



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 31 417 T2 2004.07.01**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 830 592 B1**

(51) Int Cl.7: **G01N 27/447**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 31 417.7**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/GB96/01122**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 913 650.6**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 35/946**

(86) PCT-Anmeldetag: **10.05.1996**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **14.11.1996**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **25.03.1998**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **28.01.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **01.07.2004**

(30) Unionspriorität:
9509410 10.05.1995 GB

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

(73) Patentinhaber:
Deltadot Ltd., London, GB

(72) Erfinder:
**HASSARD, Francis, John, Princes Gardens,
London SW7 1LU, GB; COLLING, John, David,
London W2 3EE, GB**

(74) Vertreter:
Uexküll & Stolberg, 22607 Hamburg

(54) Bezeichnung: **METHODE ZUR IDENTIFIZIERUNG MOLEKULARER SUBSTANZEN**

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 ein Verfahren zum Identifizieren molekularer Substanzen innerhalb eines Gemisches und insbesondere, obwohl nicht ausschließlich, die Identifizierung von Biomolekülen.

[0002] In elektrophoretischen oder anderen Anwendungen, bei denen molekulare Substanzen zu identifizieren sind, ist es natürlich gut bekannt, die Geschwindigkeit einer bestimmten molekularen Bande zu messen und die betroffene Molekülart gemäß dieser Geschwindigkeit zu identifizieren. Typischerweise geschieht dies durch Messen der Zeit, die eine bestimmte Bande benötigt, um sich zwischen einem ersten und einen zweiten festen Sensor zu bewegen. Typische Beispiele dieser Technik sind in WO-A-94/01581 und auch in Beckers et al.: "Use of a Double-Detector System for the Measurement of Mobilities in Zone Electrophoresis", Journal of Chromatography, 452(1988) 591–600, beschrieben. Es ist auch bekannt, wie beispielsweise in der japanischen Patentszusammenfassung, Band 6, Nummer 82 (P-116) [960], 11. Juli 1980 beschrieben, mehrere Detektoren zu verwenden, um die Geschwindigkeit individueller Teilchen innerhalb eines sich bewegenden Gemisches zu verfolgen.

[0003] Der oben erwähnte Artikel von Beckers et al. wird als der nächstliegende Stand der Technik angesehen. Darin wird ein Verfahren zum Identifizieren molekularer Substanzen innerhalb eines Gemisches beschrieben, wie es im Oberbegriff der Ansprüche 1 und 2 definiert ist.

[0004] Gemäß einem ersten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zum Identifizieren molekularer Substanzen innerhalb eines Gemisches bereitgestellt, das durch die Merkmale im kennzeichnenden Teil von Anspruch 1 definiert ist.

[0005] Gemäß einem zweiten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zum Identifizieren molekularer Substanzen innerhalb eines Gemisches bereitgestellt, das durch die Merkmale im kennzeichnenden Teil von Anspruch 2 definiert ist.

[0006] Durch die Transformation in den Geschwindigkeitsraum und Integration über die Zeit können die individuellen molekularen Substanzen (z. B. Biomoleküle) schnell als individuelle Spitzen oder Peaks im Geschwindigkeitsraum identifiziert werden. Die Größe und/oder Breite jedes Peaks kann dazu verwendet werden, um ein Maß für die Menge jeder molekularen Substanz zu erhalten.

[0007] Bei der Transformation in den Geschwindigkeitsraum kann eine Berechnung der Geschwindigkeit durchgeführt werden, die eine molekulare Substanz innerhalb des sich bewegenden Gemisches benötigt, um einen gegebenen Detektor I_k zu einer Zeit t zu erreichen, zu der das Signal von diesem Detektor aufgenommen worden ist. Diese nominelle Geschwindigkeit kann als Z_k geteilt durch t berechnet werden, wobei Z_k die Entfernung vom Ursprungsort

zu dem Detektor I_k und t die vergangene Zeit ist. Es gibt jedoch auch andere Verfahren zum Bestimmen der nominellen Geschwindigkeiten, beispielsweise die Messung der Zeit, die eine bekannte Substanz zur Bewegung zwischen einem Detektor und dem nächsten benötigt. Es wäre auch möglich, die Geschwindigkeit zu bestimmen, indem eine bestimmte Sequenz von Banden an einem Detektor identifiziert wird und gemessen wird, wie lange es dauert, bis diese Sequenz von Banden sich im Mittel zu dem nächsten Detektor bewegt hat. Auf diese Weise kann eine individuelle Bande innerhalb der Sequenz identifiziert und eine genaue Zeitbestimmung an zwei separaten Detektoren durchgeführt werden, wobei die Geschwindigkeit dann auf Grundlage der Kenntnis der Entfernung zwischen den Detektoren durchgeführt wird.

[0008] In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung können Moleküle dargestellt werden, indem ihre Eigenabsorption von UV-Licht detektiert wird. In dieser bevorzugten Ausführungsform verwenden wir das Eigenbild des Moleküls selbst, egal ob es ein Nukleinsäurefragment oder ein Protein oder eine Polypeptidkette ist. Das Bild stammt von dem absorbierenden Molekül, unter Anwendung von molekularer UV-Absorptionsspektrometrie, im Gegensatz zu der wohlbekannten Technik der optischen Spektrometrie. Der Schlüsselvorteil liegt in dem Fehlen einer Markierung.

[0009] Diese bevorzugte Ausführungsform hat viele wichtige Konsequenzen. Die vielleicht Offensichtlichste ist, dass keine gefährliche Markierung mehr benötigt wird, sei es eine radioaktive oder eine bekanntermaßen karzinogene Markierung wie Ethidiumbromid. Ein anderer Punkt besteht darin, dass bei Sequenzierungsreaktionen das Fehlen der Markierung eine der Hauptbegrenzungen hinsichtlich der Anzahl der Basen, die sequenziert werden kann, aufhebt, d. h. die Menge an Radioaktivität, die innerhalb der Probe aufgenommen werden kann.

[0010] Vorzugsweise werden die interessierenden Moleküle direkt dargestellt, indem ihre Absorption durch Abbilden der Nukleinsäure oder des Proteins auf einen Diamantdetektor detektiert wird. Dies kann durch Beleuchten des darzustellenden Objekts – seien es Nukleinsäuren oder Proteine – mit UV-Licht konstanter Helligkeit entweder aus einem Breitbandspektrumgerät wie einer Heliumentladungsröhre oder einem monochromatischem Laser wie einem Excimer-Laser bei 196 nm geschehen. Wir beobachten verschiedene Lichtintensitäten, die einen hinter dem abzubildenden Objekt platzierten Detektor erreichen. Im Falle von zwei- oder dreidimensionaler Darstellung wird der Schatten gleichzeitig dargestellt und das Objekt dadurch identifiziert. Dies erfordert einen zweidimensionalen Detektor wie etwa eine Pixel-Vorrichtung oder eine in Pixel unterteilte Streifenvorrichtung.

