



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 37 839 T2** 2007.12.13

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 965 034 B1**

(51) Int Cl.⁸: **G01N 21/64** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 37 839.3**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/04363**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 910 195.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/039636**

(86) PCT-Anmeldetag: **06.03.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **11.09.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **22.12.1999**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **30.05.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **13.12.2007**

(30) Unionspriorität:

40124 P 07.03.1997 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE**

(73) Patentinhaber:

Clare Chemical Research LLC, Denver, Col., US

(72) Erfinder:

SEVILLE, Mark, Denver, CO 80206, US

(74) Vertreter:

**Müller-Boré & Partner, Patentanwälte, European
Patent Attorneys, 81671 München**

(54) Bezeichnung: **Fluorometrischer Nachweis mit sichtbarem Light**

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

BEZUG AUF VERWANDTE ANMELDUNGEN

[0001] Diese Anmeldung beansprucht die Priorität der US Seriennr. 60/040,124, die am 7. März 1997 eingereicht wurde.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Die Trennung von DNA Fragmenten durch Polyacrylamid oder Agarose Gelelektrophorese ist ein gut etabliertes und umfassend verwendetes Hilfsmittel in der Molekularbiologie (Sharp, P.A. et al., "Detection of two restriction endonucleases activities in Haemophilus parainfluenza Biochemistry 12: 3055). Die Standardtechnik zur Betrachtung der Positionen der getrennten Fragmente in einem Gel schließt die Verwendung eines ultravioletten (UV) Transilluminators ein (Brunk, C.F. und Simpson, L., "Comparison of various ultraviolet sources for fluorescent detection of ethidium bromide-DNA complexes in polyacrylamide gels", (1977) Analytical Biochemistry 82: 455). Dieses Verfahren schließt zuerst ein Färben des Gels mit einem Fluoreszenzfarbstoff, wie Ethidiumbromid oder SYBR® Green I, ein. Die DNA Fragmente, die den Farbstoff binden, werden dann durch Anordnen des Gels auf einem Leuchtkasten sichtbar gemacht, der mit einer UV Lichtquelle ausgestattet ist. Typischerweise stellt die UV Quelle zusammen mit einem eingebauten Filter Licht mit einem Anregungsmaximum von ungefähr 254, 300 oder 360 nm bereit. Das UV Licht bewirkt, dass der DNA gebundene Farbstoff in den roten (Ethidiumbromid) oder grünen (SYBR Green I) Bereichen des sichtbaren Lichtspektrums fluoresziert. Die farbige Fluoreszenz ermöglicht ein Sichtbarmachen und Lokalisieren der DNA Fragmente im Gel. Das Sichtbarmachen von DNA in einem Gel wird entweder verwendet, um den Erfolg einer Genklonierungsreaktion zu bewerten, wie er durch die Größe und Anzahl von anwesenden DNA Fragmenten beurteilt wird, oder um ein Fragment von besonderer Größe zu identifizieren, das aus dem Gel herausgeschnitten und in weiteren Reaktionsschritten verwendet werden kann.

[0003] Transilluminatoren, wie sie im Stand der Technik verwendet werden, um Fluorophore sichtbar zu machen, werden in mehreren Patenten, einschließlich US 5,347,342, 5,387,801, 5,327,195, 4,657,655 und 4,071,883, beschrieben. Eine klinische Untersuchung von Hautanomalien, die Fluoreszenz bewirken, sind im US Patent Nr. 5,363,854 unter Verwendung von Bildern mit sichtbarem Licht als eine Kontrolle beschrieben worden.

[0004] Die Verwendung von UV Licht zur Betrachtung von Molekülen in Gelen weist zwei hauptsächliche Nachteile auf: (1) Es ist gefährlich. Die Augen sind sehr empfindlich gegenüber UV Licht, und es ist eine absolute Notwendigkeit, dass der Betrachter selbst für kurze Betrachtungsdauer einen Augenschutz trägt, um die Möglichkeit ernster Schädigung zu verhindern. Eine längerfristige Exposition gegenüber UV Licht führt zu einer Schädigung des Hautgewebes (Sonnenbrand), und es muss darauf geachtet werden, eine Hautexposition durch Tragen von Handschuhen, langärmeligen Jacken und einer Vollgesichtsmaske zu minimieren. (2) DNA Proben werden durch Exposition gegenüber UV Licht geschädigt. Es ist kürzlich durch Epicentre Technologies dokumentiert worden, dass eine 10–20 Sekunden Exposition gegenüber 305 nm UV Licht auf einem Transilluminator ausreichend ist, um eine erhebliche Schädigung der DNA zu bewirken. Diese Zeitdauer ist das absolute Minimum, das benötigt wird, um eine DNA Bande aus einem Gel herauszuschneiden.

[0005] Eine Alternative zur UV Durchleuchtung schließt die Verwendung von Laserlichtquellen ein. Jedoch ist die Verwendung von Laserlicht auf die einfache und direkte Betrachtung eines DNA Gels durch das menschliche Auge nicht anwendbar. Der extrem kleine Querschnitt des Laserlichtstrahls erfordert, dass ein typisches DNA Gel durch den Laser gescannt wird, die Fluoreszenzintensität an jedem Punkt elektronisch gemessen und digital gespeichert wird, bevor ein zusammengesetztes Bild des DNA Gels unter Verwendung von Computer-Software zur Betrachtung zusammengebaut wird.

[0006] Kästen mit sichtbarem Licht für Verwendungen durch den Fachmann sind dem Stand der Technik zum Sichtbarmachen von nicht fluoreszierenden Materialien bekannt, wie z.B. im US Patent 3,802,102 beschrieben. Die Verwendung von sichtbarem Licht, um bestimmte Fluoreszenzfarbstoffe nachzuweisen, wird z.B. auf der Lighttools Research Internetseite unter <http://www.lighttools.com/page8.html> vorgeschlagen. Jedoch wird keine ausführbare Offenbarung zur Herstellung solcher Vorrichtungen bereitgestellt. Keine dieser Referenzen stellt Vorrichtungen oder Systeme zur Betrachtung von Fluoreszenzmustern unter Verwendung von sichtbarem Licht bereit.

[0007] Trotz der kürzlichen Entwicklung von Farbstoffen, die im sichtbaren Spektrum fluoreszieren (Haug-

land, R. [1996] "Handbook of Fluorescent Probes and Resarch Chemicals, sechste Auflage", Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, S. 13–18, 25–29, 29–35) bleiben Transilluminator und andere Vorrichtungen, um die Vorteile aus den Eigenschaften solcher Farbstoffe zu nutzen, wenig gut entwickelt. Die europäische Patentanmeldung Nr. 0603783 offenbart zum Beispiel Verfahren, die, wie berichtet, befähigt sind, Nukleinsäuren unter Verwendung von Fluoreszenzfärbungen nachzuweisen, die unter Verwendung von sichtbarem Licht zur Anregung befähigt sind. Es ist ein Ziel dieser Erfindung Vorrichtungen und Verfahren zur direkten und indirekten Betrachtung und Messung von Fluoreszenzmustern bereitzustellen, welche die Verwendung von UV Durchleuchtung nicht einschließen, sondern eher befähigt sind, Quellen von sichtbarem Licht, wie gewöhnliche Lampen, im Gegensatz zu Lasern und den fokussierten Lichtarten zu verwenden, die in Standard Fluorometern verwendet werden.

ZUSAMMENFASSUNG

[0008] Erfindungsgemäß wird ein Photolumineszenz-Abbildungssystem mit sichtbarem Licht des Typs bereitgestellt, der im beigefügten Patentanspruch 1 angegeben ist.

[0009] Ein System mit sichtbarem Licht zum Nachweis von Fluoreszenzmustern wird bereitgestellt, die von den Fluorophoren emittiert werden, die befähigt sind, Licht eines Emissionswellenlängenbereichs zu emittieren (Emissionsspektrum), wenn es durch Licht eines Anregungswellenlängenbereichs (Anregungsspektrum) angeregt wird. In einer Ausführungsform muss der Anregungswellenlängenbereich von dem Emissionswellenlängenbereich verschieden sein, obwohl diese Bereiche überlappen können, und mindestens ein Teil des nicht überlappenden Teils des Emissionswellenlängenbereichs muss innerhalb des sichtbaren Spektrums liegen. Sowohl die Anregungs- als auch Emissionswellenlängenbereiche liegen innerhalb des sichtbaren Spektrums.

[0010] In bevorzugten Ausführungsform unter Verwendung von Farbfiltern ist Licht des "Anregungstyps" für den Fluorophor Licht innerhalb des Anregungswellenlängenbereichs für den Fluorophor, und Licht des "emittierten Typs" ist Licht innerhalb des Emissionswellenlängenbereichs für den Fluorophor. Der erste Filter lässt vorzugsweise mindestens ungefähr 70 % des Lichts von der Lichtquelle im Anregungswellenlängenbereich durch, und der zweite Filter lässt mindestens ungefähr 95 % des Lichts im Emissionswellenlängenbereich durch. Der Begriff "Filter", wie hier verwendet, schließt Kombinationen von Filtern ein.

[0011] In anderen Ausführungsformen, in denen polarisierende Filter verwendet werden, lässt der erste Filter das Licht von der Quelle in einem engen Bereich von Orientierungen durch, und der zweite Filter ist so orientiert, um Licht von der Quelle auszuschließen, d.h. er lässt nur Licht durch, das orthogonal zu dem ist, das durch den ersten Filter hindurchgeleitet ist, so dass nur Licht, das durch den Fluorophor emittiert wird, durch den zweiten Filter hindurchgeleitet wird.

[0012] Die Fluorophore können irgendwelche Fluorophore sein, die dem Fachmann bekannt oder einfach verfügbar sind, und sie werden vorzugsweise in der Form von Fluorophoren verwendet, die an oder in einer biologischen Probe gebunden sind. Fluorophore können verwendet werden, um jede erwünschte Substanz nachzuweisen und zu quantifizieren, an die sie angeheftet oder in die sie eingebracht werden können, z.B. organische Moleküle, wie Proteine, Nukleinsäuren, Kohlehydrate, Pigmente und Farbstoffe, anorganische Moleküle, wie Mineralien, Bakterien, eukaryotische Zellen, Gewebe und Organismen. Fluorophore können ein intrinsischer Teil eines Organismus oder einer Substanz sein, die nachgewiesen werden soll, z.B. verschiedene Farbstoffe und Pigmente, die zum Beispiel in Pilzen, Fischen, Bakterien und Mineralien gefunden werden.

[0013] Das System dieser Erfindung kann in eine integrierte Vorrichtung eingebracht werden, wie in eine horizontale oder vertikale Gelelektrophorese-Einheit, einen Scanner oder eine andere Vorrichtung, in der ein Nachweis von Fluoreszenz erforderlich ist.

[0014] Die erfindungsgemäßen Vorrichtungen und Verfahren sind insbesondere zur Betrachtung von Mustern nützlich, d.h. von zweidimensionalen und dreidimensionalen räumlichen Anordnungen von Fluorophoren. Fluoreszenzdetektoren, wie sie in Fluorometern gefunden werden, sind eher fähig nur die Anwesenheit und Intensität von Fluoreszenz als ein Erzeugen eines Bilds nachzuweisen, das einen Datenstrom erzeugt, der maschinell interpretiert werden muss. Die vorliegende Erfindung ermöglicht eine direkte Betrachtung zweidimensionaler (oder dreidimensionaler) Muster von Fluorophoren durch das menschliche Auge. Solche Muster von Fluorophoren schließen die räumliche Anordnung von Fluorophoren auf DNA auf einem Gel oder von Fluorophoren auf einer TLC Platte, die räumliche Verteilung von Fluorophoren in Reagenzgläsern in einer Halterung, die räumliche Verteilung von Fluorophoren in Pilzen oder in Bakterien auf der Haut oder auf Fleisch, das zum menschlichen Verzehr bestimmt ist, oder die räumliche Anordnung von fluoreszierenden Fischen in einem Ge-

fäß ein. Die Bilder von Fluoreszenzmustern, die durch die Verfahren und Vorrichtungen dieser Erfindung erzeugt werden, können im Zeitverlauf betrachtet werden und können fotografiert, digitalisiert, gespeichert und anders maschinell manipuliert werden, aber in allen Fällen wird ein zwei- oder dreidimensionales Bild erzeugt. Die Lichtquelle sollte kein Laser sein, und jeder mechanische Detektor, der hier verwendet wird, wie das menschliche Auge, schließt vorzugsweise eine Anordnung von Photodetektoren ein.

[0015] Die Lichtquelle sollte minimal Licht im ultravioletten Bereich erzeugen, d.h. weniger als 1 % ihres Lichts sollte im ultravioletten Bereich liegen, der erste Filter könnte wirksam ultraviolettes Licht heraus screenen, vorzugsweise bis zu einem Niveau von weniger als 1 %, um Schädigung von DNA, die im System betrachtet wird, zu verhindern. Selbst wenn polarisierende Filter verwendet werden, wird ein blauer Filter vorzugsweise als ein Teil von oder zusätzlich zu dem ersten Filter verwendet, um DNA Schädigung zu verhindern. Alternativ kann der Streukörper verwendet werden, um restliches UV Licht herauszufiltern, und der Streukörper und der erste Filter können in einem Materialbogen kombiniert werden. (Die meisten blauen Filter filtern ultraviolettes Licht sowie sichtbares Licht in Wellenlängen, die länger als blau sind, heraus.)

[0016] Der Lichtdetektor oder "Betrachter", der verwendet wird, um die Fluoreszenz des Fluorophors unter Verwendung dieses Systems nachzuweisen, kann ein Auge eines Betrachters oder eine Vorrichtung, wie ein optischer Scanner oder eine ladungsgekoppelte Vorrichtungskamera zum Eingeben eines digitalisierten Bildes in einen Computer, oder eine Kamera sein. Solche Vorrichtungen können auch Mittel zum Quantifizieren des Lichts innerhalb des Emissionswellenlängenbereichs, das den Betrachter erreicht, umfassen und können auch Mittel umfassen, wie einen angemessenen programmierten Computer, wie er dem Stand der Technik bekannt ist, zum Umwandeln solcher quantitativen Messungen in Werte für die Menge von biologischem Material, das in der Probe anwesend ist, die gemessen werden soll.

[0017] Der erste Filter ist befähigt, Licht von der Lichtquelle des emittierten Typs für die Fluorophore herauszufiltern. Dies bedeutet, dass mindestens etwas des Lichtes von der Lichtquelle des emittierten Typs durch den ersten Filter herausgefiltert wird. In vielen Fällen überlappen die Anregungs- und Emissionsspektren für die Fluorophore, die verwendet werden. Der erste Filter muss nur Licht in einem Teil des Emissionsspektrums absorbieren, gewöhnlich das obere Wellenlängen Ende davon.

[0018] In einigen Ausführungsformen kann der erste Filter ein integrierter Teil des Trägers für den Fluorophor oder des Materials oder Mediums sein, welches den Fluorophor enthält. Zum Beispiel kann der erste Filter als der Gelträger einer Durchleuchtungsvorrichtung dienen, auf dem Fluorophor enthaltendes Material im Gel angeordnet wird. Das Gel selbst, das z.B. mit einem Pigment, wie einem blauen Pigment imprägniert ist, kann als der erste Filter dienen.

[0019] In einigen Ausführungsformen, die unten vollständiger beschrieben sind, kann der zweite Filter angepasst werden, um über dem menschlichen Auge angeordnet zu werden, z.B. als Linsen für eine Brille, die durch einen menschlichen Betrachter getragen wird, oder er kann angepasst werden, um an der Linse eines optischen Scanners oder einer Kamera befestigt zu werden. Der zweite Filter kann auch als ein Sicherheitsverschluss für eine Elektrophorese-Einheit oder als eine Wand für das Gefäß für das Fluorophor enthaltende Material dienen. Der Begriff "befestigt" bedeutet in diesem Zusammenhang sowohl entfernter befestigt als auch als ein integrierter Teil einer Vorrichtung eingebaut. In einigen unten beschriebenen Ausführungsformen kann die Lichtquelle auch eine in der Hand gehaltene Lichtquelle sein, die hinter der Probe oder vorzugsweise vor der Probe und in einem Winkel zum Betrachter gehalten wird. Die in der Hand gehaltene Einheit zum Halten der Lichtquelle umfasst vorzugsweise auch den ersten optischen Filter als Teil des Gehäuses.

[0020] Das Fluorophor enthaltende Material kann durchsichtig oder trüb sein, und das System kann so gestaltet sein, dass Licht von der Lichtquelle direkt durch den ersten Filter, das Fluorophor enthaltende Material und den zweiten Filter hindurchgeleitet wird, um den Betrachter im Falle eines durchsichtigen Mediums zu erreichen, oder dass Licht von der Lichtquelle durch den ersten Filter hindurchgeleitet wird, um auf das Fluorophor enthaltende Material zu treffen, wobei emittiertes Licht vom Medium zurück zum Betrachter "prallt", das zuerst durch den zweiten Filter hindurchgeleitet wurde. Die Konfiguration optischer Komponenten kann jeden Winkel von gerade über 0° bis 180° einnehmen. Der Winkel wird so durch Linien gebildet, die von der Lampe zu der Probe und von der Probe zum Detektor gezogen werden.

[0021] Der Begriff "Transilluminator", wie hier verwendet, bedeutet eine Vorrichtung (anders als ein Fluorometer, das eine Anordnung einer Fluorophor markierten Probe in einem speziell konstruierten Probenhalter erfordert), die ermöglicht, dass Licht durch eine Oberfläche scheint, in oder auf der ein Fluorophor enthaltendes Material angeordnet worden ist, und schließt horizontale Gelelektrophorese Vorrichtungen und andere Vorrich-

tungen ein, in denen Fluoreszenz enthaltende Materialien auf einer Oberfläche verteilt sind. Erfindungsgemäß wird auch ein Verfahren zur Betrachtung von einem oder mehreren Fluoreszenzmustern bereitgestellt, wie im beigefügten Patentanspruch 16 angegeben.

[0022] Erfindungsgemäße Vorrichtungen verwenden eher sichtbares als ultraviolettes Licht zum Anregen und Betrachten von Fluoreszenz. Bevorzugte erfindungsgemäße Ausführungsformen unter Verwendung von Lichtquellen von ungefähr 9 W emittieren sogar weniger gefährliches UV Licht als Standard Fluoreszenzröhren, wie sie in den meisten Büros und Labors verwendet werden. Eine Verwendung von sichtbarem Licht ermöglicht die Unversehrtheit von DNA, die beobachtet wird, zu erhalten. Die erfindungsgemäßen Vorrichtungen ermöglichen einen Nachweis von bis zu 0,1–1 ng DNA, was gleichwertig oder leicht besser ist als ein 312 nm UV Transilluminator. Unter Verwendung einer ladungsgekoppelten Vorrichtung-(engl.: charge-coupled device (CCD))Kamera ist es möglich, Niveaus von bis zu zehn Picogramm SYBR Gold gefärbter DNA nachzuweisen. Eine Betrachtung wird durch das Auge oder durch eine abbildende Vorrichtung durchgeführt, wie eine Kamera oder einen Computerscanner, unter Verwendung sowohl herkömmlicher Photographie als auch digitaler Abbildungssysteme.

KURZBESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0023] [Fig. 1](#) ist eine schematische Darstellung der Funktionsprinzipien einer erfindungsgemäßen Vorrichtung.

