



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) **EP 1 284 008 B1**

(12) **EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT**

(45) Veröffentlichungstag und Bekanntmachung des
Hinweises auf die Patenterteilung:
14.04.2004 Patentblatt 2004/16

(21) Anmeldenummer: **01949232.1**

(22) Anmeldetag: **23.05.2001**

(51) Int Cl.7: **H01J 49/04**

(86) Internationale Anmeldenummer:
PCT/DE2001/002079

(87) Internationale Veröffentlichungsnummer:
WO 2001/091154 (29.11.2001 Gazette 2001/48)

(54) **PROBENTRÄGER FÜR MASSENSPEKTROMETER**

SAMPLE SUPPORT FOR MASS SPECTROMETERS

PORTE-ECHANTILLON POUR SPECTROMETRE DE MASSE

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE TR**
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: **23.05.2000 DE 10027120**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
19.02.2003 Patentblatt 2003/08

(73) Patentinhaber: **Epigenomics AG
10435 Berlin (DE)**

(72) Erfinder: **BERLIN, Kurt
14532 Stahnsdorf (DE)**

(74) Vertreter: **Schubert, Klemens, Dr.
Neue Promenade 5
10178 Berlin-Mitte (DE)**

(56) Entgegenhaltungen:
**WO-A-00/67293 WO-A-01/90761
WO-A-99/00657 GB-A- 2 156 073
GB-A- 2 178 534 US-A- 3 096 435
US-A- 3 886 358 US-A- 5 498 545
US-A- 5 770 860**

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).

EP 1 284 008 B1

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung beschreibt einen Probenträger für Massenspektrometer, insbesondere für MALDI-TOF Massenspektrometer.

[0002] Matrix-assisted laser desorption/ionization time-offlight Massenspektrometrie (MALDI-TOF) hat die Analytik von Biomolekülen revolutioniert (Karas, M. & Hillenkamp, F. Anal. Chem. 60, 2299-2301 (1988)).

[0003] Im Stand der Technik sind eine Reihe von Probenträgern bekannt, welche auch zur MALDI-TOF Massenspektrometrie geeignet sind. So beschreibt US-A 4,384,193 eine Probenträgervorrichtung, welche zur Aufnahme von Objektträgern geeignet ist und zur Inkubation von Proben verwendet wird. MALDI-TOF Massenspektrometrie war jedoch zum Zeitpunkt der Publikation dieser Druckschrift noch nicht bekannt. EP-A 0964427 beschreibt Halter für MALDI-TOF Massenspektrometrie im Allgemeinen. Jedoch müssen die Träger für die Analyten stets leitfähig ausgebildet sein. Aus DE-A 19712195 und US-A 5770860 ist bekannt, dass auch Mikrotiterplatten zur MALDI-TOF Massenspektrometrie eingesetzt werden können. DE-A 19834070 schließlich offenbart, dass Probenträger für MALDI-TOF Massenspektrometrie auch aus hydrophoben Material gefertigt werden könne, dass aber stets dafür zu sorgen ist, dass die Oberfläche (beispielsweise durch Einlagerung von Graphit elektrisch leitend wird.

[0004] Die üblicherweise für MALDI-TOF Massenspektrometrie verwendeten Probenträger aus Metall, die für einzelne Proben, oftmals 26 oder 100 Proben oder neuerdings auch für 384 Proben ausgelegt werden, sind meist so geartet, dass die Probe zusammen mit einer Matrix, meist einer organischen Säure, unmittelbar auf ihre Position auf dem Probenträger eingebracht wird. Bei ihnen handelt es sich im wesentlichen um plane Metallplatten. Die von der Firma Bruker neuerdings vertriebenen Probenträger mit 384 Probenpositionen entsprechen in ihrem Raster und ihren Abmaßen einer Mikrotiterplatte. Für die unmittelbare Verwendung von Biochips (Oligomer-Arrays) im Massenspektrometer sind diese Probenträger nicht geeignet, da dabei eine Immobilisierung von Oligonukleotiden erforderlich ist, die an einem Probenträger nur mit erheblichem Aufwand möglich ist.

