

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
1. Juni 2006 (01.06.2006)

PCT

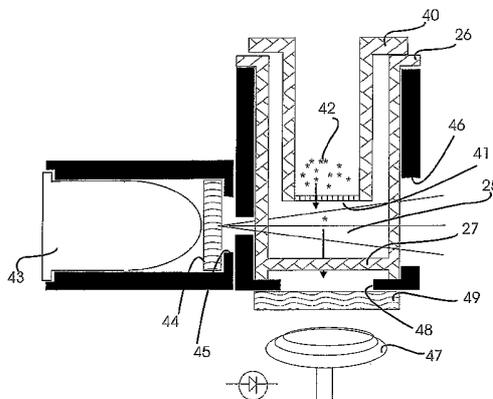
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2006/056168 A1**

- (51) Internationale Patentklassifikation:  
*G01N 21/64* (2006.01) *C12M 1/34* (2006.01)  
*G01J 3/44* (2006.01)
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2005/002067
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
17. November 2005 (17.11.2005)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:  
10 2004 056 787.5  
24. November 2004 (24.11.2004) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): HEINRICH HEINE UNIVERSITÄT DÜSSELDORF [DE/DE]; Universitätsstrasse 1, 40225 Düsseldorf (DE).
- (72) Erfinder; und  
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LEMOINE, Horst [DE/DE]; Himmelgeisterstrasse 222, 40225 Düsseldorf (DE). ROOD, Achim [DE/DE]; Viktoriastrasse 60, 42115 Wuppertal (DE).
- (74) Anwalt: REMUS, Alvaro; Mörsenbroicher Weg 200, 40470 Düsseldorf (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: DEVICE AND METHOD FOR THE MEASUREMENT OF FLUORESCENCE IN SEVERAL REACTION CHAMBERS

(54) Bezeichnung: VORRICHTUNG UND VERFAHREN ZUR MESSUNG VON FLUORESCENZ IN MEHREREN REAKTIONSRÄUMEN



(57) Abstract: The invention relates to a device and a method for measuring fluorescence in at least two reaction chambers (25). According to the invention, molecules, especially fluorescent dyes (42), which are placed inside the reaction chambers (25), are excited with light having a specific wavelength, and the light is directed to the reaction chambers via a light-guiding apparatus. According to the inventive method, the light emitted by the molecules is measured in each reaction chamber (25) independently of the other reaction chambers by at least one detection unit (47) that is assigned exclusively to the respective reaction chamber (25). In the inventive device, at least one detection unit (47) is disposed on each reaction chamber (25) in order to measure the light emitted by the molecules such that the fluorescence can be measured in each reaction chamber (25) independently of the other reaction chambers. The very compact device allows practically all imaginable biochemical reactions and cell-physiological events that are based on the use of fluorescence markers to be measured and monitored with precision and at a high resolution. Providing each individual measurement channel with a separate detection unit (47) advantageously makes it possible to monitor and quantitatively detect also very quick reactions.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Messung von Fluoreszenz in mindestens zwei Reaktionsräumen (25), wobei innerhalb der Reaktionsräume (25) befindliche Moleküle, insbesondere Fluoreszenzfarbstoffe (42), mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2006/056168 A1



AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

**(84) Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,

TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

---

werden und das Licht über eine Lichtleitvorrichtung zu den Reaktionsräumen (25) geleitet wird. Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird das durch die Moleküle emittierte Licht in jedem Reaktionsraum (25) unabhängig von den anderen Reaktionsräumen durch zumindest eine nur dem jeweiligen Reaktionsraum (25) zugeordnete Erfassungseinrichtung (47) gemessen. Bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist an jedem Reaktionsraum (25) jeweils zumindest eine Erfassungseinrichtung (47) zur Messung des durch die Moleküle emittierten Lichts angeordnet, so dass die Fluoreszenz in jedem Reaktionsraum (25) unabhängig von den weiteren Reaktionsräumen gemessen werden kann. Mit der sehr kompakten Vorrichtung können praktisch alle erdenklichen biochemischen Reaktionen und zellphysiologischen Ereignisse, die auf der Verwendung von Fluoreszenz-Markern basieren, präzise und mit hoher Auflösung gemessen und verfolgt werden. Aufgrund der Ausstattung jedes einzelnen Messkanals mit einer gesonderten Erfassungseinrichtung (47) können dabei in besonders vorteilhafter Weise auch sehr schnelle Reaktionen verfolgt und quantitativ erfasst werden.

## Vorrichtung und Verfahren zur Messung von Fluoreszenz in mehreren Reaktionsräumen

### 5 Hintergrund der Erfindung

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Messung von Fluoreszenz in mindestens zwei Reaktionsräumen, mit mindestens einer Lichtquelle zur Anregung innerhalb der Reaktionsräume befindlicher Moleküle mit Licht einer bestimmten Wellenlänge, wobei das Licht von der Lichtquelle über zumindest eine Lichtleitvorrichtung zu den Reaktionsräumen leitbar ist. Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Messung von Fluoreszenz in mindestens zwei Reaktionsräumen, bei dem innerhalb der Reaktionsräume befindliche Moleküle mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden, wobei das Licht über eine Lichtleitvorrichtung zu den Reaktionsräumen geleitet wird. Die Erfindung betrifft ferner eine Schaltungsanordnung zur Steuerung einer Vorrichtung und/oder eines Verfahrens zur Messung von Fluoreszenz in mindestens zwei Reaktionsräumen, mit mindestens einer Steuereinrichtung zum An- und Abschalten zumindest einer Lichtquelle zur Anregung innerhalb der Reaktionsräume befindlicher Moleküle mit Licht einer bestimmten Wellenlänge und mindestens einer Kontrolleinrichtung zur Verarbeitung von Messsignalen.

Vorrichtungen und Verfahren der eingangs genannten Art kommen vor allem in der zellphysiologischen, biochemischen, pharmakologischen und klinischen Forschung und Entwicklung zum Einsatz. Sie dienen beispielsweise dem quantitativen Nachweis von Fluoreszenz-Markern, mit denen Signalmoleküle (z. B.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$ ,  $\text{NO}$ ), signalgebende Prozesse (z. B. Membranpotentiale), Rezeptor-Ligand-Bindungen oder Zellzahlen (bei experimenteller Beeinflussung des Zellwachstums) bestimmt sowie eine Fülle von enzymatischen und immunologischen Nachweisverfahren durchgeführt werden können. Die Fluoreszenzfarbstoffe, mittels derer biochemische oder physiologische Experimente verfolgt bzw. gemessen werden können, werden dabei mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt, um gleichzeitig die Intensität des von den Molekülen emittierten Lichts zu messen. Aus der Intensität der gemessenen Fluoreszenz kann dann auf die Menge der

Fluoreszenzfarbstoffe geschlossen und somit der Verlauf einer biochemischen Reaktion verfolgt werden. Die Fluoreszenzfarbstoffe geben dabei nach Anregung der Fluoreszenz durch Licht geeigneter Wellenlänge die absorbierte Lichtenergie innerhalb von ca.  $10^{-6}$  Sekunden in Form von elektromagnetischer Strahlung längerer Wellenlänge wieder ab. Anregung und Messung müssen daher praktisch gleichzeitig erfolgen.

Da vor allem bei zellphysiologischen und pharmakologischen Versuchsreihen eine Vielzahl von Reaktionsansätzen gleichzeitig und in kurzer Zeit getestet werden müssen, finden bei solchen Versuchsreihen vorzugsweise Behältnisse mit mehreren in einer Reihe oder in mehreren parallelen Reihen angeordneten Reaktionsräumen Verwendung. Für zellphysiologische Untersuchungen haben sich beispielsweise Behältnisse mit einer oder zwei Reihen mit jeweils 8 oder 12 Reaktionsräumen als vorteilhaft erwiesen. Insbesondere bei HT-Analysen (HT = high throughput), bei denen eine Vielzahl von Proben in möglichst kurzer Zeit getestet werden soll, werden Behältnisse mit beispielsweise 96 oder 384 Reaktionsräumen verwendet. Bei derartigen Behältnissen spricht man in der Regel von Mehrlochplatten, Mikrotiterplatten oder Multiwells.

## 20 Stand der Technik

Vorrichtungen und Verfahren zur Messung von Fluoreszenz in mehreren Reaktionsräumen sind bereits bekannt. Die Firma Molecular Devices Corporation aus Sunnyvale in Kalifornien (USA) vertreibt beispielsweise eine Vorrichtung der eingangs genannten Art, bei der die Lichtquelle aus einem Argon-Ionen-Laser besteht, wobei der erzeugte Laserstrahl mittels eines halbdurchlässigen Umlenkspiegels auf alle Reaktionsräume einer 96- oder 384-well-Platte gestreut wird. Das von den Fluoreszenzfarbstoffen emittierte Licht wird von einer CCD-Kamera erfasst und für jeden Reaktionsraum separat ausgewertet. Diese bekannte Vorrichtung hat allerdings den Nachteil, dass zur Fokussierung des emittierten Lichts jedes einzelnen Reaktionsraums auf den entsprechenden Chip der CCD-Kamera eine aufwendige und teure Optik erforderlich ist. Darüber hinaus ist die Auflösung für einen einzelnen Reaktionsraum zu gering um sehr kleine Änderungen der Flu-

oreszenzintensität zu erfassen und darzustellen oder die Fluoreszenzsignale bei sehr schnellen Reaktionen aufzulösen.

Aus der DE 197 55 187 A1 ist ferner eine Vorrichtung zur Messung der Fluoreszenz einer Probe bekannt, die eine Messung der Fluoreszenz in einzelnen Reaktionsräumen einer Mikrotiterplatte ermöglicht. Eine Mikrotiterplatte ist dabei mit ihren nach oben offenen Reaktionsräumen auf einer verfahrbaren Einrichtung angeordnet, welche mittels dreier Schrittmotoren in drei Ebenen verstellbar ist. Die Vorrichtung weist ferner eine Fassung auf, in der eine stabförmige Lichtleiteinrichtung derart angeordnet ist, dass Licht zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe von oben über die Öffnung in einen Reaktionsraum gelangen kann. In der Fassung ist ferner ein Lichtleiter angeordnet, der das von den Fluoreszenzfarbstoffen emittierte Licht zu einem Strahlungsdetektor leitet, bei dem es sich vorzugsweise um einen Photomultiplier handelt. Um die Fluoreszenz in einem einzelnen Reaktionsraum messen zu können, muss die Mikrotiterplatte mittels der verfahrbaren Einrichtung derart bewegt werden, dass die einzelnen Reaktionsräume nacheinander unterhalb der Fassung und damit der Lichtleiteinrichtung und dem stabförmigen Lichtleiter ausgerichtet sind. Dies hat aber den Nachteil, dass eine aufwendige Mechanik zum Bewegen der verfahrbaren Einrichtung erforderlich ist, so dass hier eine insgesamt sehr voluminöse und störanfällige Vorrichtung vorliegt. Des weiteren geht die für den mechanischen Transport benötigte Zeit für die eigentliche Fluoreszenzmessung verloren.

#### Zusammenfassung der Erfindung

Es ist Aufgabe der Erfindung, die genannten Nachteile zu vermeiden und eine Vorrichtung der eingangs genannten Art zu schaffen, die kompakt ist und kostengünstig hergestellt werden kann, sowie ein Verfahren der eingangs genannten Art zur Verfügung zu stellen, das eine sehr schnelle Messung von Fluoreszenz in einzelnen Reaktionsräumen mit hoher Auflösung ermöglicht.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch eine Vorrichtung der eingangs genannten Art gelöst, bei der an jedem Reaktionsraum jeweils zumindest eine Erfassungseinrichtung zur Messung von durch die Moleküle emittiertem Licht angeord-

net ist. Dadurch, dass jeder Reaktionsraum mit einer Erfassungseinrichtung, beispielsweise einer Halbleiter-Photodiode, ausgestattet ist, kann die Fluoreszenz in jedem Reaktionsraum unabhängig von dem zweiten Reaktionsraum oder den weiteren Reaktionsräumen gemessen werden. Dies ermöglicht ein paralleles  
5 und/oder sequenzielles Messen aller Reaktionsräume in sehr kurzen Zeitintervallen, so dass die erfindungsgemäße Vorrichtung auch für die Messung sehr schneller Reaktionen geeignet ist. Darüber hinaus ist weder ein Bewegen einer Erfassungseinrichtung noch der Reaktionsräume erforderlich, so dass keine aufwendige Mechanik benötigt wird. Hierdurch wird einerseits die Geschwindigkeit aufeinanderfolgender Messungen zusätzlich erhöht und andererseits die Störanfälligkeit reduziert. Darüber hinaus ist eine sehr kompakte Bauweise möglich, so dass die erfindungsgemäße Vorrichtung einen sehr geringen Platzbedarf hat und praktisch überall aufgestellt werden kann, beispielsweise auch auf einem einfachen Labor-  
10 tisch. Dadurch, dass an jedem Reaktionsraum eine Erfassungseinrichtung angeordnet ist, werden zwischen dem jeweiligen Reaktionsraum und der Erfassungseinrichtung keine anspruchsvollen optischen Einrichtungen wie beispielsweise Umlenkspiegel oder optische Linsen benötigt, so dass die Herstellungskosten für die erfindungsgemäße Vorrichtung gering gehalten werden können. Die erfindungsgemäße Vorrichtung ist universell einsetzbar und dabei insbesondere auch  
15 für Forschungs- bzw. Entwicklungseinrichtungen jeglicher Größe, aber auch für kleinere Universitätslaboratorien geeignet. Mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung können praktisch alle erdenklichen biochemischen Reaktionen, die auf der Verwendung von Fluoreszenz-Markern basieren, präzise und mit hoher Auflösung gemessen werden. Aufgrund der Ausstattung jedes einzelnen Messkanals mit einer gesonderten Erfassungseinrichtung können dabei in besonders vorteilhafter  
20 Weise auch sehr schnelle Reaktionen, beispielsweise Änderungen des Membranpotentials lebender Zellen, gemessen und quantitativ erfasst werden.