[0024] [Fig. 2](#) ist eine Graphik, welche die Fluoreszenzanregungs- und emissionsspektren einer Nukleinsäure Gelfärbung mit an doppelsträngige DNA gebundenem SYBR Green I zeigt.

[0025] [Fig. 3](#) zeigt das Absorptionsspektrum des Acrylit #668-0GP optischen Filters, der als ein erster optischer Filter in einer erfindungsgemäßen Ausführungsform verwendet wird.

[0026] [Fig. 4](#) zeigt das Absorptionsspektrum des Wratten #98 optischen Filters, der als ein erster optischer Filter in einer erfindungsgemäßen Ausführungsform verwendet wird.

[0027] [Fig. 5](#) zeigt das Absorptionsspektrum des Perspex #300 optischen Filters, der als ein zweiter optischer Filter in einer erfindungsgemäßen Ausführungsform verwendet wird.

[0028] [Fig. 6](#) zeigt das Absorptionsspektrum des Wratten #12 optischen Filters, der als ein zweiter optischer Filter in einer erfindungsgemäßen Ausführungsform verwendet wird.

[0029] [Fig. 7](#) zeigt Absorptionsspektren der Acrylit #668-0GP und Perspex #300 optischen Filter, die als eine Kombination eines ersten und zweiten Filters in einer erfindungsgemäßen Ausführungsform verwendet werden.

[0030] [Fig. 8](#) zeigt Absorptionsspektren der Wratten #98 und Wratten #12 optischen Filter, die als eine Kombination eines ersten und zweiten Filters in einer erfindungsgemäßen Ausführungsform verwendet werden.

[0031] [Fig. 9](#) ist eine Schnitt- und auseinandergezogene Ansicht einer erfindungsgemäßen Durchleuchtungsvorrichtung.

[0032] [Fig. 10](#) ist eine Schnittansicht eines erfindungsgemäßen integrierten Transilluminators und einer erfindungsgemäßen integrierten horizontalen Elektrophorese-Einheit.

[0033] [Fig. 11](#) ist eine Seitenansicht einer erfindungsgemäßen integrierten Scanner Durchleuchtungsvorrichtung.

[0034] [Fig. 12](#) ist eine perspektivische Ansicht einer erfindungsgemäßen in der Hand gehaltenen Einheit.

[0035] [Fig. 13](#) zeigt ein Schema eines Transilluminators zur Betrachtung von fluoreszierenden Materialien in Gelen und anderen durchsichtigen Medien.

[0036] [Fig. 14](#) zeigt ein Schema für einen Top-Transilluminator zur Betrachtung von fluoreszierenden Materialien in trüben Medien, wie Dünnschichtchromatographieplatten.

[0037] [Fig. 15](#) zeigt ein Schema zur Betrachtung der Position von fluoreszierenden Materialien während einer Säulenchromatographie.

[0038] [Fig. 16](#) zeigt ein Gelelektrophorese Gerät, in dem die zwei Platten, die das Gel enthalten, auch als die zwei Filter wirken, die ermöglichen, dass fluoreszierende Materialien während einer Gelelektrophorese betrachtet werden können.

[0039] [Fig. 17](#) zeigt ein Dünnschichtchromatographie Gerät, in dem die Filter ein integrierter Teil des Geräts sind, die ermöglichen, dass fluoreszierende Materialien während einer Dünnschichtchromatographie betrachtet werden können.

[0040] [Fig. 18](#) zeigt eine in der Hand gehaltene Einheit zusammen mit einer Brille, die von dem Betrachter getragen wird, die als Linsen den zweiten optischen Filter aufweist.

[0041] [Fig. 19](#) zeigt einen erfindungsgemäßen Transilluminator, der einen in der Hand gehaltenen zweiten Filter umfasst, der nützlich ist, fluoreszierende Materialien manuell zu scannen und anwesende Mengen zu quantifizieren.

[0042] [Fig. 20](#) vergleicht SYBR Gold gefärbte DNA Gele auf einem 312 nm UV Transilluminator und auf einem erfindungsgemäßen Transilluminator.

[0043] [Fig. 21](#) zeigt ein SYBR Gold gefärbtes DNA Gelbild, das durch Computerscannen erfasst wurde.

[0044] [Fig. 22](#) zeigt Gele, bei denen DNA Abbau unter Verwendung eines 312 nm UV Transilluminators mit DNA Abbau und unter Verwendung eines erfindungsgemäßen Transilluminators verglichen werden.

[0045] [Fig. 23](#) vergleicht Ethidiumbromid gefärbte DNA Gele auf einem ultravioletten Transilluminator (linke Seite) und auf einem erfindungsgemäßen Transilluminator (rechte Seite).

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG

[0046] Was das menschliche Auge als "weißes Licht" wahrnimmt, besteht aus der ganzen elektromagnetischen Strahlung mit Wellenlängen zwischen ungefähr 400 und 750 nm (das "sichtbare Spektrum"). (Licht von 200–400 nm wird als ultraviolett oder UV bezeichnet.) Verschiedene Wellenlängen des Lichts werden, wenn sie isoliert sind, durch das menschliche Auge als farbig gesehen: Licht von Wellenlängen zwischen 400–500 nm wird im Allgemeinen als violette/blau Farbtöne gesehen; 500–550 nm wird als grüne/gelbe Farbtöne gesehen und 550–750 nm wird als orange/rote Farbtöne gesehen. Der Begriff "sichtbares Licht", wie hier verwendet, bezeichnet Licht mit (einer) Wellenlänge/n zwischen ungefähr 400 nm und ungefähr 750 nm. Nicht alle Wellenlängen in diesem Bereich müssen im "sichtbaren Licht" zum Zweck dieser Erfindung anwesend sein.

[0047] Viele Farbstoffe werden durch Licht innerhalb des sichtbaren Spektrums zum Fluoreszieren angeregt. Jedoch ist vor der vorliegenden Erfindung diese Fluoreszenz in Transilluminatoren oder in Handlampen nicht verwendet worden, da die Fluoreszenz aufgrund der großen Menge einfallenden Lichts von der Lichtquelle selbst, die den Beobachter oder das nachweisende Gerät erreicht, nicht nachweisbar ist, wenn weißes oder breitbandiges, sichtbares Licht zur Anregung des Farbstoffes verwendet wird. Diese Aufgabe wird in der vorliegenden Erfindung durch Anordnen geeigneter optischer Filter auf beiden Seiten des Materials gelöst, an das der Fluorophor gebunden ist, um zu verhindern, dass die Gesamtheit des Lampenlichts den Beobachter erreicht und um zu ermöglichen, dass Fluoreszenzlicht vom Fluorophor gesehen wird.

[0048] "Optische Filter" entfernen oder "absorbieren", d.h. verhindern eine Transmission des Lichts eines bestimmten Typs, während ein Hindurchleiten oder eine "Übertragung" des Lichts eines anderen Typs ermöglicht wird. Zum Beispiel absorbiert ein Farbfilter, der blau erscheint, das meiste des grünen und roten Lichts und lässt das blaue Licht durch. Ein Farbfilter, der bernsteinfarben erscheint, absorbiert blaues Licht und lässt grünes und rotes Licht durch. Die Kombination aus grünem und rotem Licht erscheint gelb-orangefarben für das Auge, wobei dem Filter eine gelb-orange oder Bernsteinfarbe verliehen wird.

[0049] Die genauen optischen Eigenschaften eines Farbfilters sind auf die Lichtabsorptionseigenschaften der bestimmten Pigmente zurückzuführen, die in seine Matrix eingebettet sind. Die Filtermatrix selbst kann aus einem weiten Bereich von Materialien hergestellt sein, die dem Stand der Technik bekannt und dem Fachmann verfügbar sind, wobei Kunststoffe, wie Acryl, Gallerte und Glas eingeschlossen sind.

[0050] Ein anderer Typ eines optischen Filters ist ein polarisierender Filter. Ein polarisierender Filter lässt nur Licht eines engen Bereichs von Orientierungen durch und verhindert eine Transmission des Lichts anderer Orientierungen.

[0051] Die optischen Eigenschaften von Filtern werden entweder bezüglich des "Absorptionsvermögens" oder der "prozentualen Übertragung" gemessen. Die Begriffe hängen wie unten gezeigt zusammen:

$$A = -\log(\%T/100)$$

wobei A das Absorptionsvermögen des Filters ist und %T die prozentuale Übertragung ist.

[0052] "Fluoreszenz" ist das Phänomen, bei dem Lichtenergie ("Anregungslicht") durch ein Molekül absorbiert wird, was dazu führt, dass das Molekül "angeregt" wird. (Lakowicz, J.R. (1983) "Principles of Fluorescence Spectroscopy", Plenum Press, New York.) Nach einem sehr kurzen Intervall wird die absorbierte Lichtenergie durch das angeregte Molekül gewöhnlich bei einer längeren Wellenlänge als das Anregungslicht emittiert. Dieses emittierte Licht wird als Fluoreszenzlicht bezeichnet. Ein Molekül das Fluoreszenz zeigt, wird als ein "Fluorophor" bezeichnet.

[0053] Irgendein gegebener Fluorophor wird durch einige Wellenlängen des Lichts angeregt werden mehr zu fluoreszieren als durch andere Wellenlängen. Das Verhältnis zwischen den Wellenlängen des Lichts und dem Grad der Anregung eines gegebenen Fluorophors bei dieser Wellenlänge wird durch das "Anregungsspektrum" des Fluorophors beschrieben. Das Anregungsspektrum wird hier auch als der "Anregungswellenlängenbereich" bezeichnet.

[0054] Gleichermaßen wird jeder gegebene Fluorophor intensivere Fluoreszenz bei besonderen Wellenlängen als bei anderen erzeugen. Das genaue Verhältnis zwischen der Wellenlänge des Lichts und der Intensität der Fluoreszenzemission bei dieser Wellenlänge wird durch das "Emissionsspektrum" oder "Fluoreszenzspektrum" des Fluorophors beschrieben. Das Emissionsspektrum wird hier auch als der "Emissionswellenlängenbereich" bezeichnet. [Fig. 2](#) stellt die Fluoreszenzanregungs- und Emissionsspektren einer Nukleinsäure Gelfärbung mit an Doppelstrang DNA gebundenem SYBR Green I graphisch dar, wie sie aus R. Haugland (1996) "Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals" entnommen ist.

[0055] Das Anregungsmaximum ist die Wellenlänge von Anregungslicht, bei der die Fluoreszenz des Fluorophors eine maximale Intensität erreicht. Das Emissionsmaximum ist die Wellenlänge des Lichts, das durch den angeregten Fluorophor emittiert wird, wenn seine Fluoreszenz bei maximaler Intensität liegt.

[0056] Die meisten Fluorophore, die durch sichtbares Licht angeregt werden und sichtbares Licht emittieren, weisen ein Emissionsspektrum auf, das mit ihrem Anregungsspektrum überlappt, obwohl das Maximum für jedes verschieden ist. Die Entfernung in Nanometern zwischen dem Anregungsspektrummaximum und dem Emissionsspektrummaximum ist als die "Stokes-Verschiebung" bekannt. Fluorophore mit großer Stokes-Verschiebung im sichtbaren Bereich funktionieren am besten in dieser Erfindung. Zum Beispiel würde ein Fluorophor mit einem Anregungsmaximum von 450 nm und einem Emissionsmaximum von 600 nm mit keiner Überlappung zwischen den Spektren ideal sein; jedoch weisen die meisten Fluorophore geringere Stokes-Verschiebungen auf. Zum Beispiel weist SYPRO Orange eine Stokes-Verschiebung von 105 nm auf, und SYPRO Gold weist eine Stokes-Verschiebung von 42 nm auf, während Fluorescein eine Stokes-Verschiebung von 25 nm aufweist.

[0057] Erfindungsgemäße sichtbare Lichtquellen emittieren typischerweise Licht, das beide Spektren einschließt oder mit ihnen überlappt. Die meisten Farbfilter lassen nicht nur Licht scharf innerhalb einer bestimmten Wellenlänge durch und verhindern eine Transmission des ganzen Lichts außerhalb dieser Wellenlänge (nicht) scharf. Stattdessen, wie in [Fig. 3](#) und [Fig. 4](#) gezeigt, ermöglichen die meisten Filter ein Hindurchleiten einer geringen Menge des Lichts sogar bei Wellenlängen, wo sie als Filter am wirksamsten sind, und sie verhindern eine Übertragung einer geringen Lichtmenge bei Wellenlängen, wo sie als Filter zum Absorbieren des Lichts am wenigstens wirksam sind. In einem "Übergangs" Wellenlängenbereich verändert sich die Fähigkeit solcher Farbfilter Licht zu absorbieren (allmählich oder scharf) entlang der Wellenlängen Skala von einem Bereich, wo das maximale Licht absorbiert wird, bekannt als der "Kantenbereich", bis zu einem Bereich, wo das meiste des Lichts durchgelassen wird und nur eine kleine Menge absorbiert wird. Aus einem praktischen Grund wird die Lichtquelle Licht in Wellenlängen erzeugen, die mit jenen überlappen, die durch den Fluorophor emittiert werden, und der Filter zwischen dem Fluorophor und dem Betrachter, der dazu verwendet wird, Licht im Emissionsspektrum durchzulassen, wird auch ermöglichen, dass genug Licht von der Quelle hindurchgeleitet

wird, um die Fluoreszenz zu übersteigen (Emissionsspektrum). Somit muss ein Filter verwendet werden, der zwischen der Lichtquelle und dem Fluorophor angeordnet ist, um Licht von der Quelle zu entfernen, das nicht durch den Filter zwischen dem Fluorophor und dem Betrachter entfernt worden ist. Um die Empfindlichkeit des Systems zu optimieren, sollten Filterpaare so ausgewählt werden, um ein Betrachten (a) der maximalen Fluoreszenzintensität und (b) eine minimale Lampenlichtintensität zu ermöglichen. Für typische Fluorophore schließt dies einen Kompromiss zwischen (a) und (b) ein. Das System kann eingestellt werden, um Lampenlichtintensität zu minimieren, so dass das Lampenlicht die Fluoreszenz nicht überwindet.

[0058] Ein erster Gesichtspunkt ist die Filterpaare so auszuwählen, dass sie zusammen im Wesentlichen eine Transmission des ganzen Anregungslichts zum Betrachter verhindern. Um dies zu erreichen muss unter der Annahme, dass die Lampe Licht möglichst nahe am Anregungsmaximum des Fluorophors erzeugt: (a) der erste Filter so viel Licht wie möglich im Emissionsspektrum des Fluorophors absorbieren, d.h. im Allgemeinen muss sich der Kantenbereich so weit, wie es durchführbar ist, in den blauen Bereich (kürzere Wellenlängen) ausdehnen; und (b) der zweite Filter so viel Licht wie möglich im Anregungsspektrum des Fluorophors absorbieren, d.h. der Kantenbereich muss sich soweit, wie es durchführbar ist, in den roten Bereich (längere Wellenlängen) ausdehnen. Dies führt tendenziell dazu, Filter zu verwenden, deren Übergangsbereiche weit entfernt sind und nicht überlappen.

[0059] Ein zweiter Gesichtspunkt zum Auswählen der Filterpaare ist es, die Menge an Licht im Emissionsspektrum für den Fluorophor zu maximieren, das den Betrachter erreicht: (a) Der erste Filter sollte so ausgewählt werden, dass so viel Licht wie möglich im Bereich des Anregungsmaximums des Fluorophors durchgelassen wird; und (b) der zweite Filter sollte so ausgewählt werden, dass so viel Licht wie möglich im Bereich des Emissionsmaximums des Fluorophors durchgelassen wird. Dies führt tendenziell dazu, Filter zu verwenden, deren Übergangsbereiche überlappen. Der Punkt entlang des Wellenlängenbereichs, wo das Absorptionsvermögen der zwei Filter zusammenfällt, sollte bei einem so hohen Absorptionsvermögen liegen, wie es durchführbar ist.

[0060] Falls das Maximum des Emissionsspektrums für einen Fluorophor mehr als 500 nm beträgt, kann das Absorptionsvermögen des Filters, der ausgewählt ist, zwischen dem Fluorophor und der Lichtquelle angeordnet zu werden, auf nahe 4 von weniger als 1 in einem Übergangsbereich ansteigen, z.B. von ungefähr 450 nm auf ungefähr 500 nm. (Gute Filter haben einem Übergangsbereich von weniger als 50 nm.) Das Absorptionsvermögen des zweiten Filters zwischen dem Fluorophor und dem Betrachter sollte dann von nahe 4 auf weniger als 1 in denselben Übergangsbereich fallen, so dass die Summe der Absorptionsvermögen der Filter bei Wellenlängen im Übergangsbereich nahe 4 beträgt, um das meiste der Wellenlängen in diesem Bereich zu filtern, so dass wirksam verhindert wird, dass Licht unter ungefähr 525 nm den Betrachter erreicht. Somit sieht der Betrachter im Wesentlichen nur Licht, das durch den Fluorophor emittiert wird.

[0061] Wie oben diskutiert, können die Anregungs- und Emissionswellenlängenbereiche des Fluorophors überlappen. Die einzige Anforderung ist, dass Licht von ausreichender Intensität, um in einem verdunkelten Raum nachweisbar zu sein (vorzugsweise ohne Hilfe durch das Auge des Betrachters, aber alternativ durch ein optisches Gerät, wie eine Kamera oder einen optischen Scanner) durch den Fluorophor außerhalb des Anregungswellenlängenbereichs emittiert wird, so dass es nachgewiesen werden kann nachdem Licht im Anregungswellenbereich herausgefiltert worden ist.

[0062] Typische Fluorophore schließen viele organische Farbstoffe ein. Jedoch sind die meisten Moleküle biologischen Ursprungs, wie Nukleinsäuren, Proteine, Lipide und Coenzyme, nicht stark fluoreszierend. (Bemerkenswerte Ausnahmen schließen das grüne Fluoreszenzprotein und seine Derivate und verschiedene Pigmente, wie Chlorophyll und andere ein, die zur Färbung von Pflanzen und Tieren verwendet werden.) Deshalb ist es gewöhnlich nötig, entweder eine biologische Probe mit einem Fluorophor zu färben oder umzusetzen, um biologische Moleküle nachzuweisen. "Färben" bezeichnet gewöhnlich das Verfahren, in dem ein Fluoreszenzfarbstoff relativ schwach an ein Zielmolekül ohne die Bildung kovalenter Bindungen bindet. Wenn ein Fluorophor mit einem Zielmolekül "umgesetzt" wird, impliziert dies gewöhnlich, dass der Komplex zwischen den zwei Arten eine relativ stabile kovalente Bindung einschließt.

[0063] Die Fluoreszenzintensität einer Probe kann entweder verwendet werden, um die Anwesenheit oder Anordnung eines Fluorophors qualitativ zu bestimmen oder um die Menge des anwesenden Fluorophors quantitativ zu bestimmen. Variationen des Messens der Intensität von Fluoreszenz schließen Fluoreszenz Resonanzenergietransfer und Fluoreszenz Polarisation ein.

[0064] Alternativ kann ein Fluorophor indirekt verwendet werden, um die Anwesenheit einer besonderen Art

zu zeigen. Zum Beispiel schließt das *Vistra* EC Substrat System (Amersham Life Science Inc., Arlington Heights, IL) die Verwendung des Enzyms alkalische Phosphatase ein, das an einen Antikörper konjugiert ist, der besonders hergestellte DNA Oligonukleotidsonden binden kann, um eine fluoreszierende Art zu bilden. Die enzymatische Reaktion bildet mehrere Fluorophore, wobei wirksam ein "amplifiziertes" Fluoreszenzsignal von der Ziel DNA bereitgestellt wird.

