040] Die nächste Komponente der Qualitätsmaßzahl, das Signal-zu-Rausch(S/N)-Verhältnis wird nun mit Blick auf [Fig. 5A](#) und [Fig. 5B](#) behandelt. Wie [Fig. 4](#) ist [Fig. 5A](#) eine schematische Darstellung eines Elektropherogramms, welche Merkmale der Daten eines Trennungslaufs mit einer Probe überdeutlich zeigt. Diese Berechnung beinhaltet zwei Teile: das Berechnen des „Rauschpegels“ in den Trennungsdaten für die Probe und das Berechnen des „Signalpegels“ der Daten. Zuerst wird die Berechnung des Rauschpegels erläutert. Die Trennungsdaten werden zunächst mithilfe eines Hochpassfilteralgorithmus digital vorbearbeitet, um die Basislinie abzuflachen (Entfernung der Tieffrequenzvariation aus dem Signal).

[0041] Dann wird mittels eines Tiefpassfilteralgorithmus die Rauschamplitude (der Rauschpegel) ermittelt. Im Allgemeinen beinhaltet dies das Beobachten der perzentilen Verteilung der Signalamplituden in den Trennungsdaten. Eine graphische Darstellung des perzentilen Rangs jedes Peaks in Bezug auf die Anzahl derartiger Peaks in jedem perzentilen Rang wird erstellt. Die sich daraus ergebende Kurve zeigt eine drastische Veränderung zwischen einem linearen Bereich mit Signalen geringer Intensität (d. h. dem Rauschen) und einem schmalen Bereich mit Signalen hoher Intensität (d. h. den gewünschten Signalen). Eine Linie, die eine Tangente zum linearen Bereich des Rauschens darstellt, wird so verlängert, dass sie die perzentile Skala schneidet. Die Amplitude, die zum perzentilen Rang am Schnittpunkt gehört, stellt die Amplitude des beobachteten Rauschens in den Trennungsdaten dar, die beim Berechnen der Qualitätsmaßzahl verwendet wird.

[0042] Insbesondere wird unter Bezugnahme auf [Fig. 5A](#) anhand der Daten der maximale Peakwert bestimmt, nämlich der Peak A2 mit der Intensität I_{\max} . Dann wird die Intensitätsskala in den Daten von null bis I_{\max} in N Intervalle aufgeteilt. Für jedes Intervall i beträgt die obere Grenze $I_{\max} * (N - i + 1)/N$ und die untere Grenze $I_{\max} * (N - i)/N$. Obgleich N im Beispiel aus [Fig. 5A](#) gleich 7 ist, bewegt sich N typischerweise in einer Größenordnung von 100 oder dergleichen und kann vom Benutzer im Allgemeinen spezifiziert und im Anschluss daran modifiziert werden.

[0043] Mit Blick auf [Fig. 5B](#) wird die Zahl der Peaks in jedem Intervall als Funktion der Intervallzahl bestimmt. So schließt Intervall Nr. 1 den Intensitätsbereich von I_{\max} bis $I_{\max} * (N - 1)/N$ ein und enthält zwei Peaks, nämlich A1 und A2. Intervall Nr. 2, das den Intensitätsbereich von $I_{\max} * (N - 1)/N$ bis $I_{\max} * (N - 2)/N$ einschließt, enthält ebenfalls zwei Peaks, nämlich B1 und B2. Intervall Nr. 3 umfasst einen Peak (C), Intervall Nr. 4 umfasst vier Peaks (D1–D4), usw..

[0044] Eine graphische Darstellung der Peakzählung in Bezug auf die Intervallzahl, wie die in [Fig. 5B](#) abgebildete, veranschaulicht, dass ein plötzlicher Anstieg der Zahl gezählter Peaks in einem gewissen Intervall K auftritt. Dieses stellt einen Bereich in den Trennungsdaten dar, in dem die Peaks vorrangig das Ergebnis von Rauschen sind. Der Cut-off K repräsentiert den Wendepunkt der graphischen Darstellung von Peakzahlen in Bezug auf das Intervall. Er ist die maximale erste Ableitung der Kurve.

[0045] Nach Bestimmung des Intervalls K wird der Rauschpegel folgendermaßen berechnet:

$$\text{Rauschpegel} = \frac{I_{\max}}{N} * K \quad (4)$$

[0046] Als nächstes wird die Anzahl der Peaks in den Intervallen 1 bis K ermittelt und mit einem Peakschwellenwert M verglichen, womit gilt:

$$\sum_{i=1}^K P_i < M, \quad (5)$$

wobei P_i für die Anzahl der Peaks im Intervall i steht.

[0047] Der Peakschwellenwert M repräsentiert das minimale Signal, das einem Peak (Signal) und nicht einer hohen Rauschamplitude zuteilbar ist. Der Peakschwellenwert wird vom Benutzer ausgewählt und lässt sich in Abhängigkeit von den Anforderungen des Benutzers modifizieren.

[0048] Falls die Gesamtzahl der Peaks, die in den Intervallen 1 bis K auftreten, unter dem Peakschwellenwert M liegt, wird der Prozess für die Intervalle K bis N wiederholt. Dies läuft darauf hinaus, dass die Daten im Bereich von $I_{\max}^*(N - K + 1)/N$ bis null in N Intervalle aufgeteilt werden. Jedes Intervall in dieser Iteration ist jeweils durch einen oberen und einen unteren Wert $I_{\max}^*(N - K + 1)/N$ und $I_{\max}^*(N - k)/N$ begrenzt; wobei I_{\max} gleich der oberen Grenze des Intervalls K ist, nämlich $I_{\max}^*(N - K + 1)/N$.