In vorteilhafter Ausgestaltung der Erfindung ist vorgesehen, dass die Reaktions-  
30 räume jeweils einen lichtdurchlässigen Boden aufweisen und die jeweilige Erfassungseinrichtung unterhalb des Bodens des jeweiligen Reaktionsraumes angeordnet ist. Auf diese Weise wird unter Aufrechterhaltung der kompakten Bauweise ermöglicht, dass die Reaktionsräume von oben zugänglich bleiben, so dass ggf. noch Substanzen in den Reaktionsräumen gegeben werden können, nachdem die

Reaktionsräume bereits in die erfindungsgemäße Vorrichtung eingesetzt wurden. Darüber hinaus wird hierdurch grundsätzlich das Einsetzen und Entnehmen der Reaktionsräume in bzw. aus der erfindungsgemäßen Vorrichtung erleichtert.

5 In weiterer Ausgestaltung der Erfindung ist in vorteilhafter Weise vorgesehen, dass zwischen dem jeweiligen Reaktionsraum und der jeweiligen Erfassungseinrichtung zumindest eine optische Einrichtung angeordnet ist. Bei der optischen Einrichtung kann es sich beispielsweise um mindestens einen Filter, mindestens eine Blende, mindestens einen Spiegel oder mindestens eine Linse handeln. Da-  
10 bei ist es auch möglich und ggf. sinnvoll diese unterschiedlichen optischen Elemente beliebig miteinander zu kombinieren. Durch Einsetzen eines geeigneten Farbfilters (als Farbglasfilter oder Interferenzfilter) kann verhindert werden, dass das zur Anregung benutzte Licht in die Erfassungseinrichtung gelangt, so dass möglichst nur Fluoreszenzlicht detektiert wird. Das Vorsehen einer Linse zwischen  
15 dem Reaktionsraum und der Erfassungseinrichtung kann beispielsweise bei bestimmten Anwendungen vorteilhaft sein, wenn das von den Fluoreszenzfarbstoffen emittierte Licht zur Erhöhung der Sensitivität gebündelt werden muss. Ist ein Spiegel zwischen dem Reaktionsraum und der Erfassungseinrichtung angeordnet, so muss dieser für Licht bestimmter Wellenlänge, d. h. insbesondere das durch die  
20 Fluoreszenzfarbstoffe emittierte Licht, durchlässig sein, damit die Detektion des emittierten Lichts nicht gestört wird. Ein solcher Spiegel kann beispielsweise sinnvoll sein, um das von der Lichtquelle kommende Licht, d. h. das Anregungslicht, in den jeweiligen Reaktionsraum umzulenken. Wenn eine oder mehrere optische Einrichtungen zwischen dem Reaktionsraum und der Erfassungseinrichtung vor-  
25 gesehen sind, sollte die Erfassungseinrichtung vorzugsweise unmittelbar an der optischen Einrichtung angeordnet sein, damit die vorteilhafte kompakte Bauweise der erfindungsgemäßen Vorrichtung erhalten bleibt.

In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist die  
30 Erfassungseinrichtung eine Halbleiter-Photodiode bzw. sind die Erfassungseinrichtungen Halbleiter-Photodioden. Diese sind relativ kostengünstig, so dass die Herstellungskosten der erfindungsgemäßen Vorrichtung insgesamt, insbesondere auch bei Ausführungsformen mit einer größeren Anzahl von Reaktionsräumen bzw. Erfassungseinrichtungen, ebenfalls gering bleiben. Dies ist ein entscheidend-

der Vorteil gegenüber der Verwendung von beispielsweise CCD-Kameras oder Photomultipliern.

In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist die  
5 Lichtquelle seitlich zu den Reaktionsräumen angeordnet, so dass diese im Sinne  
der kompakten Bauweise der erfindungsgemäßen Vorrichtung in räumlicher Nähe  
zu den Reaktionsräumen angebracht werden kann, ohne die Detektion des emit-  
tierten Lichts und die Zugänglichkeit zu den Reaktionsräumen von oben zu stören.  
Das Licht sollte dabei vorzugsweise senkrecht oder quer zur Achse zwischen der  
10 Erfassungseinrichtung und dem Reaktionsraum in den jeweiligen Reaktionsraum  
leitbar sein. Dies hat den Vorteil, dass der Anregungslichtstrahl so ausgerichtet  
werden kann, dass das Auftreffen von Streulicht auf die Erfassungseinrichtung  
verhindert bzw. minimiert wird. Darüber hinaus ist diese Ausführungsform für be-  
sondere Verwendungen der erfindungsgemäßen Vorrichtung von Vorteil, bei-  
15 spielsweise für die Verwendung bei zellphysiologischen Untersuchungen mit so-  
genannten Hang-ins, vorauf weiter unten noch näher eingegangen wird.

Alternativ kann das Licht in vorteilhafter Ausgestaltung der Erfindung auch parallel  
zur Achse zwischen Erfassungseinrichtung und Reaktionsraum in den jeweiligen  
20 Reaktionsraum leitbar sein. Wenn beispielsweise physiologische Untersuchungen  
an lebenden Zellen durchgeführt werden, die am Boden des Reaktionsraums an-  
haften, dann muss auch die Einstrahlung des Anregungslichts in den Reaktions-  
raum von unten, d. h. parallel zur Detektionsrichtung erfolgen. Das kann bei-  
spielsweise dadurch realisiert werden, dass ein halbdurchlässiger Umlenkspiegel  
25 zwischen der Lichtleiteinrichtung und dem Reaktionsraum angeordnet ist. Dieser  
Umlenkspiegel lenkt den Anregungslichtstrahl von einer seitlich zu den Reaktions-  
räumen angeordneten Lichtquelle in den jeweiligen Reaktionsraum und lässt  
gleichzeitig das von den Fluoreszenzfarbstoffen emittierte Licht passieren. Vor-  
zugsweise wird das Licht in diesem Fall von einer zwischen der Lichtleiteinrichtung  
30 und dem Reaktionsraum angeordneten Linse gebündelt und parallelisiert, um stö-  
rendes Streulicht zu vermeiden. Durch das Vorsehen eines Farbfilters zwischen  
der Lichtleiteinrichtung und dem Reaktionsraum kann beispielsweise auch die  
Wellenlänge des Anregungslichts gewählt bzw. verändert werden. Eine oder meh-  
rere in den Strahlengang eingearbeitete Blende(n) bewirkt bzw. bewirken eine Op-

timierung des Interferenzprozesses beim Einsatz von Interferenzfiltern, eine Optimierung der Fokussierung durch eine Sammellinse und/oder die Reduzierung von auftretendem Streulicht. In Abhängigkeit von den Erfordernissen können selbstverständlich auch mehrere der genannten optischen Elemente oder eine beliebige  
5 Kombination derselben vorgesehen sein.

In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist die Lichtleiteinrichtung als einfacher Kanal oder röhrenförmig ausgebildet. Die Lichtleiteinrichtung kann alternativ aber auch beispielsweise mindestens eine Lichtleit-  
10 faser, vorzugsweise eine Glasfaser oder Kunststofffaser, sein. Dies ist insbesondere dann von Vorteil, wenn nur eine Lichtquelle vorgesehen ist, da in diesem Fall das von der Lichtquelle kommende Licht mittels mehrerer Lichtleitfasern auf die unterschiedlichen Reaktionsräume verteilt werden kann.

15 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist an jedem Reaktionsraum jeweils zumindest eine Lichtquelle angeordnet. Dies hat den Vorteil, dass jeder Reaktionsraum auch bezüglich des Anregungslichts von den anderen Reaktionsräumen bzw. dem anderen Reaktionsraum unabhängig ist, was sich vorteilhaft auf die Geschwindigkeit aufeinanderfolgender Messungen auswirkt. Bei  
20 dieser Ausführungsform ist also jeder Reaktionsraum mit einer Anregungslichtquelle und einer Erfassungseinrichtung ausgestattet, so dass eine separate Messung für jeden Reaktionsraum möglich ist. Diese vollständige Trennung einzelner, autarker Messkanäle hat den Vorteil, dass die erfindungsgemäße Vorrichtung sehr variabel einsetzbar ist und darüber hinaus sehr schnelle Messfolgen ermöglicht.

25 Um die Herstellungskosten der erfindungsgemäßen Vorrichtung gering zu halten, ist die Lichtquelle vorzugsweise eine Licht-emittierende Diode (LED). Um die Qualität des Anregungslichts zu erhöhen, kann die Lichtquelle aber beispielsweise auch eine Laserdiode sein. Stehen diese nicht zur Verfügung, kann die Lichtquelle  
30 auch ein Laser sein, was beispielsweise auch dann von Vorteil ist, wenn nur eine Lichtquelle vorgesehen ist. Wenn dagegen jeder Reaktionsraum mit einer eigenen Lichtquelle versehen ist, so sollten aus Kostengründen vorzugsweise LEDs oder Laserdioden verwendet werden.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß auch durch ein Verfahren der eingangs genannten Art gelöst, bei dem durch die Moleküle emittiertes Licht in jedem Reaktionsraum unabhängig von dem anderen Reaktionsraum oder den anderen Reaktionsräumen durch zumindest eine nur dem jeweiligen Reaktionsraum zugeordnete Erfassungseinrichtung gemessen wird. Das separate Erfassen des emittierten Lichts aus jedem einzelnen Reaktionsraum unabhängig von den anderen Reaktionsräumen hat den Vorteil, dass die einzelnen Messkanäle gleichzeitig oder in sehr schneller Abfolge aktiviert werden können. Das erfindungsgemäße Verfahren ist daher einerseits sehr flexibel und andererseits sehr schnell, so dass es insbesondere für zellphysiologische Untersuchungen geeignet ist.

Die Messungen können in vorteilhafter Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens also in den einzelnen Reaktionsräumen nacheinander durchgeführt werden, wobei die Anregung in sehr schneller Abfolge sequenziell erfolgen kann. Darüber hinaus ist es aber auch möglich in zumindest zwei oder allen Reaktionsräumen gleichzeitig zu messen, so dass die Versuchsdauer insgesamt reduziert werden kann.

In einer besonderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist vorgesehen, dass in zumindest einem Reaktionsraum in gleichbleibenden Abständen wiederholt gemessen wird. Die pulsartige Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe innerhalb eines Reaktionsraumes oder mehrerer Reaktionsräume ermöglicht das Messen in dem jeweiligen Reaktionsraum mit sehr hoher Frequenz, so dass hierbei auch sehr schnell ablaufende Reaktionen mit hoher Auflösung verfolgt werden können. Bei der Beschränkung auf einen Reaktionsraum kann dabei die zu verarbeitende Datenmenge in vergleichsweise geringem Rahmen gehalten werden.

In besonders vorteilhafter Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist ferner vorgesehen, dass die in der erfindungsgemäßen Vorrichtung implementierte Erfassungseinrichtung während einer einzelnen Messung eine Vielzahl von Messwerten erfasst und ein Mittelwert dieser Messwerte errechnet und angezeigt wird. Durch dieses Sampling-Verfahren in der Messvorrichtung werden Messschwankungen deutlich reduziert, ohne dass die im Datenverarbeitungsgerät (z. B. PC) anfallende Datenmenge vergrößert wird. Das Sampling Verfahren in der

Messvorrichtung benimmt natürlich nicht die Möglichkeit, insbesondere bei langsamen Kinetiken, im PC eine weitere Mittlung vorzunehmen.

In einer besonderen Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird jedem Reaktionsraum eine Lichtquelle zugeordnet und die Messung in einem Reaktionsraum parallel zum Einschalten der jeweiligen Lichtquelle eingeleitet. Dadurch, dass jeder Reaktionsraum mit einer Lichtquelle und einer Erfassungseinrichtung ausgestattet wird, kann eine vollständige apparative und elektronische Trennung der einzelnen Messkanäle durchgeführt werden. Hierdurch sind sehr flexible und schnelle Verfahrensabläufe möglich. Durch das Synchronisieren der Anregung und der Messung wird das erfindungsgemäße Verfahren darüber hinaus ökonomisch und die anfallende Datenmenge reduziert, da in jedem Kanal nur dann gemessen wird, wenn auch eine Anregung der Licht-emittierenden Moleküle erfolgt. Dabei können die Lichtquellen zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe wiederholt nacheinander an- und abgeschaltet und/oder in ihrer Amplitude verändert werden, so dass ein sequenzielles Anregen der Moleküle in den verschiedenen Reaktionsräumen erfolgt. Diese Art der salternierend-sequentiellen Anregung liefert diskontinuierlich, aber mit hoher Taktrate, Fluoreszenzmessdaten, so dass eine quasi-analoge Darstellung der Messdaten möglich wird. Durch diese Art einer salternierend-sequentiellen Anregung der Fluoreszenz kann Photobleaching und ein Aufheizen der Probe effektiv minimiert werden.

Alternativ können auch alle Reaktionsräume durch eine Lichtquelle mit Licht versorgt werden, wobei das Licht mittels separater Lichtleiteinrichtungen gleichmäßig auf die unterschiedlichen Reaktionsräume verteilt wird. Ein solches Verfahren ist vor allem dann vorteilhaft, wenn eine einzige, aber qualitativ hochwertige Lichtquelle verwendet werden soll oder muss.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß ebenfalls durch eine Schaltungsanordnung der eingangs genannten Art gelöst, bei der die Kontrolleinrichtung mit mindestens zwei Erfassungseinrichtungen zur Messung von durch die Moleküle emittiertem Licht, welche jeweils unabhängig voneinander an einem Reaktionsraum angeordnet sind, verbunden ist. Es liegt also nicht nur eine optische, sondern auch eine vollständige elektronische Trennung der unterschiedlichen Messkanäle vor, so

dass die Messung in jedem einzelnen Messkanal, d. h. in jedem Reaktionsraum, unabhängig gesteuert werden kann. Das Auslesen der Messdaten kann sowohl sequenziell als auch parallel erfolgen, so dass die erfindungsgemäße Schaltungsanordnung einen sehr flexiblen Verfahrensablauf ermöglicht. Der Vorteil der erfindungsgemäßen Schaltungsanordnung, die vorzugsweise in die erfindungsgemäße Vorrichtung integriert ist, liegt also darin, dass eine exakte elektronische Kanal-

5 trennung vorliegt, so dass Messungenauigkeiten durch Kanalübersprechen vermieden werden.