[0065] Einige Beispiele von Fluorophoren, die mit biologischen Proben verwendet werden, sind in Tabelle 1 angegeben.

Tabelle 1

Farbstoff	Anregungsmaximum (nm)	Emissionsmaximum (nm)	Verwendungen
Ethidiumbromid (EB) ¹	518	605	Färbung für Nukleinsäuren
SYBR® Green ²	494	521	Färbung für Nukleinsäuren
SYPRO® Orange ⁵	485	590	Färbung für Proteine
SYBR® Gold ²	495	537	Färbung für Nukleinsäuren
GelStar® ³	493	527	Färbung für Nukleinsäuren
<i>Vistra</i> ™ Green ⁴	497	520	Färbung für Nukleinsäuren
<i>Vistra</i> ™ ECF Substrat ⁴	440	560	indirekter Nachweis
4-Chlor-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol ¹	467	539	kovalente Markierung
Fluoresceinderivate ¹	495	520	kovalente Markierung
Texas Red® ²	587	602	kovalente Markierung

¹ Verfügbar von Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.

² Marke von Molecular Probes, Inc. aus Eugene, OR.

³ Verfügbar von FMC Bioproducts, Rockland, ME.

⁴ Verfügbar von Amersham Life Science Inc., Arlington Heights, IL.

⁵ SYPRO® ist eine Marke von Molecular Probes, Inc. aus Eugene, OR.

[0066] Das Entfernen von Lampenlicht durch Filter, so dass der Betrachter im Wesentlichen nur das Licht sieht, das durch den Fluorophor emittiert wird, wird in zwei Schritten erreicht (siehe [Fig. 1](#)). In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein Filterpaar, das einen blauen ersten Filter und einen bernsteinfarbenen zweiten Filter umfasst, mit einem Fluorophor verwendet, wie SYBR® Green I oder Ethidiumbromid, der maximal bei ungefähr 500 nm oder weniger (d.h. durch blaues Licht) angeregt wird und seine maximale Fluoreszenz bei 500 nm oder mehr (d.h. die Fluoreszenz ist grün oder rot) emittiert.

[0067] Der erste Filter, der blau ist, ist zwischen der Lichtquelle und dem Fluorophor angeordnet und absorbiert die grünen und roten Bestandteile des sichtbaren Lichts und lässt nur blaues Licht zum Fluorophor durch. Das blaue Licht regt den Fluorophor an, zu fluoreszieren. Zwischen dem Fluorophor und dem Beobachter ist ein zweiter Filter angeordnet, der bernsteinfarben ist, der das blaue Licht von der Lampe absorbiert, aber das grüne oder rote Fluoreszenzlicht vom Fluorophor zum Lichtdetektor, z.B. einem menschlichen Betrachter oder einer Nachweisausstattung, durchlässt.

[0068] Eine andere Ausführungsform verwendet polarisierende Filter. Bei einer typischen Lichtquelle wird das

Licht gleichmäßig um alle möglichen Orientierungen polarisiert. Durch Anordnen eines polarisierenden Filters vor einer Lampe ist es möglich, Licht mit einem engen Bereich von Orientierungen auszuwählen. Wenn ein zweiter polarisierender Filter auf dem ersten Filter angeordnet wird, aber orthogonal zum ersten, dann wird dieser zweite Filter im Wesentlichen das ganze polarisierte Licht entfernen, das durch den ersten Filter hindurchgeleitet wurde. Das Nettoergebnis ist, dass kein Licht den Betrachter erreicht. Wenn eine fluoreszierende Probe oben auf dem ersten Filter angeordnet wird, wird einiges der Probe durch das polarisierte Licht angeregt werden, das durch den ersten Filter hindurchgeleitet wird. Die Probe wird Fluoreszenz emittieren. Diese Fluoreszenz ist auch polarisiert. Jedoch wird das emittierte Licht eine ziemlich breite Verteilung von Orientierungen aufweisen. Einige dieser Orientierungen werden befähigt sein, durch den zweiten Filter hindurchgeleitet zu werden und den Betrachter zu erreichen. Das Nettoergebnis ist, dass die Fluoreszenz vom Betrachter gegen einen dunklen Hintergrund gesehen werden kann.

[0069] Die "Lichtquelle" kann irgendeine Vorrichtung sein, die befähigt ist, sichtbares Licht zu emittieren, z.B. ein typisches Haushaltslicht, wie eine leistungsschwache Fluoreszenzröhre oder eine Glühbirne, die sichtbares Licht erzeugt, einschließlich der Wellenlängen innerhalb des Anregungsspektrums des Fluorophors. Verschiedene Lampen erzeugen verschiedene Lichtintensitäten bei verschiedenen Wellenlängen. Somit kann zum Beispiel eine Lampe, die eine maximale Lichtausgabe bei Wellenlängen aufweist, bei denen eine Anregung des Fluorophors maximal ist, durch Verändern des Phosphors in einer Fluoreszenzröhre hergestellt werden. Einige Beispiele sind in Tabelle 2 angegeben.

Tabelle 2

Lampe	maximale Ausgabe (nm)	halbe Breite der Ausgabe (nm)	relative Ausgabe am Maximum
Philips F40B ¹	460	160	0,19
Interelectric F40T12/BBY ²	445	33	1,00
Nichia NP-160 ³	480	120	0,35
Panasonic FPL28EB ⁴	blau		
Panasonic FML27EB ⁴	blau		
Sylvania CF9DS/blau ⁵	457	46	
Dulux S9W F9TT/grün ⁶	550*	25	
Dulux S9W F9TT/rot ⁶	rot		

¹ Verfügbar von Phillips Lighting Co. aus Somerset, NJ.

² Verfügbar von Interelectric Corporation, Warren, NJ.

³ Verfügbar von Nichia America Corporation aus Mountville, PA.

⁴ Verfügbar von Matsushita Home and Commercial Products Company, Secaucus, NJ.

⁵ Verfügbar von Osram Sylvania, Inc., Mybrook, NY.

⁶ Verfügbar von Osram Corporation, Montgomery, NY.

* Hauptwert.

[0070] Jedoch fallen nur Lichtquellen, die blaues Licht erzeugen, innerhalb den Schutzbereich der beanspruchten Erfindung.

[0071] Der erste optische Filter wird zwischen dem Fluorophor und der Lichtquelle angeordnet und lässt Licht von der Lichtquelle im Wellenlängenbereich des Anregungsspektrums des Fluorophors durch. Da die meisten Fluorophore, die in der Erfindung nützlich sind, zwischen ungefähr 450 nm und 550 nm maximal angeregt werden, wird der erste optische Filter für das Auge typischerweise blau oder grün erscheinen.

[0072] Es ist wesentlich, dass der erste optische Filter die Übertragung von so viel Licht wie möglich von der

Lichtquelle verhindert (absorbiert), das ähnliche Wellenlängen wie die Fluoreszenzemission des Fluorophors aufweist. Ein Filter mit einer prozentualen Übertragung von ungefähr 0,01 % bei Wellenlängen im Emissionsspektrum des Fluorophors ist erwünscht.

[0073] Beispiele von Filtern mit diesen Eigenschaften schließen den Acrylit® #668-0GP, der von Cyro Industries aus Rockaway, NJ verfügbar ist, und den Wratten #98 ein, der von Eastman Kodak Company aus Rochester, NY hergestellt wird. [Fig. 3](#) zeigt das Absorptionsspektrum dieses Acrylit #668-0GP Filters, das durch ein Gerät gemessen wurde, das befähigt ist, Absorptionsvermögen bis zu 3,5 zu messen. [Fig. 4](#) zeigt das Absorptionsspektrum des Wratten #98 Filters aus dem Kodak Handbuch photographischer Filter. Die Datenreihe erstreckt sich nicht über Absorptionsvermögen von 3,0.

[0074] Der zweite optische Filter sollte nur Licht mit Wellenlängen im Bereich des Fluoreszenzemissionsspektrums des Fluorophors durchlassen. Da die meisten Fluorophore, die in der Erfindung nützlich sind, Emissionsspektren zwischen ungefähr 500 nm und ungefähr 650 nm aufweisen, wird der zweite Filter typischerweise gelb, bernsteinfarben oder rot für das Auge erscheinen.

[0075] Es ist wesentlich, dass der zweite Filter die Übertragung von so viel Licht wie möglich von der Lampe verhindert, das durch den ersten Filter hindurchgelassen wird. Für die meisten hier beschriebenen Fluorophore bedeutet dies, dass der zweite Filter blaues Licht absorbieren muss. Ein Filter mit einer prozentualen Übertragung von weniger als 0,1 % im blauen Bereich ist erwünscht. Filter mit diesen Eigenschaften schließen den Perspex® #300, der von ICI Chemicals and Polymers Limited of Darwen, Lancs., U.K. hergestellt wird, und den Wratten #12 ein, der von Eastman Kodak Company aus Rochester, NY hergestellt wird. [Fig. 5](#) zeigt das Absorptionsspektrum des Perspex® #300 Filters, das durch ein Gerät gemessen wurde, das befähigt ist, Absorptionsvermögen bis zu 3,5 zu messen. [Fig. 6](#) zeigt das Absorptionsspektrum des Wratten #12 Filters aus dem Kodak Handbuch photographischer Filter. Die Datenreihe erstreckt sich nicht über das Absorptionsvermögen von 3,0. Der Acrylit #408-5GP Filter, der von Cyro Industries aus Rockaway, NJ hergestellt wird, sollte aufgrund intrinsischer Fluoreszenz nicht allein verwendet werden, obwohl er zulässige Übertragungseigenschaften aufweist.

[0076] In einigen Fällen kann die Verwendung von zwei bernsteinfarbenen Filtern zusammen erwünscht sein. Zum Beispiel kann die Kombination des Wratten #12 mit dem Lee #15, der von Lee Filters, Ltd. aus Andover, Hampshire, U.K. hergestellt wird, zu gesteigerten Niveaus des Fluoreszenznachweises aufgrund einer Abnahme des durchgelassenen Hintergrundlichtes führen. In einer etwas anderen Situation kann der Acrylit #408-5GP Filter verwendet werden, der intrinsische Fluoreszenz besitzt, wenn ein Lee #21 Filter zwischen dem #408 Filter und der Probe angeordnet wird. Dies verringert wirksam die intrinsische Fluoreszenz. Probleme, die durch intrinsische Fluoreszenz des Filters bewirkt werden, können verringert werden, indem der Filter von der Lichtquelle weiter weg bewegt wird.

[0077] Die Übertragungseigenschaften der zwei Filter sollten von hoher nach niedriger Übertragung im Fall des blauen Filters und niedriger zu hoher im Fall des bernsteinfarbenen Filters, wie oben diskutiert, in einer solchen Weise ineinander übergehen, dass die zwei Filter zusammen die Übertragung von Lampenlicht zum Betrachter verhindern.

[0078] Beispiele nützlicher Filterkombinationen für diese Erfindung schließen den Acrylit #668-0GP mit dem Perspex® #300 ([Fig. 7](#)) und den Wratten #98 mit dem Wratten #12 ([Fig. 8](#)) ein.

[0079] [Fig. 1](#) ist eine schematische Darstellung der Funktionsprinzipien von erfindungsgemäßen Vorrichtungen und wird unter Bezugnahme auf bevorzugte Ausführungsformen beschrieben. Eine Lichtquelle **10**, wie eine Fluoreszenzlampe, scheint sichtbares Licht **20**, das durch den breiten Pfeil angezeigt ist, auf einen ersten optischen Filter **30**, der Wellenlängen entfernt, die keine Fluoreszenzemission des Fluorophors aktivieren, der auf dem Fluorophor enthaltenden Material **50** enthalten ist, das typischerweise ein Gel ist, das gefärbtes biologisches Material enthält. In einer bevorzugten Ausführungsform entfernt der erste Filter **30** rotes und grünes Licht. Nach Hindurchleiten durch den Filter **30** wird sichtbares Licht **20** zu Licht, das fast ausschließlich im Anregungswellenlängenbereich **40** liegt, in der bevorzugten Ausführungsform blaues Licht, das durch den langen, schmalen Pfeil angezeigt ist, wobei einiges des Lichtes durch das Fluorophor enthaltende Material **50** hindurchgeleitet wird und einiges davon den Fluorophor darauf trifft, wobei bewirkt wird, dass er Licht im Emissionswellenlängenbereich emittiert, das mit einem großen Überschuss des Lichts im Anregungswellenlängenbereich gemischt wird, um gemischtes Licht **70** zu bilden, in der bevorzugten Ausführungsform rotes oder grünes Licht, das mit blauem Licht gemischt wird. Das gemischte Licht **70** wird durch den zweiten optischen Filter **60** hindurchgeleitet, wo Licht im Anregungswellenlängenbereich (blaues Licht) entfernt wird, wobei Licht in der

Emissionswellenlänge **80** zurückbleibt, in der bevorzugten Ausführungsform rotes oder grünes Licht, das übrig bleibt, um den Lichtdetektor **90** zu treffen, der ein menschliches Auge oder eine Vorrichtung sein kann, wie ein optischer Scanner oder eine Kamera. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Lichtquelle **10** innerhalb eines Leuchtkastens **15** enthalten (siehe [Fig. 9–Fig. 12](#)), wie in einem herkömmlichen, kommerziell erhältlichen Transilluminator mit sichtbarem Licht. Die Lichtquelle **10** kann eine Fluoreszenzröhrenlampe oder Lampen im Standarddesign sein, zum Beispiel FPL28EB, die von Matsushita Home and Commercial Products Company aus Secaucus, NJ verfügbar ist, oder CF9DS/blau, die von Osram Sylvania, Inc., Maybrook, NY verfügbar ist. Die Sensitivität der Vorrichtung kann durch Verwenden von Lampen verstärkt werden, welche die maximale Lichtausgabe im Bereich des Anregungslichtspektrums bereitstellen (zwischen 450 und 500 nm in der bevorzugten Ausführungsform). Der erste Filter **30** ist vorzugsweise ein Stück halbdurchsichtiges Material, das oben am Leuchtkasten **15** befestigt ist, von ausreichender Größe, um die gesamte Oberfläche des Transilluminators zu bedecken. Die optischen Eigenschaften des Bogens in der bevorzugten Ausführungsform sind derart, dass Licht von weniger als ungefähr 500–550 nm durchgelassen wird und Licht von längeren Wellenlängen abgeschnitten wird. Jede Art von Film oder Bildschirm mit diesen optischen Eigenschaften kann verwendet werden. Eine bevorzugte Ausführungsform verwendet einen Acrylit #668-0GP Filter. Das Fluorophor enthaltende Material **50** ist vorzugsweise ein Fluoreszenz gefärbtes DNA Gel. Der zweite optische Filter **60** kann in der Form eines Bogens direkt über dem Gel vorliegen oder an einer abbildenden Vorrichtung befestigt sein oder in der Form von Linsen für eine Brille **28** vorliegen (in [Fig. 14](#) gezeigt). Dieser Filter **60** ist ein halbdurchsichtiger Film oder Bogen, der Licht von Wellenlängen weniger als der Emissionswellenlängenbereich oder mindestens das Emissionswellenlängenmaximum abschneidet, d.h. weniger als ungefähr 500–550 nm in der bevorzugten Ausführungsform, und Licht längerer Wellenlängen durchlässt. Jede Art von Film oder Bildschirm mit diesen optischen Eigenschaften kann verwendet werden. Eine bevorzugte Ausführungsform verwendet den Perspex® #300 Filter. Wenn der zweite Filter **60** ein Bogen ist, wird er oben auf dem Gel in der bevorzugten Ausführungsform angeordnet, und wird entlang der Kanten unterstützt, um einen Kontakt mit dem Gel zu vermeiden. Dieser Filter **60** kann an dem Leuchtkasten durch ein Gelenk oder andere Vorrichtungen, die im Stand der Technik bekannt sind, falls erwünscht, befestigt werden.

[0080] Die Lichtquelle kann aus vielen Arten bestehen und in viele Strukturen eingebracht sein. Jede geeignete Lichtquelle, die befähigt ist, die gesamte Probe im Anregungswellenlängenbereich für das Fluorophor zu beleuchten, das verwendet wird, kann als Lichtquelle **10** eingesetzt werden, zum Beispiel kann ein TV Bildschirm, Fotokopierer, Overhead Projektor, Diaprojektor, Kamerablitz, Straßenlicht, Blitzlicht, Autoscheinwerfer, Computerscanner oder eine Licht emittierende Diode verwendet werden, jedoch fallen nur Licht erzeugende Elemente, die eine maximale Lichtausgabe im sichtbaren Lichtspektrum von 500 nm oder weniger erzeugen und die Licht erzeugen, das im Wesentlichen frei von Licht im ultravioletten Bereich ist, innerhalb des Schutzbereichs der beanspruchten Erfindung.

[0081] Die erfindungsgemäßen Systeme können sowohl für quantitative als auch qualitative Analyse, Nachweis, Abbildung, Spektroskopie, Chromatographie, Mikroskopie, DNA Sequenzieren, Klonieren, Polymerase Kettenreaktion (PCR) Verfahren, Zellsortieren, Reparatur von DNA Schädigung oder Mutation, z.B. aufgrund von Alterung oder Krebs, Studien mit lebenden Tieren, z.B. genetisch veränderten Mäuse, die das Gen für das grüne Fluoreszenzprotein enthalten, und dergleichen, bakterielle Identifikation, Nachweis und Überwachen von Wachstum, medizinische Diagnose, z.B. Nachweis von Pilzinfektionen auf der Haut, Industrie- und Umweltstudien, Mineralstudien und Hobbys, z.B. das Vergnügen tropischer Fische oder anderen tropischen Meerestiere, die natürlicherweise Fluoreszenzpigmente enthalten, verwendet werden.

[0082] In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein Agarose- oder Polyacrylamidgel, in dem DNA Fragmente zuvor durch Elektrophorese getrennt worden sind, mit einem geeigneten Fluoreszenzfarbstoff, wie Ethidiumbromid, gefärbt, wie es in einem Standard Handbuch für Labortechniken in der Molekularbiologie beschrieben ist, oder wie es im Fall von SYBR Green I und SYBR Gold in der Literatur beschrieben ist, die durch Molecular Probes, Inc. aus Eugene, OR bereitgestellt wird. Das gefärbte Gel, das hier als das Fluorophor enthaltende Material **50** bezeichnet wird, wird oben (bezüglich des Betrachters vor) auf dem ersten optischen Filter **30** angeordnet. Die Lampen oder Lichtquellen **10** im Transilluminator sind eingeschaltet. Entweder der zweite optische Filter **60** ist über (wie durch den Betrachter definiert vor) dem Fluorophor enthaltenden Material **50** angeordnet, d.h. dem Gel, oder die Brille **28**, wie in [Fig. 28](#) gezeigt, wird durch den menschlichen Betrachter getragen. Alternativ gestalten Linsen den zweiten optischen Filter **60** aus, die so ausgeführt sind, um an einem optischen Scanner oder einer Kamera befestigt zu werden, die als ein Betrachter verwendet werden.