[0049] Eine weitere Bestimmung des Peakzählwerts in Bezug auf die Intervallzahl wird vorgenommen, und ein neues Intervall K' wird in Übereinstimmung mit den obigen Kriterien für die Auswahl von K ausgesucht. Der Rauschpegel wird erneut berechnet als:

$$\text{Rauschpegel} = \frac{I'_{\max}}{N} * K' \quad (6)$$

[0050] Der Peakschwellenwert M wird mit dem Peakzählwert zwischen Intervall 1 und dem neuen Intervall K' ein weiteres Mal verglichen. Falls das Verhältnis aus Gleichung 5 noch immer gilt, wird der Prozess des Subdividierens noch einmal wiederholt und fortgesetzt, bis das Verhältnis aus Gleichung 5 nicht länger gilt, wobei ein „Rauschpegel“-Term erreicht wird, der bei der S/N-Berechnung zur Anwendung kommt.

[0051] Der zweite Term, der beim Berechnen des S/N-Verhältnisses eingesetzt wird, ist der „Signalpegel“. Der Signalpegel ist definiert als die durchschnittliche Peakhöhe jener Peaks in den Trennungsdaten, die größer sind als (F·Rauschpegel), wobei F einen Rauschschwellenwert darstellt.

[0052] F ist ein vom Benutzer wählbarer Schwellenwert, um Peaks aus dem Rauschen zu trennen, wobei $F > 2$ gilt. Dieser Cut-off-Schwellenwert muss 2 überschreiten, weil bei der Peakanalyse die Detektionsgrenze gemeinhin als Peaks mit $S/N > 2$ definiert ist.

[0053] Schließlich erfolgt die Berechnung des durchschnittlichen beobachteten Peaksignals mittels:

$$S/N = \left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n H_i \right) / \text{Rauschpegel}, \quad (7)$$

wobei

H_i für die Peakhöhe der Peaks steht, verwendet im Signalpegel-Term, und n für die Anzahl derartiger Peaks steht.

[0054] Die dritte Komponente der Qualitätsmaßzahl besteht im Linearitätsindex eines Größenbestimmungsstandards. Der Größenbestimmungsstandard liefert eine Grundlage für das Wandeln von Peakdetektionszeiten der Probenpeaks zu einem entsprechenden Größenmaß, etwa der Anzahl an Basenpaaren oder das molekulare Gewicht. Beispielsweise kann bei einer elektrophoretischen Trennung von Polynukleotiden ein Größenbestimmungsstandard Marker-Peaks umfassen, welche Nukleotidketten mit einer Länge von 100 Basenpaaren, 200 Basenpaaren und 400 Basenpaaren aufweisen. Die Elutionszeiten dieser Marker können sich jeweils auf 10 Minuten, 20 Minuten und 40 Minuten belaufen. Die Länge einer mit-wandernden Probe, die einen Peak bei 30 Minuten aufweist, würde auf 300 Basenpaare geschätzt durch Interpolieren zwischen flankierenden Markern beim 20-Minuten- und 40-Minuten-Peak des Größenbestimmungsstandards. Die Präzision der

Interpolation hängt ab von der Linearität oder der Annäherung an eine Kurve dritter Ordnung des Größe/Zeit-Verhältnisses des Größenbestimmungsstandards; nicht alle Trennungen sind linear, und diese können durch Kurven zweiter, dritter oder höherer Ordnung präziser beschrieben werden. Deshalb dient der Linearitätsindex des Größenbestimmungsstandards als Maß für den Grad der Linearität oder die Präzision der Annäherung an eine Kurve dritter Ordnung des Größe/Zeit-Verhältnisses und wird in folgender Weise erreicht: Zunächst werden die Größen der Bestandteilmarker im Größenbestimmungsstandard und deren entsprechende Elutionszeiten gewonnen. Der erste Peak in den Daten für den Standard entspricht der Detektion des kleinsten Markers, da dieser zuerst eluiert. Die Größe (d. h. die Anzahl der Basenpaare) für den kleinsten Marker entspricht wiederum dem Zeitpunkt, zu dem der erste Peak auftritt. Gleichermaßen erscheint der nächst größere Marker im Standard zu einem Zeitpunkt, der dem Zeitpunkt des Auftretens des zweiten Peaks entspricht, usw.. Ein Schaubild dieses Verhältnisses ist in [Fig. 6](#) dargestellt, wo die Basenpaarlänge (BP_i) als Funktion der Elutionszeit (t_i) graphisch veranschaulicht ist. Im Genanalysebeispiel handelt es sich beim Standard um eine Sammlung von Nukleotidmarkerfragmenten, und die „Größe“ jedes Fragments wird in Bezug auf Basenpaare ausgedrückt. Für andere Trennungs-Assays kann sich die „Größe“ der Bestandteile in einem Standard auf irgendeine andere physikalische Eigenschaft der Bestandteile beziehen, z. B. auf das molekulare Gewicht.

[0055] Als nächstes werden, unter Verwendung einer Methode der kleinsten Quadrate, die Punkte aus den Daten durch ein Polynom dritter Ordnung näherungsweise bestimmt. Zwar ist eine Anwendung anderer Interpolationsverfahren möglich, aber es wurde beobachtet, dass eine Kurve dritter Ordnung die beste Leistung über den Gesamtbereich von Größen (d. h. Basenpaaren) im Größenbestimmungsstandard aufwies. Insbesondere wird ein Polynom dritter Ordnung $y(t_i)$ so ausgewählt, dass

$$\sum_{i=1}^N (y(t_i) - BP_i)^2 \quad (8)$$

minimiert wird.