[0011] Wenn die Erfindung auf die Identifizierung von Nukleinsäuren angewendet wird, wird die bevor-

zugte Technik eine quantitative Unterscheidung zwischen transmittierter und absorbierter Energie ermöglichen. Die Quantifizierung von DNA unter diesen Bedingungen hat wichtige Anwendungen bei der Konstruktion von Expressionsvektoren, die zum Erzeugen spezialisierter Proteine zur Verwendung in Therapien verwendet werden.

[0012] Wenn die vorliegende Erfindung auf die Identifizierung von Peptiden und Proteinen angewendet wird, kann dieselbe Ausrüstung verwendet werden, wie sie beim Darstellen von DNR-Restriktions-Enzym-Karten verwendet wird. Die Geschwindigkeit der Identifizierung, die durch die vorliegende Erfindung ermöglicht wird, bietet signifikante Vorteile gegenüber den vorhandenen Techniken, von denen manche bis zu drei Monate benötigen.

[0013] Die Erfindung kann auf vielen Wegen praktisch realisiert werden, und es wird nun eine spezifische Ausführungsform beispielhaft unter Bezugnahme auf die Zeichnungen beschrieben, in denen:

[0014] **Fig. 1** einen Detektor aus dem Stand der Technik zeigt;

[0015] **Fig. 2** einen Querschnitt durch eine Detektor zeigt, der zur Verwendung mit dem Verfahren der vorliegenden Erfindung geeignet ist;

[0016] **Fig. 3** eine perspektivische Ansicht des Detektors aus **Fig. 2** ist;

[0017] **Fig. 4a** einen anderen Detektor zeigt, wobei die Elektroden in einer Bipolaranordnung angeschlossen sind;

[0018] **Fig. 4b** den Detektor aus **Fig. 4a** zeigt, wobei die Elektroden in einer Widerstandsreihenordnung angeschlossen sind;

[0019] **Fig. 5** einen weiteren Detektor zeigt, der zur Verwendung bei einem Verfahren der vorliegenden Erfindung geeignet ist.

[0020] **Fig. 6** schematisch einen automatischen DNA-Sequenzierer zeigt, der ebenfalls zur Verwendung bei dem Verfahren der vorliegenden Erfindung geeignet ist;

[0021] **Fig. 7** ein schematischer Schnitt durch den in **Fig. 6** gezeigten Sequenzierer ist;

[0022] **Fig. 8** die bevorzugte Ausführungsform des Isolierens von Biomolekülen schematisch illustriert; und

[0023] **Fig. 9** die Resultate der bevorzugten Analyse als Graph im Geschwindigkeitsraum zeigt.

[0024] Bevor wir das bevorzugte Verfahren der Erfindung beschreiben, werden wir zunächst einige Aparatetypen betrachten, die zur Verwendung bei dem Verfahren geeignet sind.

[0025] Es wird nun auf die **Fig. 6** und **7** Bezug genommen, die einen automatischen DNA-Sequenzierer schematisch zeigen, der zur Verwendung bei dem Verfahren der vorliegenden Erfindung geeignet ist.

[0026] **Fig. 6** und **7** zeigen eine Untereinheit der vorgeschlagenen Sequenzier Vorrichtung. Die Vorrichtung weist insgesamt vier oder fünf solcher Untereinheiten auf. Jede Untereinheit umfasst ein oberes Pufferreservoir **810**, das eine Pufferlösung

820 enthält, ein unteres Reservoir, das eine Pufferlösung **840** enthält, eine UV-Quelle **870** oder eine Mehrzahl solcher Quellen, einen UV-Detektor **860**, der mit standardmäßigen Ausleseeinrichtungen **865** verbunden ist, eine Kathode **822**, die mit der Pufferlösung **820** verbunden ist, und eine Anode **842**, die mit der Pufferlösung **840** verbunden ist. Die Vorrichtung umfasst auch vier Festphasenmatrixröhren **850**, die zwischen dem unteren und dem oberen Reservoir verlaufen.

[0027] Sowohl das untere als auch das obere Reservoir **810**, **830** kann aus einem klaren Kunststoffmaterial hergestellt sein und einfache Pufferlösung **820**, **840** enthalten, um den übermäßigen Aufbau von Säure in dem System zu verhindern. Die Festphasenmatrixröhren **850** sind oben in Kontakt mit der Pufferlösung **820** und unten in Kontakt mit der Pufferlösung **840**.

[0028] Die Lichtquelle **870** umfasst eine UV-Lampe oder eine Deuterium-Lampe oder eine Entladungslampe. Alternativ könnte sie einen Laser aufweisen, der zum Betrieb im Bereich zwischen 220 nm und 180 nm in der Lage ist, oder sogar eine Diode.

[0029] Der Detektor **860** weist irgendeinen geeigneten optischen Detektor auf, der an die Wellenlänge der Lichtquelle **870** angepasst ist. Der Detektor umfasst vorzugsweise einen Diamant-Streifendetektor, wie weiter unten unter Bezugnahme auf **Fig. 2** bis **5** detaillierter beschrieben wird. Die Breite der Streifen kann zwischen 5 und 200 µm liegen, abhängig von den zu detektierenden Wellenlängen und der erforderlichen Auflösung. Die Schmalheit der Streifen und die Tatsache, dass eine im Wesentlichen ebene Beleuchtung verwendet wird, ermöglicht eine hohe Genauigkeit und Auflösung.

[0030] Der Detektor **860** ist mit geeigneten elektronischen Schaltungen verbunden, die eine digitale Auslese an einem Ausgang **865** bereitstellen. Eine Standardausleseeinrichtung ist z. B. labview^(TM), die ihre Ausgabe direkt in einen geeigneten Datenbank-Prozessor, wie etwa MacVector^(TM) oder MacDNAsys^(TM), eingibt.

[0031] Die Festphasenmatrixröhren **850** umfassen vier Quarzröhren, die ein geeignetes Festphasenmaterial enthalten. Geeignete Materialien umfassen z. B. vorhandene Gel-Matrizen auf Siliziumbasis, wie etwa die Sephadex^(TM) Gruppe. Die Festphase ist relativ UV-durchlässig und auch wiederverwendbar. Die Länge der Röhren hängt von der genauen Art der ausgewählten Festphasen ab, wird aber typischerweise nicht mehr als 15 bis 20 cm betragen.