[0083] [Fig. 9](#) ist eine Schnittansicht einer erfindungsgemäßen Durchleuchtungsvorrichtung. Der Leuchtkasten **15** enthält elektrische Bestandteile, unterstützt Acrylbögen und lenkt Licht so gleichmäßig und intensiv wie möglich aus dem Oberteil. Das Innere des Kastens ist vorzugsweise aus einem weißen Kunststoff hergestellt,

um so viel Licht wie möglich zu reflektieren. Der Kasten weist vorzugsweise gebogene Kanten und einen Reflektor unter der Lampe auf, um eine Reflektion zu fördern. Die Seiten sind gewinkelt, um eine Lichtreflektion zu fördern. Er ist auch im Wesentlichen wasserdicht und lichtdicht. Der zweite optische Filter **60** ist vorzugsweise ein bernsteinfarbener Bildschirm, der den Perspex® #300 Acryl umfasst, der so gestaltet ist, um gut über das Oberteil des Kastens zu passen und um über die Kante des ersten optischen Filters **30** zu fallen, der vorzugsweise ein blauer Bildschirm ist. Die Überlappung des zweiten optischen Filters **60** über die Kanten des ersten optischen Filters **30** verhindert eine Lichtundichtigkeit und hindert den zweiten optischen Filter **60** daran wegzugleiten. Zur Betrachtung mit dem Auge kann der bernsteinfarbene Bildschirm durch eine Brille mit bernsteinfarbenen Linsen ersetzt werden. Zur Betrachtung mit einem Gerät kann der bernsteinfarbene Bildschirm durch einen kleinen Filter über der Betrachtungsgerät Blende ersetzt werden. Andere Materialien, die für den bernsteinfarbenen Bildschirm nützlich sind, schließen 7,62 mm (0,3") VSA orangefarbenes Vinyl von der Northwest Laminating Company, Inc., aus Seattle, WA und den Wratten Filter #21 von Eastman Kodak Co., – Rochester, NY ein. Der blaue Bildschirm ist vorzugsweise aus 6,35 mm (1/4") Cyro Industries 668-0GP Acryl, Rockaway, NJ, hergestellt. Er wird vorzugsweise am Leuchtkasten **15** in einer solchen Weise befestigt, dass seine obere Oberfläche frei von Verbindungen, Löchern, Schrauben und dergleichen ist, um Korrosion durch Flüssigkeiten zu verhindern. Der Bildschirm kann zusätzlich gehärtet sein, um ein Verkratzen zu verhindern. Er kann auch mit Gelenken versehen werden, so dass der Transilluminator, falls erwünscht, als ein Weißlicht Transilluminator verwendet werden kann. Um im Tageslicht oder beleuchteten Raum verwendet zu werden, ist der Transilluminator mit einem Betrachtungskasten ausgestattet, d.h. einer Abdeckung über dem Transilluminator durch dessen Oberteil, die Proben betrachtet werden können.

[0084] In einer bevorzugten Ausführungsform liegt unter dem ersten optischen Filter, der auf einer Lippe ruht, die durch Ausstellen der vertikalen Seiten des Leuchtkastens bereitgestellt wird, ein Streukörper Bildschirm **35** vor, um so intensives und gleichmäßiges Licht wie möglich über den Oberflächenbereich des ersten optischen Filters **30** bereitzustellen. Vorzugsweise ist der Streukörper Bildschirm **35** aus 1,59 mm (1/16") weißem Acryl, wie Acrylit #020-4 von Cyro Industries, hergestellt. Innerhalb des Leuchtkastens **15** ist ein An/Aus-Schalter **95**, ein Hauptkabel **96** und eine Sicherung **97** angeordnet. Die Vorrichtung kann für AG oder DC Strom gestaltet sein. Ein AC Vorschaltgerät **99** ist ein magnetisches Vorschaltgerät für die AC Übersetzung der Lampe. Die Lichtquelle **10** kann eine einzige 9W 15,9 cm (6-1/2") blaue kompakte Fluoreszenzlampe CF9DS/blau von Osram/Sylvania Inc., Maybrook, NY sein, die an einem vertikalen Bereich der Rückwand befestigt ist und zentral angeordnet ist, um eine gleichmäßige Lichtverteilung sicherzustellen. Eine größere Ausführungsform des Transilluminators enthält zwei 28 W Fluoreszenzlampen (FDL28EB), die von Matsushita Home and Commercial Company, Secaucus, NJ verfügbar sind.

[0085] [Fig. 10](#) ist eine Schnittansicht eines erfindungsgemäßen integrierten Transilluminators und einer erfindungsgemäßen horizontalen Elektrophorese-Einheit. Die Einheit umfasst weibliche Verbinder **100** von einem DC Stromversorger (nicht gezeigt), die so gestaltet sind, dass sie zu männlichen Verbindern **110** passen, die hinter oder durch den zweiten Filter **60** angeordnet sind, der vom Hauptteil des Leuchtkastens **15** durch Blöcke **105** getrennt ist. Die DC Stromversorgung über eine Platinelektrode **200** stellt Spannung über ein Gel zur Verfügung, um eine DNA Probe aufzutrennen. Der zweite Filter dient auch als ein Sicherheitsdeckel. Der erste Filter **30** dient auch als ein Lager für das Agarosegel, das als Fluorophor enthaltendes Material **50** wirkt. Sperrungsträgerstreifen **120** und eine Sperrungsträgerkonsole **125** unterstützen eine Sperrungsfeder **122**, die aus federndem Kunststoff hergestellt und zusammengedrückt ist, um zwischen den Sperrungsträger **120** und einen ersten Filterträger **32** zu passen. Ein Teflon beschichteter Schaumstoff **124** ist an der Sperrungsfeder **122** befestigt, so dass er gegen den Gelträger **32** gezwängt ist, um einen wasserdichten Verschluss zu bilden. Eine ähnliche Sperrung (nicht gezeigt) ist auf der linken Seite der Vorrichtung angeordnet. Die Sperrungen werden verwendet, um die flüssige Agarose zu enthalten, wenn sie geliert. Ein Kamm **115** wirkt, um Kammern im Agarosegel bereitzustellen, in die Proben geladen werden können. Der Streukörper **35** ist zwischen dem ersten Filter **30** und der Lichtquelle **10** angeordnet, um das Licht gleichmäßig auszubreiten. Sammelgefäße **130** halten Puffer bereit. Das AC Vorschaltgerät **99** für die Lichtquelle ist unter einem der Sammelgefäße **130** angeordnet, wobei es an eine AC Stromversorgung über das Hauptkabel **96** ankoppelbar ist. Alternativ kann die Lichtquelle von einer DC Quelle mit Strom versorgt werden.

[0086] Im Betrieb wird eine DNA Probe mit SYBR Green I inkubiert, das 100- oder 1000-fach in TAE verdünnt wurde, Ladungspuffer wird zugegeben und anschließend wird die Probe in eine Kammer im Agarosegel geladen. Die Probe wird anschließend elektrophoretisch bei ungefähr 100 V, 50 mA getrennt. Die Lichtquelle wird angeschaltet. Die DNA Fragmente werden betrachtet, während sie sich trennen. Sobald eine interessierende DNA Bande vom Rest der Mischung getrennt ist, kann die Elektrophorese gestoppt und das Gel fotografiert und die Bande, falls erwünscht, herausgeschnitten werden. Bei einfachen Mischungen werden verschiedene DNA Banden in Minuten getrennt. Somit verringert die Vorrichtung die Zeit von "blinder" Standard UV Elektro-

phoresis von ungefähr zwei Stunden drastisch. Die DNA Proben können auch vorgefärbt werden, wie mit Ethidiumbromid, und betrachtet werden, während sie sich auftrennen.

[0087] [Fig. 11](#) zeigt eine Seitenansicht einer erfindungsgemäßen integrierten Scannerdurchleuchtungsvorrichtung, die einen modifizierten kommerziell verfügbaren Scanner verwendet. Lichtquellen **10** sind wie der erste Filter **30** innerhalb eines Deckels **140** enthalten. Dieser Deckel kann verwendet werden, um das Standard Transparenzzubehör auf vielen Scannern zu ersetzen. Der Deckel **140** ist vorzugsweise drehbar, z.B. durch Gelenke (nicht gezeigt) mit dem Fotodetektorgefäß **190** verbunden, dessen obere Oberfläche, die den zweiten Filter **60** umfasst, so gestaltet ist, dass das Gel nicht zusammengedrückt wird, wenn der Deckel **140** abgesenkt wird. Fotodetektoren **150**, die innerhalb des Gefäßes **190** angeordnet sind, bewegen sich auf einer Führung **160** oder werden durch andere Mittel bewegt, die im Stand der Technik bekannt sind, um ein Fluorophor enthaltendes Material **50** zu scannen, das oben auf dem zweiten Filter **60** angeordnet ist. Ein Fotodetektorgefäß **190** umfasst auch Mittel zum Nachweisen des Fluoreszenzlichts, Digitalisieren des gescannten Bildes (nicht gezeigt), wie einen Prozessor, der Scannersoftware umfasst (nicht gezeigt), der im Stand der Technik bekannt ist, und digitalisierte Bilddaten **170** werden zur Analyse an einen Computer geschickt (nicht gezeigt). Die Empfindlichkeit der meisten kommerziell verfügbaren Scanner sollte ungefähr 40-fach verbessert werden, z.B. durch Verlangsamung der Scan Geschwindigkeit der Fotodetektoren **150** oder durch Ersetzen der Fotodioden Anordnung durch empfindlichere Mittel, wie einer ladungsgekoppelte Vorrichtung, zur erfindungsgemäßen Verwendung.

[0088] [Fig. 12](#) ist eine perspektivische Ansicht einer in der Hand gehaltenen erfindungsgemäßen Einheit **25**, die auf Kompaktheit ausgelegt ist, so dass die Einheit leicht in der Hand gehalten werden kann. Vorzugsweise verwendet diese Einheit austauschbare Bestandteile und weist in einer bevorzugten Ausführungsform Dimensionen von ungefähr (L x B x H): 279,4 x 63,5 x 38,1 mm (11" x 2,5" x 1,5") auf. Die Einheit umfasst ein oberes Gehäuse **175**, das den ersten Filter **30** und einen Streukörper (nicht getrennt gezeigt), den Ein/Aus-Schalter **95**, das DC Vorschaltgerät **98** und eine DC Eingangsbuchse **215** enthält. Die Lichtquelle **10** ist in einer Lampenvorschaltgerät Halterungskonsole **180** abnehmbar in einem unteren Gehäuse **185** angebracht, das so gestaltet ist, um in das obere Gehäuse **175** zu passen und durch Schrauben oder Arretierungsmittel (nicht gezeigt) im oberen Gehäuse **175** gehalten zu werden, so dass der erste Filter **30** direkt über einer Lichtquelle **10** angeordnet ist, wenn die Einheit zusammengebaut ist. Die Einheit schließt auch einen DC Eingangsbuchsenhalter **220** ein, um eine Verbindung zu einem Einstecktransformator für die Wand zu ermöglichen, um AC in DC zu transformieren.

[0089] Die erfindungsgemäßen Vorrichtungen können durch AC oder DC Strom unter Verwendung von entweder einem magnetischen, elektronischen oder DC Vorschaltgerät versorgt werden, um die Lichtquellen anzutreiben. Eine 12 Volt DC Stromversorgung ist bevorzugt, da 12 V signifikant sicherer sind als 120 V. Durch Verbinden der Einheit mit einer AC Stromquelle durch einen Einstecktransformator für die Wand oder dergleichen, der befähigt ist, AC in DC umzuwandeln, kann die Einheit an verschiedene Arten von AC Strom angepasst werden, die irgendwo in der Welt verfügbar sind. Infolgedessen ist jede zusammengebaute Einheit intern identisch. Zusätzlich kann die Einheit durch wieder aufladbare Batterien versorgt werden. Ein solches Merkmal ist insbesondere für Handlampen, z.B. zur Verwendung in Krankenhäusern und für Untersuchungen von Umwelteigenschaften, z.B. an Tatorten und auf oder von anderen Planeten, nützlich.

[0090] Zur erhöhten Empfindlichkeit können Lampen verwendet werden, die durch reflektierende silbermetallische Verkleidungen unterstützt werden, um Licht zu reflektieren. Lampen, die verschiedene Phosphore und Formen und verschiedene Wellenlängen verwenden, um ein Betrachten von Fluoreszenz zu verbessern, können auch verwendet werden, zum Beispiel maßgeschneiderte Lampen. Der erste optische Filter kann getrennte Bereiche für verschiedene Betrachtungstätigkeiten umfassen, z.B. zur Betrachtung von Farbstoffen mit verschiedenen Fluoreszenzeigenschaften, und der zweite Filter kann entsprechend getrennte Bereiche zur Betrachtung von Fluoreszenzarten und farbigen Färbungen umfassen, wie sie gewöhnlich mit einem Standard Leuchtkasten betrachtet werden. Der erste Filter kann Aussparungen oder andere Mittel zum Sichern der Anordnung bezüglich eines Leuchtkastens umfassen oder kann andere Halter für die Lichtquelle umfassen. Der erste Filter kann auch drehbar sein, um die Anschlussfläche der Einheit einzusparen. Der zweite Filter kann an dem Leuchtkasten durch eine mit Gelenken versehene Oberteilkonsole mit Aussparungen für verschiedene Filter, falls erwünscht, befestigt sein.

[0091] SYBR Green und SYBR Gold von Molecular Probes, Inc. aus Eugene, OR, sind bevorzugte Färbungen für DNA. Sie sind zum Nachweis von DNA empfindlicher als Ethidiumbromid und weniger mutagen. Wenn SYBR Green als Vorfärbung verwendet wird, sind zusätzlich die Kosten pro Gel zu denen unter Verwendung Ethidiumbromid vergleichbar. Diese Färbung beeinflusst die nachträgliche Gel Handhabung von gefärbter

DNA nicht, und kann, falls nötig, durch Ethanolpräzipitation entfernt werden.

[0092] Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Transilluminators umfasst eine 14 × 21 cm Betrachtungsoberfläche, die zur Betrachtung von Gelen kleinerer Größen geeignet ist. Größere Betrachtungsoberflächen, wie 28 × 42 cm, können für mehrer und extra große Gele verwendet werden. Es ist wirtschaftlich durchführbar, diese Erfindung zu verwenden, um Transilluminator herzustellen, die weit größer sind als bekannte UV Kästen, d.h. über 1,22 m (vier Fuß) lang.

[0093] Eine optimale Konfiguration der Vorrichtung kann als die Konfiguration aus einer Lampe und Filtern bestimmt werden, die für irgendeinen gegebenen Fluorophor die maximale Menge an Fluoreszenz und die minimale Menge an Lampenlicht ergibt, die den menschlichen Betrachter oder Detektor erreichen.

[0094] Das Verfahren zur Optimierung beginnt mit einer Berücksichtigung der optischen Eigenschaften des besonderen Fluorophors, der nachgewiesen werden soll:

- (a) Die Lampe sollte ihre maximale Lichtintensität bei Wellenlängen innerhalb des Anregungsspektrums des Fluorophors erzeugen.
- (b) Der erste Filter sollte die maximale Länge an Licht bei Wellenlängen innerhalb des Anregungsspektrums des Fluorophors durchlassen. Filter der bevorzugten Ausführungsformen hiervon lassen über 70 % des Lichts in diesem Bereich durch.
- (c) Der zweite Filter sollte die maximale Menge an Licht bei Wellenlängen innerhalb des Emissionsspektrums des Fluorophors durchlassen. In der Praxis lassen Filter der bevorzugten Ausführungsformen hiervon über 95 % des Lichts in diesem Bereich durch.

[0095] Zugleich dass das Anregungslicht zu und das emittierte Licht von dem Fluorophor maximiert wird, ist es entscheidend, das Licht von der Lampe, das den Betrachter erreicht, auf einem Minimum zu halten. Dies schließt die folgenden Berücksichtigungen ein:

- (a) Eine Lampe, die eine minimale Lichtintensität außerhalb des Anregungsbereiches des Fluorophors erzeugt.
- (b) Der erste Filter sollte so viel des Lampenlichts mit Wellenlängen außerhalb des Anregungsspektrums des Fluorophors wie möglich absorbieren. Filter der bevorzugten Ausführungsformen hiervon absorbieren ungefähr 99,99 % des Lichts in diesem Bereich.
- (c) Der zweite Filter sollte so viel des Lampenlichts mit Wellenlängen außerhalb des Emissionsspektrums des Fluorophors wie möglich absorbieren. Filter der bevorzugten Ausführungsformen hiervon absorbieren ungefähr 99,9 % des Lichts in diesem Bereich.
- (d) Die Absorptionswellenlängenbereiche der zwei Filter müssen so ineinander übergehen, dass die Summe der Absorptionsvermögen der zwei Filter im Übergangsbereich dazu führt, dass so viel des Lampenlichts wie möglich in diesem Bereich absorbiert wird. In der Praxis absorbieren die besten gefundenen Filterkombinationen ungefähr 99,9 % des Lichts in diesem Bereich.
- (e) Wenn der erste Filter Lampenlicht in einem Bereich außerhalb der Anregungs- und Emissionsbereiche des Fluorophors durchlässt, dann muss der zweite Filter dieses Licht absorbieren.
- (f) Wenn der zweite Filter intrinsische Fluoreszenz besitzt, sollte auch ein zusätzlicher zweiter Filter umfasst sein, der zwischen ihm und der Lichtquelle angeordnet ist, um Licht herauszufiltern, das ihn anregt zu fluoreszieren.

[0096] Beim Optimieren des Systems zum Nachweis eines besonderen Fluorophors kann eine Lampe verwendet werden, die einen besonders gestalteten Phosphor enthält, oder es können Filter verwendet werden, die besonders gestaltete Pigmente enthalten, wie sie durch den Fachmann ohne übermäßiges Experimentieren leicht hergestellt und zusammengesetzt werden können.

[0097] Unter Verwendung leicht verfügbarer Bestandteile ist die folgende optimale Konfiguration für einen Leuchtkasten erstellt worden, um DNA Fragmente nachzuweisen, die durch Gelelektrophorese getrennt werden und anschließend mit SYBR Green I oder Ethidiumbromid gefärbt werden.

- (a) Lampe: Panasonic FPL28EB (verfügbar von Matsushita Home and Commercial Products Company, Secaucus, NJ) oder Sylvania CF9DS/blau
- (b) erster Filter: Acrylit #668-0GB
- (c) zweiter Filter: Perspex® #300

[0098] Mit diesen Bestandteilen ist es möglich, einen Transilluminator zu bilden, der ein Empfindlichkeitsniveau zum Nachweis gefärbter DNA bereitstellt, das zu dem eines herkömmlichen UV Transilluminators vergleichbar ist, wie im Beispiel unten beschrieben (siehe Tabelle 7).

[0099] Diese Konfiguration aus Lampen und Filtern ist auch zum Nachweisen anderer Fluorophore mit ähnlichen Anregungs- und Emissionseigenschaften wie SYBR Green I und Ethidiumbromid geeignet, wie SYPRO Orange, Vistra Green, Vistra ECF Substrat, GelStar, Fluorescein und Derivate und Eosin und Derivate und Rhodamin und Derivate.

[0100] Die Prinzipien, die hier beschrieben werden, können verwendet werden, um eine größere Anzahl verschiedener Vorrichtungen unter Verwendung verschiedener Anordnungen der Bestandteile herzustellen.