[0005] Verwendete Probenträger für die Immobilisierung auf einer Oberfläche besitzen eine metallische, mit Glas beschichtete oder chemisch modifizierte Oberfläche (WO 99/29898). Der Nachteil dieser Oberflächen ist, dass die Beschichtung für hochsensitive Analytik nicht besonders gleichmäßig ist. Ferner ist die Beschichtung in der Regel entweder sehr arbeitsaufwendig und/oder kostenintensiv. Metallträger mit Glasbeschichtung sind bekannt, dienen jedoch eher zum Schaffen einer besonders glatten Oberfläche, um kritische Kalibrierungsprobleme zu lösen.

[0006] Biochips werden dagegen häufig im Objektträgerformat verwendet. Meist genügen wenige chemi-

sche Modifizierungsschritte, um die Glasoberfläche eines herkömmlichen Objektträgers, wie er auch für die Mikroskopie verwendet wird zu aktivieren, so dass vorzugsweise eine kovalente chemische Bindung zu eingebrachten Sondenoligonukleotiden möglich ist, die in einem vorgegebenen Raster auf der Oberfläche des Objektträgers liegen.

[0007] Eine Übersicht über den Stand der Technik in der Oligomer Array Herstellung lässt sich aus einer im Januar 1999 erschienenen Sonderausgabe von Nature Genetics (Nature Genetics Supplement, Volume 21, January 1999), der dort zitierten Literatur und dem US-Patent 5994065 über Methoden zur Herstellung von festen Trägern für Zielmoleküle wie Oligonukleotide bei vermindertem nichtspezifischem Hintergrundsignal entnehmen.

[0008] Ein derartiger Probenträger ist aus der GB 2,178,534 A bekannt. Hierbei ist die Aussparung semi-zylindrisch ausgebildet, die zur Aufnahme eines kugelförmigen Trägers dient, der eine Öffnung aufweist, in welche die zu analysierende Substanz eingebracht wird.

[0009] Das der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende technische Problem war somit, dass für die Verwendung von Biochips im Massenspektrometer keine technologische Kompatibilität in Material und Form gegeben ist.

[0010] Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, einen Probenträger zu schaffen, der die Nachteile des Standes der Technik überwindet.

[0011] Gegenstand der Erfindung ist ein Probenträger, der das Einbringen von herkömmlichen Biochips im Objektträgerformat in ein kommerzielles MALDI-Massenspektrometer erlaubt.

[0012] Die Aufgabe der Erfindung wird dadurch gelöst, dass ein Probenträger für Massenspektrometer, insbesondere für MALDI-TOF Massenspektrometer, bestehend aus Metall oder einem anderen leitfähigen Material geschaffen wird, wobei dieser Probenträger mindestens eine Aussparung zur Aufnahme von plattenförmigen Trägern für biologische Proben aufweist und dass die Befestigung zwischen dem Probenträger und dem plattenförmigen Träger für biologische Proben mittels doppelseitigem Klebeband, Schrauben, Federn, Schnappverschlüssen, Drahtbügeln und/oder Schienen erfolgt, dadurch gekennzeichnet, dass die plattenförmigen Träger für biologische Proben nicht leitendem Material und/oder Glas bestehen.

[0013] Erfindungsgemäß bevorzugt ist es dabei, dass die Aussparungen in ihren Abmessungen handelsüblichen Objektträgern entsprechen. Besonders bevorzugt ist es, dass die Abmessungen in der Länge zwischen 75 und 130 mm, in der Breite zwischen 25 und 100 mm und in der Höhe zwischen 2 und 20 mm betragen.

[0014] Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßer Probenträger, wobei mindestens ein Träger für biologische Proben darauf angeordnet ist. Dabei ist es bevorzugt, dass die Träger für biologische Proben handelsüblichen Ob-

jektträgern entsprechen. Weiterhin ist bevorzugt, dass die Abmessungen der Träger für biologische Proben zwischen 72 und 78 mm in der Länge, 22 bis 28 mm in der Breite und 0,5 bis 2 mm in der Höhe liegen.