10 In besonderer Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Schaltungsanordnung ist vorgesehen, dass die Kontrolleinrichtung über mindestens eine Verstärkereinheit und/oder mindestens eine Verteilereinrichtung und/oder mindestens einen Analog-/Digital-Wandler mit den Erfassungseinrichtungen verbunden ist. Diese elektroni-

15 Messsignale erzeugt und verarbeiten werden können und darüber hinaus eine eindeutige Zuordnung zu den einzelnen Messkanälen erfolgen kann. Wenn eine Verteilereinrichtung, beispielsweise ein Multiplexer, vorgesehen ist, kann die Schaltungsanordnung deutlich vereinfacht werden, da beispielsweise nur noch ein Analog-/Digital-Wandler erforderlich ist. Allerdings ist in diesem Fall dann kein pa-

20 ralleles Messen in mehreren Kanälen möglich.

In vorteilhafter Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Schaltungsanordnung ist vorgesehen, dass eine Übermittlung der Messsignale von den Erfassungseinrichtungen zur Kontrolleinrichtung mittels der Verteilereinrichtung durch die Kontroll-

25 einrichtung steuerbar ist. Über die Verteilereinrichtung kann die Kontrolleinrichtung also steuern, welcher Messkanal aktiviert wird, d. h. aus welcher Erfassungseinrichtung Messdaten ausgelesen werden. Dies hat den Vorteil, dass nur der Messkanal aktiv ist, an dem tatsächlich Messdaten ermittelt werden, d. h. es wird nur jeweils die Erfassungseinrichtung ausgelesen, die dem Reaktionsraum zugeordnet

30 ist, in dem die Fluoreszenzfarbstoffe angeregt werden. Die anderen Messkanäle werden dagegen nicht ausgelesen, so dass insgesamt die zu verarbeitende Datenmenge reduziert wird.

In besonders vorteilhafter Ausgestaltung der Erfindung ist vorgesehen, dass die Kontrolleinrichtung mit der Steuereinrichtung oder den Steuereinrichtungen verbunden ist und/oder dass die Steuereinrichtung(en) mittels eines Triggersignals schaltbar und gleichzeitig in ihrer Amplitude veränderbar ist bzw. sind. Die Kontrolleinrichtung steuert in dieser Ausführungsform also nicht nur das Auslesen der Messdaten aus den einzelnen Messkanälen, sondern auch das An- und Abschalten sowie die Amplitudenmodulation der Anregungslichtquellen. Auf diese Weise kann die Anregungsintensität sowie das Einschalten der Anregungslichtquelle für einen bestimmten Reaktionsraum optimal mit dem Auslesen der Messdaten aus der entsprechenden Erfassungseinrichtung synchronisiert werden. Die Steuereinrichtungen sind vorzugsweise elektronische Steuereinrichtungen, beispielsweise Transistoren.

Die Erfindung umfasst ferner zumindest ein Programmelement, das mit einer elektronischen Datenverarbeitungseinrichtung lesbar und ausführbar ist und das, wenn es ausgeführt wird, dazu geeignet ist, die erfindungsgemäße Vorrichtung, das erfindungsgemäßen Verfahren und/oder die erfindungsgemäße Schaltungsanordnung zu steuern. Die Erfindung umfasst ferner ein entsprechendes Speichermedium, das mittels einer elektronischen Datenverarbeitungseinrichtung lesbar ist und auf dem die genannten Programmelemente gespeichert sind. Erfindungsgemäß ist ein Programmelement in der Kontrolleinrichtung implementiert, so dass die erfindungsgemäße Vorrichtung bzw. Schaltungsanordnung völlig autark, d. h. ohne die Anbindung an ein externes Datenverarbeitungsgerät (z. B. einen PC), betrieben werden kann. Es ist ferner ein weiteres Programmelement vorgesehen, das auf einem externen Datenverarbeitungsgerät (z. B. PC) installiert ist und unter einem mit einem gängigen Betriebssystem arbeitenden Anwendungsprogramm läuft. Die beiden erfindungsgemäßen Programmelemente korrespondieren und sind aufeinander abgestimmt, so dass alle Messparameter einfach eingestellt werden können. Darüber hinaus sind die bei einer Messung anfallenden Datenmengen so gering (ca. 100 kB für 12 Messkanäle bei 60 min. Messdauer), dass diese in einem in der erfindungsgemäßen Vorrichtung angeordneten Speicher abgelegt werden können und erst nach Abschluss des Experiments zur weiteren Verarbeitung auf einen externen Speicher (z.B. in einem PC) übertragen werden müssen. Die erfindungsgemäße Vorrichtung bzw. Schaltungsanordnung

kann also auch während einer Messung ohne die Anbindung an ein externes Datenverarbeitungsgerät (z. B. einen PC) betrieben werden, so dass ein sehr flexibler und unproblematischer Einsatz möglich ist.

- 5 Die Erfindung wird im Weiteren anhand der Figuren beispielhaft näher erläutert.

#### Kurze Beschreibung der Abbildungen

Es zeigt:

10

Figur 1 eine perspektivische Ansicht einer erfindungsgemäßen Vorrichtung mit 12 Messkanälen und Lichtanregung quer zur Detektionsrichtung,

15

Figur 2 eine perspektivische Ansicht einer erfindungsgemäßen Vorrichtung mit 8 Messkanälen und einem Kontrollkanal sowie Lichtanregung quer zur Detektionsrichtung,

20

Figur 3 einen Längsschnitt durch einen Messkanal einer besonderen Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung mit Anregung parallel zur Detektionsrichtung,

25

Figur 4 einen Längsschnitt durch einen Messkanal einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung mit Anregung quer zur Detektionsrichtung,

30

Figur 5a ein Ablaufdiagramm einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens vom Einschalten der erfindungsgemäßen Vorrichtung bis zum Start der Messung,

Figur 5b ein Ablaufdiagramm einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens vom Start der Messung bis zum Programmende,

Figur 6 ein Prinzip-Blockdiagramm einer besonderen Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Schaltungsanordnung und

Figur 7 ein beispielhaftes Messprotokoll eines mit einer erfindungsgemäßen Vorrichtung durchgeführten zellphysiologischen Experiments.

#### Beschreibung verschiedener und bevorzugter Ausführungsformen der Erfindung

5

Figur 1 zeigt eine perspektivische Ansicht einer erfindungsgemäßen Vorrichtung 1 mit 12 Messkanälen. Die Vorrichtung 1 besteht aus einem Gehäuse 2, das in erster Linie der Aufnahme der erfindungsgemäßen Schaltungsanordnung und der Erfassungseinrichtungen dient. Da die erfindungsgemäße Vorrichtung 1 keine bewegbaren Teile enthält und somit keine aufwendige Mechanik erforderlich ist, ist das Gehäuse 2 bzw. die Vorrichtung 1 sehr kompakt und kann praktisch überall, beispielsweise auch in S1-, S2- oder Isotopen-Labors, aufgestellt werden. Die erfindungsgemäße Vorrichtung 1 kann dabei so kompakt hergestellt werden, dass sie kleiner als ein herkömmlicher Schuhkarton ist. Die erfindungsgemäße Vorrichtung 1 weist ferner einen ersten Block 3 und einen zweiten Block 4 auf, welche jeweils auf das Gehäuse 2 aufgeschraubt werden können. Die erfindungsgemäße Vorrichtung 1 umfasst ferner einen hier nicht dargestellten Deckel, der den oberen Bereich des Gehäuses 2 und insbesondere den ersten Block 3 und den zweiten Block 4 abdeckt, damit kein Tageslicht auf die Erfassungseinrichtungen treffen kann. In vorteilhafter Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Vorrichtung 1 kann der Deckel lichtundurchlässige Öffnungen aufweisen, über die Substanzen bzw. Lösungen in die einzelnen Reaktionsräume gegeben werden können. Diese Ausführungsform ist vor allem dann vorteilhaft, wenn sehr schnelle Reaktionen gemessen werden sollen, da hier eine durch das Schließen des Deckels bedingte Verzögerung zwischen der Zugabe der Substanzen und dem Beginn der Messung vermieden werden kann. Darüber hinaus ermöglicht diese besondere Ausgestaltung des Deckels eine Zugabe von Substanzen während einer laufenden Messung.

30 Das Gehäuse 2 weist an seiner oberen Wand 5 eine Ausnehmung 6 und insgesamt 12 Filter 7.1 – 7.12 auf. Die Ausnehmung 6, die im zusammengesetzten Zustand von dem ersten Block 3 abgedeckt wird, dient der Aufnahme der Elektronik für die Anregungslichtquellen, beispielsweise einer entsprechenden Platine. Die Filter 7.1 – 7.12, bei denen es sich um Farbfilter, beispielsweise Farbglasfilter als

Langpass oder Interferenzfilter als Bandpass, handelt, decken Öffnungen ab, durch welche das von Fluoreszenzfarbstoffen emittierte Licht zu den hier nicht sichtbaren Erfassungseinrichtungen gelangt. Die Filter 7.1 – 7.12 sind dabei, ggf. im Block, auswechselbar, so dass die Wellenlänge des zu erfassenden Lichtes (Emission) durch einfachen Filterwechsel angepasst werden kann, wenn die Wellenlänge des anregenden Lichtes (Excitation) verändert wird. Unmittelbar unterhalb jedes Filters 7.1 – 7.12 ist eine Erfassungseinrichtung, beispielsweise eine Halbleiter-Photodiode, angeordnet. Jeder Messkanal weist folglich eine nur ihm zugeordnete Erfassungseinrichtung auf, so dass sowohl bei der Detektion als auch bei der Excitation eine vollständige Kanaltrennung vorliegt. Der zweite Block 4 weist 12 in Reihe angeordnete Durchbrüche 8.1 – 8.12 auf, die jeweils der Aufnahme eines Reaktionsraumes dienen. Der zweite Block 4 wird derart auf das Gehäuse 2 aufgeschraubt, dass die Durchbrüche 8.1 – 8.12 mit den Filtern 7.1 – 7.12 bzw. den darunter liegenden Durchbrüchen und Erfassungseinrichtungen zur Deckung kommen. Somit ist jedem Reaktionsraum in dieser Ausführungsform exakt eine Erfassungsvorrichtung zugeordnet, so dass die Messung der Fluoreszenz in einem einzelnen Reaktionsraum unabhängig von den anderen Reaktionsräumen erfolgen kann. Bei den hier nicht dargestellten Reaktionsräumen handelt es sich üblicherweise um kleine Kunststoff- oder Glasgefäße, die in Form einer Reihe miteinander verbunden sind. Solche Reaktionsbehältnisse werden üblicherweise als Muliwells oder Multiwell-Strips bezeichnet. In die Durchbrüche 8.1 – 8.12 der erfindungsgemäßen Vorrichtung 1 können sowohl einzelne Reaktionsräume als auch eine Reihe von Reaktionsräumen eingesetzt werden. Der zweite Block 4 weist an seiner dem ersten Block 3 zugewandten Seite ferner Lichteintrittsöffnungen 9.1 – 9.12 auf, durch die das Anregungslicht in die jeweiligen Durchbrüche 8.1 – 8.12 und damit in die entsprechenden Reaktionsräume gelangen kann. Der zweite Block 4 weist ferner Lichtfallen 10.1 – 10.12 auf, bei denen es sich um Bohrungen handelt, durch die das in die Reaktionsräume eingeleitete Anregungslicht wieder austreten kann. Durch diese vorteilhafte Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Vorrichtung 1 kann durch das Anregungslicht verursachtes Streulicht verhindert bzw. minimiert werden, so dass die Messung hiervon nicht negativ beeinflusst werden kann. Innerhalb des ersten Blocks 3 sind 12 Lichtquellen 11.1 – 11.12 in Reihe angeordnet. Bei den Lichtquellen 11.1 – 11.12 handelt es sich vorzugsweise um LEDs, die kostengünstig sind und eine engbandige (beispielsweise

20 nm Halbwertsbreite) Prä-Selektion der gewünschten Lichtfarbe bei guter Lichtqualität liefern. Das von den Lichtquellen 11.1 – 11.12 ausgesendete Licht tritt durch die Öffnungen 12.1 – 12.12 aus dem ersten Block 3 aus und gelangt über die Lichteintrittsöffnungen 9.1 – 9.12 in die jeweiligen Reaktionsräume in den

5 Durchbrüchen 8.1 – 8.12. Daher müssen sich die Öffnungen 12.1 – 12.12 und die Lichteintrittsöffnungen 9.1 – 9.12 beim Befestigen der Blöcke 3, 4 auf dem Gehäuse 2 in Deckung befinden. Beim Befestigen des ersten Blocks 3 auf dem Gehäuse 2 muss darüber hinaus eine Verbindung zwischen den Lichtquellen 11.1 – 11.12 und der in der Ausnehmung 6 angeordneten Steuerelektronik hergestellt werden.

10 Die Blöcke 3, 4 sind auswechselbar, so dass die erfindungsgemäße Vorrichtung 1 variabel an unterschiedliche Anwendungen angepasst werden kann. Darüber hinaus sollten alle Teile der Vorrichtung 1, die mit Licht in Berührung kommen, aus schwarz-eloxiertem Aluminium bestehen, damit Streulicht effektiv absorbiert wird.