[0032] Im Betrieb wird Spannung zwischen der Anode und der Kathode angelegt, um entlang der Länge der Festphasenmatrixröhren **850** eine Potentialdifferenz zu erzeugen. Die vier individuellen Reaktionen, die zu detektieren sind, werden jeweils in ihre separate Säule eingeführt und elektrophoretisch zur Anode bewegt. Sobald die Banden sich zwischen die Quelle **870** und den Detektor **860** bewegen, wird ein einfaches qualitatives Bild jeder Bande digitalisiert und in

einer Datenbank abgespeichert. Die resultierende Information kann entweder in Echtzeit ausgelesen werden oder sie kann innerhalb der Elektronik des Detektionssystems gespeichert werden, bis die Elektrolyse abgeschlossen ist. Dann kann die gesamte Information auf einmal ausgelesen werden.

[0033] Nachdem das Sequenzierungsgemisch durch die Säule gelaufen ist, können alle Spuren der DNA entfernt werden, indem kontinuierlich ein elektrisches Feld und eine Pufferlösung einwirken. Nach gründlichem Waschen kann die Festphase wiederverwendet werden.

[0034] Es ist zu bemerken, dass die Einfachheit des Betriebs der vorliegenden Vorrichtung und die Wiederverwendbarkeit der Festphase sich wenigstens zum Teil daraus ergibt, dass keine radioaktive Markierung mehr erforderlich ist.

[0035] Es wird natürlich anzuerkennen sein, dass geeignete Apparate nicht auf die oben beschriebenen spezifischen Merkmale eingeschränkt sind. Geeignete äquivalente Vorrichtungen können von Fachleuten leicht aufgebaut werden, wobei die genauen Einzelheiten solcher Strukturen von dem spezifisch interessierenden Gebiet abhängen. Spezifische Gebiete, in denen die Vorrichtung und das Verfahren der vorliegenden Erfindung Anwendung finden können, umfassen Nukleinsäureabfragen und -kartierungen, einschließlich Sequenzierung, Restriktionsenzymkartierung, Quantifizierung, High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) und Oligonukleotid-Reinigung und Proteindarstellung, einschließlich Peptidanalyse und Überwachung von Nukleinsäuremanipulationen und medizinischer Diagnostik.

[0036] Bei geeigneten Anwendungen kann ein UV-Sensor verwendet werden, wie er unten unter Bezugnahme auf **Fig. 1** bis **5**, beschrieben wird. Diese Anwendungen sind mit hoher Wahrscheinlichkeit solche, bei denen die Darstellung ungefähr im Bereich von 220 und 290 nm erreicht werden kann. Es ist jedoch nicht wesentlich, eine Streifenstruktur zu verwenden, wie sie hier speziell beschrieben ist, und in bestimmten Anwendungen sind planare Diamantdetektoren vollständig angemessen. Der Vorteil eines Diamantdetektors liegt in dem fast vollständigen Fehlen von Rauschen, seiner exzellenten Quantenausbeute und seiner Linearität.

[0037] In Regionen, die für die Verwendung von Diamantdetektoren nicht geeignet sind, wie beispielsweise etwa die Region von etwa 220 bis 290 nm (wo DNA absorbiert) können Nicht-Diamant Halbleiter verwendet werden. Geeignete Detektoren schließen UV-erweiterte Siliziumdetektoren und Photomultiplier ein.

[0038] Die bevorzugten Verfahren der vorliegenden Erfindung können entweder von den Eigenabsorptionseigenschaften der Moleküle, wenn sie Licht ausgesetzt sind, Gebrauch machen, oder alternativ von den Absorptionseigenschaften der Moleküle, wenn sie Licht ausgesetzt sind, Gebrauch machen oder alternativ von Absorptionseigenschaften von Markie-

rungen Gebrauch machen, die an den interessierenden Molekülen angebracht sind. Spezielle molekulare Absorber mit unterschiedlichen Molekülerweiterungen können verwendet werden, um die Sensitivität zu verbessern. Solche Absorber können ungiftig sein.

[0039] Ein typischer bekannter Detektor für geladene Teilchen ist in **Fig. 1** gezeigt. Der Detektor weist eine flache Schicht **10** aus einem isolierenden Material, wie etwa Diamant, auf, die dünne Gold-Elektrodenbeschichtungen **12**, **14** an ihrer unteren und oberen Oberfläche aufweist. Die obere Elektrodenbeschichtung **12** weist eine Mehrzahl von parallelen Auslesestreifen auf, die in einer Richtung senkrecht zur Papierebene in der Figur ausgerichtet sind, und die untere Elektrodenbeschichtung **14** weist eine weitere Mehrzahl von Auslesestreifen auf, die in einer Richtung parallel zu der Papierebene ausgerichtet sind. Zwischen den Elektrodenbeschichtungen wird eine große Potentialdifferenz V aufrechterhalten. Entweder die obere oder die untere Elektrode kann kontinuierlich sein, und die Streifen können abwechselnde Polarität haben.

[0040] Ein geladenes Teilchen, das einem Weg **16** durch den Diamanten folgt, erzeugt Elektron-Loch-Paare **18**, **20**, die sich unter dem Einfluss des elektrischen Feldes trennen und eine Ladung auf den Auslesestreifen induzieren. Die Energie des Teilchens kann durch die gesammelte Ladungsmenge bestimmt werden, und seine Position anhand des Schnittpunktes der oberen und der unteren Streifen, die die größten induzierten Ladungen empfangen.

[0041] Ein anderer bevorzugter Detektor, der zur Verwendung bei dem Verfahren der vorliegenden Erfindung geeignet ist, wird nun im Detail beschrieben, unter besonderer Bezugnahme auf die **Fig. 2** und **3**. Es ist ein Diamantdetektor, der ein Diamantsubstrat **30** aufweist, das auf einer Oberfläche eine Vielzahl von parallel geätzten Diamantstreifen **40** hat. Auf einer Seite jedes Streifens befindet sich eine positive Ausleseelektrode **50** und auf der anderen Seite eine negative Elektrode **60**. Diese sind vorzugsweise Leiter, aber könnten auch aus hochleitfähig dotiertem Halbleitermaterial bestehen.

[0042] Im Betrieb ist der Detektor so positioniert, dass das Substrat im Wesentlichen senkrecht zu einem Teilchenstrahl oder einem elektromagnetischen Strahl **70** liegt, der zu detektieren ist. Ein individuelles Teilchen, das in einen der Streifen einfällt, erzeugt ionisierte Ladungsträger, die auf Grund der großen Potentialdifferenz, die zwischen den Elektroden erzeugt ist, schnell zu den Elektroden **50**, **60** driften. Dadurch wird Ladung auf den Elektroden induziert, wobei diese Ladung durch Ausleseeinrichtungen (nicht gezeigt) an den Enden der Streifen ausgelesen wird.