[0101] Zum Beispiel zeigt [Fig. 13](#) ein Schema eines Transilluminators zur Betrachtung fluoreszierender Materialien in Gelen und anderen durchsichtigen Medien. In dieser Ausführungsform sind die Lichtquellen **10** und der erste optische Filter **30** in einem Halter oder dem Leuchtkasten **15** enthalten, über welchem das Fluorophor enthaltende Material **50** angeordnet ist. Der zweite optische Filter **60** ist über dem Fluorophor enthaltenden Material **50** angeordnet. Das Licht im Anregungswellenlängenbereich trifft zuerst den Filter **30**, um Wellenlängen herauszufiltern, und wird in das Medium **50** geleitet, wobei bewirkt wird, dass Fluorophore darin fluoreszieren, die Licht im Emissionswellenlängenbereich emittieren, das gemischt mit Licht im Anregungswellenlängenbereich durch den zweiten optischen Filter hindurchgeleitet wird, wo Licht im Anregungswellenlängenbereich herausgefiltert wird, wobei im Wesentlichen nur Licht im Emissionswellenlängenbereich austritt, um den Lichtdetektor **90** zu treffen.

[0102] [Fig. 14](#) zeigt ein Schema eines Epibeleuchters zur Beleuchtung von oben zur Betrachtung von Fluoreszenzmaterialien in trüben Medien, wie Dünnschichtchromatographieplatten. In diesem Fall wird Licht von den Lichtquellen **10**, die in den Leuchtkasten **15** gehalten werden, durch den ersten optischen Filter **30** hindurchgeleitet, um Fluorophore im Medium **50** anzuregen, um Licht im Emissionswellenlängenbereich zu emittieren, das durch den zweiten Filter **60** hindurchgeleitet wird, der in einem Winkel (vorzugsweise, aber nicht notwendigerweise 90°) zum ersten Filter **30** zum Herausfiltern von Wellenlängen außer jenen im Emissionswellenlängenbereich angeordnet ist, nach welchem das Licht im Emissionswellenlängenbereich den Lichtdetektor **90** trifft.

[0103] [Fig. 15](#) zeigt ein Schema zur Betrachtung der Position von fluoreszierenden Materialien während einer Säulenchromatographie. In diesem Fall wird ein Leuchtkasten **15**, der die Lichtquellen **10** und den ersten Filter **30** enthält, neben dem Fluorophor enthaltenden Material **50**, einem Säulenchromatograph, angeordnet. Der zweite Filter **60** wird auf der gegenüberliegenden Seite der Säule angeordnet. Das Licht wird durch den ersten Filter **30** hindurchgeleitet, trifft die Säule **50** und wird durch den zweiten Filter **60** zum Lichtdetektor **90** hindurchgeleitet.

[0104] [Fig. 16](#) zeigt ein Gelelektrophorese Gerät, in dem die zwei Platten, die das Gel enthalten, auch als die zwei Filter wirken, wobei ermöglicht wird, dass fluoreszierende Materialien fortlaufend während der Elektrophorese betrachtet werden. Der Leuchtkasten **15**, der die Lichtquellen **10** enthält, hält den Filter **30** in seiner Position. Der erste Filter **30** und zweite Filter **60** wirken als die zwei Platten, die das Gel halten, d.h. das Fluorophor enthaltende Material **50**. Der Lichtdetektor **90** ist so angeordnet, um Licht zu erhalten, das von den Lichtquellen **10** durch den ersten Filter **30**, das Fluorophor enthaltende Material **50** und den zweiten Filter **60** hindurchgeleitet wird. Vorzugsweise hat der erfindungsgemäße horizontale Elektrophorese Transilluminator eine Anschlussfläche von ungefähr 25 × 10 cm und weist dieselbe Größe wie eine gewöhnliche Gelkammer auf. Da der Betrachter das Voranschreiten einer DNA Trennung fortlaufend überwachen kann, muss ein Gel nur so lang laufen gelassen werden bis die interessierende/n DNA Bande/n getrennt ist/sind, somit können in vielen Fällen Gellaufzeiten auf fünfzehn bis zwanzig Minuten verkürzt werden. Zusätzlich können DNA Banden in der Elektrophorese-Einheit aus dem Gel ausgeschnitten werden, wobei die Gefahr eines Beschädigens des Gels während einer Übertragung in einen getrennten Transilluminator vermieden wird.

[0105] [Fig. 17](#) zeigt ein Dünnschichtchromatographie Gerät, in dem die Filter ein integrierter Teil des Geräts sind, wobei ermöglicht wird, dass fluoreszierende Materialien während einer Dünnschichtchromatographie betrachtet werden. In diesem Fall ist der erste Filter **30** ein integrierter Teil des Leuchtkastens **15**, welcher die Lichtquelle **10** enthält, welche abnehmbar mit einem Gefäß **27** verbunden ist, in welchem das Fluorophor enthaltende Material **50** angeordnet ist. Eine Seite des Gefäßes **27** umfasst den zweiten Filter **60**. Wie in [Fig. 11](#) wird Licht von einer Lichtquelle **10** durch den ersten Filter **30** hindurchgeleitet, um das Fluorophor enthaltende Material **50** zu treffen, und die Fluoreszenz wird durch einen zweiten Filter **60** hindurchgeleitet und erreicht den Lichtdetektor **90**.

[0106] [Fig. 18](#) zeigt eine in der Hand gehaltene Einheit zusammen mit der Brille **28**, die den zweiten Filter **60** enthält, die von einem menschlichen Betrachter getragen wird. Das Auge des Betrachters oder ein mechani-

scher Lichtdetektor **90** wird durch eine Linse oder Linsen bedeckt, die als Teil der Brille **28** gezeigt ist/sind, die den zweiten Filter **60** enthalten. Das Licht von der Lichtquelle **10** in der in der Hand gehaltenen Einheit **25** wird durch den ersten Filter **30** hindurchgeleitet, der auch in der in der Hand gehaltenen Einheit **25** umfasst ist, wird dann durch das Fluorophor enthaltende Material **50** und den zweiten Filter **60** hindurchgeleitet, der in der Brille **28** umfasst ist, um das Auge des Betrachters oder den Lichtdetektor **90** zu erreichen. Diese Ausführungsform ist für ein durchsichtiges Medium nützlich. In alternativen Ausführungsformen, die ein trübes Medium einschließen, kann die in der Hand gehaltene Einheit **25** bezüglich des Fluorophor enthaltenden Materials **50** so angeordnet werden, dass das Licht von der Lichtquelle **10** das Medium **50** trifft und die emittierte Fluoreszenz zum zweiten Filter **60** und Lichtdetektor **90** hindurch tritt. Die Lichtquelle **10** kann mit DC oder AC Strom arbeiten. Als eine DC Einheit kann die in der Hand gehaltene Einheit **25** durch wieder aufladbare Batterien versorgt werden und somit, falls erwünscht, an entfernten Orten arbeiten.

[0107] Die in der Hand gehaltene Einheit stellt eine Einsatzflexibilität zur Betrachtung von Fluorophoren sowohl in "offenen" Systemen, wie Agarosegelen, Nitrocellulose und Polyvinylidifluorid (PVDF) Membranen und Dünnschichtchromatographie (engl.: thin layer chromatography (TLC)) Platten, als auch in "geschlossenen" Systemen bereit, wie Plastik- und Glasröhrchen, Platten mit 96 Vertiefungen, Chromatographiesäulen und Natriumdodecylsulfatpolyacrylamid Gelelektrophorese (engl.: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE)) Gelen und jeder Art von Gel während Elektrophorese. Unter Verwendung von sichtbarem Licht können Fluorophore durch einen weiten Bereich von durchsichtigen oder halbdurchsichtigen Materialien betrachtet werden, wie Glas, Polystyrol, Polyethylen, Polypropylen oder Acryl. Zum Beispiel kann in 1,5 ml Polypropylen Zentrifugenröhrchen unter Verwendung einer in der Hand gehaltenen Ausführungsform, wie hier beschrieben, Fluorescein mit einer achtfach höheren Empfindlichkeit als unter Verwendung einer UV Lampe nachgewiesen werden, so dass Konzentrationen bis zu 25 nM nachgewiesen werden können, wobei unter Verwendung von UV Licht bei 360 und 312 nm ungefähr 200 nM die geringste nachweisbare Konzentration von Fluorescein ist und unter Verwendung von UV Licht bei 245 nm über 1000 nM Fluorescein anwesend sein müssen, um nachgewiesen zu werden.

[0108] In "offenen" Systemen, wie Agarosegelen, Nitrocellulosemembranen und TLC Platten, ist festgestellt worden, dass Fluorescein bei sehr geringen Konzentrationen nachweisbar ist. Zum Beispiel liegt die visuelle Nachweisgrenze bei PVDF Membranen bei ungefähr 12 Femtomol Fluorescein, ungefähr die zweifache Sensitivität, die unter Verwendung von UV Licht erreicht wird.

[0109] [Fig. 19](#) zeigt einen erfindungsgemäßen Transilluminator, der einen Leuchtkasten **15** umfasst, der die Lichtquelle **10** und den ersten Filter **30** enthält, auf welchem das Fluorophor enthaltende Material **50** angeordnet ist. Ein in der Hand gehaltener Stab **210**, der den zweiten Filter **60** umfasst, kann manuell über das Fluorophor enthaltende Material **50** geleitet werden und schickt Bilddaten **170** zu einem Detektor (nicht gezeigt). Der Betrachter **90**, der als ein menschliches Auge gezeigt ist, das eine Brille trägt, die auch die zweiten Filter **60** enthält, kann die Fluoreszenz direkt betrachten, um beim Lenken des Stabes über das Fluorophor enthaltende Material behilflich zu sein.

[0110] [Fig. 20](#) zeigt ein Gel, das SYBR Gold gefärbte DNA auf einem 312 nm UV Transilluminator (linke Seite) mit einem erfindungsgemäßen Transilluminator vergleicht. Verschiedene Mengen an λ DNA, die mit HindIII geschnitten wurde, wurden durch Gelelektrophorese getrennt, und das Gel wurde mit SYBR Gold gefärbt. Die Gele wurden dann auf einem 312 nm UV Transilluminator (links) oder einem erfindungsgemäßen Transilluminator (rechts) fotografiert. Wie gesehen werden kann, stellt der erfindungsgemäße Transilluminator eine höhere Empfindlichkeit bereit.

[0111] [Fig. 21](#) zeigt das SYBR Gold Gel des in [Fig. 20](#) (rechte Seite) gezeigten Bildes, das unter Verwendung eines erfindungsgemäßen Transilluminators hergestellt wurde und unter Verwendung eines Computerscanners erfasst wurde. Das ursprüngliche Farbbild wurde in Graustufen umgewandelt und invertiert.

[0112] [Fig. 22](#) zeigt Gele, die einen DNA Abbau unter Verwendung eines 312 nm UV Transilluminators (rechte Seite) mit dem unter Verwendung eines erfindungsgemäßen Transilluminators vergleichen. 100 ng supercoiled Plasmid pBR322, das SYBR Green I enthält, wurde entweder auf einer Ausführungsform (F40T12/BBY + #668 Filter) oder einem 312 nm UV Transilluminator (UV) für verschiedene Zeiträume angeordnet. Die DNA wurde dann mit T4 Endonuklease V verdaut, die T:T Dimere ausschneidet. Die DNA wurde dann auf einem 0,7 % Agarosegel laufen gelassen und fotografiert. Es ist klar, dass bis zu 5 Sekunden Exposition gegenüber UV Licht ausreichend sind, um nahezu 100 % des Plasmids in die entspannte (engl.: relaxed (rx)) Form umzusetzen und dass nach 300 Sekunden die DNA vollständig fragmentiert ist. Im Gegensatz dazu führt eine 300 Sekunden Exposition auf der erfindungsgemäßen Ausführungsform zu keiner nachweisbaren Veränderung des

Plasmids.

[0113] [Fig. 23](#) zeigt Gele, die DNA vergleichen, die mit Ethidiumbromid, unter Verwendung eines Standard UV Transilluminators (linke Seite) und eines erfindungsgemäßen Transilluminators (rechte Seite) gefärbt wurden.

[0114] Wie durch den Fachmann erkannt werden wird, kann der zweite Filter, der in irgendeiner der oben beschriebenen Ausführungsformen gezeigt ist, eher in der Form von Linsen einer Brille oder als Zusätze für mechanische Lichtdetektoren als ein Filterbogen oder eine Platte, wie gezeigt, bereitgestellt werden. Ferner können die Vorrichtungen mit austauschbaren Filtern oder nebeneinander angeordneten Filter gestaltet werden, um zu ermöglichen, dass verschiedene Fluorophore mit maximaler Empfindlichkeit nachgewiesen werden. Lampen können konstruiert werden, um Wellenlängen bereitzustellen, die für jedes System optimiert sind, jede nach den hier bereitgestellten Lehren, wie es vom Fachmann leicht verstanden werden kann.

BEISPIELE

Beispiel 1: Empfindlichkeit

[0115] Die Empfindlichkeit einer optimierten erfindungsgemäßen Vorrichtung wurde durch Nachweis bekannter Mengen an DNA auf Gelen, die mit SYBR Green I und Ethidiumbromid gefärbt wurden, sowohl durch das Auge als auch durch Fotografie gemessen. Was durch das Auge gesehen wird und was auf fotografischem Film aufgezeichnet wird, sind nicht notwendigerweise ein und dasselbe, insbesondere wenn Schwarz-Weiß Fotografie verwendet wird. Zum Beispiel ist fotografischer Film fähig, ein Bild über viele Sekunden anzuhäufen, und nach Bearbeiten kann das Bild quantifiziert werden. Andererseits ist die interpretative Fähigkeit des menschlichen Auges ohne Parallelen, wenn es direkt ein Bild betrachtet. Obwohl Wissenschaftler Fotografien von DNA Gelen für ihre Laboraufzeichnungen und für eine detaillierte Analyse, wie einer Berechnung der Größen von DNA Fragmenten, verwenden, wird viel der Analyse eines DNA Bandenmusters auf einem Gel unter Verwendung des bloßen Auges ausgeführt. Ferner wird das Ausschneiden von Gelteilen, die DNA enthalten, immer per Auge durchgeführt. Deshalb ist es wichtig, dass die Empfindlichkeit von jedem Gerät zum Sichtbarmachen von DNA in Gelen dokumentiert wird und für das menschliche Auge und fotografische Nachweisverfahren getrennt optimiert wird.

[0116] Der verwendete Leuchtkasten war ein Apollo 100, der von OfficeMax, Denver, CO. erhalten wurde. Er war mit einer F15T8DRWG Fluoreszenzröhre ausgerüstet. Dieser Kasten war zum Testen von 45,7 cm (18") Fluoreszenzröhren geeignet, wie die Osram F15T8D und die Osram F15T8BLK. Andere Lampen wurden an provisorische Gehäuse angepasst.

[0117] Die Fluoreszenzröhren wurden von Environmental Lighting, Denver, CO (Osram F15T8D, Osram F15T8BLK, Phillips F40B und Sylvania CF9DS/blau Lampen) und U.S. Aquarium, Denver, CO. (Panasonic FPL28EB Lampen) erhalten.

[0118] Die verwendeten Gallerfilter wurden von Mike's Camera, Boulder, CO oder von Wasatch Photographic, Denver, CO erhalten und schlossen Kodak Wratten Gallerfilter #12 (orangefarben), #21 (bernsteinfarben), #98 (blau) und #47 (blau) und Lee Gallerfilter #15 (bernsteinfarben) und #21 (bernsteinfarben) ein.

[0119] Die verwendeten Acrylfilter wurden entweder von SS Plastics, Englewood, CO, Fantastic Plastic, Englewood, CO oder Colorado Plastic, Boulder, CO erhalten und schlossen Acrylit #408-5GP (bernsteinfarben), Acrylit #668-0GP (blau), RAM #UM 2119 (bernsteinfarben), Dupont Lucit L#AM2422 (bernsteinfarben) und Dupont Lucit L #AM2424 (blau) ein. Zusätzlich wurde der bernsteinfarbene Filter Perspex® #300 von Amari Plastics, Bristol, UK erhalten. Alle amerikanischen Acrylfilter wurden in 3,18 mm (1/8 Inch) dicken Bögen verwendet, mit Ausnahme des 668-0GP, blau, der sowohl in 18 mm (1/8") und 6,35 mm (1/4") Dicken verwendet wurde. Die britischen Materialien betragen 3 und 6 mm.

[0120] Die Fluoreszenzfarbstoffe Ethidiumbromid, SYBR Green I und SYBR Gold wurden von Molecular Probes Inc., Eugene, OR erhalten. Alle anderen Chemikalien wurden von Boehringer Mannheim Corporation, Indianapolis, IN oder Sigma Corporation, St. Louis, MO erhalten.

[0121] Drei Proben λ DNA (1 μ g, 0,1 μ g und 0,01 μ g), die mit dem Restriktionsenzym EcoRI geschnitten wurden, wurden zweifach auf einem 0,7 % Agarosegel in 40 mM Tris Acetat Puffer (TAE), pH 7,8; 1 mM Ethylen-diamintetraessigsäure (EDTA) bei 85 V für 90 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde dann hal-

biert. Eine Hälfte des Gels wurde in einer 1:10.000 Verdünnung aus SYBR Green I in TAE für 30 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt, und die andere Hälfte wurde in einer 0,5 µg/ml Lösung Ethidiumbromid in TAE unter denselben Bedingungen gefärbt. Die Gele wurden bei 4°C gelagert.

[0122] Zu Referenzzwecken wurden die Gele auf einen UVP Modell #C-63 UV Transilluminator (302 nm Beleuchtung) (Ultraviolet Products, Inc., Upland, CA) unter Verwendung eines Polaroid 667 Films fotografiert. Die Expositionszeit betrug 0,5 Sekunden, und der f-Stopp betrug 5,5. Ein Kodak Wratten #12 Filter wurde oben auf dem Gel angeordnet. Die Kamera war eine Oszilloskopkamera C27 (Tektronix Inc., Portland, OR).

[0123] Um die optimale Konfiguration von Filtern und Lampen zu bestimmen, wurde ein Prototyp eines Transilluminators mit sichtbarem Licht gemäß des Schemas hergestellt, das in [Fig. 1](#) dargestellt und oben beschrieben ist. Die Gallerfilter wurden in klare, durchsichtige Acrylbögen eingeschlossen, um sie zu schützen. Alle Filter wurden in Kartonfassungen eingeschlossen, um eine Lichtundichtigkeit um die Kanten herum zu verhindern. Ein Verdunkelungstuch wurde verwendet, um Streulicht von der Lampe auszuschließen.

[0124] Eine Vielfalt von Lampen und Filtern wurde in dem Gerät angeordnet, und die DNA Banden in den Gelen wurden in einem schwach beleuchteten Raum sichtbar gemacht und fotografiert. Zusammen mit der Kamera wurde kein zusätzlicher Filter verwendet.

[0125] Um den neuen Transilluminator mit dem herkömmlichen UV Modell zu vergleichen, wurde von den bekannten Größen der Fragmente, die durch eine EcoRI Spaltung der λ DNA erzeugt wurden, die Menge an DNA in jeder Bande auf dem Agarosegel berechnet. Die Mengen reichten von 410 ng bis 0,7 ng pro Bande. Eine vollständige Auflistung ist in Tabelle 3 angegeben.

