

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 1 192 007 B1

(12)

EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT

(45) Veröffentlichungstag und Bekanntmachung des Hinweises auf die Patenterteilung:

21.04.2004 Patentblatt 2004/17

(51) Int Cl.7: **B01L 3/00**

(86) Internationale Anmeldenummer:

PCT/EP2000/006103

(21) Anmeldenummer: **00952983.5**

(87) Internationale Veröffentlichungsnummer:

WO 2001/002094 (11.01.2001 Gazette 2001/02)

(22) Anmeldetag: **30.06.2000**

(54) **MICROCHIP-MATRIX-VORRICHTUNG ZUR VERVIELFÄLTIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON NUKLEINSÄUREN**

MICROCHIP MATRIX DEVICE FOR DUPLICATING AND CHARACTERIZING NUCLEIC ACIDS

DISPOSITIF MATRICE A MICROCIRCUIT INTEGRE DESTINE A L'AMPLIFICATION ET A LA CHARACTERISATION D'ACIDES NUCLEIQUES

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(30) Priorität: **02.07.1999 DE 19932423**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:

03.04.2002 Patentblatt 2002/14

(73) Patentinhaber: **Clondia Chip Technologies GmbH**

07743 Jena (DE)

(72) Erfinder:

- **EHRICHT, Ralf**
D-07749 Jena (DE)
- **ELLINGER, Thomas**
D-07743 Jena (DE)

• **TUCHSCHERER, Jens**

D-07743 Jena (DE)

• **ERMANTRAUT, Eugen**

D-07745 Jena (DE)

• **POSER, Siegfried**

D-07749 Jena (DE)

• **SCHULZ, Torsten**

D-07743 Jena (DE)

(74) Vertreter: **Neuefeind, Regina**

Maiwald Patentanwalts GmbH

Elisenhof

Elisenstrasse 3

80335 München (DE)

(56) Entgegenhaltungen:

EP-A- 0 840 113

WO-A-95/33846

WO-A-99/09042

DE-A- 19 940 750

DE-A- 19 950 225

US-A- 5 856 174

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 1 192 007 B1

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Vervielfältigung und Charakterisierung von Nukleinsäuren.

[0002] Seit Jahrzehnten ist bekannt, daß die Amplifikation (Vervielfältigung) von Desoxyribonukleinsäure (DNS), den Molekülen, die das Genom (die Erbinformation) von Organismen verschlüsseln, in vivo (in der Zelle) durch Transkription erfolgt und in vitro (außerhalb der Zelle) durch die Methode der Polymerasekettenreaktion (PCR) betrieben werden kann.

Es ist mittlerweile Labor-Standard, Nukleinsäuren durch die PCR zu vervielfältigen, die PCR-Produkte zu klonieren (in ein Trägermolekül einzubauen und in einen Mikroorganismus einzuführen), die klonierten PCR-Produkte in Mikroorganismen zu amplifizieren und die amplifizierten PCR-Produkte zu isolieren (Sambrook, J.; Fritsch, E. F. and Maniatis, T., 1989, Molecular cloning: a laboratory manual 2nd edn. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory). Diese routinemäßige zweistufige Vervielfältigung ermöglicht, aus einigen wenigen Ausgangsnukleinsäuremolekülen eine enorm große Anzahl gleicher Moleküle zu erzeugen, hat jedoch den Nachteil, daß sie sehr arbeits- und zeitaufwendig ist, einen geringen Probendurchsatz (die Zahl der bearbeiteten Nukleinsäuren in einer Zeiteinheit) aufweist und somit sehr kostenintensiv ist.

Die einstufige Vervielfältigung durch PCR hingegen ist verhältnismäßig schnell, ermöglicht durch miniaturisierte Verfahren einen hohen Probendurchsatz in geringen Ansatzvolumina und ist durch Automatisierung nicht so arbeitsintensiv.

Eine Charakterisierung von Nukleinsäuren durch eine alleinige Vervielfältigung ist nicht möglich. Vielmehr ist es notwendig, nach der Vervielfältigung Analysemethoden, wie Nukleinsäuresequenzbestimmungen oder elektrophoretische Untersuchungen der PCR-Produkte bzw. deren enzymatisch hergestellten Einzelfragmente, zur Charakterisierung der PCR-Produkte einzusetzen.

[0003] Aus den Schriften US 5,716,842; DE 195 19 015 A1; WO 94/05414; US 5,587,128; US 5,498,392; WO 91/16966; WO 92/13967; F 90 09894 sowie den Publikationen von S. Poser, T. Schulz, U. Dillner, V. Baier, J. M. Köhler, D. Schimkat, G. Mayer, A. Siebert (Chip elementes for fast thermocycling, Sensors and Actuators A, 1997: 62 672-675) und M. U. Kopp, A. J. de Mello, A. Manz (Chemical amplification: Continuous-flow PCR on a chip, Science, 1998: 280 1046-1048) sind verschiedene miniaturisierbare oder miniaturisierte Verfahren und Geräte (Thermocycler) zur Durchführung der PCR bekannt.