[0015] Äußerst bevorzugt ist es, dass der Träger für biologische Proben aus einem nichtleitenden Material und/oder Glas besteht.

[0016] Ganz besonders bevorzugt ist es, dass auf dem Träger für biologische Proben DNA-Fragmente oder Oligonukleotide in einem rechtwinkligen oder hexagonalen Muster aufgebracht sind.

[0017] Erfindungsgemäß ist es ferner, dass die Befestigung zwischen dem Probenträger und dem Träger für biologische Proben mittels doppelseitigem Klebeband, Schrauben, Federn, Schnappverschlüssen, Drahtbügeln und/oder Schienen erfolgt.

[0018] Außerdem ist bevorzugt, dass der erfindungsgemäße Probenträger im Format einer Mikrotiterplatte entspricht. Insbesondere bevorzugt ist ein Probenträger in den Abmessungen von ca. 123 mm x 82 mm x 9,5 mm.

[0019] Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung eines Probenträgers nach einem der voranstehenden Ansprüche zur Analyse von Polymorphismen und/oder DNA-Methylierung in DNA-Proben.

[0020] Die vorliegende Erfindung beschreibt somit einen Probenträger für MALDI-Massenspektrometer. Dieser Probenträger besteht aus einem elektrisch leitenden Material, vorzugsweise Stahl oder Aluminium. In dem Probenträger befinden sich Aussparungen, die zur Aufnahme von Platten dienen, die aus Glas oder Silicium sein können. Der Erfindung liegt zudem die überraschende Erkenntnis zugrunde, dass herkömmliche Objektträger in ein solches Massenspektrometer eingebracht werden können, ohne dass die fehlende Leitfähigkeit des Glasträgers dem Messergebnis signifikant abträglich ist. Die Proben befinden sich auf den Platten, die in den Probenträger eingesetzt werden können.

[0021] Erfindungsgemäß bevorzugt sind daher insbesondere Probenträger, auf welchen Träger für biologische Proben aufgebracht bzw. befestigt sind, die aus nicht metallischen und/oder nicht leitenden Materialien bestehen. Ganz besonders bevorzugt sind dabei Träger für biologische Proben aus Glas.

[0022] Beschrieben wird ein Probenträger für ein MALDI-TOF Spektrometer bevorzugt aus Metall, der Aussparungen zur Aufnahme von 1 - 5 Platten aufweist, die vorzugsweise in ihren Abmaßen handelsüblichen Objektträgern entsprechen. Vorzugsweise liegen die Abmessungen des Probenträgers in der Länge zwischen 75 und 130 mm, in der Breite zwischen 25 und 100 mm und in der Höhe zwischen 2 und 20 mm. Besonders bevorzugt liegen die Abmessungen der Platten, die aus Glas, Silicium oder Metall sein können, bei 72-78 mm x 22-28 mm x 0,5-2 mm. Dies entspricht den Abmessungen handelsüblicher Objektträger, deren genaue Maße auch im internationalen Vergleich variabel

sind.

[0023] In einer bevorzugten Variante werden die Platten mit einem doppelseitigen Klebeband auf dem Probenträger befestigt. In einer weiteren, besonders bevorzugten Variante erfolgt die Befestigung mit Schrauben, Federn, Schnappverschlüssen, Drahtbügeln oder Schienen.

[0024] Der Probenträger wird bevorzugt für Matrix-assistierte Laser Desorptions/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI-TOF) verwendet, die mit 384 definierten Positionen pro Probenträger arbeitet und daher einem Probenträger im Format einer Mikrotiterplatte (ca. 123 mm x 82 mm x 9,5 mm) entspricht.