[0126] Um eine Standardmessung der Nachweisbarkeit bereitzustellen, wurde das gefärbte Gel zuerst auf einem Standard 302 nm UV Transilluminator angeordnet. Die DNA Banden waren unter Verwendung des bloßen Auges bis zu dem 0,9 ng Niveau herunter sichtbar, wenn mit SYBR Green I gefärbt wurde, und bis zu 1,4 ng, wenn mit Ethidiumbromid gefärbt wurde (Tabelle 4). In einem Foto war die Empfindlichkeit unwesentlich geringer: 1,4 ng für SYBR Green I und 4,4 ng für Ethidiumbromid. Die leicht höhere Sichtbarkeit der SYBR Green gefärbten DNA ist wahrscheinlich auf ein geringeres Hintergrundlichtniveau von dem Gel selbst zurückzuführen. Die Fähigkeit bis zu 0,9 ng DNA nachzuweisen, dient als ein Referenzpunkt für die Empfindlichkeit des hergestellten Transilluminators mit sichtbarem Licht.

[0127] Die Gele wurden dann auf dem neuen Transilluminator angeordnet, und verschiedene Kombinationen blauer Filter unter dem Gel und bernsteinfarbener Filter über dem Gel wurden zusammen mit verschiedenen Lampen erprobt. Sowohl Ergebnisse mit dem bloßen Auge als auch mit einem Fotofilm sind in den Tabellen 5 und 6 angegeben.

[0128] Von den blauen Filtern lässt #2424 übermäßige Mengen an rotem Licht durch, und seine Verwendung wurde nicht weiter fortgeführt. Der #98 lässt blaues Licht von signifikant kürzeren Wellenlängen als sowohl #668-0GB oder #47 durch, von denen beide sehr ähnliche Transmissionscharakteristika aufzuweisen scheinen. Die Transmissionscharakteristika kürzerer Wellenlängen von #98 bedeuten, dass er mit den gelben Emissionsfiltern (z.B. #12) verwendet werden kann, während #668-0GP und #47 mit den orangefarbenen Emissionsfiltern optimal sind.

[0129] Mit entweder #668-0GP oder #47 als Anregungsfilter wurde im Allgemeinen nachgewiesen, dass die Verwendung eines einzelnen orangefarbenen Filters auf der Emissionsseite nicht ausreichend war, weil entweder zu viel Hintergrundlicht durchgelassen wurde, um einen Nachweis der fluoreszierenden DNA zu ermöglichen, oder weil der Filter intrinsische Fluoreszenz besaß, welche die DNA Fluoreszenz überdeckte. Dieses letztere Problem war insbesondere mit den Filtern #408 und #2422 beachtlich.

[0130] Die Filterfluoreszenz kann unter Verwendung von zwei Emissionsfiltern in Reihe überwunden werden. Somit war es durch Anordnen eines #2119 oder Lee #21 vor einem #408 oder #2422 relativ zu der Lampe möglich, die Fluoreszenz des zweiten Emissionsfilters signifikant zu verringern.

[0131] Der Filter Perspex® #300 besaß keine intrinsische Fluoreszenz und erzielte zusammen mit #668-0GP als Anregungsfilter die besten Gesamtergebnisse.

[0132] Die Fotografie schließt signifikant verschiedene Expositionszeiten ein: typischerweise 0,6 Sekunden für UV, 5 Sekunden für die F40B und 15 Sekunden für die F15T8D. Unter Verwendung der F15T8D war die

Nachweisbarkeit von SYBR Green gefärbter DNA in Fotografien unter Verwendung entweder einer fünf Sekunden oder einer 15 Sekunden Expositionszeit ungefähr dieselbe. Jedoch war unter Verwendung einer fünf Sekunden Exposition die Ethidiumbromid gefärbte DNA in Fotografien im Wesentlichen nicht nachweisbar.

[0133] Eine nützliche Anordnung schließt Anregungsfilter #668-0GP und Emissionsfilter #300 ein (Tabelle 7). Entweder die Lampe F15T8D oder F40B erzielt ähnliche Niveaus von DNA Nachweisbarkeit für das bloße Auge. Für fotografische Zwecke erfordert die F15T8D eine 15 Sekunden Exposition, um angemessen EB gefärbte DNA zu zeigen, während die F40B fünf Sekunden erfordert. Es ist unwahrscheinlich, dass dieser Unterschied irgendeine praktische Signifikanz aufweist. Eine Lampe, die in einer Größe verfügbar ist, die in den Leuchtkasten passt, ist bevorzugt.

[0134] Die kleinste Menge an DNA, die für das bloße Auge unter Verwendung einer F15T8D Lampe und #668-0GP und #300 Filtern sichtbar ist, beträgt 0,7 ng, wenn mit SYBR Green I gefärbt wird. Dies ist mit dem Nachweisniveau des UV Transilluminators (0,9 ng) vergleichbar. Mit einer Ethidium gefärbten DNA ist der Weißlicht (WL) Transilluminator mit einem 4,1 ng Nachweisniveau etwa weniger empfindlich verglichen mit der Fähigkeit des UV Transilluminators, 1,4 ng nachzuweisen.

[0135] Bei der Fotografie ist die Situation umgekehrt: Das Nachweisniveau von 0,7 ng für SYBR Green gefärbte DNA unter Verwendung des WL Transilluminators ist etwas besser als der UV Transilluminator (1,5 ng). Mit einer Ethidium gefärbten DNA sind beide Transilluminator vergleichbar empfindlich und können 4,1 ng DNA nachweisen.

Tabelle 3

Mengen an anwesender DNA im Gel nach Elektrophorese

Banden Nr.	Größe (Basenpaar)	ng DNA pro Bande		
		1 µg Beladung	0,1 µg Beladung	0,01 µg Beladung
1	21220	410	41	4,1
2	7420	140	14	1,4
3 +4 ¹	5800 + 5640	220	22	2,2
5	4880	90	9	0,9
6	3530	70	7	0,7

¹ Die Banden #3 und #4 wurden auf dem Gel nicht aufgelöst.

Tabelle 4

Nachweisbare Niveaus von DNA unter Verwendung eines UV Transilluminators

Verfahren des Nachweises	Menge an nachweisbarer DNA (ng)	
	SYBR Green I	Ethidiumbromid
Auge	0,9	1,4
Foto ¹	1,5	4,1

¹ Die Expositionszeit für die Fotografien betrug 0,5 Sekunden.

Tabelle 5

Direkter sichtbarer Nachweis von fluoreszierender DNA¹

Bernstein- farbener Filter	Blauer Filter											
	47				98				668-0GP			
	WL		BL		WL		BL		WL		BL	
	SG	EB	SG	EB	SG	EB	SG	EB	SG	EB	SG	EB
12 + 15							0,9	41				
2119 + 408	0,9	9	0,9	9			0,9	22	0,9	9	0,7	4,1
2119 + 2422	0,9	9	0,7	4,1			0,9	22	0,9	9	0,7	4,1
21 + 408	0,9	22	0,7	9					0,7	9	0,7	4,1
300	0,7	9	0,7	9			0,9	22	0,7	4,1	0,7	4,1

¹ Diese Tabelle dokumentiert die Menge an DNA (in Nanogramm), die unter Verwendung verschiedener Filterkombinationen auf dem Gel sichtbar ist. WL, weiße Fluoreszenzlampe F15T8D; BL, blaue Fluoreszenzlampe F40B; SG, SYBR Green I; EB, Ethidiumbromid. Leere Eintragungen wurden nicht gemessen.

Tabelle 6

Fotografischer Nachweis von fluoreszierender DNA

Bernstein- farbener Filter	Blauer Filter											
	47				98				668-0GP			
	WL		BL		WL		BL		WL		BL	
	SG	EB	SG	EB	SG	EB	SG	EB	SG	EB	SG	EB
12 + 15												
2119 + 408									0,7	9		
2119 + 2422									0,9	9	0,9	4,1
21 + 408			1,0	9					0,7	9	0,9	9
300	1,0	9	1,0	9					0,7	4,1	0,7	4,1

¹ Diese Tabelle dokumentiert die minimale Menge an DNA (in Nanogramm), die in Fotografien auf dem Gel nachweisbar ist. WL, weiße Fluoreszenzlampe F15T8D; BL, blaue Fluoreszenzlampe F40B; SG, SYBR Green I; EB, Ethidiumbromid. Die Expositionszeiten für die WL und BL Fotografien betragen jeweils 15 Sekunden bzw. fünf Sekunden.

Tabelle 7

Nachweisbare Niveaus von DNA unter Verwendung des Transilluminators ¹

Nachweisverfahren	Menge an nachweisbarer DNA (ng)	
	SYBR Green I gefärbtes Gel	Ethidiumbromid gefärbtes Gel
Auge	0,7 (0,9)	4,1 (1,4)
Foto	0,7 (1,5)	4,1 (4,1)

¹ Der Transilluminator war mit einer F15T8D Lampe und den Filtern #668-0GP (blau) und #300 (bernsteinfarben) ausgerüstet. Für den fotografischen Nachweis betrug die Expositionszeit 15 Sekunden. Die Mengen an nachweisbarer DNA unter Verwendung eines UV Transilluminators sind eingeklammert. (Siehe Tabelle 3.)

Beispiel 2: Blaue kompakte Fluoreszenzlampen und SYBR Gold

[0136] Verschiedene Verdünnungen von λ DNA, die mit HindIII (Boehringer Mannheim) in 10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA geschnitten wurden, wurden bei 60°C für drei Minuten inkubiert. Die Proben wurden auf Eis gelegt und ein Probenladungspuffer (0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol, 15 % Ficoll Typ 400 in 10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 7,5) wurde zu jeder Mischung hinzugefügt. Verschiedene Mengen der DNA Proben (von 428 ng bis 0,85 ng) wurden in 89 nM Tris Borat, pH 7,82, und 2 mM EDTA (TBE) auf ein 1 % Agarosegel 76,2 × 127 mm (3" × 5") geladen. Das Gel wurde bei 80 V für zwei Stunden laufen gelassen und anschließend in 100 ml einer 1:10000 Verdünnung (in TAE) aus SYBR Gold für 30 Minuten gelegt. Das Gel wurde unter Verwendung einer Polaroid® Kamera (Polaroid Corporation, Cambridge, MA) mit einem Polaroid 667 Film entweder auf einem Fisher UV 312 nm Transilluminator mit variabler Intensität (Fischer Scientific, Pittsburgh, PA, Modell Nr. FBTTV-816), der in allen Fällen auf maximale Intensität eingestellt war, einem Wratten #12 auf der Kamera (f-Stopp = 5,6, Expositionszeit = 1/8 Sekunde) oder einer erfindungsgemäßen Ausführungsform fotografiert, die mit einer CF9DS/blauen Lampe, einem #668-0GP ersten Filter und einem #300 zweiten Filter (kein zusätzlicher Filter über der Kamera, f-Stopp = 5,6, Expositionszeit = 1 Sekunde) ausgestattet war.

[0137] Die Fotografien sind in [Fig. 20](#) gezeigt. Tabelle 8 zeigt die Menge an DNA in jeder Bande.

Tabelle 8

Die Menge an λ DNA die mit HindIII auf dem Gel geschnitten wurde.

Die Mengen aufgeführter DNA sind in ng angegeben.

Spur #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
DNA Beladung	428	214	107	54	27	13	6,7	3,3	1,7	0,85
Bande 1	204	102	51	26	13	6,4	3,2	1,6	0,80	0,40
Bande 2	83	42	21	10	5,2	2,6	1,3	0,65	0,32	0,16
Bande 3	58	29	14	7,2	3,6	1,8	0,90	0,45	0,22	0,11
Bande 4	38	19	10	4,8	2,4	1,2	0,60	0,30	0,15	0,075
Bande 5	20	10	5,1	2,6	1,3	0,64	0,32	0,16	0,080	0,040
Bande 6	18	8,9	4,5	2,2	1,1	0,56	0,27	0,13	0,070	0,035

[0138] In der unter Verwendung der erfindungsgemäßen Ausführungsform aufgenommenen Fotografie ist es möglich, Bande 3 in Spur 10 sichtbar zu machen. Dies entspricht 110 pg DNA. In der unter Verwendung des

UV Transilluminators aufgenommenen Fotografie ist es möglich, Bande 2 in Spur 10 zu sehen. Dies entspricht 160 pg DNA.

[0139] Per Auge lag Spur 10, Bande 4 (75 pg) gerade an der Grenze der Sichtbarkeit für beide Vorrichtungen.

Beispiel 3: Ethidiumbromid Gel

[0140] λ DNA, die mit HindIII (Boehringer Mannheim) in 10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA geschnitten wurde, wurde mit einem Probenladungspuffer und verschiedenen Mengen DNA (von 125 ng bis 15,6 ng) auf ein 0,7 % Agarosegel 76,2 × 127 mm (3" × 5") in TAE geladen. Ethidiumbromid wurde sowohl zum Gel als auch zum Laufpuffer in einer Endkonzentration von 0,25 µg/ml hinzugefügt. Das Gel wurde bei 110 V für zwei Stunden laufen gelassen und dann per Auge untersucht und unter Verwendung einer Polaroidkamera mit einem Polaroid 667 Film entweder auf einem UV 312 nm Transilluminator (Fisher Scientific), der auf maximale Lampenintensität eingestellt war, unter Verwendung eines roten Tiffen 40,5 mm 23A Filters (Tiffen Manufacturing Corp., Hauppauge, NY) auf der Kamera (f-Stopp = 5,6, Expositionszeit = 2 Sekunden), oder einer erfindungsgemäßen Ausführungsform fotografiert, wie in [Fig. 9](#) dargestellt, die mit einer CF9DS/blauen Lampe, einem #668-0GP ersten Filter und einem Perspex® #300 zweiten Filter ausgestattet war. Ein Wratten #21 (Kodak) wurde als ein zusätzlicher zweiter Filter für die Fotografie verwendet (f-Stopp = 5,6, Expositionszeit = 30 Sekunden). Das Gel wurde auch auf einer Ausführungsform beobachtet und fotografiert (f-Stopp = 5,6, Expositionszeit = 10 Sekunden), die mit der obigen identisch ist, mit der Ausnahme, dass sei zwei CF9DS/blau Lampen enthielt.

[0141] Die Fotografien des Gels sind in [Fig. 23](#) gezeigt. Tabelle 9 zeigt die Menge an DNA in jeder Bande.

Tabelle 9

Die Menge an λ DNA auf dem Gel, die mit HindIII geschnitten wurde.

Die Mengen an aufgeführter DNA werden in ng angegeben.

Spur #	1	2	3	4
DNA Ladung	125	63	31	16
Bande 1	60	30	15	7,5
Bande 2	24	12	6,1	3,0
Bande 3	17	8,5	4,2	2,1
Bande 4	11	5,6	2,8	1,4
Bande 5	6,0	3,0	1,5	0,75
Bande 6	5,2	2,6	1,3	0,65

[0142] Per Auge war es unter Verwendung des UV Transilluminators möglich, 0,65 ng DNA zu sehen. Unter Verwendung der Ausführungsform mit einer einzigen Lampe, war es möglich, 2,4 ng DNA zu sehen und unter Verwendung der Ausführungsform mit zwei Lampen war es möglich, 1,2 ng DNA zu sehen. Insgesamt war die Betrachtbarkeit der DNA Banden in der Ausführungsform mit zwei Lampen darin besser als in der Version mit einer einzigen Lampe, dahingehend dass das Auge nicht so lange benötigte, um sich anzupassen, wie es das für die geringeren Lichtniveaus tat, die von der Einzellampenversion stammen.

[0143] In dem Polaroidfoto, das unter Verwendung des 312 nm UV Transilluminators aufgenommen wurde, ist es möglich, die Bande 6 in Spur 4 zu sehen. Dies entspricht 0,65 ng DNA. In dem Foto, das unter Verwendung der Ausführungsform mit einer einzigen Lampe aufgenommen wurde, ist es möglich, dieselbe Bande zu sehen, wenn der Polaroidfilm für 30 Sekunden exponiert wird. Die Ausführungsform mit zwei Lampen ergab sehr ähnliche DNA Nachweisbarkeitsergebnisse im Foto, aber die benötigte Expositionszeit war nur ein Drittel so lang.

Beispiel 4: Gel Scannen

[0144] Das SYBR Gold gefärbte Gel, das in Beispiel 2 verwendet wurde, wurde auf einem Astra 600S Scanner (Umax Technologies, Inc., Fremont, CA) angeordnet, der mit einem Power CenterPro™ 180 Computer (PowerComputing, Round Rock, TX) verbunden war, auf dem eine VistaScan V2.3.7 Software (Umax Data Systems, Inc.) lief. Der bernsteinfarbene Filter Perspex #300 wurde oben auf dem Scannerlager angeordnet, das Gel wurde oben auf dem Perspex angeordnet und oben darauf ein #668-0GP erster Filter und eine CF9DS/blau Lampe. Das Gel wurde in Farbe bei 600 dpi unter Verwendung des "durchlässigen Modus" (engl.: „transmissive mode“) mit VistaScan Einstellung von jeweils 97, 9, 34 bzw. 53 für Glanzlicht, Schatten, Helligkeit bzw. Kontrast gescannt.

[0145] [Fig. 21](#) zeigt das sich ergebende Bild, das unter Verwendung von Bildbearbeitungssoftware verstärkt wurde, wie sie in Canvas 5.0 (Deneba Systems, Inc., Miami, FL) gefunden wird. Es ist möglich, die Bande 1 in Spur 6 zu sehen. Dies entspricht 6,4 ng DNA.

Beispiel 5: DNA Unversehrtheit

[0146] Ein supercoiled Plasmid pBR322 wurde entweder auf einem erfindungsgemäßen Transilluminator oder einem 312 nm UV Transilluminator für verschiedene Zeiten angeordnet. Die DNA wurde dann mit T4 Endonuklease V gespalten, die T:T Dimere ausschneidet, und auf einem 0,7 % Agarosegel laufen gelassen, um eine Quantifizierung der Menge entspannter Plasmide zu ermöglichen, die sich bildeten.

[0147] 1 µg supercoiled pBR322 in 100 µl 50 mM Tris, pH 7,5, 5 mM EDTA wurde mit 1 µl einer 100-fach Verdünnung aus SYBR Green I (verdünnt in 50 mM Tris, pH 7,5, 5 mM EDTA) auf Eis inkubiert. Diese Mischung wurde direkt auf der Oberfläche entweder einer Ausführungsform, die aus einer F40T12/BBY Lampe (Interelectric Inc., Warren, NJ) und einem Cyro #668-0GP Filter zusammengesetzt war, oder einem 312 nm UV Transilluminator angeordnet. Ein "Null-Zeit" Aliquot von 10 µl wurde von der Oberfläche vor dem Einschalten des Transilluminators entfernt und im Dunkeln auf Eis gelagert. Ferner wurden 10 µl Proben 5, 15, 30, 60 und 300 Sekunden nachdem die Vorrichtung angeschaltet wurde, entfernt.

[0148] 1 µl einer 20-fachen Verdünnung (unter Verwendung von 50 mM Tris, pH 7,5, 5 mM EDTA) aus T4 Endonuklease V (Epicentre, Madison, WI) wurde zu jedem 10 µl Zeitpunkt zugegeben und für zwei Stunden bei 37°C umgesetzt. Dieses Enzym schneidet T:T Dimere aus. Die Proben wurden dann auf einem 0,7 % Agarosegel in TAE laufen gelassen, und das Bandenmuster wurde fotografiert.

[0149] Die Ergebnisse sind in [Fig. 22](#) gezeigt. Es wird gezeigt, dass UV Licht äußerst schädlich für DNA ist; nach einer nur fünf Sekunden Exposition ist die supercoiled DNA fast vollständig in die entspannte Form umgesetzt, und nach fünf Minuten ist fast die ganze DNA in eine niedermolekulare Schliere umgesetzt worden. Unter Verwendung des erfindungsgemäßen Transilluminators jedoch war im Wesentlichen keine DNA Schädigung über die gesamte Dauer der Exposition (5 Minuten) nachweisbar.