[0043] Das Substrat und die Streifen bestehen vorzugsweise aus Diamant, der entweder natürlich oder künstlich gezüchtet sein kann. Die Streifen können entweder mit dem Substrat gezüchtet sein, oder sie können gätzt sein (z. B. mit einer Excimer-Laser). Die

Elektroden **50**, **60** können aus irgendeinem Material oder einer Kombination von Materialien (z. B. Titan, Vanadium, Chrom und/oder Gold) bestehen, die einen ohmschen Kontakt mit der Diamantoberfläche bei geeigneter Bearbeitung (z. B. Abtragung, Ionenimplantation oder Glühen) bilden. Standardmäßige Aufbringungstechniken können dazu verwendet werden, um das Metall als dünne Beschichtung auf die Seiten der Streifen aufzubringen. Typischerweise kann die Vorrichtung hergestellt werden, indem die Streifen geätzt werden, Material aufgebracht wird, und dann die obere Oberfläche poliert wird.

[0044] Es ist aus **Fig. 2** zu erkennen, dass die Empfindlichkeit der dargestellten Vorrichtung erhöht werden kann, indem der Wert von D (oder die Höhe der Streifen) erhöht wird. Je größer die Höhe der Streifen, desto größer ist die Materialmenge, die ein Teilchen durchdringen muss, wodurch die Ionisation in der Vorrichtung erhöht wird. Die Höhe der Streifen wird üblicherweise an die erwartete Eindringtiefe der Teilchen oder der Photonen, die zu detektieren sind, angepasst. Die Auslesegeschwindigkeit und -effizienz wird durch die Breite L jedes Streifens bestimmt. Abhängig von der jeweiligen Anwendung kann der Wert von L so klein wie einige Mikrometer oder ein größerer Wert von bis zu etwa $200\ \mu\text{m}$ sein, und der Wert von D $10\ \mu\text{m}$ oder mehr. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis ist groß, da das Übersprechen von Signalen zwischen individuellen Streifen vernachlässigbar ist. Eine typische Substrattiefe beträgt etwa $100\ \mu\text{m}$, was genügend dick ist, um die Streifen zu tragen und um selbsttragend ohne Notwendigkeit für eine weitere Trägerbasis zu sein. Vorzugsweise wird in der Vorrichtung Diamant mit relativ schlechter Qualität verwendet, der eine Rekombinationslänge von vielleicht $6\ \mu\text{m}$ oder dergleichen hat.

[0045] Die Impedanz der Ausleseeinrichtungen (nicht gezeigt) an dem Ende der Streifen ist vorzugsweise an die Impedanz der Elektroden **50**, **60** angepasst, wodurch die Auslesegeschwindigkeit erhöht und Signalverluste reduziert werden.

[0046] Es gibt viele Verfahrensweisen, mit denen eine Potentialdifferenz zwischen den Elektroden **50**, **60**, wie in **Fig. 2** gezeigt, angelegt werden kann. In der einfachsten Form kann einfach eine Spannungsquelle zwischen den Elektroden angeschlossen werden. Alternativ können die Elektroden mit einer Widerstandskette (nicht gezeigt) gekoppelt werden, wobei die Potentialdifferenz zwischen den Elektroden durch den Potentialabfall über den entsprechenden Widerstand definiert ist.

[0047] Eine andere geeignete Vorrichtung ist in **Fig. 4** gezeigt, bei der die Elektroden über der Basis und den Seiten des Zwischenraums zwischen den Diamantstreifen **40** gebildet sind. Das bedeutet, dass effektiv jede Elektrode **40'** auf der linken Seite des Streifens **40** elektrisch mit einer entsprechenden Elektrode **60'** auf der rechten Seite des nächsten Streifens in der Folge gekoppelt ist, so dass sie zusammen eine einzige U-förmige Elektrode **61** bilden.

In der Ausführungsform aus **Fig. 4a** ist ein erstes abwechselndes Paar von U-förmigen Elektroden **61** über eine erste Spannungsquelle V_1 gekoppelt und zweite abwechselnde Paare sind durch eine zweite Spannungsquelle V_2 gekoppelt. Eine solche bipolare Spannungsanordnung stellt sicher, dass immer eine konstante Potentialdifferenz $V_1 - V_2$ über jeden Streifen **40** vorhanden ist.

[0048] Eine alternative Verfahrensweise zur Anwendung von Spannungen auf die U-förmigen Elektroden **61** ist in **Fig. 4b** gezeigt. Hier wird eine Widerstandskette verwendet, um eine Eingangsspannung V über eine Vielzahl von Reihenwiderständen R abfallen zu lassen. Die Spannung über jedem Streifen **40** kann gewählt werden, indem geeignete Werte für V und R gewählt werden.

[0049] Es ist natürlich davon auszugehen, dass eine ähnliche bipolare Spannungsanordnung oder Widerstandsketten-Spannungsanordnung in Verbindung mit der Ausführungsform aus **Fig. 2** verwendet werden kann.

[0050] Eine typische Potentialdifferenz über dem Streifen **40** kann im Bereich von $1\ \text{Volt pro}\ \mu\text{m}$ liegen. Wesentlich höhere Spannungen können verwendet werden, wenn gewünscht (weil Diamant eine sehr hohe Durchbruchspannung hat), aber es besteht im Allgemeinen keine Notwendigkeit für hohe Potentialdifferenzen, da bei höheren Spannungen die Ladungsträgergeschwindigkeit schnell in die Sättigung kommt.

[0051] In einer weiteren geeigneten Vorrichtung (nicht gezeigt) ist ein weiterer paralleler Satz von Streifen, orthogonal zu dem ersten Satz, auf der unteren Oberfläche des Substrats **30** vorgesehen. Diese beiden senkrechten Sätze von Streifen erlauben eine präzise x-y Positionsbestimmung für jedes detektierte Teilchen.

[0052] Die Zwischenräume zwischen den Streifen können mit Kunststoffmaterial und/oder anderem Absorber gefüllt sein, wodurch die Leistungsfähigkeit des Detektors zur Detektion neutraler Teilchen verbessert wird.

[0053] Noch eine weitere geeignete Vorrichtung ist in **Fig. 5** gezeigt. Hier sind die Zwischenräume zwischen den Streifen **40** extrem schmal geworden und sie enthalten jeweils eine separate Elektrode **62**. Eine solche Vorrichtung ist unter vielen Umständen bevorzugt, da die Schmalheit der Zwischenräume zwischen den Streifen **40** einen nur kleinen Akzeptanzverlust im Vergleich zu den Ausführungsformen aus **Fig. 2**, **3** und **4** bewirkt. Die Breite des Zwischenraums, und mithin die Breite der Elektrode **62**, kann in erster Linie davon abhängen, wie schmal eine Nut in das Diamantsubstrat geschnitten werden kann. Die Elektroden **62** können in jeder gewünschten Weise miteinander gekoppelt werden, um so eine geeignete Potentialdifferenz über die Streifen **40** zu erzeugen, z. B. unter Anwendung der Ansätze aus **Fig. 4a** oder **Fig. 4b**.