15 Aus Figur 1 wird deutlich, dass die erfindungsgemäße Vorrichtung 1 sehr kompakt ist und darüber hinaus jeder einzelne Messkanal vollständig ausgestattet und somit autark ist, so dass eine apparative Trennung der einzelnen Messkanäle vorliegt. In jedem Messkanal bzw. jedem Reaktionsraum kann daher die Fluoreszenz unabhängig von den anderen Reaktionsräumen gemessen werden. Selbst bei einer

20 salternierend-sequenziellen Messung, d. h. einem nacheinander erfolgenden An- und Abschalten der Lichtquellen 11.1 – 11.12 und entsprechendem Auslesen der Messdaten aus den hier nicht dargestellten Erfassungseinrichtungen, kann folglich sehr schnell und in kurzen Abständen gemessen werden, da kein mechanisches Umschalten von einem Messkanal auf den nächsten erfolgen muss und

25 die einzelnen Bauteile oder die Reaktionsräume nicht mechanisch bewegt werden müssen. Selbstverständlich können die Messkanäle auch in zwei parallelen oder mehreren Reihen angeordnet sein, so dass auch Mehrlochplatten mit einer großen Anzahl von Reaktionsräumen mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung verwendet werden können.

30

Figur 2 zeigt eine perspektivische Ansicht einer weiteren Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Vorrichtung 15, die in ihrem Aufbau im wesentlichen der Vorrichtung 1 gemäß Figur 1 entspricht. Die Vorrichtung 15 unterscheidet sich von der Vorrichtung 1 gemäß Figur 1 im wesentlichen dadurch, dass hier nicht 12, sondern

8 Messkanäle 16.1 – 16.8 vorgesehen sind. Jeder Messkanal 16.1 – 16.8 weist dabei eine Erfassungsvorrichtung auf, so dass die Fluoreszenz in jeden Reaktionsraum separat gemessen werden kann. Auch hier ist jedem Reaktionsraum eine eigene Lichtquelle 17.1 – 17.8 zugeordnet, so dass jeder Messkanal 16.1 – 16.8 autark arbeiten und separat angesteuert werden kann. Die erfindungsgemäße Vorrichtung umfasst ferner einen zusätzlichen Messkanal 18 mit einem entsprechenden Durchbruch 19 zur Aufnahme eines zusätzlichen Reaktionsraumes und einer eigenen Lichtquelle 20. Dieser zusätzlichen Messkanal 18 dient Kontrollmesszwecken, beispielsweise in einem zellfreien Kompartiment zur Dokumentation von Photobleaching oder der Stabilität des Fluoreszenzfarbstoffes.

Figur 3 zeigt einen Längsschnitt durch die Bauteile eines einzelnen Messkanals. Die Anordnung dient der Messung der Fluoreszenz von entsprechend anregbaren Molekülen innerhalb des Reaktionsraumes 25, insbesondere bei zellphysiologischen Untersuchungen an adhärennten Zellen. Der Reaktionsraum 25 ist zylindrisch ausgebildet und weist eine Seitenwand 26 und einen lichtdurchlässigen Boden 27 auf. Die Seitenwand 26 und der Boden 27 bestehen vorzugsweise aus einem transparenten Material, beispielsweise Kunststoff oder Glas. Während der Boden 27 lichtdurchlässig sein muss, damit das von den Fluoreszenzfarbstoffen emittierte Licht nach unten austreten kann, könnte es für bestimmte Anwendungen alternativ vorteilhaft sein, die Seitenwand 26 aus einem lichtundurchlässigen Material herzustellen. Dies ist allerdings nur dann möglich, wenn wie im vorliegenden Beispiel die Einstrahlung des Anregungslichts von unten über den Boden 27 erfolgt.

Seitlich und unterhalb vom Reaktionsraum 27 ist eine Lichtquelle 28 angeordnet, bei der es sich im vorliegenden Ausführungsbeispiel um eine Licht-emittierende Diode (LED) handelt. Das von der Lichtquelle 28 emittierte Licht tritt durch den Filter 29, die Blende 30 und die Linse 31 in die Lichtleiteinrichtung 32 aus. Bei dem Filter 29 kann es sich beispielsweise um einen Farbfilter handeln, der eine Auswahl der Wellenlänge des anregenden Lichts ermöglicht. Mittels der Linse 31 wird das von der Lichtquelle 28 emittierte Licht parallelisiert, so dass die Messung störendes Streulicht minimiert wird. Bei der Lichtleiteinrichtung 32 handelt es sich im vorliegenden Ausführungsbeispiel um einen einfachen Kanal, der vorzugsweise

zumindest an seinen Innenflächen schwarz gefärbt ist, damit ggf. auftretendes Streulicht absorbiert wird. Das von der Lichtquelle 28 emittierte Licht wird in der Lichtleitrichtung 32 durch einen Spiegel 33 umgelenkt und durch die Blende 34 von unten in den Reaktionsraum 25 geleitet. Das Anregungslicht tritt dabei durch das Schutzglas 35 und den Boden 27 hindurch. Das Schutzglas 35 dient dem Schutz der optischen Elemente unterhalb des Reaktionsraums 25, beispielsweise vor einem Eindringen von Flüssigkeit. Das Schutzglas 35 und der Boden 27 sind in Bezug auf die Längsachse des Reaktionsraumes 25 geneigt angeordnet, so dass das einfallende Licht nicht senkrecht, sondern schräg auf die äußeren Oberflächen des Schutzglases 35 und des Bodens 27 trifft. Durch diese Maßnahme können Reflektionen an den genannten Oberflächen in eine Richtung gelenkt werden, die von der Erfassungseinrichtung nicht erfassbar ist. So kann beispielsweise bei einer Neigung mindestens einer der genannten Oberflächen in einem Winkel von  $5^\circ - 15^\circ$ , vorzugsweise  $8^\circ - 10^\circ$ , die Reflektion um mehr als zwei Drittel reduziert werden. Eine weitere Verminderung störender Reflektionen kann durch eine Anti-Reflexbeschichtung der genannten Oberflächen erreicht werden.

Das in den Reaktionsraum 25 geleitete Licht hat eine bestimmte Wellenlänge, beispielsweise 488 nm, so dass geeignete Moleküle innerhalb des Reaktionsraums 25 zur Fluoreszenz angeregt werden. Das durch die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe emittierte Licht tritt u. a. durch den Boden 27 und das Schutzglas 35 nach unten aus dem Reaktionsraum 25 aus. Da es sich bei dem Spiegel 33 um einen halbdurchlässigen Spiegel handelt, kann das von den Fluoreszenzfarbstoffen emittierte Licht durch die Erfassungseinrichtung 36 detektiert werden. Das zu messende Licht tritt dabei zuvor durch den Filter 37, bei dem es sich beispielsweise um einen Farbglasfilter als Langpass oder einen Interferenzfilter als Bandpass handelt. Bei der Erfassungseinrichtung 36 handelt es sich vorzugsweise um eine einfache Halbleiter-Photodiode. Da jeder Messkanal eine eigene Erfassungseinrichtung aufweist, sollten diese relativ preisgünstig sein, damit die Herstellungskosten für die gesamte Vorrichtung gering bleiben. Bei der dargestellten Ausführungsform wird das von der Lichtquelle ausgesendete Licht, d. h. das Anregungslicht, parallel zu der Achse zwischen Erfassungseinrichtung 36 und Reaktionsraum 25 von unten in den Reaktionsraum 25 geleitet. Die Richtung des Anregungslichts verläuft also genau entgegengesetzt zur Detektionsrichtung. Auf diese Weise wird

eine Störung der Messung durch das Anregungslicht vermieden. Darüber hinaus wird durch die gezeigte Anordnung das Auftreten von störendem Streulicht deutlich minimiert. Dadurch dass die Erfassungseinrichtung 36 unmittelbar unterhalb der optischen Einrichtungen, d. h. insbesondere des Filters 37 und des Spiegels 33, angeordnet ist und sich die Lichtquelle 28 ebenfalls in unmittelbarer Nähe des Spiegels 33 seitlich zur Achse zwischen Erfassungseinrichtung 36 und Reaktionsraum 25 befindet, sind die optischen Signalverluste sowohl bei der Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe als auch bei der Detektion des emittierten Lichts sehr gering und es entsteht eine sehr kompakte Anordnung, so dass die erfindungsgemäße Vorrichtung sehr sensitiv ist und insgesamt ebenfalls sehr kompakt gebaut werden kann. Darüber hinaus ist in dem hier dargestellten Ausführungsbeispiel der Messkanal komplett ausgestattet, d. h. sowohl mit einer eigenen Erfassungseinrichtung 36 als auch einer eigenen Lichtquelle 28 versehen. Hierdurch ist eine vollständige Trennung zwischen den einzelnen Messkanälen möglich. Jeder Messkanal kann völlig autark betrieben werden, so dass die erfindungsgemäße Vorrichtung insgesamt sehr schnell, genau und flexibel messen kann.

Figur 4 zeigt einen Längsschnitt durch einen Messkanal einer alternativen Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung, bei der das Anregungslicht orthogonal zur Detektionsrichtung in den Reaktionsraum 25 geleitet wird. Der Reaktionsraum 25 wird durch die Seitenwand 26 und den Boden 27 gebildet und entspricht somit dem Reaktionsraum 25 gemäß Figur 3. In den Reaktionsraum 25 ist zusätzlich ein Zellkultureinsatz 40 eingehängt, welcher eine filterartige Bodenfläche 41 aufweist. Auf der filterartigen Bodenfläche 41 können lebende Zellen wachsen und einen sogenannten Monolayer (geschlossenen Zellrasen) bilden. Mit Hilfe eines solchen Zellkultureinsatzes 40, einem sogenannten Hang-in, kann beispielsweise der Transport von Tracermolekülen durch Endothel-Monolayer untersucht werden, wobei diese Tracermoleküle sowohl aufgrund ihrer Größe und Form einer regulierten Diffusion unterliegen als auch aufgrund einer Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff 42 zur Fluoreszenz angeregt werden können. Unter bestimmten Bedingungen gelangen dabei diese Tracermoleküle mit den Fluoreszenzfarbstoffen 42 durch den Zellrasen und die filterartige Bodenfläche 41 in den Reaktionsraum 25 und können dort mittels der erfindungsgemäßen Vorrichtung detektiert werden. Zu diesem Zweck ist seitlich vom Reaktionsraum 25 eine Licht-

quelle 43 angeordnet, im vorliegenden Ausführungsbeispiel eine LED. Die Lichtquelle 43 emittiert Licht, das durch den Filter 44, die Blende 45 und die, zumindest an dieser Stelle lichtdurchlässige, Seitenwand 26 in den Reaktionsraum 25 gelangt. Durch dieses Licht können im Reaktionsraum 25 befindliche Fluoreszenzfarbstoffe 42 angeregt werden. Das Anregungslicht tritt auf der der Blende 45 gegenüberliegenden Seite des Reaktionsraumes 25 durch die Öffnung 46 wieder aus und gelangt in eine sogenannte Lichtfalle, bei der es sich beispielsweise um einen einfachen dunklen Kanal handeln kann. Überraschenderweise hat sich nämlich herausgestellt, dass eine solche Lichtfalle geeignet ist, das Auftreten von Streulicht innerhalb des Messsystems und somit die störenden Einflüsse des Anregungslichts effektiv zu verringern.

Unmittelbar unter dem Boden 27 des Reaktionsraums 25 ist eine Erfassungseinrichtung 47 angeordnet. Das von den Fluoreszenzfarbstoffen 42 innerhalb des Reaktionsraumes 25 emittierte Licht tritt durch den transparenten Boden 27, die Blende 48 und den Filter 49 aus und wird durch die Erfassungsvorrichtung 47 detektiert. Anhand der Intensität der hier gemessenen Fluoreszenz kann also beispielsweise die Konzentration der durch einen Zellmonolayer hindurch diffundierten fluoreszierenden Tracermoleküle (Fluxmarker) bestimmt werden. Durch die besondere Anordnung der Lichtquelle 43 und des Photodetektors 47 ist auch bei dieser Ausführungsform eine kompakte Bauweise gewährleistet. Darüber hinaus sind, wie auch bei der Ausführungsform gemäß Figur 3, die Strahlungswege sowohl des Anregungslichts als auch des emittierten Fluoreszenzlichts sehr kurz, was sich positiv auf die Sensitivität der Fluoreszenzmessung auswirkt und eine deutliche Reduzierung des Streulicht bewirkt.

Ein besonderer Vorteil der erfindungsgemäßen Vorrichtung liegt darin, dass ein Benutzer durch den einfachen Austausch einzelner Bauteile, beispielsweise der Blöcke 3, 4 gemäß Figur 1, der Filter 7.1 – 7.12 gemäß Figur 1 oder des Teilerkopfes mit dem halbdurchlässigen Spiegel 33 gemäß Figur 3, die Lichtfarbe für die Fluoreszenzfarbstoffe oder den Betriebsmodus (Anregung quer zur Detektionsrichtung gemäß den Figuren 1, 2 und 4 oder Anregung parallel zur Detektionsrichtung gemäß Figur 3) wechseln kann. Hierdurch ist die erfindungsgemäße Vorrichtung sehr flexibel und trägt zur Kostenminimierung bei.

Figur 5a zeigt ein Ablaufdiagramm einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens für den Zeitraum vom Einschalten einer erfindungsgemäßen Vorrichtung bis zum Start der Fluoreszenzmessung. Im ersten Schritt 50 wird zunächst die erfindungsgemäße Vorrichtung eingeschaltet. In Schritt 51 läuft dann eine Installationsroutine ab, bei der beispielsweise auch die zuletzt verwendeten Einstellungen aufgerufen werden können. In Schritt 52 wird die benötigte Software geladen. Dabei werden zuletzt verwendete Parameter aus einer Initialisierungsdatei ausgelesen und über eine COM-Schnittstelle zur erfindungsgemäßen Vorrichtung übertragen. Optional können in Schritt 53 gespeicherte Messparameter aufgerufen werden. Alternativ können in Schritt 54 ebenfalls optional die aktuellen Messparameter geändert werden. Nach dem Einstellen der Messparameter wird in Schritt 55 die erfindungsgemäße Vorrichtung mit den Reaktionsgefäßen, d. h. den mit den Messproben gefüllten Reaktionsräumen, bestückt. Dies geschieht vorzugsweise durch das Einsetzen einer Multiwellplatte oder eines Multiwell-Strips in die entsprechenden Durchbrüche der erfindungsgemäßen Vorrichtung. Danach kann in Schritt 56 die Messung gestartet werden.