[0150] Diese Erfindung bewahrt die Unversehrtheit der DNA Proben. Dieses Merkmal der Erfindung sorgt für verstärkte Wirksamkeiten in Verfahren, in denen die Unversehrtheit und der Informationsgehalt der DNA Proben wichtig ist, wie Genklonieren und Sequenzieren.

Beispiel 6: Polarisierung

[0151] Um die Fähigkeit eines Paares von Polarisationsfiltern zu testen, Fluoreszenzlicht auszuwählen und Lampenlicht zu entfernen, wurde ein Agarosegel unter Verwendung mehrerer Filterkombinationen betrachtet, das verschiedene Mengen λ DNA enthielt, die mit HindIII geschnitten und mit SYBR Gold Färbung gefärbt waren (dasselbe wie in Beispiel 2 verwendete Gel). Die Lichtquelle war eine CF9DS/blau Lampe. Die Polarisationsfilter waren von Visual Pursuits, Inc., Vernon Hills, IL.

Tabelle 10

Erster Filter	Zweiter Filter	ng DNA
keiner	keiner	26
P*	P (parallel)	83
P	P (orthogonal)	5,2

*P zeigt einen Polarisationsfilter von Visual Pursuits an.

[0152] Für die Fotografie wurde unter Verwendung eines Polaroid 667 Films nachgewiesen, dass es notwendig ist, einen Wratten #21 Filter einzuschließen, um das Lampenlicht auf Niveaus zu verringern, bei denen die fluoreszierenden DNA Banden festgehalten werden können.

[0153] Das Lampenlicht wurde nicht vollständig durch die zwei orthogonalen Polarisationsfilter entfernt, was die Empfindlichkeit dieser Ausführungsform relativ mangelhaft macht. Das Absorptionsspektrum von zwei orthogonalen Polarisationsfiltern zusammen zeigt, dass eine signifikante Menge blaues Licht durchgelassen wurde ($\%T_{460nm} = 0,23 \%$). Dies zeigt an, dass diese besonderen Polarisationsfilter das Licht in diesem Wellenlängenbereich nicht wirksam genug polarisieren, um von großem praktischen Nutzen zu sein. Filter, die zusammen ein $\% T$ von ungefähr 0,02 % oder weniger aufweisen, werden benötigt. Die Polarisation von Fluoreszenz kann verwendet werden, um zwischen großen und kleinen Fluorophormolekülen, immobilisierten oder freien Fluorophormolekülen oder orientierten/nicht orientierten Molekülen zu unterscheiden.

[0154] Es sollte verstanden werden, dass das fluorometrische Nachweissystem mit sichtbarem Licht, wie es hier insbesondere beschrieben ist, verändert werden kann, ohne von seiner grundlegenden Eigenschaft abzuweichen. Zum Beispiel können verschiedene Lichtquellen, Einstellungen und Filtertypen jene ersetzen, die hier exemplarisch dargelegt und beschrieben sind, solange das Licht, das den Lichtdetektor erreicht, d.h. das Auge des Betrachters oder die Nachweisvorrichtung, ausreichend Information über das Licht enthält, das von den Fluorophoren emittiert wird, deren Fluoreszenz sichtbar gemacht werden soll, um ein Betrachten eines Bildes des Fluoreszenzmusters zu ermöglichen, und solange ausreichend störendes Licht herausgefiltert worden ist, so dass ein Sichtbarmachen möglich ist. Es sollte deshalb verstanden werden, dass die Erfindung in anderen Weisen als hier spezifisch beschrieben innerhalb des Schutzbereichs der angehängten Patentansprüche durchgeführt werden kann.

Patentansprüche

1. Photolumineszenz-Abbildungssystem mit sichtbarem Licht, welches ein Licht erzeugendes Element (10), einen optischen Anregungsfilter (30) und einen optischen Emissionsfilter (60) zur Betrachtung von Fluoreszenz, welche von Fluorophoren oder einem Material (50) emittiert wird, das Fluorophore enthält, die befähigt sind, durch Licht eines Anregungstyps (40) angeregt zu werden und die befähigt sind, Licht eines emittierten Typs (70) zu emittieren, wobei mindestens ein Teil des emittierten Typs von einer von dem Anregungstyp verschiedenen Wellenlänge ist, einschließt, wobei das System umfasst:

a) eine Lichtquelle (10), umfassend das Licht erzeugende Element, welches Licht (20) zum Anregen der Fluorophore erzeugt, und den zwischen dem Licht erzeugenden Element und den Fluorophoren angeordneten optischen Anregungsfilter (30), welcher Licht des Anregungstyps (40) durchlässt und das Durchlassen von Licht des emittierten Typs verhindert, und

b) den zum Empfangen von Licht von den Fluorophoren angeordneten optischen Emissionsfilter (60), wobei der optische Emissionsfilter Licht des emittierten Typs (70) von den Fluorophoren durchlässt und das Durchlassen des Anregungslichts (40) verhindert, **dadurch gekennzeichnet**, dass

die Lichtquelle ein Licht erzeugendes Element (10) umfasst, welches maximale Lichtausgabe im sichtbaren Spektrum von 500 nm oder weniger erzeugt, und Licht erzeugt, welches im Wesentlichen frei von Licht im ultravioletten Bereich ist, und

das System derart angeordnet ist, dass ein oder mehrere Muster der von den Fluorophoren emittierten Fluoreszenz betrachtbar sind.

2. Photolumineszenz-Abbildungssystem nach Anspruch 1, umfassend einen Lichtdetektor (90), welcher entlang einer optischen Beleuchtungsachse angeordnet ist, die durch eine gedankliche, die Lichtquelle (10) und die Fluorophore verbindende Linie definiert ist.

3. Photolumineszenz-Abbildungssystem nach Anspruch 1, umfassend einen Lichtdetektor (90), welcher an einem Punkt angeordnet ist, der sich nicht auf einer optischen Beleuchtungsachse befindet, die durch eine gedankliche, die Lichtquelle (10) und die Fluorophore verbindende Linie definiert ist.

4. Photolumineszenz-Abbildungssystem nach Anspruch 2 oder 3, wobei der Lichtdetektor (90) eine Kamera, ein Scanner oder ein menschliches Auge ist.

5. Photolumineszenz-Abbildungssystem mit sichtbarem Licht nach Anspruch 1, wobei das Licht erzeugende Element (10) eine oder mehrere Fluoreszenzlampen umfasst.

6. Photolumineszenz-Abbildungssystem mit sichtbarem Licht nach Anspruch 1, wobei der optische Emissionsfilter (60) und der optische Anregungsfilter farbige optische Filter sind.

7. Photolumineszenz-Abbildungssystem mit sichtbarem Licht nach Anspruch 1, wobei der Anregungsfilter (30) ein Langwellen-Kantenfilter bzw. -Abschneidefilter im sichtbaren Bereich ist.

8. Photolumineszenz-Abbildungssystem mit sichtbarem Licht nach Anspruch 1, wobei der Emissionsfilter (60) ein Kurzwellen-Kantenfilter bzw. -Abschneidefilter im sichtbaren Bereich ist.

9. Photolumineszenz-Abbildungssystem mit sichtbarem Licht nach Anspruch 1, wobei der Emissionsfilter (60) eingerichtet ist, über einem menschlichen Auge angeordnet zu werden.

10. Photolumineszenz-Abbildungssystem nach Anspruch 1, wobei die Lichtquelle (10), der optische Anregungsfilter (30) und der optische Emissionsfilter (60) Komponenten einer integrierten horizontalen Gelelektrophorese-Einheit sind.

11. Photolumineszenz-Abbildungssystem nach Anspruch 1, wobei die Lichtquelle (10), der optische Anregungsfilter (30) und der optische Emissionsfilter (60) Komponenten einer integrierten vertikalen Gelelektrophorese-Einheit sind.

12. Photolumineszenz-Abbildungssystem nach Anspruch 1, wobei die Lichtquelle (10), der optische Anregungsfilter (30) und der optische Emissionsfilter (60) Komponenten einer integrierten Dünnschichtchromatographie-Einheit sind.

13. Photolumineszenz-Abbildungssystem mit sichtbarem Licht nach Anspruch 1, wobei die Lichtquelle (10) in einer in der Hand gehaltenen bzw. tragbaren Einheit angeordnet ist.

14. Photolumineszenz-Abbildungssystem mit sichtbarem Licht nach Anspruch 1, wobei der optische Anregungsfilter (30) polarisiertes Licht des Anregungstyps (40) mit einer ersten Polarisationsausrichtung durchlässt und das Durchlassen bzw. die Transmission von Licht des Licht erzeugenden Elements mit einer von der ersten Polarisationsausrichtung verschiedenen Polarisationsausrichtung verhindert, wobei der optische Emissionsfilter (60) polarisiertes Licht des emittierten Typs (70) mit einer zweiten Polarisationsausrichtung durchlässt und das Durchlassen von Licht des Anregungstyps (40) verhindert, und wobei die zweite Polarisationsausrichtung von der ersten Polarisationsausrichtung verschieden ist.

15. Photolumineszenz-Abbildungssystem mit sichtbarem Licht nach Anspruch 1, wobei die Fluorophore eine Stokes-Verschiebung von weniger als etwa 100 nm aufweisen.

16. Verfahren zur Betrachtung von Fluoreszenz, welche von Fluorophoren emittiert wird, die befähigt sind, durch Licht eines Anregungstyps (40) angeregt zu werden und Licht eines emittierten Typs (70) zu erzeugen, wobei mindestens ein Teil des emittierten Typs von einer von dem Anregungstyp verschiedenen Wellenlänge ist, einschließlich der Schritte des Lenkens von Licht von einem Licht erzeugenden Element (10) durch einen optischen Anregungsfilter (30) auf die Fluorophore und des Hindurchleitens emittierten Lichts durch einen optischen Emissionsfilter (60), wobei das Verfahren umfasst:

a) das Lenken sichtbaren Lichts (20) von einer Lichtquelle (10) auf die Fluorophore oder ein Material (50), welches die Fluorophore enthält, wodurch die Fluorophore Licht des emittierten Typs (70) emittieren, wobei die Lichtquelle (10) das Licht erzeugende Element umfasst, welches Licht (20) erzeugt, von dem mindesten ein Teil von dem Anregungstyp ist, und der optische Anregungsfilter (30) zwischen dem Licht erzeugenden Element und den Fluorophoren angeordnet ist, wobei der optische Anregungsfilter Licht des Anregungstyps (40) durchlässt und das Durchlassen von Licht des emittierten Typs (70) verhindert,

b) das Hindurchleiten des emittierten Lichts (**70**) durch den optischen Emissionsfilter (**60**), welcher Licht des emittierten Typs von den Fluorophoren durchlässt und das Durchlassen von Licht des Anregungstyps (**40**) verhindert, wodurch eine Fluoreszenzabbildung gebildet wird, und
c) das Betrachten der Abbildung mit einem menschlichen Auge oder einem anderen Lichtdetektor (**90**), dadurch gekennzeichnet, dass
das sichtbare Licht (**20**) von einem Licht erzeugenden Element (**10**) gelenkt wird, welches maximale Lichtausgabe im sichtbaren Spektrum von 500 nm oder weniger erzeugt, und Licht erzeugt, welches im Wesentlichen frei von Licht im ultravioletten Bereich ist, und
die Fluoreszenzabbildung eine Abbildung einer oder mehrerer Fluoreszenzmuster ist.

17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei die Fluorophore fluoreszenzgefärbte DNA sind.

18. Verfahren nach Anspruch 16, wobei die Fluorophore mindestens ein fluoreszenzmarkiertes Protein umfassen.

19. Verfahren nach Anspruch 16, wobei das Fluorophore enthaltende Material mindestens ein fluoreszierendes Protein enthält.

20. Verfahren nach Anspruch 16, wobei die Fluorophore in einem Gel vorliegen.

21. Verfahren nach Anspruch 16, wobei die Fluorophore in einem lebenden Organismus vorliegen.

22. Verfahren nach Anspruch 16, wobei die Fluorophore in einer Anordnung von Reagenzgläsern betrachtet werden.

23. Photolumineszenz-Abbildungssystem nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass der optische Anregungsfilter (**30**) blau ist und der optische Emissionsfilter (**60**) bernsteinfarben ist.

24. Photolumineszenz-Abbildungssystem nach Anspruch 23, wobei die betrachtbare Abbildung alle angeregten Fluorophore umfasst.

25. Photolumineszenz-Abbildungssystem nach einem der Ansprüche 10 bis 11, wobei die Gelelektrophorese-Betrachtungsoberfläche größer als 294 cm² ist.

26. Photolumineszenz-Abbildungssystem nach einem der Ansprüche 1 bis 15, 23 bis 25, wobei das Licht erzeugende Element eine Vielzahl von blaues Licht erzeugenden Elementen umfasst.