[0054] Der oben beschriebene Detektor für ionisie-

rende Strahlung kann extrem schnelle Ladungsauslese erreichen, vermutlich innerhalb von 35 ps und bestimmt innerhalb von 50 ps.

[0055] Wir wenden uns nun einer Diskussion der Art und Weise zu, in der der oben beschriebene Apparat praktisch benutzt werden kann, um gemäß der bevorzugten Ausführungsform der Erfindung individuelle Moleküle innerhalb eines Gemischs zu identifizieren. [0056] **Fig. 8** illustriert die Anordnung schematisch. Auf einer Seite eines länglichen Substrats **910**, entlang dessen sich die Moleküle bewegen, befindet sich eine UV-Lampe **920**, während auf der anderen Seite eine Reihe von beabstandeten UV-Detektoren $I_1, I_2, I_3, \dots, I_N$ vorhanden ist. Wie zuvor diskutiert wurde, wird die Sequenzierung erreicht, indem der Durchgang von Banden von Biomolekülen vor den Detektorelementen detektiert wird. Da die Biomoleküle UV-Licht in der interessierenden Region absorbieren, induziert der Durchgang jeglicher Bande vor einem Detektor einen Abfall des nominellen Gleichstroms, der durch die konstante Bestrahlung **330** des Detektorelements durch die UV-Lichtquelle **920** bewirkt wird. Der Stromabfall wird gemessen und markiert und als ein individuelles Signal behandelt, das in Beziehung zu einer gegebenen Biomolekül-Bande gesetzt werden kann. In einem Elektrophoresegel ist die Geschwindigkeit einer gegebenen Bande umgekehrt proportional zur Wurzel der Masse der Nukleinsäuresequenz der Bande; die Ladung der Sequenz ist von ihrer Länge entkoppelt auf Grund von Reibungsbremskräften, die eine "Endgeschwindigkeit" festlegen, die durch die Kräfte bewirkt wird, die proportional zur Länge sind.

[0057] Um die individuellen Moleküle zu identifizieren, erfasst das System automatisch eine Reihe von Signalen $S_k(t)$ für die Reihe der Detektoren I_k zu Zeiten $t = t_1, t_2, t_3, \dots$. Da nun die Position jedes Detektorelements bekannt ist und auch die vergangene Zeit bekannt ist, ist es möglich, die Geschwindigkeit zu berechnen, die ein bestimmtes Molekül benötigt hätte, um den bestimmten Detektor in der gegebenen vergangenen Zeit zu erreichen. Wenn wir z. B. annehmen, dass die vergangene Zeit von $t_0 = 0$ aus gemessen wird, und dass der Detektor I_k sich in einer Entfernung von Z_k vom Ursprung O befindet, können wir die nominelle Geschwindigkeit $V_k(t)$ durch den Ausdruck Z_k/t berechnen.

[0058] Jedes Signal $S_k(t)$ wird dann in das zugehörige Intervall in einem gewichteten laufend aktualisierten Histogramm addiert, das nach der nominellen Geschwindigkeit als Histogramm eingeteilt ist. Die individuellen Signale können in das betreffende Intervall in irgendeiner zweckmäßigen Weise addiert werden, aber in der bevorzugten Ausführungsform wird ein Gewicht w zu dem Intervall für jedes Signal addiert, wobei das Gewicht proportional zur Signalgröße $S_k(t)$ ist. Ein entsprechender Graph oder ein entsprechendes Histogramm von Gewichten, das im Geschwindigkeitsraum aufgetragen ist, ist in **Fig. 9** gezeigt.

[0059] Da jedes verschiedene Biomolekül, das zu detektieren ist, eine verschiedene Länge hat, wird es mit einer unterschiedlichen Geschwindigkeit wandern und daher an einer unterschiedlichen Stelle in dem Histogramm aus **Fig. 9** auftauchen. Individuelle Moleküle erscheinen als separate Spitzen oder Peaks in dem Histogramm; in den dargestellten Beispielen wurden Moleküle A, B und C detektiert. Bei einer möglichen Vorgehensweise können die Signale S_k für Zeiten t_1, t_2, t_3, \dots erfasst werden. Sobald alle Daten erfasst sind, können sie dargestellt und analysiert werden, wie **Fig. 9** zeigt. In einer alternativen und bevorzugten Ausführungsform werden die Daten jedoch bei ihrer Erfassung eingeteilt. Der Vorteil einer solchen Vorgehensweise besteht darin, dass der Graph, wie er in **Fig. 9** gezeigt ist, beispielsweise auf einem Computer-Bildschirm dargestellt werden kann und in Echtzeit aktualisiert werden kann. Während die Datenerfassung fortschreitet, treten die Spitzen, die für die detektierten Moleküle repräsentativ sind, allmählich klarer hervor.

[0060] Es ist davon auszugehen, dass die Zeitperioden zwischen aufeinanderfolgenden Auslesen der Detektoren nach Maßgabe der Anwendung gewählt werden können. In der bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Auslese alle hundert Millisekunden, aber für andere Anwendungen kann die Periode so klein wie einige Mikrosekunden oder so groß wie einige Minuten oder sogar Stunden sein. Vorausgesetzt, dass die Ausleseelektronik den Datenfluss handhaben kann, gibt es keinen wirklichen in Kauf zu nehmenden Nachteil, wenn man zu kürzeren und kürzeren Zeiten übergeht. Außerdem besteht keine Notwendigkeit, dass die Zeitperioden direkt aufeinanderfolgend sind, obwohl in der Praxis direkt zusammenhängende Messperioden wahrscheinlich bequemer sind, insbesondere bei der vorliegenden Anwendung, bei der die Periode durch die Driftgeschwindigkeit, die Größe der Bande und bestimmte andere Faktoren definiert ist.