[0056] Dann erfolgt die Berechnung des Linearitätsindexes wie folgt:

$$\text{Linearitätsindex} = 1 - \sqrt{1 - R^2} \quad (9)$$

wobei

$$R = 1 - \frac{\sum_{i=1}^N y(t_i)^2 - \sum_{i=1}^N BP_i^2}{\sqrt{\left(\sum_{i=1}^N y(t_i) - \sum_{i=1}^N BP_i\right)^2 - N \left(\sum_{i=1}^N y(t_i) - \sum_{i=1}^N BP_i\right)^2}}$$

und

N für die Anzahl an Bestandteilen in dem Standard steht.

[0057] Schließlich wird die Berechnung der Qualitätsmaßzahl Q folgendermaßen vorgenommen:

$$Q = \frac{(a * \text{Linearitätsindex}) + (b * S/N) + (c * \text{Peakauflösung})}{a + b' + c}, \quad (10)$$

wobei

a im Bereich von 2 bis 10 liegt,

b im Bereich von 0,1 bis 1,0 liegt,

c im Bereich von 0,5 bis 2,0 liegt, und

$$b' = \begin{cases} b * S/N & \text{if } S/N > 40 \\ b * 40 & \text{andernfalls} \end{cases}$$

(11)

[0058] Die Skalierungskonstanten a, b und c sind durch den Benutzer wählbar, wobei sich die Defaultwerte für Kapillartrennungen auf a = 5, b = 0,2 und c = 1,0 belaufen. Der Bereich und die Defaultwerte lassen sich

an andere Trennungsarten anpassen, und zwar in Abhängigkeit davon, welche Signalintensität und welche Auflösung im Prozess beobachtet werden.

[0059] Während sich die obige Erläuterung auf kapillarelektrophoretische(CE)-Trennungen konzentriert, ist anzumerken, dass das Verfahren gleichermaßen auf andere Arten von Trennungs-Assays anwendbar ist. Beispielsweise produzieren Gelbildaten Daten, bei denen die Peakdetektion eher auf Entfernung als auf Zeit beruht. Allerdings werden Gelbildaten der gleichen Art von Analyse unterzogen wie Elektropherogramme, außer dass anstelle der Zeiteine Entfernungsmessung tritt. In chromatographischen Trennungen, wie den CE-Trennungen, passiert das Analyt einen ortsfesten Detektor, und die Messung der Signalintensität erfolgt in Bezug auf die Zeit.

[0060] Das Verfahren der Erfindung ist problemlos in der Praxis anwendbar, und zwar in Form eines Computersystems, in dem die Software läuft, welche die Schritte implementiert, die das Verfahren umfassen und in [Fig. 7A](#) und [Fig. 7B](#) veranschaulicht sind. In einem Durchlauf mit 96 Kapillaren wurde die gleiche Menge DNA getrennt. Die meisten Trennungen fielen qualitativ hochwertig aus, wie die vier Kapillaren mit der höchsten Q-Maßzahl zeigen ([Fig. 7A](#)). Trennungen mit schlechter Qualität resultierten in breiten, schwach ausgeprägten Peaks, wie die Kapillaren mit der niedrigsten Q-Maßzahl bezeugen ([Fig. 7B](#)). Die Implementierung der Software liegt gut innerhalb des Fähigkeitsbereichs eines durchschnittlichen Programmierers mit dem üblichen Fachwissen. Zusätzlich kann die Software in ein halbautomatisiertes System eingegliedert werden, welches Roboter manipuliert zur Vorbereitung der Proben und zur Durchführung der Trennungsläufe nutzt. Die PASS-, FAIL- und REVIEW-Indikatoren würden aus Signalen bestehen, die an Roboter-Steuerungseinrichtungen übertragen würden, um die Manipulatoren zu bedienen, damit sie verschiedene erfindungsgemäße Aufgaben ausführen. So könnte für Proben aus FAIL-Durchläufen automatisch ein erneuter Durchlauf vorgenommen werden, wohingegen für eine REVIEW identifizierte Probendurchläufe zwecks manueller Durchsicht an den Forscher gesendet würden.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Analysieren einer biochemischen Probe, umfassend:

Trennen der Probe in einem Trennungslauf (**104**) in ihre Bestandteilkomponenten, wodurch Trennungsdaten erzeugt werden, die eine Detektion eines Signals repräsentieren, das eine physikalische Eigenschaft anzeigt, die mit den Komponenten als eine Funktion entweder der Zeit oder der Entfernung entlang eines Trennweges verbunden ist, wobei die Trennungsdaten eine Mehrzahl von Probenpeaks aufweisen;

Trennen eines mit-wandernden Standards, der Bestandteile bekannter physikalischer Eigenschaften aufweist, wodurch Referenzpeaks in die Trenndaten eingeführt werden; gekennzeichnet durch die Schritte:

basierend auf den Trennungsdaten, Verarbeiten einer metrischen Eigenschaft, die die Qualität des Trennungslaufs anzeigt, einschließlich Verarbeiten eines Wertes, der die Auflösung der Probenpeaks in den Trennungsdaten (**106**) anzeigt, Verarbeiten eines Wertes, der ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis in den Trennungsdaten anzeigt, und Bestimmen eines Grades der Wanderungslinearität der Referenzpeaks; und basierend auf der metrischen Eigenschaft, entweder Fortfahren mit einem nächsten Schritt im Analysieren der Probe (**108**) oder Wiederholen des Trennungslaufs (**105**).

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die biochemische Probe eine Probe von Polynukleotiden ist, wobei das Verfahren weiter umfasst vor dem Ausführen des Trennungslaufs Erzeugen von Kopien der Probe von Nukleotiden, um Amplifikations-Produkte herzustellen, und Markieren einer Zielsequenz in den Amplifikations-Produkten.