[0025] Die Platten, die bevorzugt als Biochips (Oligomer-Arrays) fungieren und daher immobilisierte Oligonukleotide tragen, können separat vom Probenträger beispielsweise in Hybridisierungsexperimenten verwendet werden, wie sie für Oligomer-Arrays Stand der Technik sind. Eine Behandlung der Oberfläche des eigentlichen Probenträgers, der nur die Platten aufnimmt, unterbleibt. Hybridisierungsprodukte müssen nicht mehr auf den Probenträger transferiert werden, sondern können direkt auf der vorgegebenen Oberfläche der eingesetzten Platten untersucht werden.

[0026] Die DNA-Fragmente oder Oligonukleotide, die man vorzugsweise auf die Oberfläche aufbringt, sind in einem rechtwinkligen oder hexagonalen Muster angeordnet.

[0027] Die aufwendige Beschichtung der Oberflächen entfällt, da die kostengünstigen Glasträger die gleiche Funktion haben bei gleichmäßigerer Oberfläche. Beschichtete Gläser der benötigten Art für die vorliegende Erfindung sind im Gegensatz zu beschichteten Metallträgern am Markt erhältlich, was einen weiteren wesentlichen Vorteil darstellt.

[0028] Die vorliegende Erfindung stellt somit ein apparatives Bindeglied zwischen der Herstellung von beispielsweise Oligomer-Array und deren Vermessung und Auswertung in Massenspektrometern. Hierdurch wird der aufwendige Transfer der Proben vermieden. Der erfindungsgemäße Probenträger stellt somit eine wesentliche Arbeitserleichterung und eine immense Kosteneinsparung dar. Insbesondere auch dadurch, dass handelsübliche Objektträger und/oder Probenträger verwendet werden könne. Derartige handelsübliche Träger sind auch für die automatisierte Analytik geeignet. Hieraus ergibt sich daher ein weiterer Kostenvorteil. Analysen könne daher mit einem großen Durchsatz kostengünstig und schnell ausgeführt werden. Der erfindungsgemäße Probenträger verbindet somit den Bereich der Probenherstellung und den der Vermessung der Proben in verblüffend einfacher Weise.

[0029] Gegenstand der vorliegenden Erfindung und eine besonders bevorzugte Ausführungsform ist ein erfindungsgemäßer Probenträger für Massenspektrometer, insbesondere für MALDI-TOF Massenspektrometer, bestehend aus Metall oder einem anderen leitfähigen Material, wobei dieser Probenträger mindestens eine

Aussparung zur Aufnahme von Trägern für biologische Proben sowie mindestens einen darauf angeordneten Träger für biologische Proben aufweist, dadurch gekennzeichnet, dass die Träger für biologische Proben aus nicht leitendem Material und/oder aus Glas bestehen. Dabei ist es weiterhin bevorzugt, dass die Träger für biologische Proben aus nicht leitendem Material und/oder aus Glas bestehen

[0030] Bevorzugt wird der Probenträger zur Analyse von Polymorphismen und/oder DNA-Methylierung in DNA-Proben verwendet.

[0031] In der Figur 1 ist eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Probenträgers dargestellt. Der erfindungsgemäße Probenträger P aus Metall oder einem anderen leitfähigen Material für das MALDI-TOF Gerät (BIFLEX III BT 1903, Bruker Analytical Systems) kann vorzugsweise mit 1 bis 3 Glaträgern G beschickt werden. Diese haben eine Größe von 76 mm x 25 mm x 1 mm.