[0061] Man wird sich erinnern, dass das Signal S_k an jedem Detektor I_k repräsentativ ist für die Stromänderung gegenüber dem nominellen Gleichstromlevel, der vorhanden ist, wenn keine Moleküle in dem Strahlenweg **930** vorhanden sind. Statistische Fluktuationen können dieses Signal entweder negativ (d. h. über dem mittleren Gleichstromlevel) oder positiv (d. h. unter dem mittleren Gleichstromlevel) machen. Im Schnitt werden sie dazu tendieren, sie aufzuheben, und wenn mehr Daten erfasst werden, wird das Rauschen allmählich unterdrückt. Indem man nicht versucht, individuelle Objekte zu verfolgen, aber stattdessen die Werte im Geschwindigkeitsraum an jedem Schritt "blind" summiert, werden die Objekte automatisch in einer Weise gefunden, die natürlich ist, sehr schnell und die Rauschen minimiert. Die benötigte Hardware ist sehr einfach und die Software und die Analysen sind noch einfacher. Die Hardware könnte z. B. bereitgestellt werden, indem ein kapazitives Element um einen Betrag proportional zu dem

Signal S_k geladen wird.

[0062] Ein weiterer Vorteil des Verfahrens besteht darin, dass nicht nur eine automatische Untergrundsubtraktion durchgeführt wird, sondern auch die erhaltende Präzision weitaus größer ist, als dies durch einfache Verwendung von Informationen von einzelnen Detektorelementen möglich wäre. Die Informationen aus der Reihe S_k insgesamt bietet einen erheblich größeren Informationsgehalt und daher erheblich größere Präzision als durch Verwendung der Detektoren individuell erhältlich wäre.

[0063] Außerdem erlaubt das Verfahren auch quantitative Auswertung indem die Höhe und Breite jeder Spitze in **Fig. 9** in Betracht gezogen wird, kann man mit einer bestimmten Genauigkeit ermitteln, welche Menge jeder detektierten Substanz in der ursprünglichen Mischung enthalten war.

[0064] Die Verwendung eines im Wesentlichen ebenen Lichtstrahls **930** und von gerichteten Detektoren stellt sicher, dass die Moleküle extrem präzise lokalisiert werden, wenn sie die Detektoren passieren. Während es natürlich möglich wäre, das beschriebene Verfahren mit Molekülen anzuwenden, die ein zu detektierendes Signal emittieren, wie etwa durch Radioaktivität oder UV-Licht, wäre die Präzision durch die zusätzliche Streuung und die Tatsache geringer, dass die Konzentration der Moleküle größer sein muss, um das gleiche Signal zu erzeugen, da das meiste abgestrahlte Licht oder Radioaktivität verlorengelht, da sie in alle Richtungen abgestrahlt werden. Indem UV-Absorption verwendet wird, um das Signal zu erzeugen, kann man viel kleinere Moleküle verwenden, so dass diese sich schneller bewegen und schneller separiert werden. Dies ermöglicht es, dass die Auslesezeit drastisch reduziert wird, möglicherweise eher auf Minuten gegenüber den herkömmlichen Stunden.

[0065] Es wird anzuerkennen sein, dass das beschriebene Verfahren andere Anwendungen als die Sequenzierung von Biomolekülen haben kann. Das allgemeine Verfahren erlaubt einem, nicht nur nicht individuelle molekulare Substanzen innerhalb eines Gemisches zu identifizieren, sondern auch ihre Anteile zu berechnen.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Identifizieren molekularer Substanzen innerhalb eines Gemisches, bei dem:

- (a) bewirkt wird, dass sich das Gemisch vorbei an einer beanstandeten Mehrzahl von Detektoren bewegt, wobei jeder Detektor I_k dazu ausgelegt ist, ein Signal S_k zu erzeugen, das repräsentativ für eine Eigenschaft des Gemisches ist, während es den Detektor I_k passiert,
- (b) das Signal $S_k(t)$ an jedem Detektor I_k wiederholt zu einer Mehrzahl von Zeiten $t = t_1, t_2, t_3 \dots$ gemessen wird, **dadurch gekennzeichnet**, dass
- (c) die Signale $S_k(t)$ nach der nominellen Geschwindigkeit $V_k(t)$ eingeteilt werden, der Geschwindigkeit,

die eine molekulare Substanz innerhalb des sich bewegenden Gemisches benötigt, um den Detektor I_k zu einer Zeit t zu erreichen, und

(d) molekulare Substanzen innerhalb des Gemisches nach Maßgabe der Peaks innerhalb der Datensammlung der eingeteilten Signale identifiziert werden.

2. Verfahren zum Identifizieren molekularer Substanzen innerhalb eines Gemisches, bei dem:

- (a) bewirkt wird, dass sich das Gemisch vorbei an einer beanstandeten Mehrzahl von Detektoren bewegt, wobei jeder Detektor I_k dazu ausgelegt ist, ein Signal S_k zu erzeugen, das repräsentativ für eine Eigenschaft des Gemisches ist, während es den Detektor I_k passiert,
- (b) das Signal $S_k(t)$ an jedem Detektor I_k wiederholt zu einer Mehrzahl von Zeiten $t = t_1, t_2, t_3 \dots$ gemessen wird, dadurch gekennzeichnet, dass
- (c) die Signale $S_k(t)$ im Geschwindigkeitsraum eingeteilt werden, und
- (d) molekulare Substanzen innerhalb des Gemisches nach Maßgabe von Peaks innerhalb der eingeteilten Signale im Geschwindigkeitsraum identifiziert werden.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, bei dem die Signale $S_k(t)$ vollständig gesammelt werden und dann in einem nachfolgenden Schritt eingeteilt werden.

4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, bei dem die Signale $S_k(t)$ eingeteilt werden, während sie gesammelt werden.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wenn abhängig von Anspruch 1, bei dem die nominelle Geschwindigkeit $V_k(t)$ auf Grund der Kenntnis der zurückgelegten Strecke vom Ursprungspunkt zum Detektor I_k und der vergangenen Zeit bestimmt wird.

6. Verfahren nach Anspruch 5, bei dem die nominelle Geschwindigkeit als Z_k/t berechnet wird, wobei Z_k die Entfernung vom Ursprungspunkt zu dem Detektor I_k und t die vergangene Zeit ist.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Signale $S_k(t)$ eingeteilt werden, indem die Werte innerhalb einer Mehrzahl von nominellen Geschwindigkeitsintervallen summiert werden.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Signale S_k repräsentativ für die Abschwächung von durch die Detektoren empfangenem Licht sind, wobei die Abschwächung ein Ergebnis der Lichtabsorption durch die zu identifizierenden molekularen Substanzen ist.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7,

bei dem die Signale S_k repräsentativ für Emissionen sind, die von den zu identifizierenden molekularen Substanzen empfangen werden.