Es folgen 14 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

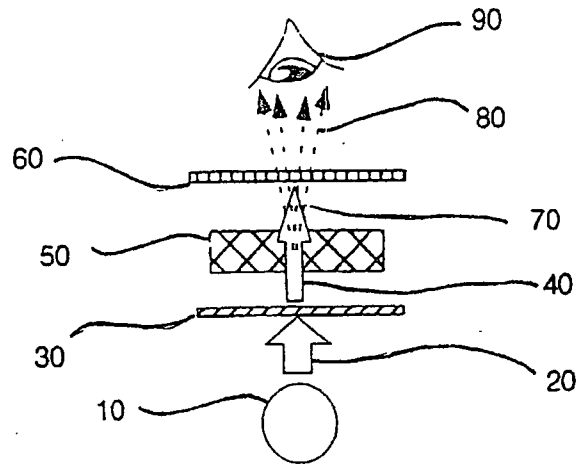


FIG. 1

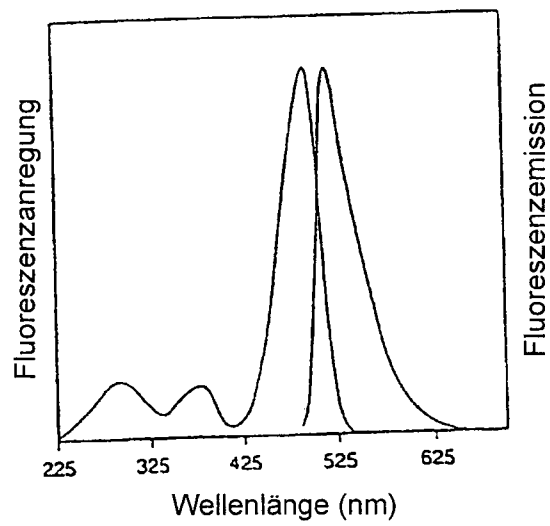


FIG. 2

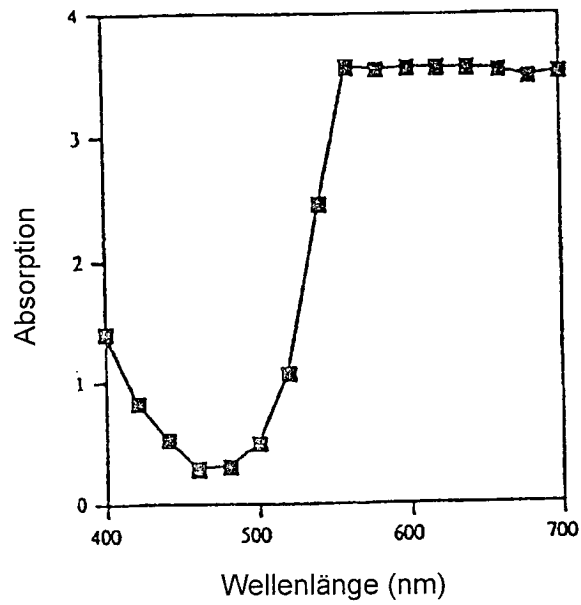


FIG. 3

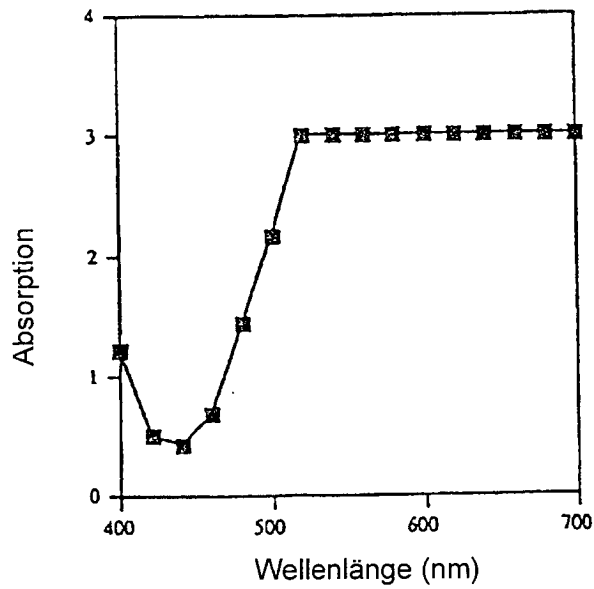


FIG. 4

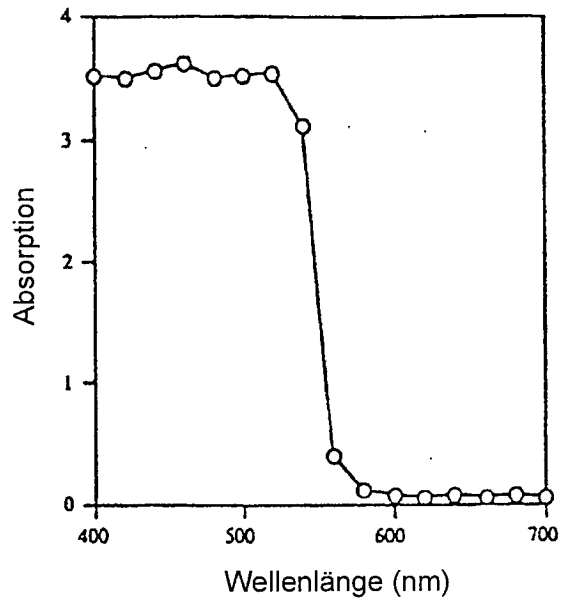


FIG. 5

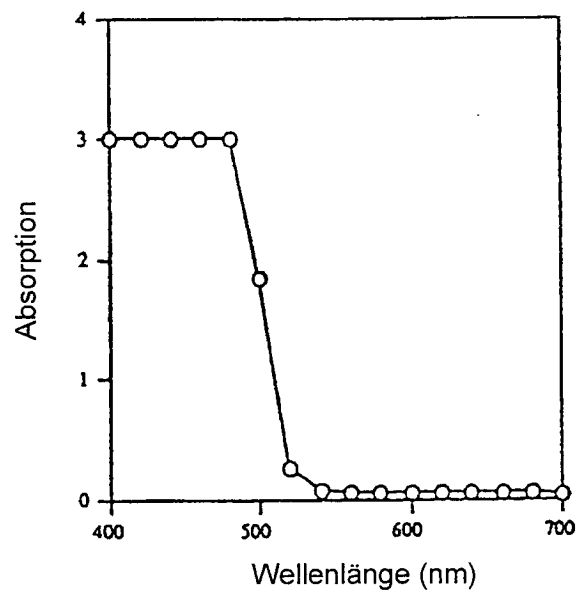


FIG. 6

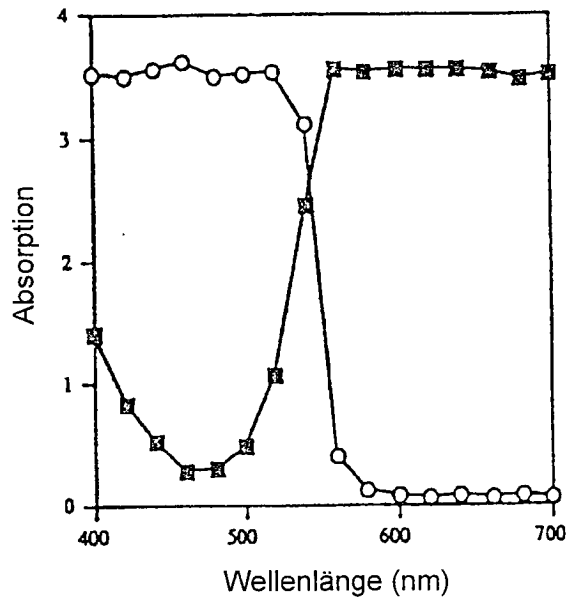


FIG. 7

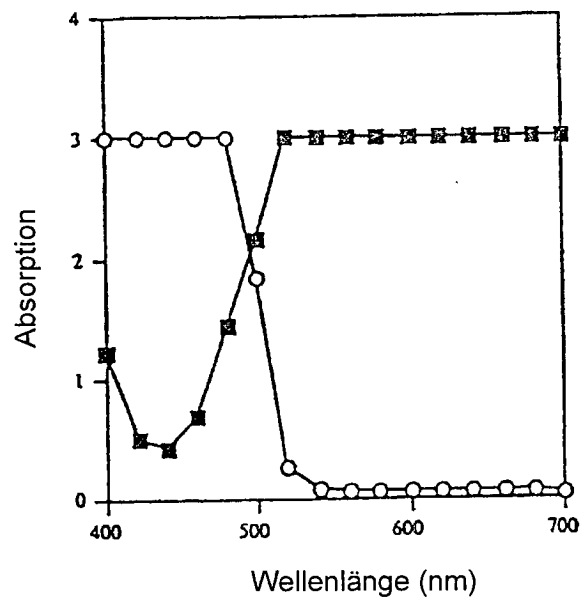


FIG. 8

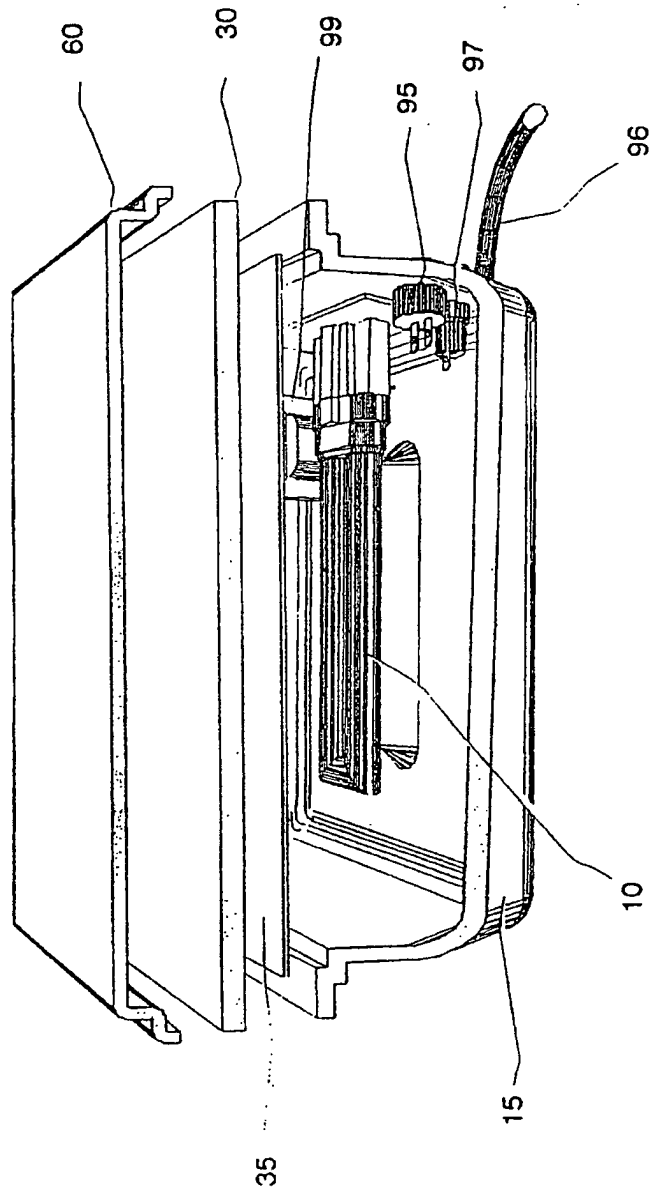
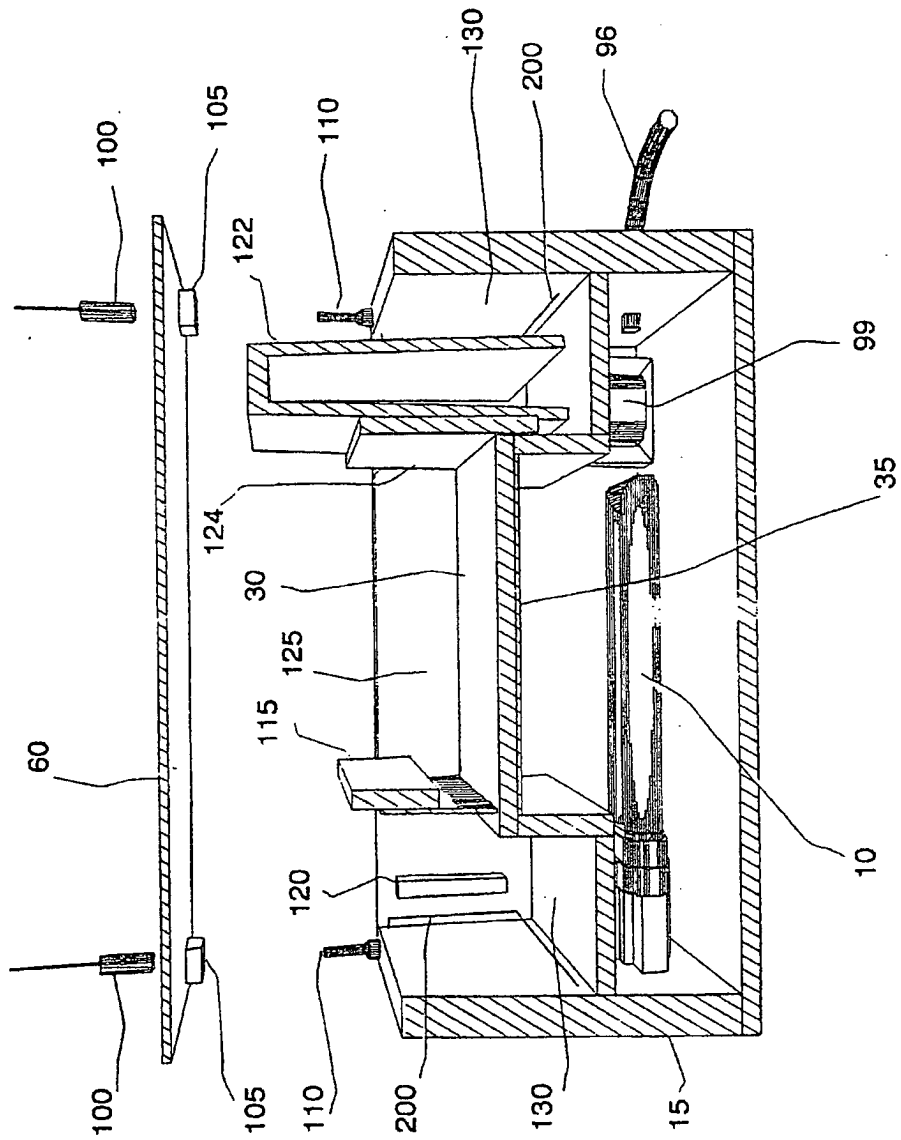


FIG. 9



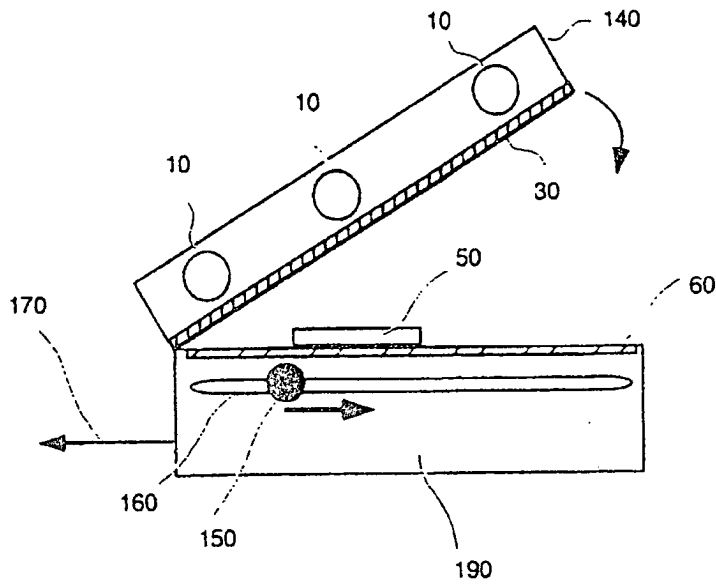


FIG. 11

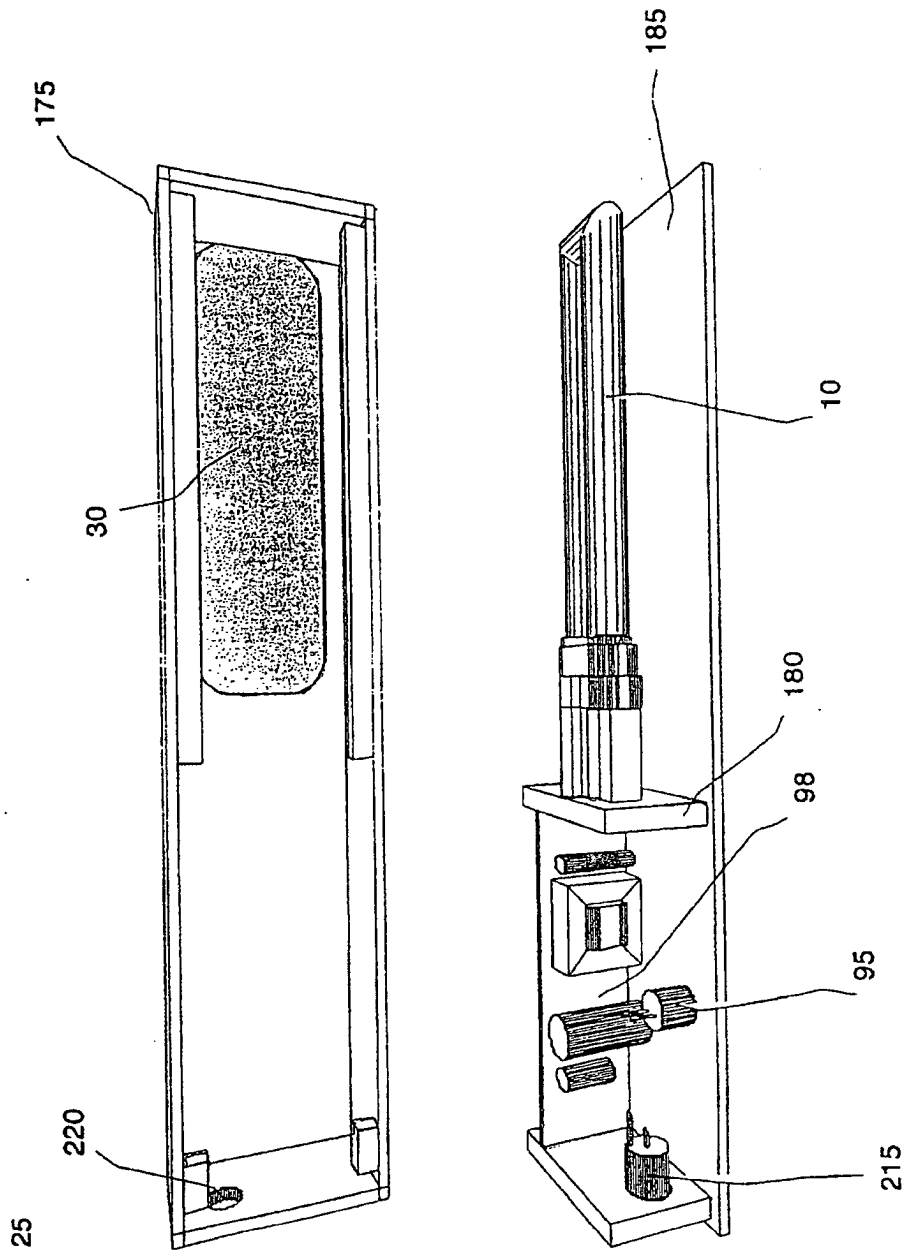


FIG. 12

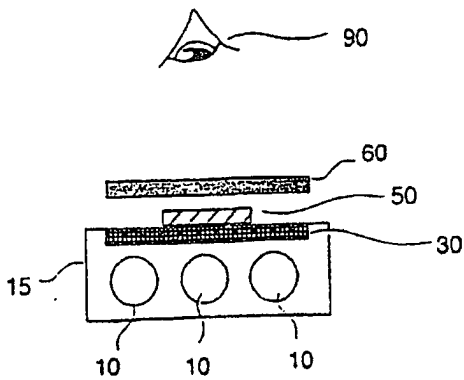


FIG. 13

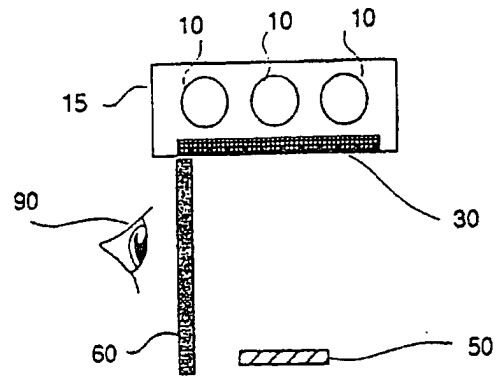


FIG. 14

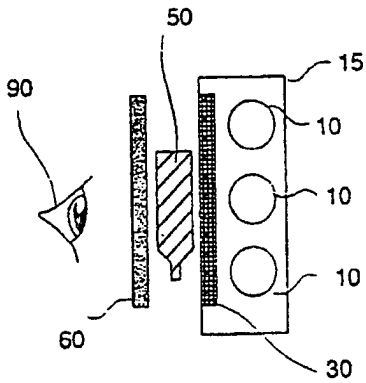


FIG. 15

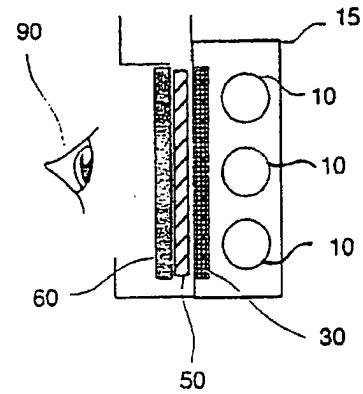


FIG. 16

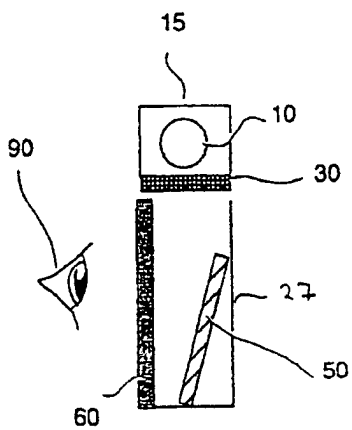


FIG 17

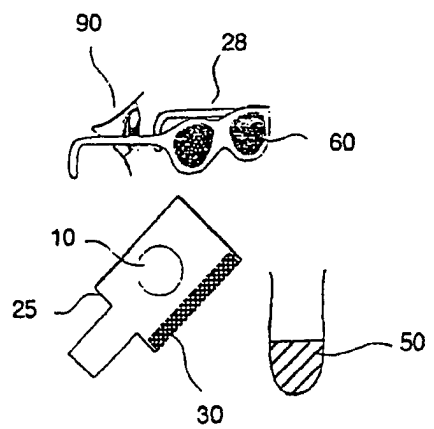


FIG 18

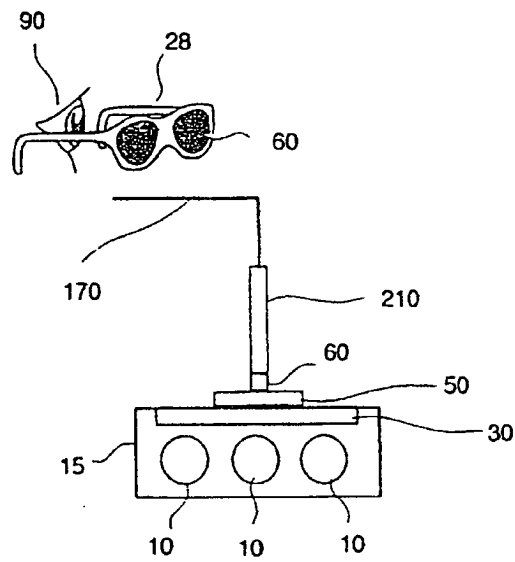


FIG. 19

Spur 1 2 3 4 5 6 7

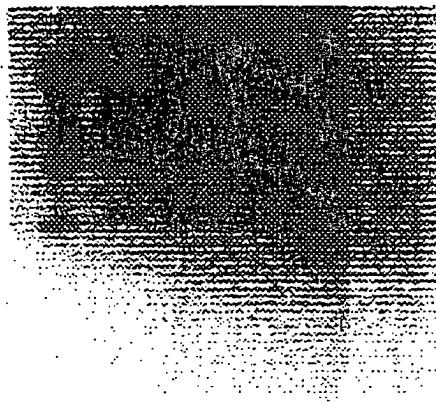


FIG. 21

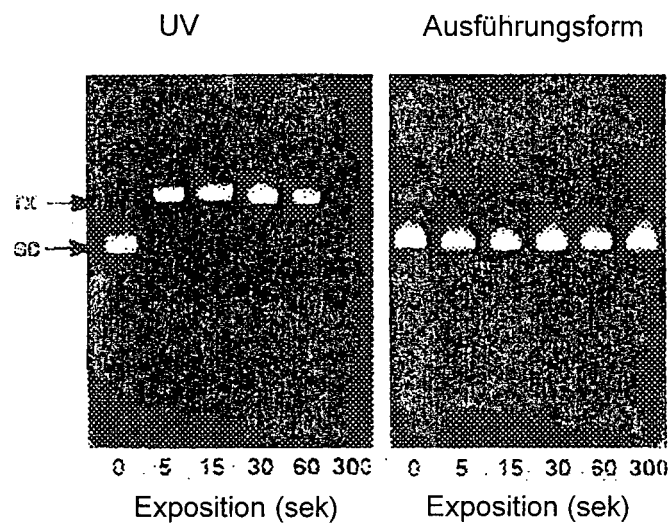


FIG 22