Figur 5b zeigt den weiteren Verlauf einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens für den Zeitraum zwischen dem Start der Messung und deren Ende. Nach dem Start der Messung in Schritt 56 wird in Schritt 57 zunächst die Lichtquelle für den ersten Messkanal angeschaltet. In Schritt 58 wird dann während der Anregung die Fluoreszenz, d.h. das von den Fluoreszenzfarbstoffen emittierte Licht, durch die Erfassungseinrichtung gemessen. Dabei können beispielsweise ca. 200 Messwerte innerhalb der Anregungsdauer von beispielsweise 30 ms analog-digital gewandelt, gemittelt und als Messwert für den ersten Messkanal abgespeichert werden. In Schritt 59 wird dann die Lichtquelle für den ersten Messkanal wieder abgeschaltet und unmittelbar darauf die Lichtquelle für den zweiten Messkanal eingeschaltet. In Schritt 60 wird dann, wie in Schritt 58, wieder eine Vielzahl von Messwerten erfasst, mehrfach analog-digital-gewandelt, gemittelt und dann als Mittelwert für den zweiten Messkanal abgespeichert. In Schritt 61 wird die Lichtquelle für den zweiten Messkanal wieder abgeschaltet und die Lichtquelle für den dritten Messkanal eingeschaltet. Diese Routine setzt sich weiter fort, bis der letzte Messkanal, im vorliegenden Ausführungsbeispiel der 12. Messkanal bzw. Reaktionsraum, gemessen wird (Schritte 62 und 63). Die digitalen Daten der

einzelnen Mittelwerte werden dann in Schritt 64 auf einen Computer übertragen und sowohl grafisch als auch numerisch auf einem Monitor dargestellt. Dabei entspricht ein Punkt der grafischen Darstellung einem Mittelwert des Fluoreszenzlichts eines Messkanals. In Schritt 65 wird geprüft, ob die Routine beendet oder  
5 fortgesetzt werden soll. Wenn das Ende der Messung erreicht ist, wird die Routine in Schritt 66 abgebrochen. Sollen noch weitere Messwerte ermittelt werden, so geht die Routine von Schritt 65 über die Schleife 67 zurück zu Schritt 57, so dass alle Messkanäle nochmals gemessen werden. Durch das wiederholte Messen aller Messkanäle kann dann die Fluoreszenzintensität über die Zeit verfolgt und grafisch dargestellt werden. Im vorliegenden Ausführungsbeispiel werden die einzelnen Kanäle bzw. Reaktionsräume sequenziell gemessen, d. h. einerseits werden die Lichtquellen der einzelnen Messkanäle nacheinander ein- und abgeschaltet und andererseits die Erfassungseinrichtungen der einzelnen Reaktionsräume nacheinander ausgelesen. Alle 12 Messkanäle (ein 12-well-strip) können dabei  
10 beispielsweise mit einer Frequenz von 1 Hz gemessen werden. Das bedeutet im vorliegenden Ausführungsbeispiel, dass die dargestellte Routine einmal pro Sekunde durchlaufen wird. Durch das Abschalten der Lichtquellen zwischen dem Erfassen der einzelnen Messwerte können dabei für die Fluoreszenzfarbstoffe schädliche Auswirkungen des Anregungslichts, beispielsweise das sogenannte  
15 Photobleaching oder eine Aufheizung der Probe durch zu starke Lichteinstrahlung, vermieden werden. Für sehr schnelle biochemische Reaktionen kann alternativ auch ein einzelner Messkanal mit einer Frequenz von 10 Hz oder mehr gemessen werden. Eine solche Auslegung des Fluoreszenzsignals ist beispielsweise dann erforderlich, wenn sehr schnelle Reaktionen gemessen werden müssen, beispielsweise schnelle Änderungen der Membranpotentiale von lebenden Zellen.  
20 Bei der Verwendung von geeigneten Fluoreszenz-Markern können dann solche Membranpotentiale praktisch in Echtzeit abgebildet werden, d. h. das Fluoreszenzsignal ist in seinem kinetischen Verlauf eine getreue Abbildung des elektro-physiologisch bestimmten Membranpotentials.

30

Figur 6 zeigt ein Prinzip-Blockdiagramm einer besonderen Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Schaltungsanordnung 70 mit 12 Messkanälen. Die zentralen Bauteile der erfindungsgemäßen Schaltungsanordnung 70 sind die Lichtquellen 71 und die Erfassungseinrichtungen 72. Bei den Lichtquellen 71 handelt es sich

um herkömmliche LEDs, mittels welcher in den Reaktionsräumen 73 befindliche Fluoreszenzfarbstoffe 74 angeregt werden können. Das durch die angeregten Fluoreszenzfarbstoffe 74 emittierte Licht wird durch die Erfassungseinrichtungen 72 erfasst und somit gemessen. Bei den Erfassungseinrichtungen 72 handelt es sich im vorliegenden Ausführungsbeispiel um Halbleiter-Photodioden. Die Fluoreszenzmessung wird innerhalb der erfindungsgemäßen Schaltungsanordnung 70 durch die Kontrolleinrichtung 75 gesteuert. Bei der Kontrolleinrichtung 75 handelt es sich vorzugsweise um einen herkömmlichen Microcontroller, beispielsweise einen 8-Bit RISC-Microcontroller. Die Kontrolleinrichtung 75 ist anregungsseitig mit einem Digital-/Analog-Wandler 76 verbunden, der zum einen den Wandler und zum anderen Steuereinrichtungen, d.h. Halbleiter-Treiber-Stufen, zur Ansteuerung der Lichtquellen 71 beinhaltet. Der Digital-/Analog-Wandler 76 wird über die Kontrolleinrichtung 75 mit digitalen Steuersignalen initialisiert. Hierdurch können die Lichtquellen 71 gezielt an- und abgeschaltet und im An-Zustand in ihrer Amplitude variiert werden. Die Steuersignale werden vorzugsweise so gewählt, dass jeder einzelne Messkanal separat ansteuerbar ist. Auf Seiten der Detektion werden die Signale der Erfassungseinrichtungen 72 den zugehörigen Verstärkereinheiten 78 zugeführt. Ferner ist detektionsseitig die Kontrolleinrichtung 75 mit einer Verteilereinrichtung 77, hier einem sogenannten Multiplexer, verbunden. Mittels eines Steuerwortes der Kontrolleinrichtung 75 kann ein bestimmter Kanaleingang des Multiplexers geöffnet und einem Analog-/Digital-Wandler 79 zugeführt werden. Welcher Kanaleingang geöffnet wird, ist davon abhängig, welcher Kanal des Digital-/Analog-Wandlers 76 gerade aktiv ist, d. h. welche Lichtquelle 71 gerade angeschaltet ist. Dies gewährleistet, dass immer nur ein freigeschalteter Multiplexerkanal mit einem aktivierten Anregungskanal korrespondiert. Von dem Multiplexer werden die Messdaten über den Analog-/Digital-Wandler 79 in den Arbeitsspeicher 80 der Kontrolleinrichtung 75 übertragen. Nach Errechnung der Mittelwerte aus den einzelnen Messwerten werden diese dann über die Schnittstelle 81 von der Kontrolleinrichtung 75 beispielsweise auf einen herkömmlichen PC übertragen, so dass die Messdaten ausgewertet und grafisch dargestellt werden können.

Bei dieser vorteilhaften Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Schaltungsanordnung 70 steuert die Kontrolleinrichtung 75 gleichzeitig das Schalten der Lichtquelle 71 für einen Reaktionsraum 74 und das Auslesen der Daten aus der entsprechen-

den Erfassungseinrichtung 72. Auf diese Weise ist sichergestellt, dass immer nur der Messkanal bzw. die Erfassungseinrichtung 72 ausgelesen wird, die dem Reaktionsraum 73 zugeordnet ist, in dem die Fluoreszenzfarbstoffe angeregt werden. Die nicht angeregten Kanäle werden dann nicht ausgelesen. Die Kontrolleinrichtung 75 führt also eine Synchronisation von Anregung und Detektion durch. Auf diese Weise wird die anfallende Datenmenge deutlich reduziert. Darüber hinaus werden durch das Abschalten der Lichtquellen zwischen dem Erfassen der einzelnen Messwerte für die Fluoreszenzfarbstoffe schädliche Auswirkungen des Anregungslichts, beispielsweise das sogenannte Photobleaching, oder auch ein Kanalübersprechen vermieden werden. Im hier dargestellten Ausführungsbeispiel ist kein paralleles Messen in mehreren Kanälen möglich, da nur ein Analog-/Digital-Wandler vorhanden ist. Wenn dagegen keine Verteilereinrichtung 77 vorgesehen und jeder Erfassungseinrichtung 72 ein Analog-/Digital-Wandler 79 zugeordnet ist, kann paralleles Messen in mehreren Kanälen durchgeführt werden.

Figur 7 zeigt beispielhaft ein Messprotokoll eines zellphysiologischen Experiments, das mit einer erfindungsgemäßen Vorrichtung durchgeführt wurde. Das gezeigte Messprotokoll repräsentiert die graphische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der relativen Fluoreszenzintensität in 5 Messkanälen, d.h. 5 Reaktionsräumen. Für dieses Experiment wurden CHO-Zellen (CHO = Chinese Hamster Ovary) mit DNA transfiziert, die für das humane SUR1-Protein (SUR1 = Sulphonylurea-Rezeptor, Typ 1) und das Kir6.2-Protein (Kir6.2 = Kalium-Kanal inward rectifier, Typ 6.2) kodiert. Die Zellen wurden in 12-well-strips in  $\alpha$ -MEM-Medium bis zur Konfluenz kultiviert. Eine Stunde vor Beginn des Experiments wurden die Zellen mit 5  $\mu$ M des Membranpotential-Markers DiBAC<sub>4</sub> (3) im Brutschrank vorinkubiert. In 5 Reaktionsräumen wurden zu den Zellen dann 3 bis 7 Minuten nach Beginn der Messung 1.0, 3.0, 10.0, 30.0 oder 100.0  $\mu$ M einer Testsubstanz (K<sup>+</sup>-Kanal-Öffner) gegeben. Die Zugabe der Testsubstanz führt zu einer Hyperpolarisation der Zellmembranen, was sich im vorliegenden Experiment in einer momentanen Abnahme der Fluoreszenzintensität niederschlägt, wobei die Kinetik bei höheren Dosen erwartungsgemäß wesentlich schneller verläuft. Nach 15 Minuten wurden jeweils 10  $\mu$ M Glibenclamid (K<sup>+</sup>-Kanal-Blocker) zugegeben, wodurch die Hyperpolarisation der Zellmembranen wieder aufgehoben wurde. Dies wird durch den momentanen Anstieg der Fluoreszenzintensität belegt. Das Messprotokoll zeigt also, dass mit der

erfindungsgemäßen Vorrichtung bzw. Schaltungsanordnung und mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens physiologische Vorgänge mit hoher Genauigkeit und zeitlicher Auflösung gemessen bzw. verfolgt werden können. Hier wird auch deutlich, dass die Messung bei hohem Signal-Rauschabstand klare Messsignale und einen kompletten kinetischen Verlauf einer Rezeptor-Ligand-gesteuerten Reaktion widerspiegelt.

Bezugszeichenliste:

	1	Vorrichtung
5	2	Gehäuse
	3	erster Block
	4	zweiter Block
	5	Wand
	6	Ausnehmung
10	7.1 – 7.12	Filter
	8.1 – 8.12	Durchbrüche
	9.1 – 9.12	Lichteintrittsöffnung
	10.1 – 10.12	Lichtfallen
	11.1 – 11.12	Lichtquellen
15	12.1 – 12.12	Öffnungen
	15	Vorrichtung
	16.1 – 16.8	Messkanäle
	17.1 – 17.8	Lichtquellen
	18	Messkanal
20	19	Durchbruch
	20	Lichtquelle
	25	Reaktionsraum
	26	Seitenwand
	27	Boden
25	28	Lichtquelle
	29	Filter
	30	Blende
	31	Linse
	32	Lichtleiteinrichtung
30	33	Spiegel
	34	Blende
	35	Schutzglas
	36	Erfassungseinrichtung
	37	Filter

	40	Zellkultureinsatz
	41	Bodenfläche
	42	Fluoreszenzfarbstoff
	43	Lichtquelle
5	44	Filter
	45	Blende
	46	Öffnung
	47	Erfassungseinrichtung
	48	Blende
10	49	Filter
	50 – 66	Schritte
	67	Schleife
	70	Schaltungsanordnung
	71	Lichtquelle
15	72	Erfassungseinrichtung
	73	Reaktionsraum
	74	Fluoreszenzfarbstoff
	75	Kontrolleinrichtung
	76	Digital-/Analog-Wandler
20	77	Verteilereinrichtung
	78	Verstärkereinheit
	79	Analog-/Digital-Wandler
	80	Arbeitsspeicher
	81	Schnittstelle

## Patentansprüche

1. Vorrichtung (1, 15) zur Messung von Fluoreszenz in mindestens zwei Reaktionsräumen, mit mindestens einer Lichtquelle zur Anregung innerhalb der Reaktionsräume befindlicher Moleküle mit Licht einer bestimmten Wellenlänge, wobei das Licht von der Lichtquelle über zumindest eine Lichtleiteinrichtung zu den Reaktionsräumen leitbar ist, **dadurch gekennzeichnet**, dass an jedem Reaktionsraum (25) jeweils zumindest eine Erfassungseinrichtung (36, 47) zur Messung von durch die Moleküle emittiertem Licht angeordnet ist.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktionsräume (25) jeweils einen lichtdurchlässigen Boden (27) aufweisen und die jeweilige Erfassungseinrichtung (36, 47) unterhalb des Bodens (27) des jeweiligen Reaktionsraumes (25) angeordnet ist.
3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen dem jeweiligen Reaktionsraum (25) und der jeweiligen Erfassungseinrichtung (36, 47) zumindest eine optische Einrichtung angeordnet ist.
4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die optische Einrichtung mindestens einen Filter (37, 49) und/oder mindestens eine Blende (34, 48) und/oder mindestens einen Spiegel (33) und/oder mindestens eine Linse umfasst.
5. Vorrichtung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Spiegel (33) für Licht bestimmter Wellenlängen durchlässig ist.
6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 3 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Erfassungseinrichtung (36, 47) unmittelbar an der optischen Einrichtung angeordnet ist.
7. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Erfassungseinrichtung (36, 47) eine Halbleiter-Photodiode ist.