10. Verfahren nach Anspruch 9, bei dem die Emissionen radioaktive Emissionen sind.

11. Verfahren nach Anspruch 9, bei dem die Emissionen UV-Emissionen sind.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Verhältnisse der molekularen Substanzen innerhalb des Gemisches nach Maßgabe der relativen Größe der Peaks innerhalb der eingeteilten Signale bestimmt werden.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

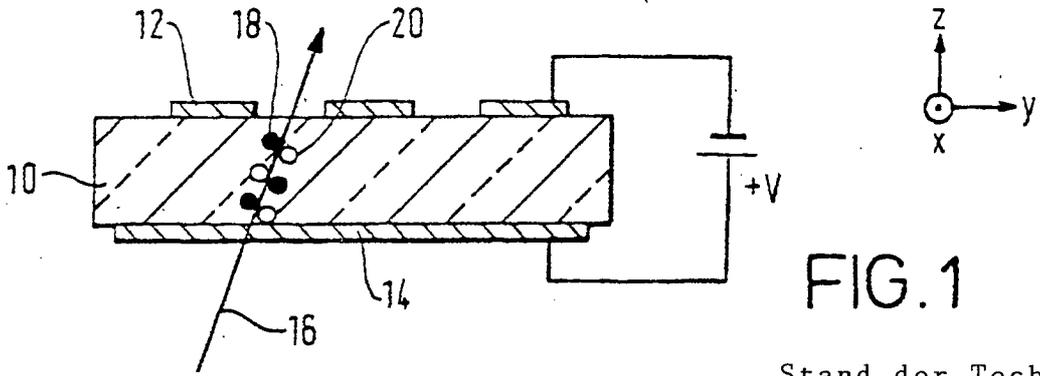


FIG. 1