3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die biochemische Probe genetisches Material darstellt, wobei das Verfahren weiter umfasst vor dem Ausführen des Trennungslaufs Amplifizieren und Markieren des genetischen Materials, um Amplifikations-Produkte herzustellen; wobei die Komponenten elektrophoretisch getrennt werden, und die Trennungsdaten Variationen in dem detektierten Signal gegen die Zeit repräsentieren, wobei die Trennungsdaten Peak-Werte umfassen, die Größen der Bestandteilkomponenten entsprechen; und wobei die metrische Qualität verarbeitet wird, ohne die Bestimmung eines Grades einer Wanderungslinearität der Referenzpeaks.

4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, weiter umfassend:

Vergleichen der metrischen Eigenschaft mit einem ersten Schwellenwert;

falls die metrische Eigenschaft geringer ist als der erste Schwellenwert, Herstellen eines ersten Indikators;

falls die metrische Qualität größer ist als der oder gleich ist dem ersten Schwellenwert, Vergleichen der metrischen Qualität mit einem zweiten Schwellenwert;

falls die metrische Qualität geringer ist als der zweite Schwellenwert, Herstellen eines zweiten Indikators; und falls die metrische Qualität grösser ist als der oder gleich ist dem zweiten Schwellenwert, Herstellen eines dritten Indikators.

5. Verfahren nach Anspruch 4, weiter umfassend das Wiederholen des Trennungslaufs, falls der erste Indikator hergestellt wird.

6. Verfahren nach Anspruch 5, weiter umfassend manuell Inspizieren der Trennungsdaten, falls der zweite Indikator hergestellt wird, und Wiederholen des Trennungslaufs, basierend auf Ergebnissen aus dem Schritt des manuellen Inspizierens der Trennungsdaten.

7. Verfahren nach Anspruch 6, weiter umfassend Fortfahren mit dem nächsten Schritt in der Analyse, falls der dritte Indikator hergestellt wird.

8. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die biochemische Probe ein biologisches Monomer ist, ausgewählt aus der Gruppe, die umfasst Aminosäuren, Nukleotide und Zucker, und biologische Polymere, einschließlich DNA, RNA, Peptide und Kohlenhydrate, wobei der Schritt des Trennens der Probe umfasst einen aus elektrophoretischer Trennung, Säulenchromatographie, Hochleistungs-flüssigkeitschromatographie und isoelektrisches Fokussieren.

9. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die Polynukleotid-Probe genetisches Material darstellt; wobei das Verfahren weiter umfasst Identifizieren von Allelen aus den Daten, wenn der dritte Indikator hergestellt wird.

10. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, wobei der Schritt des Trennens entweder elektrophoretische Kapillartrennung oder elektrophoretische Kapillar-Feld-Trennung ist, und wobei die Daten ein Elektropherogramm-Profil sind.

11. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, wobei der Schritt des Trennens elektrophoretische Slab-Gel-Trennung umfasst, und wobei die Daten aus einem Gelbild erhalten werden.

12. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, wobei der Schritt des Amplifizierens ein Schritt des Amplifizierens durch Polymerasekettenreaktion ist.

13. Verfahren nach Anspruch 3, wobei der nächste Schritt ein Schritt des Identifizierens von Allelen aus den Trennungsdaten ist.

14. Verfahren nach Anspruch 3, wobei, falls die metrische Eigenschaft in einen ersten Bereich von Werten fällt, der Trennungslauf wiederholt wird.

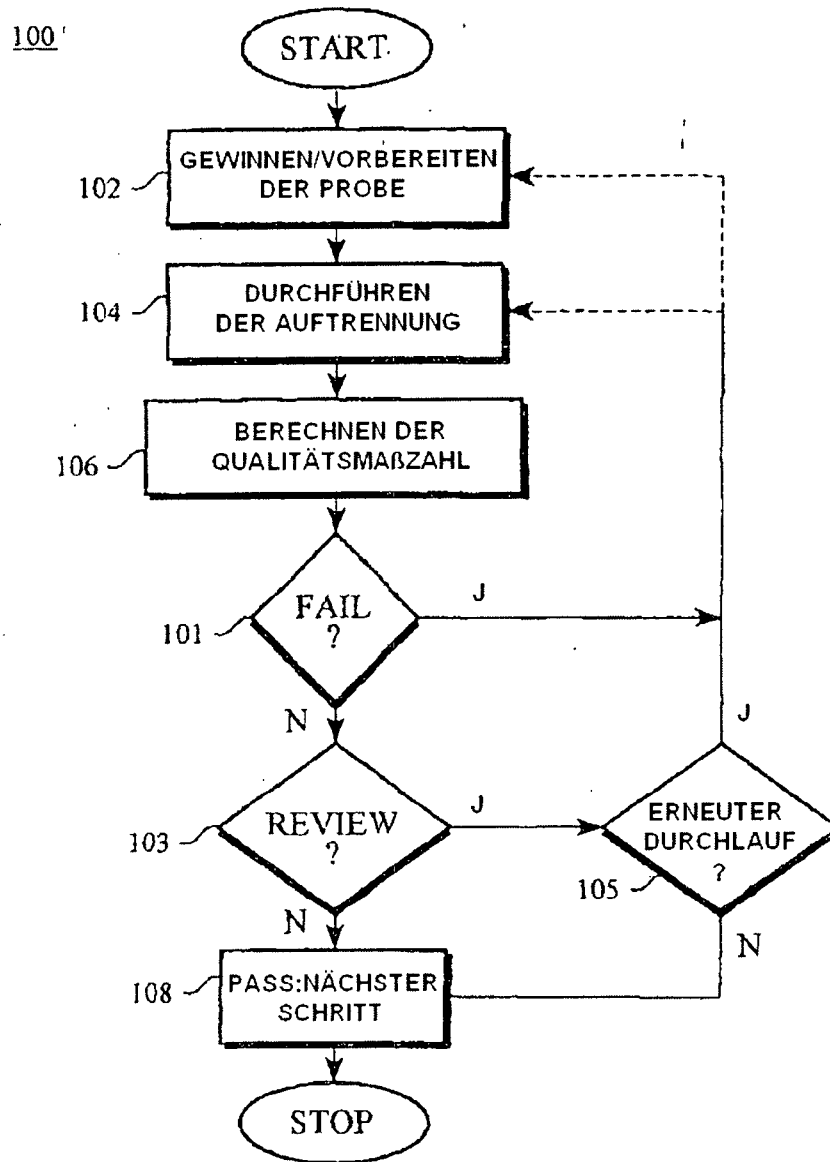
15. Verfahren nach 14, wobei, falls die metrische Eigenschaft in einen zweiten Bereich von Werten fällt, die Trennungsdaten manuell ausgewertet werden, um zu bestimmen, ob der Trennungslauf wiederholt wird.