Patentansprüche

1. Probenträger für Massenspektrometer, insbesondere für MALDI-TOF Massenspektrometer, bestehend aus Metall oder einem anderen leitfähigen Material, wobei dieser Probenträger mindestens eine Aussparung zur Aufnahme von plattenförmigen Trägern für biologische Proben aufweist und dass die Befestigung zwischen dem Probenträger und dem plattenförmigen Träger für biologische Proben mittels doppelseitigem Klebeband, Schrauben, Federn, Schnappverschlüssen, Drahtbügeln und/oder Schienen erfolgt, **dadurch gekennzeichnet, dass** die plattenförmigen Träger für biologische Proben aus nicht leitenden Material und/oder aus Glas bestehen.
2. Probenträger nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Abmessungen der plattenförmigen Träger für biologische Proben zwischen 72 und 78 mm in der Länge, 22 bis 28 mm in der Breite und 0,5 bis 2 mm in der Höhe liegen.
3. Probenträger nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** auf dem plattenförmigen Träger für biologische Proben DNA-Fragmente oder Oligonukleotide in einem rechtwinkligen oder hexagonalen Muster aufgebracht sind.
4. Probenträger nach einem der voranstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** dieser im Format einer Mikrotiterplatte entspricht.
5. Probenträger nach Anspruch 4 in den Abmessungen von ca. 123 mm x 82 mm x 9,5 mm.
6. Verwendung eines Probenträgers nach einem der

voranstehenden Ansprüche zur Analyse von Polymorphismen und/oder DNA-Methylierung in DNA-Proben.

Claims

1. A sample holder for the mass spectrometer, particularly for the MALDI-TOF mass spectrometer, comprised of metal or another conductive material, wherein this sample holder has at least one recess for the uptake of platelike holders for biological samples and that the sample holder and the platelike holder for biological samples are attached together by means of double-sided adhesive tape, screws, springs, snap closures, wire clips and/or tracks, **characterized in that** the platelike holders for biological samples are comprised of non-conducting material and/or of glass.
2. The sample holder according to claim 1, further **characterized in that** the dimensions of the platelike holders for biological samples are between 72 and 78 mm in length, 22 to 28 mm in width and 0.5 to 2 mm in height.
3. The sample holder according to claim 1, further **characterized in that** DNA fragments or oligonucleotides are introduced in a rectangular or hexagonal pattern on the platelike holder for biological samples.
4. The sample holder according to one of the preceding claims, further **characterized in that** this holder corresponds in format to a microtiter plate.
5. The sample holder according to claim 4, in dimensions of approximately 123 mm x 82 mm x 9.5 mm.
6. Use of a sample holder according to one of the preceding claims for the analysis of polymorphisms and/or DNA methylation in DNA samples.

Revendications

1. Porte-échantillon pour spectromètre de masse, en particulier pour un spectromètre de masse de type MALDI-TOF, en métal ou constitué d'un autre matériau conducteur, où ce porte-échantillon présente au moins un évidement pour le logement de supports en forme de plaquettes, utilisés pour des échantillons biologiques, et où la fixation entre le porte-échantillon et le support en forme de plaquette, utilisé pour des échantillons biologiques, est réalisée au moyen d'un ruban adhésif double face, de vis, de ressorts, de fermetures à déclic, d'attaches métalliques et/ou de rails,

caractérisé en ce que les supports en forme de plaquettes, utilisés pour des échantillons biologiques, sont constitués d'un matériau non conducteur et/ou sont en verre.

5

2. Porte-échantillon selon la revendication 1, **caractérisé en ce que** les dimensions des supports en forme de plaquettes, utilisés pour des échantillons biologiques, sont comprises entre 72 mm et 78 mm de longueur, entre 22 mm et 28 mm de largeur et entre 0,5 mm et 2 mm de hauteur. 10
3. Porte-échantillon selon la revendication 1, **caractérisé en ce que** l'on applique sur le support en forme de plaquette, utilisé pour des échantillons biologiques, des fragments d'ADN ou des oligonucléotides suivant un modèle rectangulaire ou hexagonal. 15
4. Porte-échantillon selon l'une quelconque des revendications précédentes, **caractérisé en ce que** ce porte-échantillon correspond au format d'une plaquette de microtitrage. 20
5. Porte-échantillon selon la revendication 4, dont les dimensions sont à peu près de 123 mm x 82 mm x 9,5 mm. 25
6. Utilisation d'un porte-échantillon selon l'une quelconque des revendications précédentes, pour l'analyse de polymorphismes et/ou pour la méthylation de l'ADN dans des échantillons d'ADN. 30

35

40

45

50

55