Stand der Technik

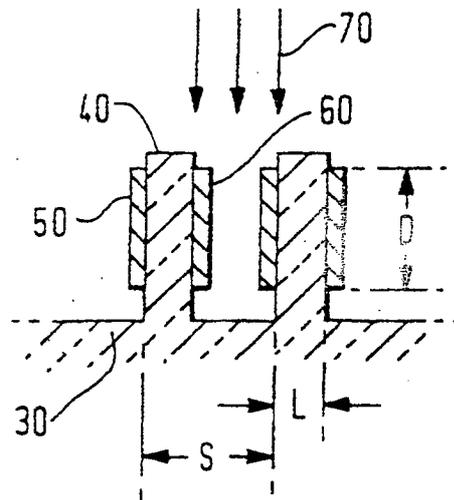


FIG. 2

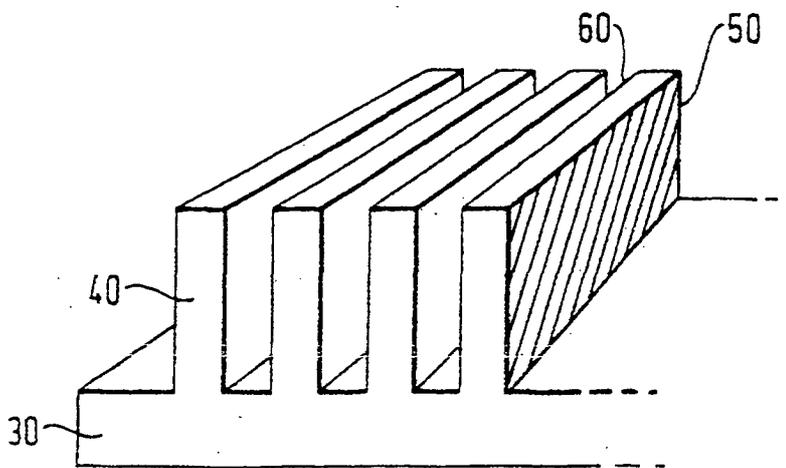


FIG. 3

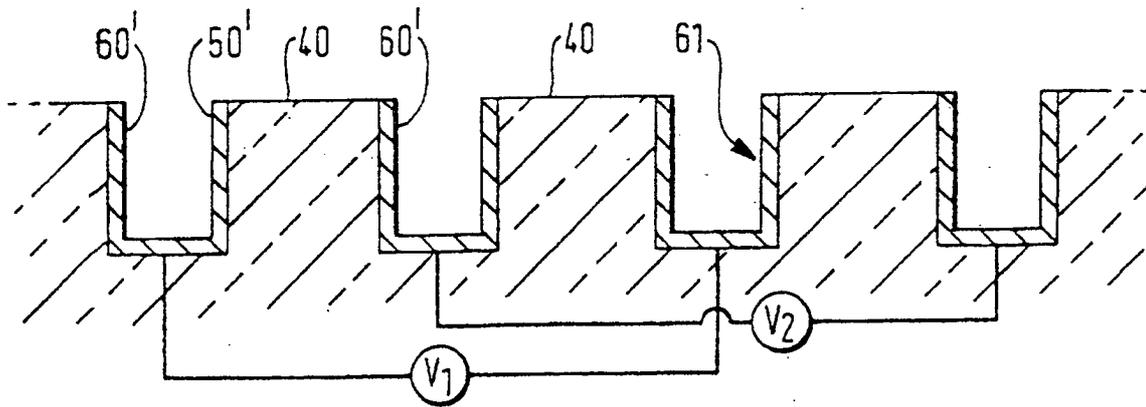


FIG. 4a

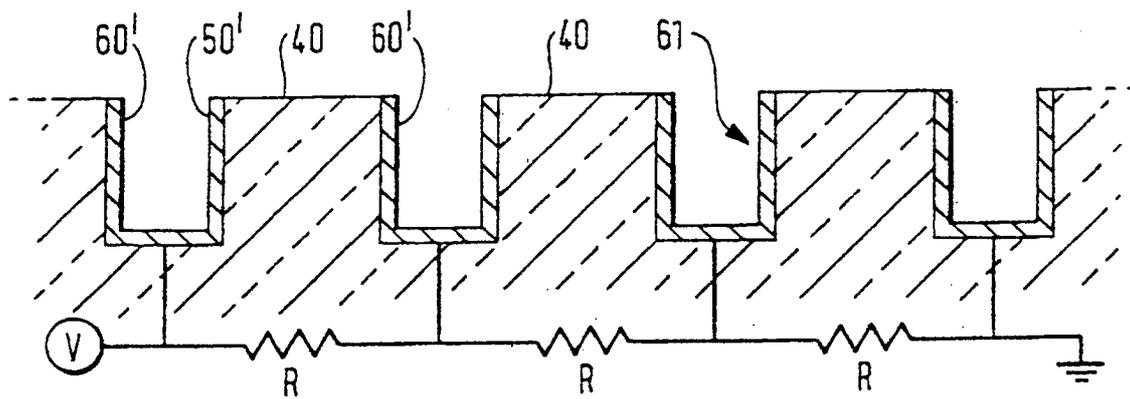


FIG. 4b

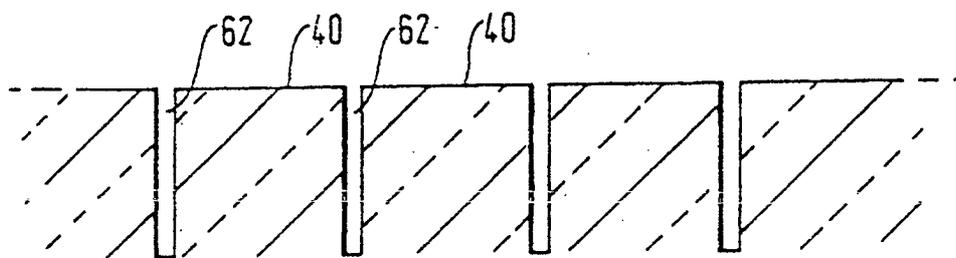


FIG. 5

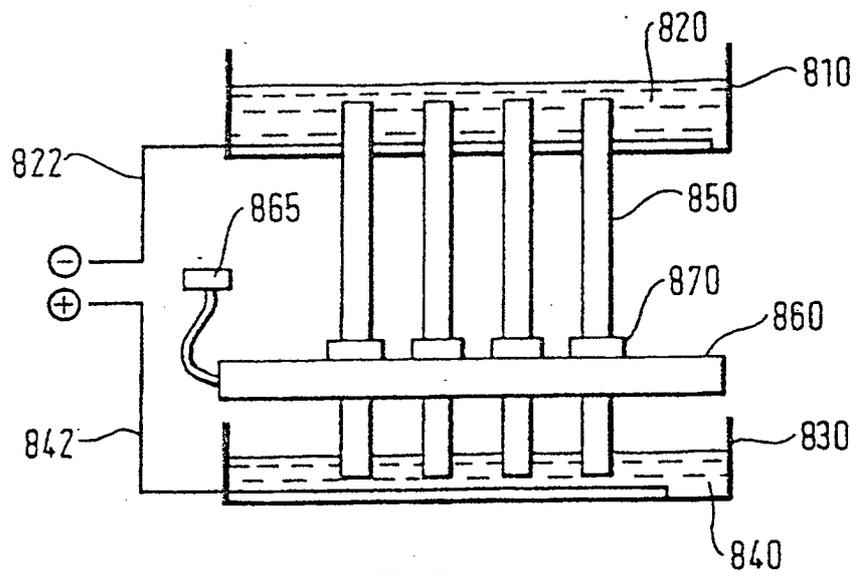


FIG. 6

FIG. 7

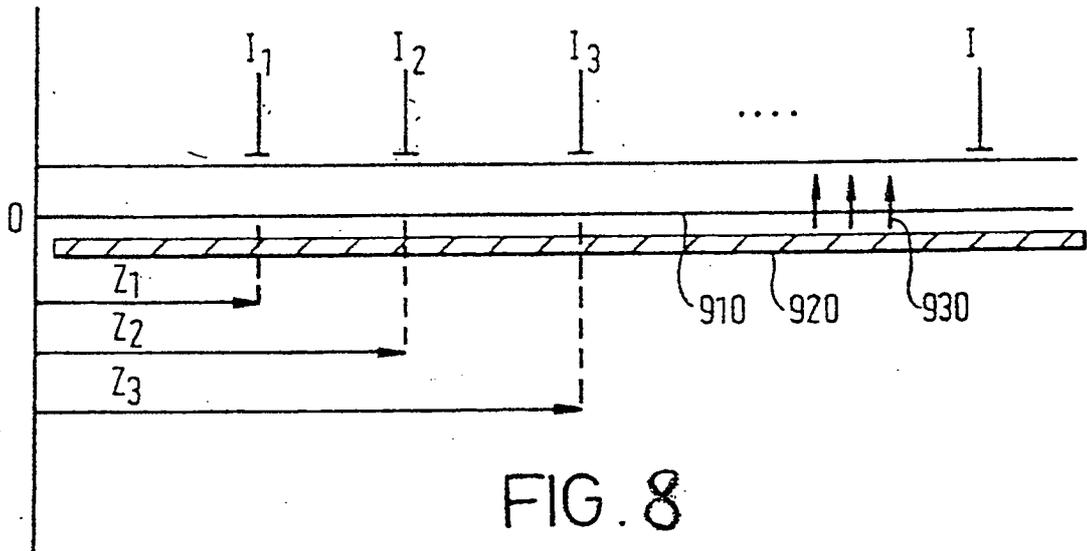
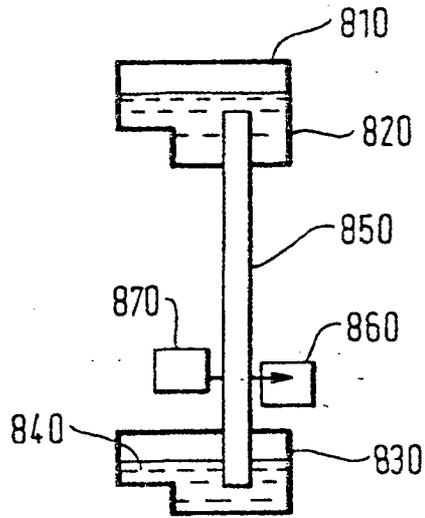


FIG. 8

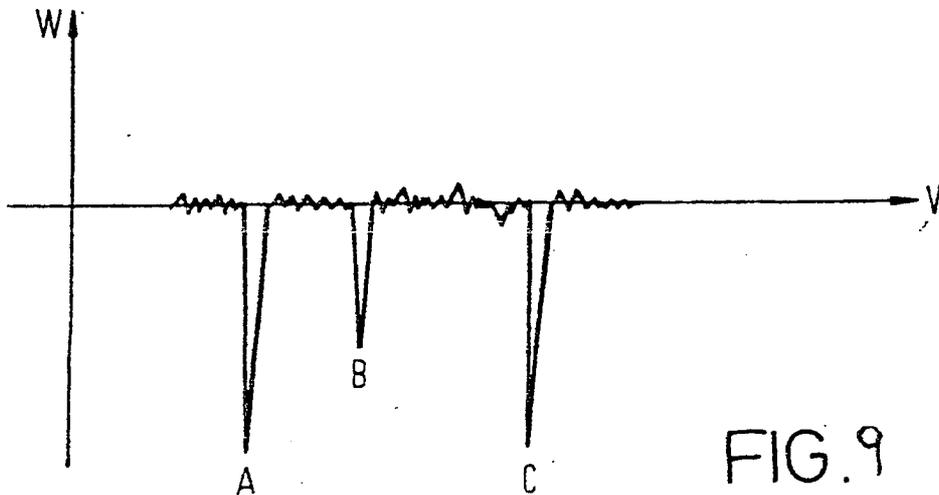


FIG. 9