16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei, falls die metrische Qualität in einen dritten Bereich von Werten fällt, Allele aus den Trennungsdaten identifiziert werden.

17. Verfahren nach Anspruch 3, wobei der Schritt des Amplifizierens ein Schritt des Klonens des ausgewählten Abschnitts des genetischen Materials ist.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

*Fig. 1*

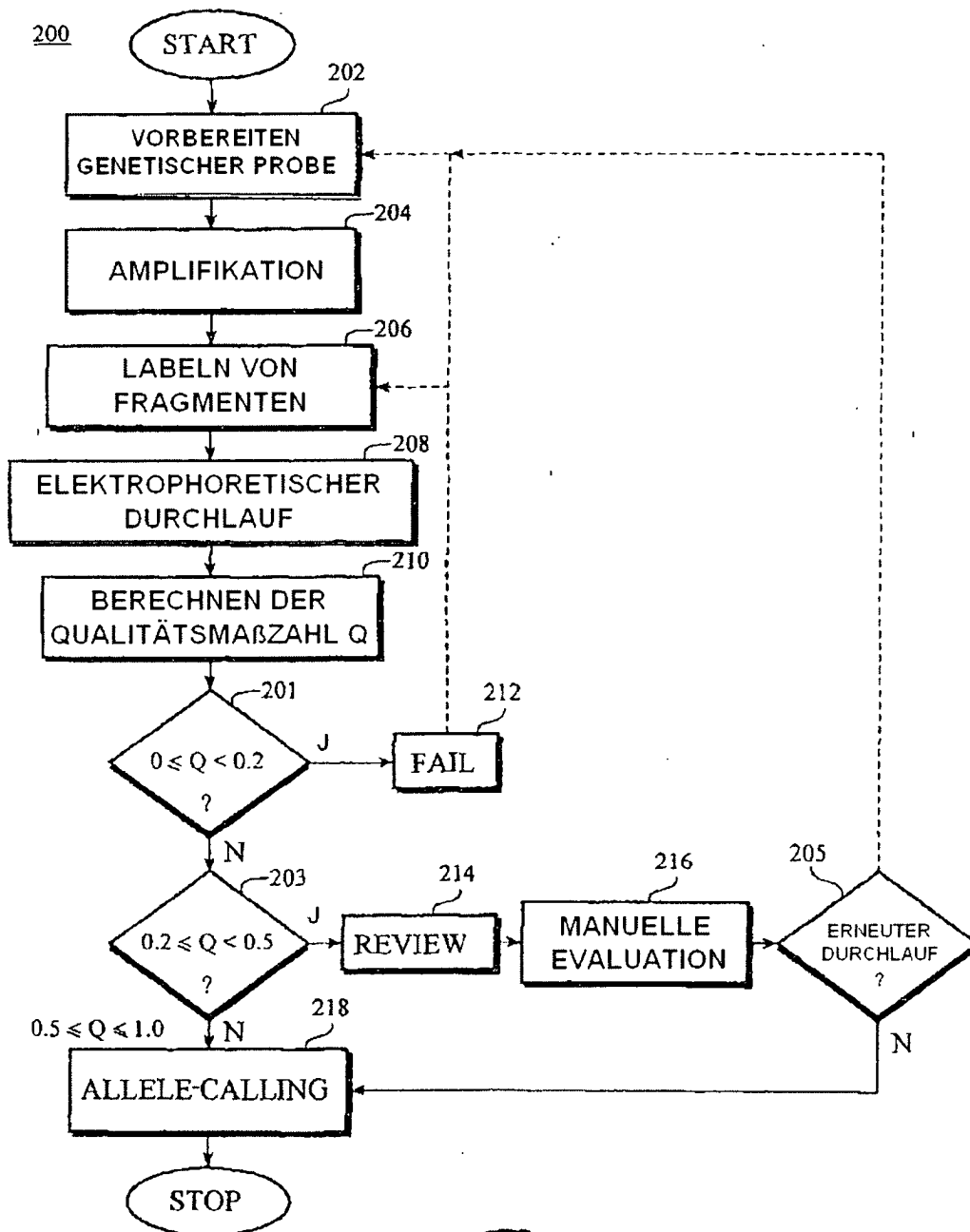


Fig. 2

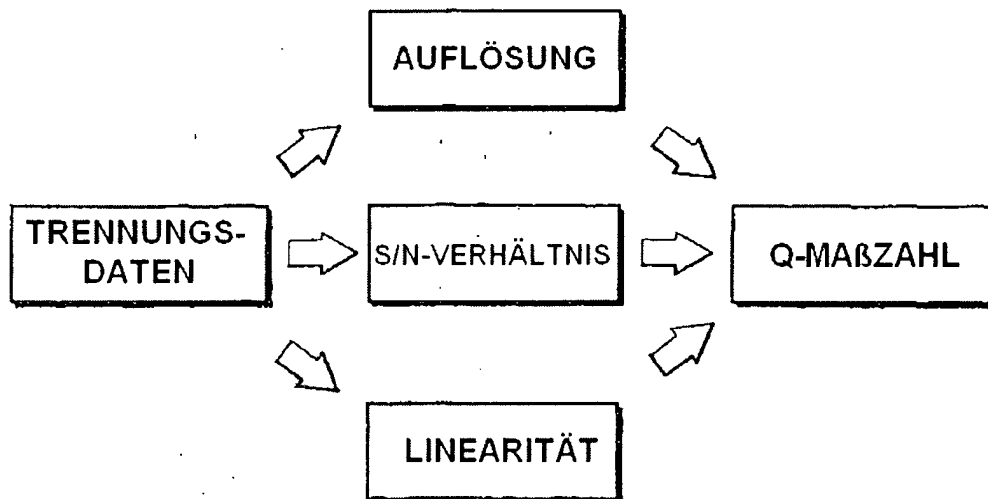


Fig. 3

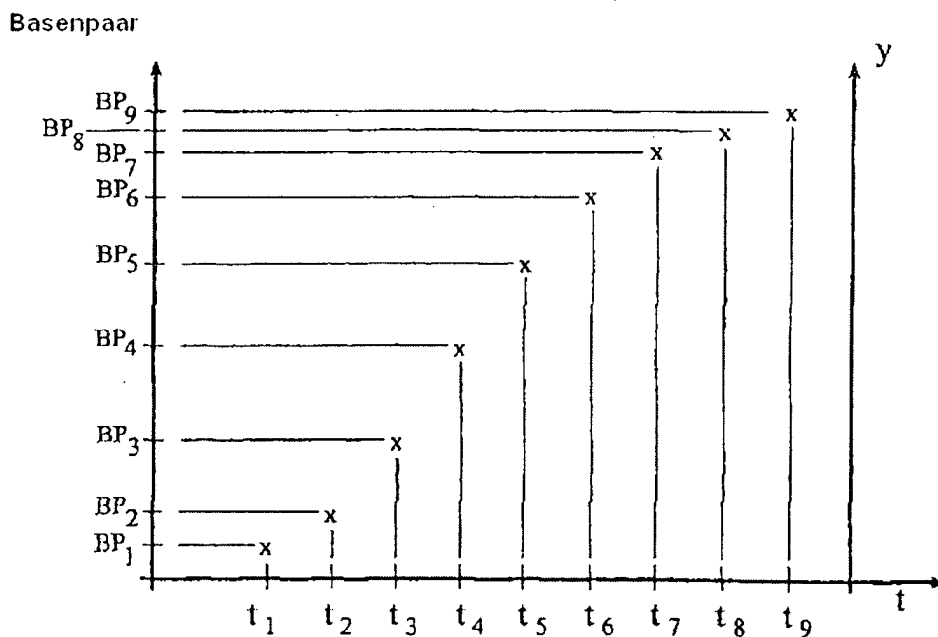


Fig. 6

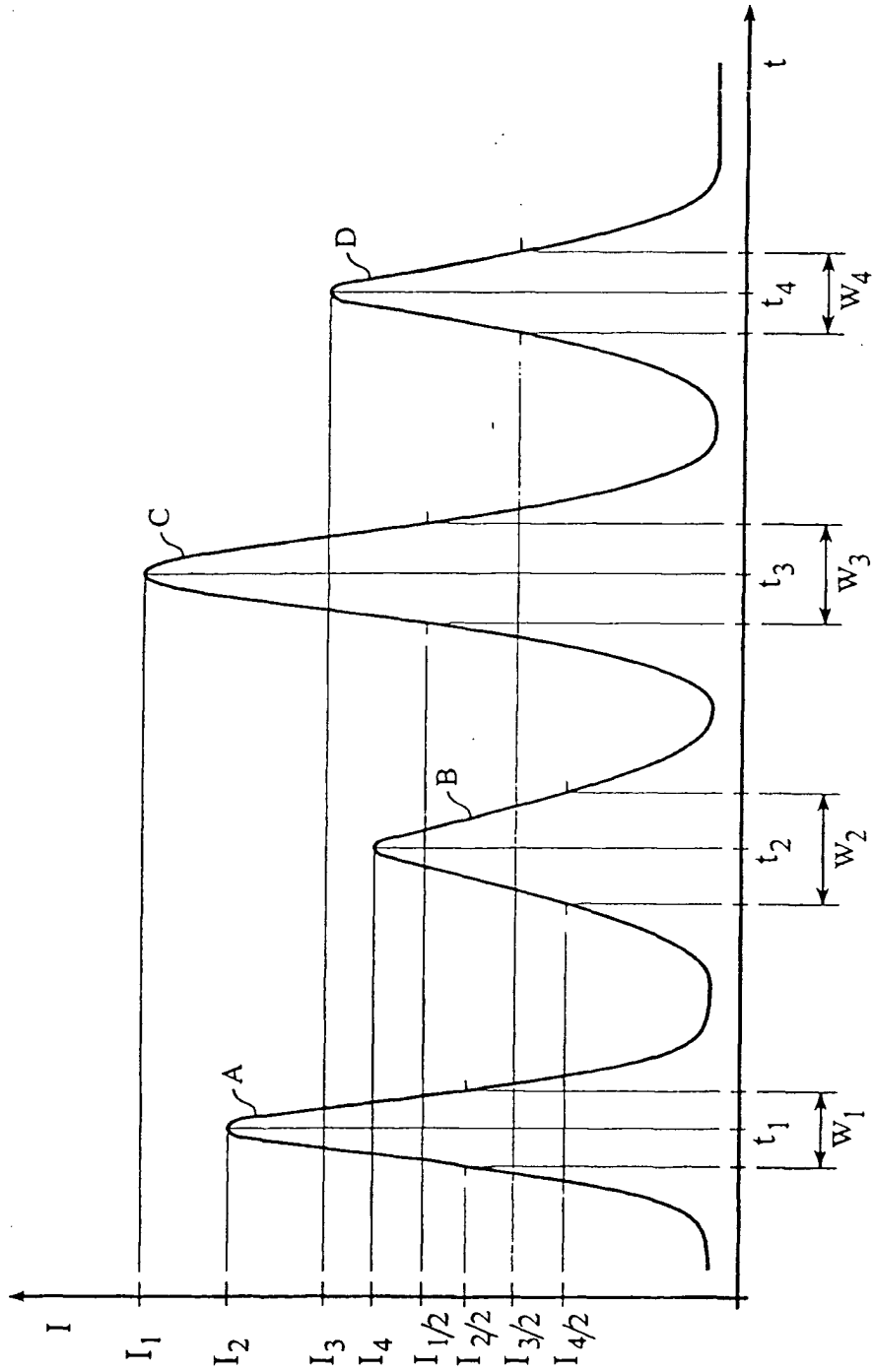


Fig. 4