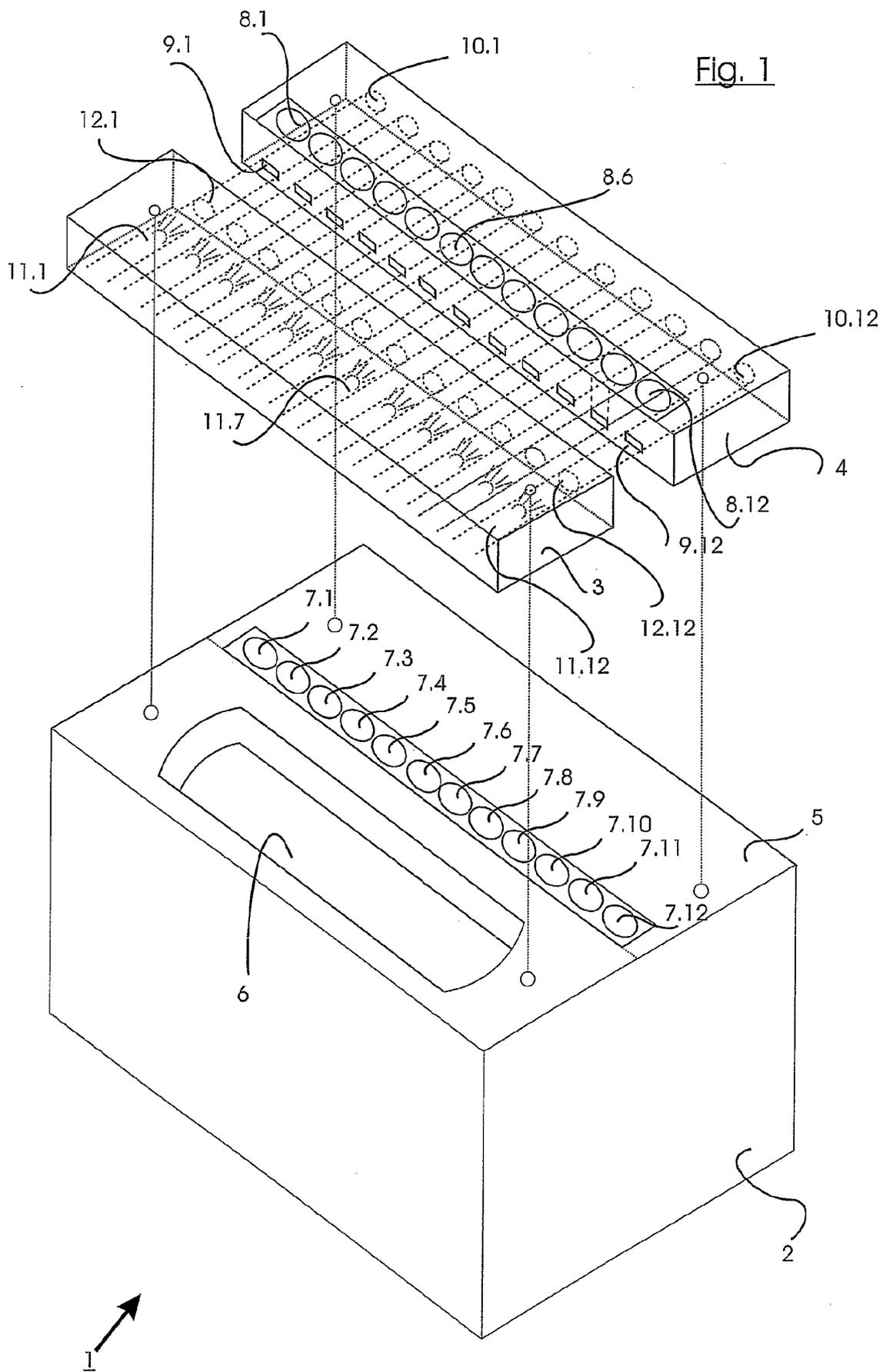
8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Lichtquelle (11, 17, 28, 43) seitlich zu den Reaktionsräumen (25) angeordnet ist und/oder dass das Licht senkrecht oder quer zur Achse zwischen Erfassungseinrichtung (36, 47) und Reaktionsraum (25) in den jeweiligen Reaktionsraum (25) leitbar ist.
9. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Licht parallel zur Achse zwischen Erfassungseinrichtung (36, 47) und Reaktionsraum (25) in den jeweiligen Reaktionsraum (25) leitbar ist.
10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen der Lichtleiteinrichtung (32) und dem Reaktionsraum (25) mindestens ein Spiegel (33) und/oder mindestens eine Blende (30, 34, 45) und/oder mindestens ein Filter (29, 44) und/oder mindestens eine Linse (31) angeordnet ist/sind.
11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Lichtleiteinrichtung (32) als einfacher Kanal oder röhrenförmig ausgebildet ist.
12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Lichtleiteinrichtung mindestens eine Lichtleitfaser, beispielsweise Glasfaser oder Kunststofffaser, ist.
13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass an jedem Reaktionsraum (25) jeweils zumindest eine Lichtquelle (11, 17, 28, 43) angeordnet ist.
14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Lichtquelle (11, 17, 28, 43) eine Licht-emittierende Diode (LED) ist.
15. Verfahren zur Messung von Fluoreszenz in mindestens zwei Reaktionsräumen, bei dem innerhalb der Reaktionsräume befindliche Moleküle mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden, wobei das Licht über eine Lichtleiteinrichtung zu den Reaktionsräumen geleitet wird, **dadurch gekenn-**

**zeichnet**, dass durch die Moleküle emittiertes Licht in jedem Reaktionsraum (25, 73) unabhängig von dem anderen Reaktionsraum (25, 73) oder den anderen Reaktionsräumen (25, 73) durch zumindest eine nur dem jeweiligen Reaktionsraum zugeordnete Erfassungseinrichtung (36, 47, 72) gemessen wird.

16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Messungen in den einzelnen Reaktionsräumen (25, 73) nacheinander durchgeführt werden.
17. Verfahren nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, dass in zumindest zwei Reaktionsräumen (25, 73) gleichzeitig gemessen wird.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass in zumindest einem Reaktionsraum (25, 73) in gleichbleibenden Abständen wiederholt gemessen wird.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Erfassungseinrichtung (36, 47, 72) während einer einzelnen Messung eine Vielzahl von Messwerten erfasst und ein Mittelwert dieser Messwerte errechnet und angezeigt wird.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass jedem Reaktionsraum (25, 73) eine Lichtquelle (11, 17, 28, 43, 71) zugeordnet wird und die Messung in einem Reaktionsraum (25, 73) parallel zum Einschalten der jeweiligen Lichtquelle (11, 17, 28, 43, 71) eingeleitet wird.
21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Lichtquellen (11, 17, 28, 43, 71) wiederholt nacheinander an- und abgeschaltet und/oder in ihrer Amplitude verändert werden.
22. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass alle Reaktionsräume (25, 73) durch eine Lichtquelle (11, 17, 28, 43, 71) mit Licht versorgt werden, wobei das Licht mittels separater Lichtleitereinrich-

- tungen gleichmäßig auf die unterschiedlichen Reaktionsräume(25, 73) verteilt wird.
23. Schaltungsanordnung (70) zur Steuerung einer Vorrichtung zur Messung von Fluoreszenz in mindestens zwei Reaktionsräumen, insbesondere der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 14, und/oder eines Verfahrens zur Messung von Fluoreszenz in mindestens zwei Reaktionsräumen, insbesondere des Verfahrens nach einem der Ansprüche 15 bis 22, mit mindestens einer Steuereinrichtung zum An- und Abschalten zumindest einer Lichtquelle zur Anregung innerhalb der Reaktionsräume befindlicher Moleküle mit Licht einer bestimmten Wellenlänge und mindestens einer Kontrolleinrichtung zur Verarbeitung von Messsignalen, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Kontrolleinrichtung (75) mit mindestens zwei Erfassungseinrichtungen (72) zur Messung von durch die Moleküle emittiertem Licht, welche jeweils unabhängig voneinander an einem Reaktionsraum (73) angeordnet sind, verbunden ist.
  24. Schaltungsanordnung nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass die Kontrolleinrichtung (75) über mindestens eine Verstärkereinheit (78) und/oder mindestens eine Verteilereinrichtung (77) und/oder mindestens einen Analog-Digital-Wandler (79) mit den Erfassungseinrichtungen (72) verbunden ist.
  25. Schaltungsanordnung nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass eine Übermittlung der Messsignale von den Erfassungseinrichtungen (72) zur Kontrolleinrichtung (75) mittels der Verteilereinrichtung (77) durch die Kontrolleinrichtung (75) steuerbar ist.
  26. Schaltungsanordnung nach einem der Ansprüche 23 bis 25, dadurch gekennzeichnet, dass die Kontrolleinrichtung (75) mit der oder den Steuereinrichtung(en) (76) verbunden ist und/oder dass die elektronische(n) Steuereinrichtung(en) (76) mittels eines Triggersignals schaltbar ist/sind.
  27. Schaltungsanordnung nach einem der Ansprüche 23 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass die Steuereinrichtung (76) ein Transistor ist.

28. Programmelement, das mittels einer elektronischen Datenverarbeitungseinrichtung lesbar und ausführbar ist und das, wenn es ausgeführt wird, dazu geeignet ist, die Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 14 zu steuern.
29. Programmelement, das mittels einer elektronischen Datenverarbeitungseinrichtung lesbar und ausführbar ist und das, wenn es ausgeführt wird, dazu geeignet ist, das Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 22 zu steuern.
30. Programmelement, das mittels einer elektronischen Datenverarbeitungseinrichtung lesbar und ausführbar ist und das, wenn es ausgeführt wird, dazu geeignet ist, die Schaltungsanordnung nach einem der Ansprüche 23 bis 27 zu steuern.
31. Speichermedium, das mittels einer elektronischen Datenverarbeitungseinrichtung lesbar ist und auf dem das Programmelement nach Anspruch 28, 29 und/oder 30 gespeichert ist.