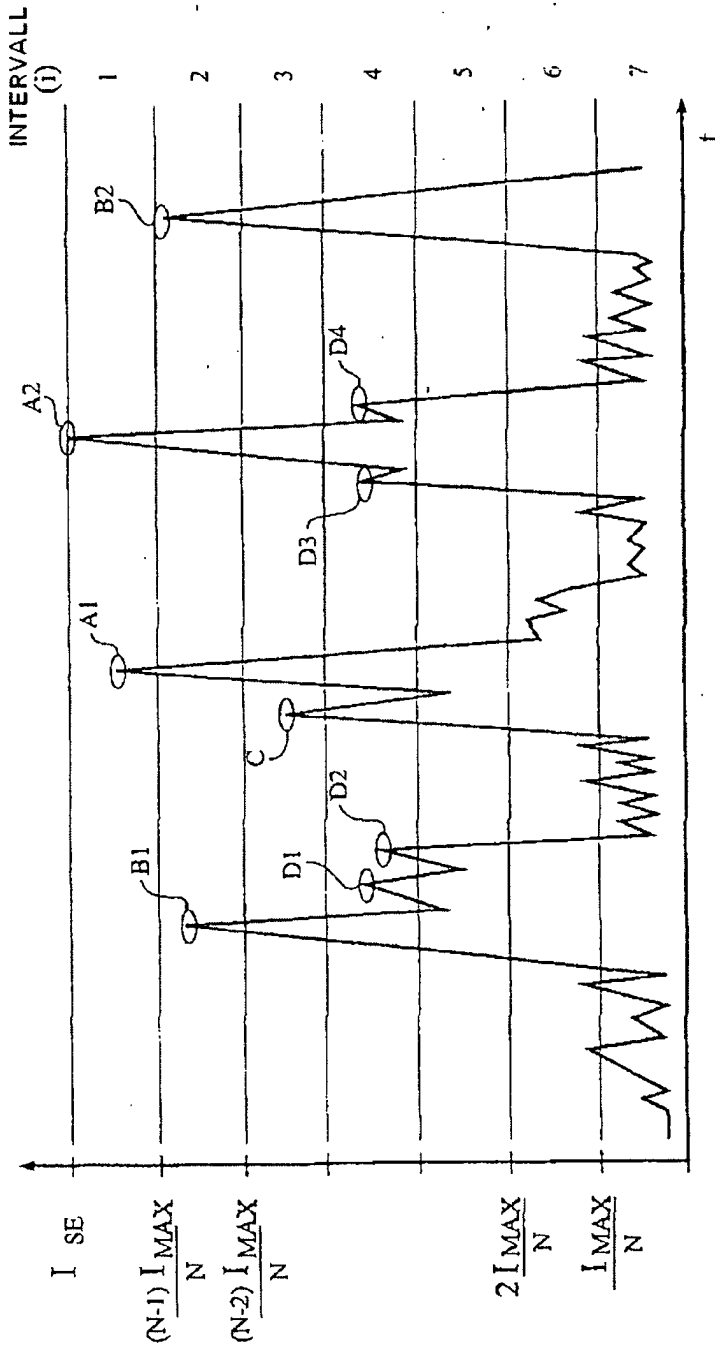


Fig. 5A

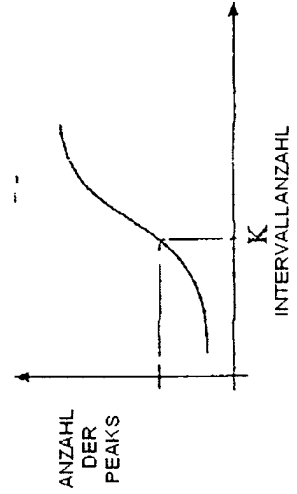


Fig. 5B

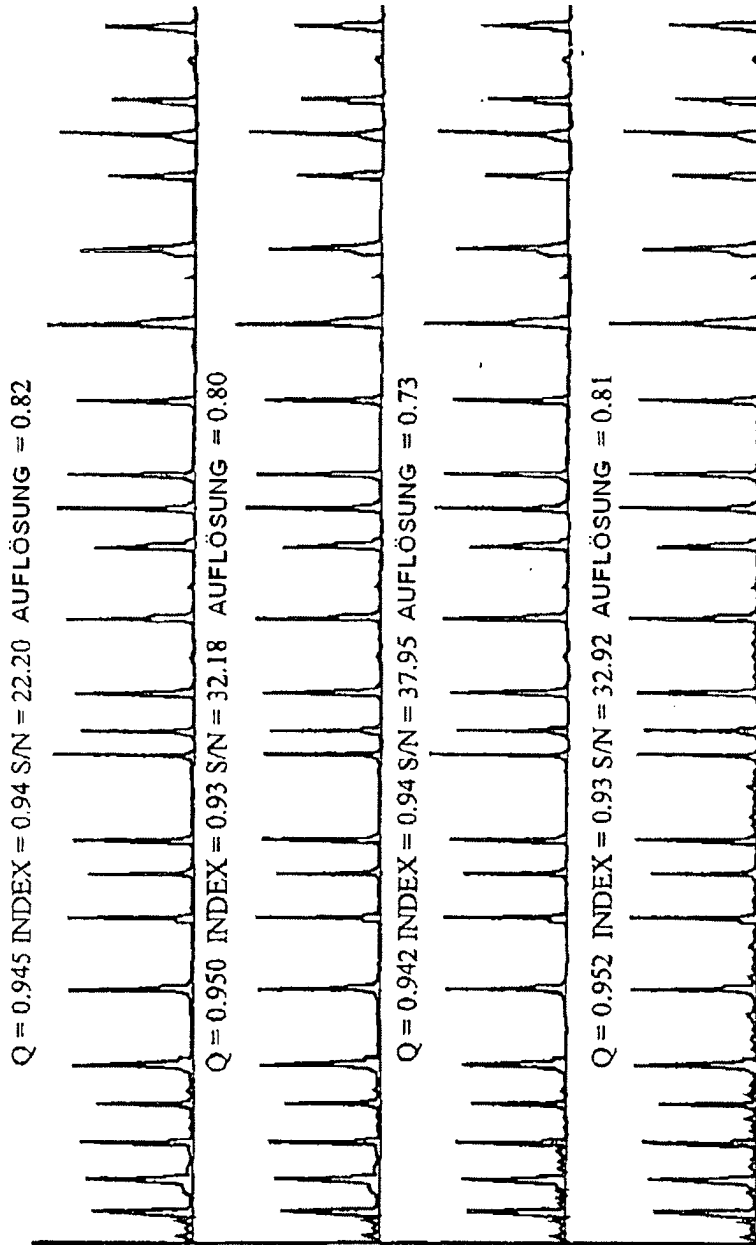


Fig. 7A

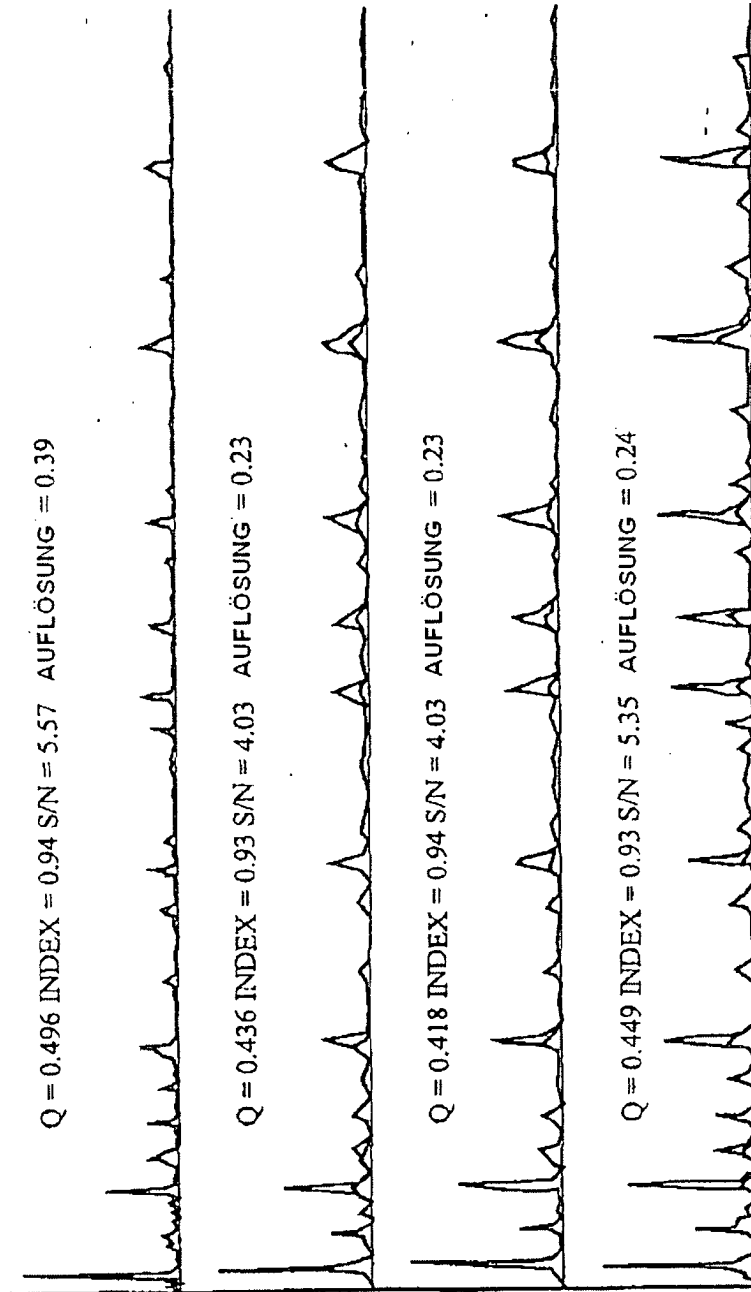


Fig. 7B