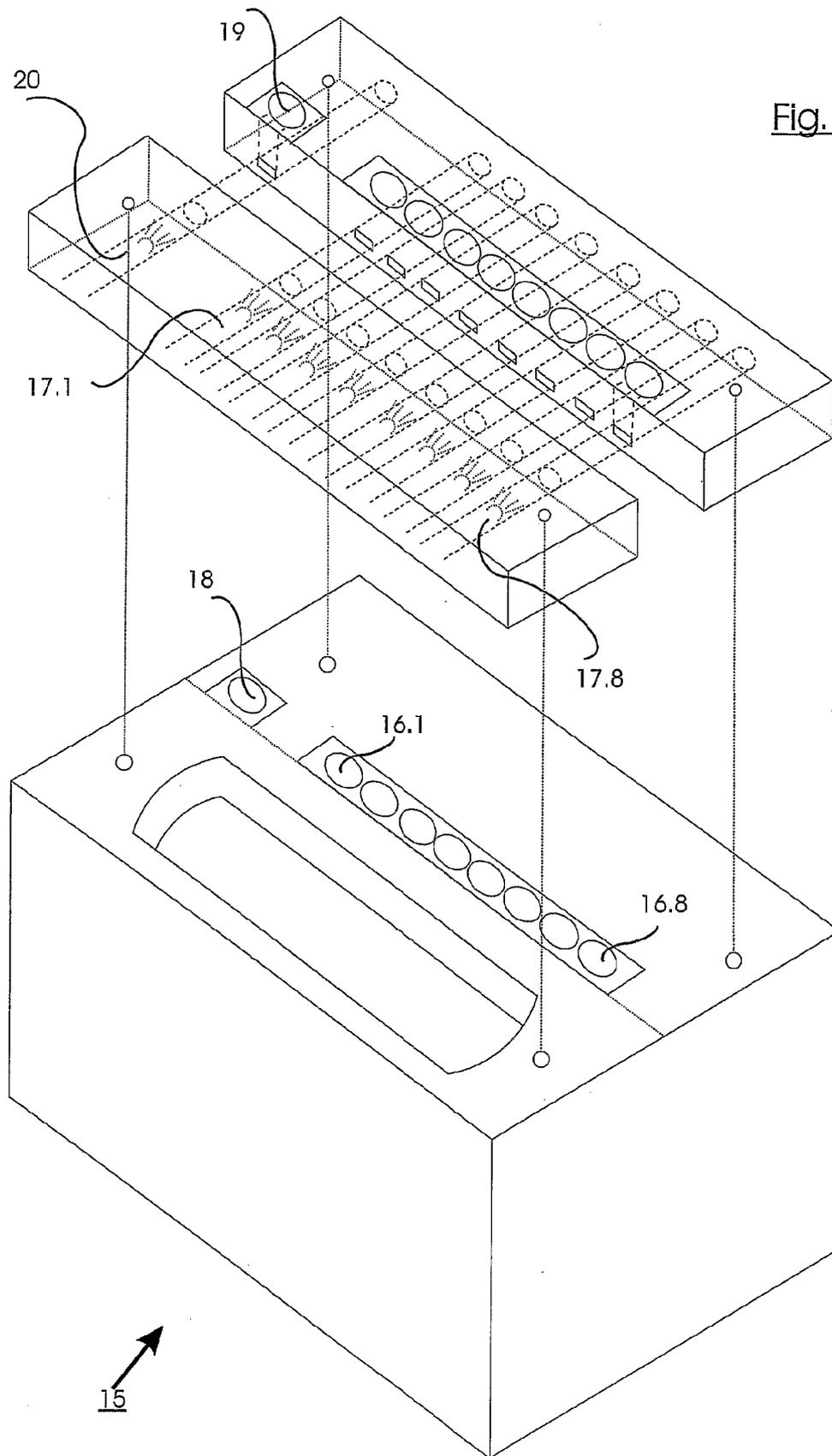


Fig. 2

Fig. 3

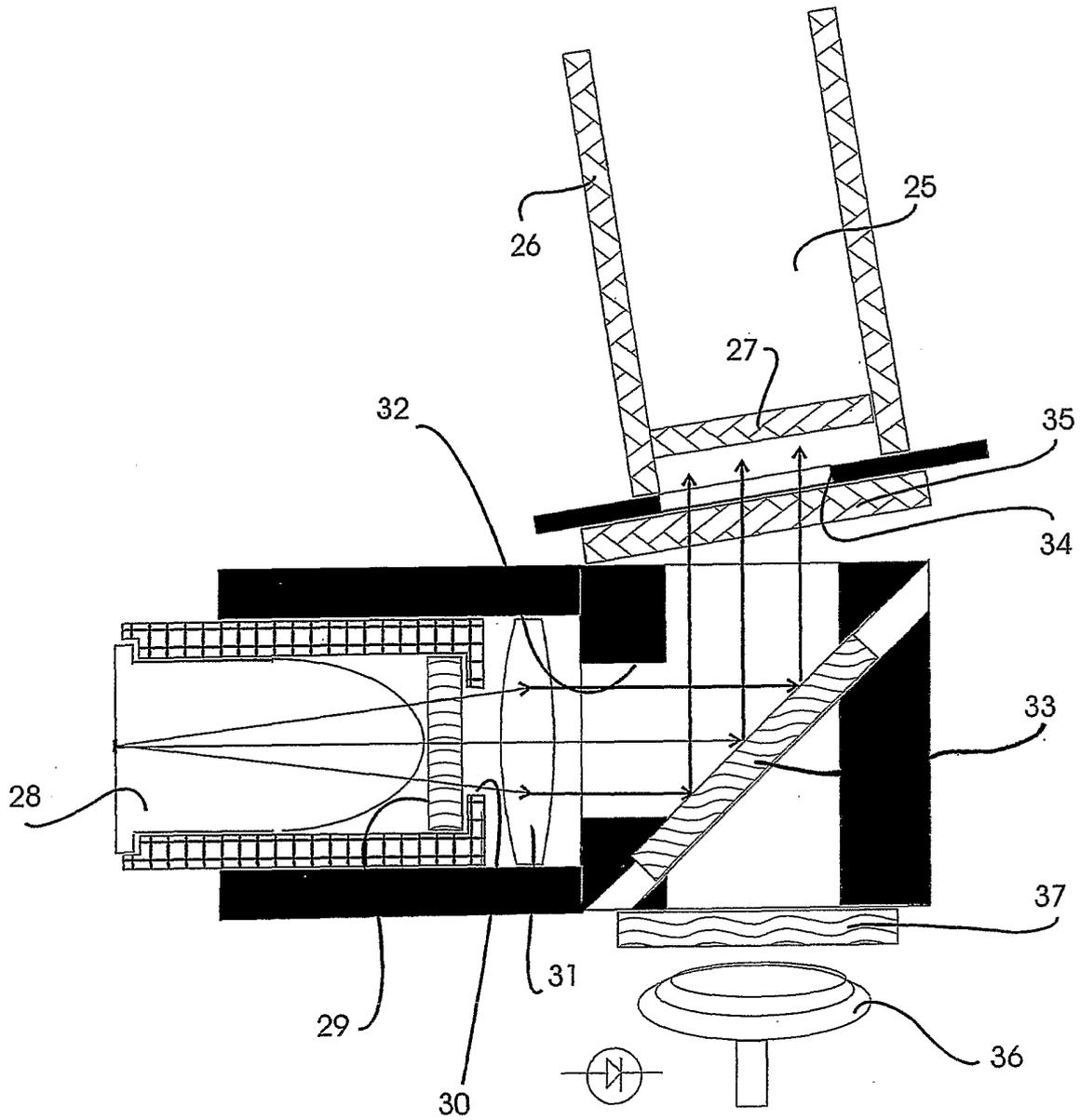


Fig. 4

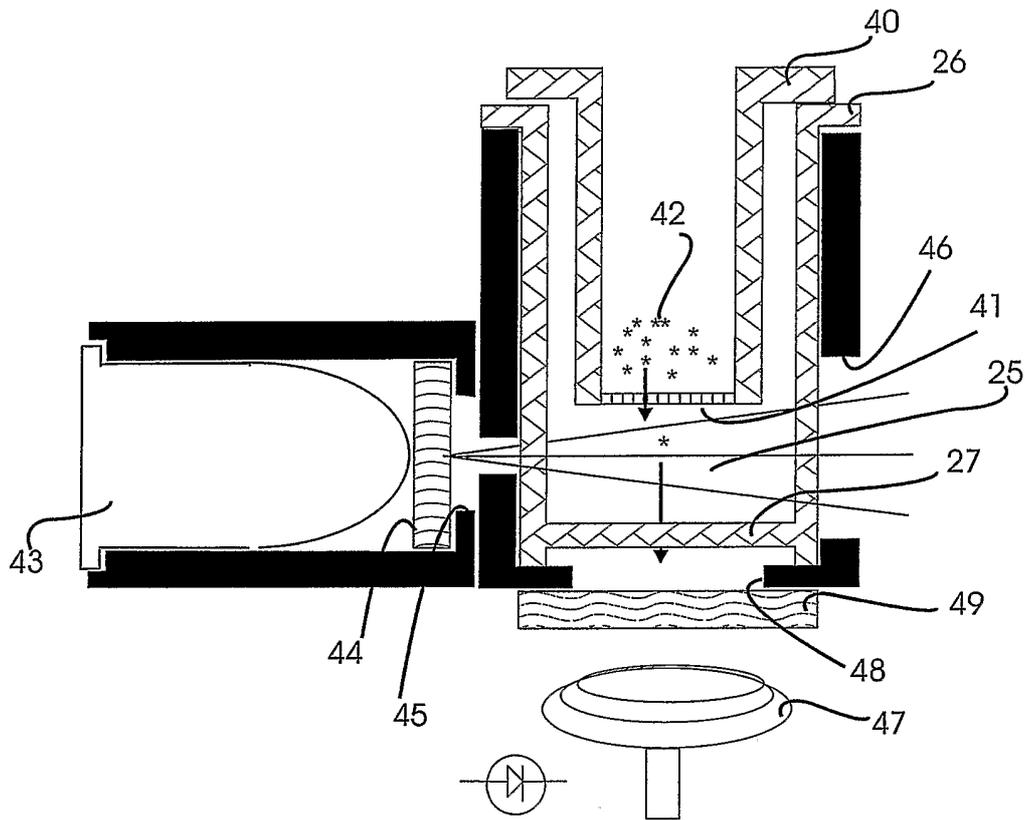


Fig. 5 a

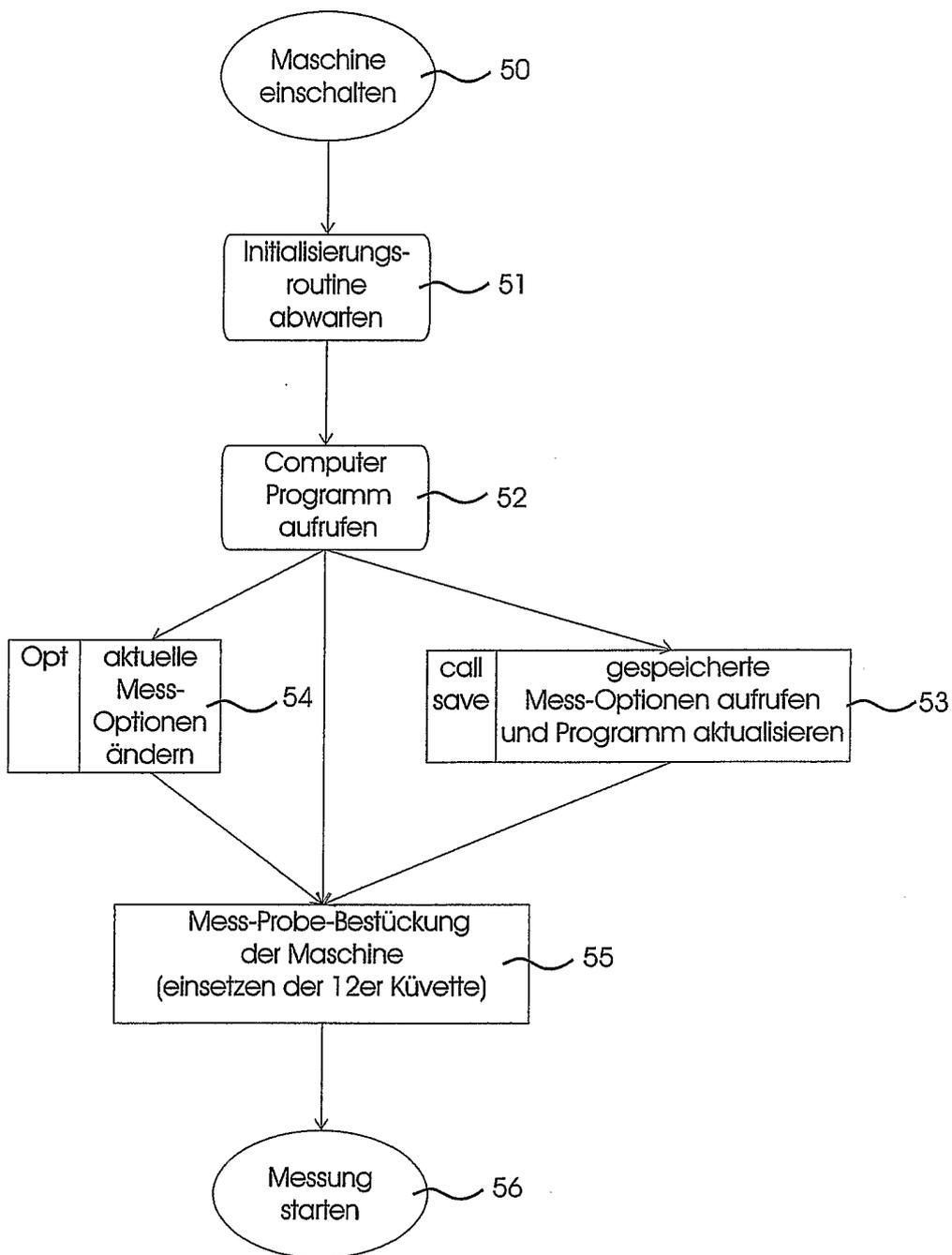
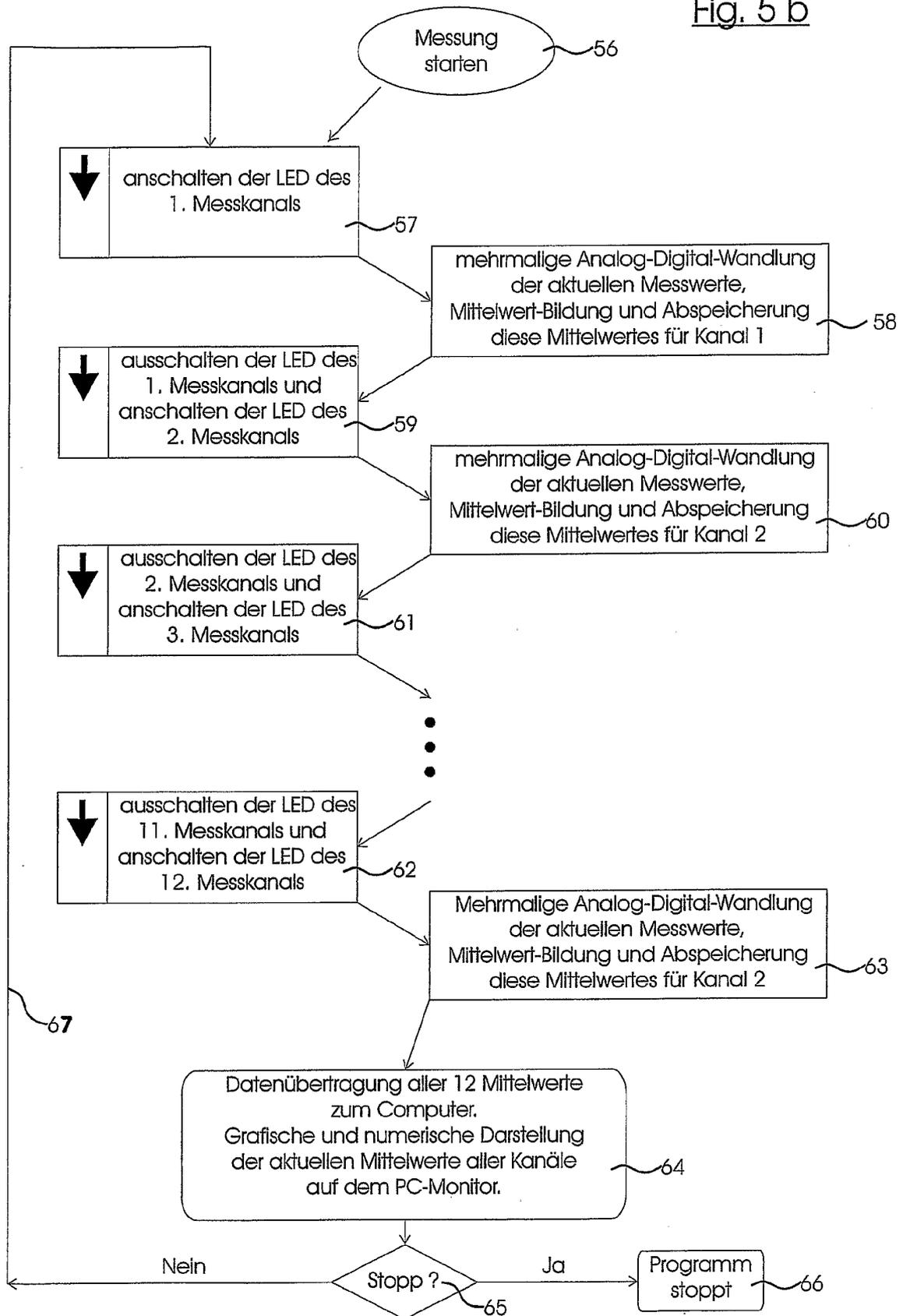
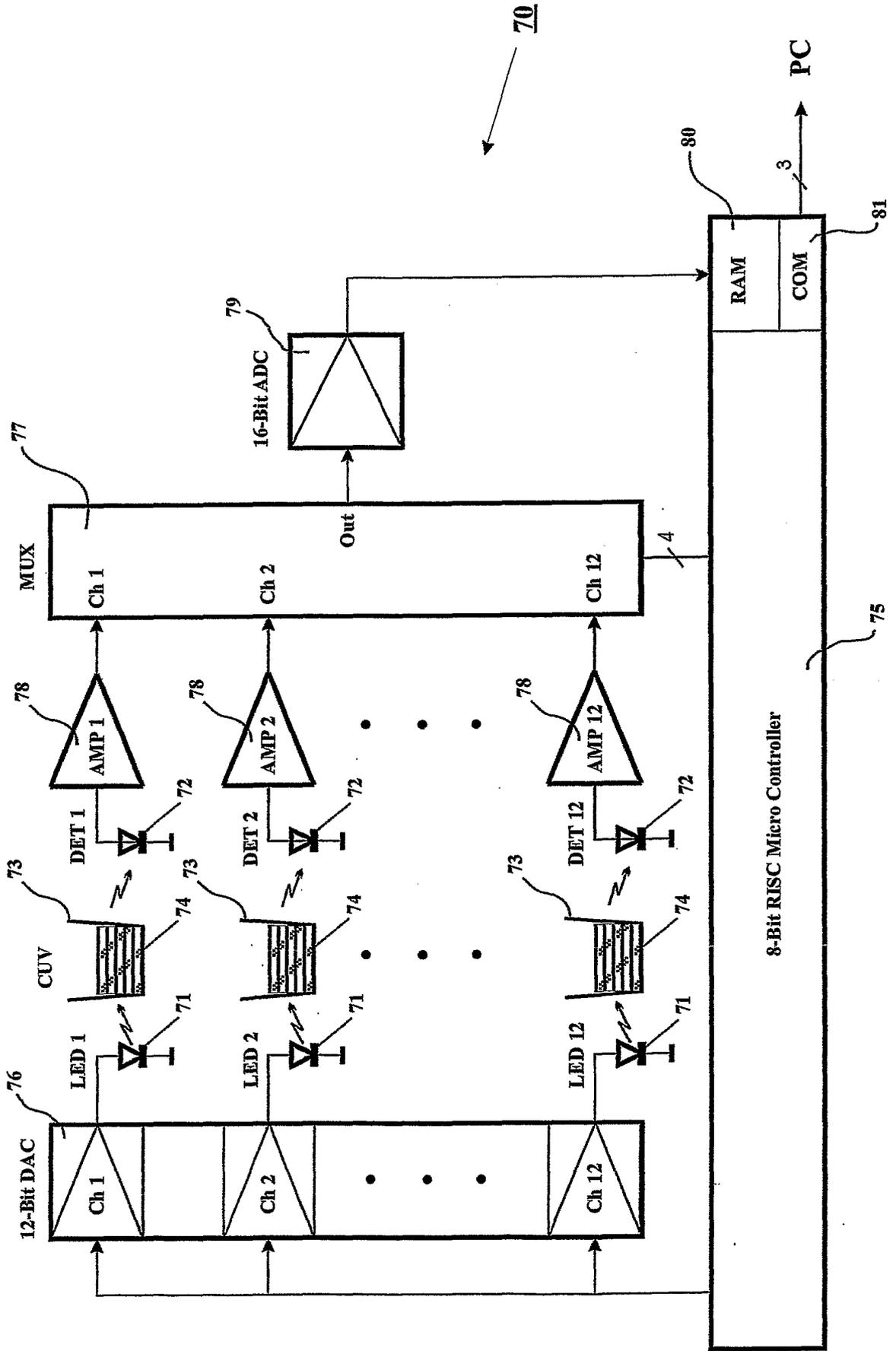


Fig. 5 b



**Fig.6**



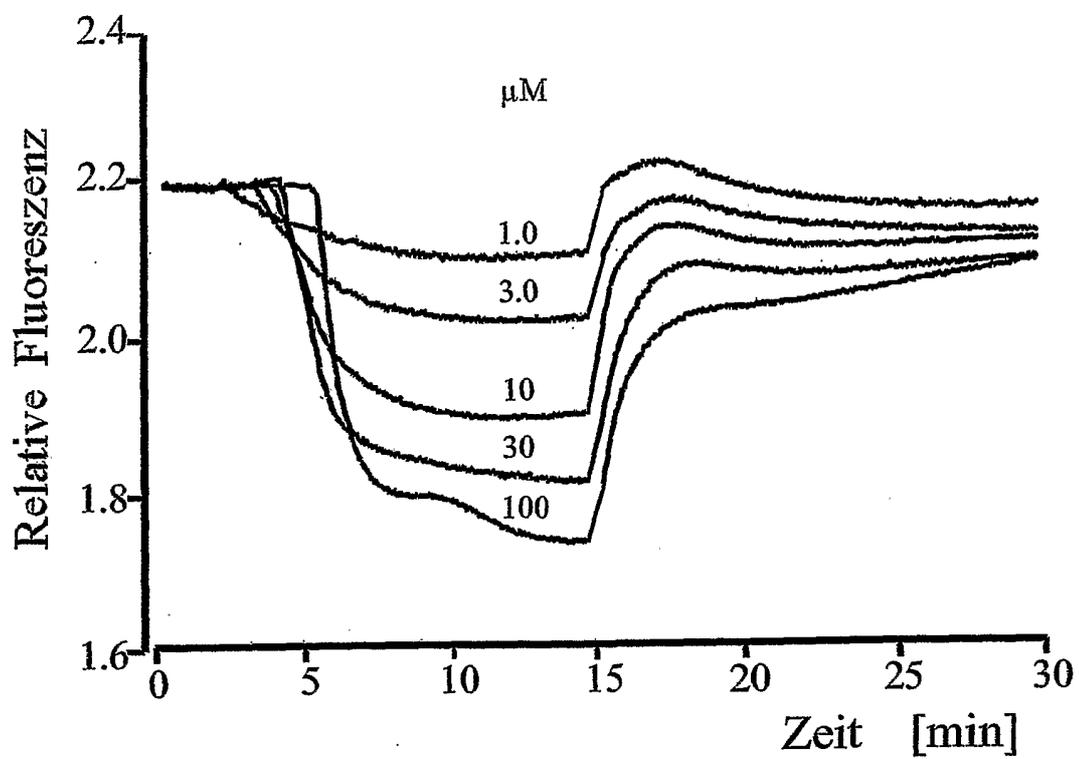


Fig. 7

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No  
PCT/DE2005/002067

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
G01N21/64      G01J3/44      C12M1/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**  
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
G01N   G01J   C12M

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)  
EPO-Internal, WPI Data

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 815 262 A (SCHROF ET AL) 29 September 1998 (1998-09-29) column 2, line 1 - line 19; figure 1 column 3, line 24 - column 4, line 22; claims 1-8	1-31
X	WO 98/13683 A (SARNOFF CORPORATION) 2 April 1998 (1998-04-02) page 10, line 3 - line 36; figure 7	1-31
A	US 2002/179849 A1 (MAHER KEVIN ET AL) 5 December 2002 (2002-12-05) page 4, paragraphs 34-37,47-50; figures 1,2	1-31
A	EP 0 580 362 A (TOSOH CORPORATION) 26 January 1994 (1994-01-26) figures 1,2; example 3	1-31
	-/--	

Further documents are listed in the continuation of Box C.       See patent family annex.

\* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  17 February 2006	Date of mailing of the international search report  28/02/2006
---	--

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Consalvo, D
---	---------------------------------------

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/DE2005/002067

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 1 253 419 A (TOSOH CORPORATION) 30 October 2002 (2002-10-30) paragraphs '0014! - '0018!, '0025!, '0036!; figures 2,4b,5a paragraphs '0051! - '0055! -----	1-31
A	EP 0 567 231 A (BECTON DICKINSON AND COMPANY; BECTON DICKINSON CO) 27 October 1993 (1993-10-27) page 4, line 21 - page 6, line 3; figure 2 -----	1-31
A	GB 2 196 734 A (* ASTROMED LIMITED) 5 May 1988 (1988-05-05) page 1, line 67 - line 110; figure 1 -----	1-31
A	US 6 392 241 B1 (RUSHBROOKE JOHN GORDON ET AL) 21 May 2002 (2002-05-21) column 9, line 44 - column 12, line 42; claims 1,2 -----	1-31

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/DE2005/002067
---

Patent document cited in search report	Publication date	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5815262	A	29-09-1998	DE 19533092 A1 EP 0762114 A2 JP 9113448 A	13-03-1997 12-03-1997 02-05-1997
WO 9813683	A	02-04-1998	AU 4607197 A	17-04-1998
US 2002179849	A1	05-12-2002	US 6399952 B1	04-06-2002
EP 0580362	A	26-01-1994	DE 69332365 D1 DE 69332365 T2 JP 6034546 A	14-11-2002 13-02-2003 08-02-1994
EP 1253419	A	30-10-2002	DE 60205157 D1 DE 60205157 T2 JP 2002318192 A US 2002155619 A1	01-09-2005 12-01-2006 31-10-2002 24-10-2002
EP 0567231	A	27-10-1993	AU 3698893 A BR 9301588 A CA 2092373 A1 JP 6050893 A US 5427920 A	28-10-1993 26-10-1993 25-10-1993 25-02-1994 27-06-1995
GB 2196734	A	05-05-1988	JP 63091537 A	22-04-1988
US 6392241	B1	21-05-2002	EP 0910790 A1 EP 0910791 A1 WO 9801743 A1 WO 9801744 A1 US 6556299 B1	28-04-1999 28-04-1999 15-01-1998 15-01-1998 29-04-2003

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2005/002067

**A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**

G01N21/64 G01J3/44 C12M1/34

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

G01N G01J C12M

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 815 262 A (SCHROF ET AL) 29. September 1998 (1998-09-29) Spalte 2, Zeile 1 - Zeile 19; Abbildung 1 Spalte 3, Zeile 24 - Spalte 4, Zeile 22; Ansprüche 1-8	1-31
X	WO 98/13683 A (SARNOFF CORPORATION) 2. April 1998 (1998-04-02) Seite 10, Zeile 3 - Zeile 36; Abbildung 7	1-31
A	US 2002/179849 A1 (MAHER KEVIN ET AL) 5. Dezember 2002 (2002-12-05) Seite 4, Absätze 34-37,47-50; Abbildungen 1,2	1-31
A	EP 0 580 362 A (TOSOH CORPORATION) 26. Januar 1994 (1994-01-26) Abbildungen 1,2; Beispiel 3	1-31



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17. Februar 2006

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

28/02/2006

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Consalvo, D

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2005/002067

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 1 253 419 A (TOSOH CORPORATION) 30. Oktober 2002 (2002-10-30) Absätze '0014! - '0018!, '0025!, '0036!; Abbildungen 2,4b,5a Absätze '0051! - '0055! -----	1-31
A	EP 0 567 231 A (BECTON DICKINSON AND COMPANY; BECTON DICKINSON CO) 27. Oktober 1993 (1993-10-27) Seite 4, Zeile 21 - Seite 6, Zeile 3; Abbildung 2 -----	1-31
A	GB 2 196 734 A (* ASTROMED LIMITED) 5. Mai 1988 (1988-05-05) Seite 1, Zeile 67 - Zeile 110; Abbildung 1 -----	1-31
A	US 6 392 241 B1 (RUSHBROOKE JOHN GORDON ET AL) 21. Mai 2002 (2002-05-21) Spalte 9, Zeile 44 - Spalte 12, Zeile 42; Ansprüche 1,2 -----	1-31

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2005/002067

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5815262	A	29-09-1998	DE 19533092 A1	13-03-1997
			EP 0762114 A2	12-03-1997
			JP 9113448 A	02-05-1997
WO 9813683	A	02-04-1998	AU 4607197 A	17-04-1998
US 2002179849	A1	05-12-2002	US 6399952 B1	04-06-2002
EP 0580362	A	26-01-1994	DE 69332365 D1	14-11-2002
			DE 69332365 T2	13-02-2003
			JP 6034546 A	08-02-1994
EP 1253419	A	30-10-2002	DE 60205157 D1	01-09-2005
			DE 60205157 T2	12-01-2006
			JP 2002318192 A	31-10-2002
			US 2002155619 A1	24-10-2002
EP 0567231	A	27-10-1993	AU 3698893 A	28-10-1993
			BR 9301588 A	26-10-1993
			CA 2092373 A1	25-10-1993
			JP 6050893 A	25-02-1994
			US 5427920 A	27-06-1995
GB 2196734	A	05-05-1988	JP 63091537 A	22-04-1988
US 6392241	B1	21-05-2002	EP 0910790 A1	28-04-1999
			EP 0910791 A1	28-04-1999
			WO 9801743 A1	15-01-1998
			WO 9801744 A1	15-01-1998
			US 6556299 B1	29-04-2003