In DE 195 19 015 A1; WO 94/05414; US 5,587,128; US 5,498,392 und der Publikation von S. Poser, T. Schulz, U. Dillner, V. Baier, J. M. Köhler, D. Schimkat, G. Mayer, A. Siebert (Chip elementes for fast thermocycling, Sensors and Actuators A, 1997: 62 672-675) sind Thermocycler beschrieben, die aus gedeckelten Kammern bestehen, welche die Proben aufnehmen.

Die in den Schriften US 5,716,842; DE 195 19 015 A1, WO 91/ 16966; WO 92/13967; F 90 09894 und der Publikation M. U. Kopp, A. J. de Mello, A. Manz (Chemical amplification: Continuous-flow PCR on a chip, Science, 1998: 280 1046-1048) vorgestellten miniaturisierbaren oder miniaturisierten Thermocycler funktionieren nach dem Prinzip, daß bei ihnen die Probenflüssigkeit kontinuierlich über drei Temperaturzonen gepumpt wird.

Der Nachteil aller o.g. Lösungen ist, daß bei der Online Detektion nur die Information, ob Nukleinsäure amplifiziert wurde und ggf. wieviel Nukleinsäure amplifiziert wurde, erhalten werden kann. Eine weitergehende Charakterisierung der Amplifikationsprodukte ist nicht möglich.

In der US-PS 5,856,174 wird ein System offenbart, mit dem es möglich ist Probenflüssigkeiten zwischen z.B. drei miniaturisierten Kammern hin und her zu pumpen. In einer Kammer dieses Systems erfolgt die PCR, in der nächsten wird eine Aufarbeitungsreaktion durchgeführt und in der dritten werden die Reaktionsprodukte, z.B. mit einem DNS-Chip, detektiert. Bei der PCR-Kammer handelt es sich um ein Standardgefäß, wie es hinlänglich in der Literatur beschrieben ist (S. Poser, T. Schulz, U. Dillner, V. Baier, J.M. Köhler, D. Schimkat, G. Mayer, A. Siebert; Chip elementes for fast thermocycling, Sensors and Actuators A, 1997: 62, 672-67). Der Nachteil dieses Systems besteht darin, daß ein kompliziertes, stör anfälliges und steuerungstechnisch aufwendiges System einer druckgetriebenen Fluidik aufgebaut werden muß, um die Probenflüssigkeit von der PCR- in die Detektionskammer zu fördern. Außerdem führt die Trennung von Amplifikation und Detektion zu einer Verlängerung der Gesamtanalysezeit.

[0004] Die genetischen Charakterisierungen, bspw. zur Identifikation und taxonomischen Einordnung von Mikroorganismen, erfolgen derzeit anhand von DNA-DNA-Hybridisierungsstudien, rRNA-Gensequenzvergleichen (bspw. mittels der 16S- oder 23S rRNA-Genabschnitte) nach erfolgter Sequenzierung dieser Abschnitte sowie anhand von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismusuntersuchungen (RFLP) oder PCR-Untersuchungen mit spezifischen Primern mittels gelelektrophoretischer Trennung und Detektion der Restriktions- oder PCR-Produkte (T. A. Brown, 1996, Gentechnologie für Einsteiger, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin Oxford).

[0005] Die bekannten RFLP-Untersuchungen basieren auf einer individuen spezifischen Verteilung von Restriktionsendonuklease-Schnittstellen, die sich auf DNS-Sequenzunterschiede im Bereich genomischer DNS bezieht, welche eine hochgradige Homologie zu einer für die Hybridisierung eingesetzte markierte DNS-Sonde besitzt (T. A. Brown, 1996, Gentechnologie für Einsteiger, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin Oxford).

Die RFLP-Untersuchung, die bspw. bei der HLA-Diagnostik (Humanes Leukozyten Antigen) in der Immunologie im Vorfeld von Transplantationen oder Transfusionen

Verwendung findet (vgl. Cesbron A., Moreau P., Milpied N., Muller JY., Harousseau JL., Bignon JD., "Influence of HLA-DP mismatches on primary MLR responses in unrelated HLA-A, B, DR, DQ, Dw identical pairs in allogeneic bone marrow transplantation" Bone Marrow Transplant 1990, Nov 6:5, 337-40 oder Martell RW., Oudshoorn M., May RM., du Toit ED., "Restriction fragment length polymorphism of HLA-DRw53 detected in South African blacks and individuals of mixed ancestry" Hum. Immunol. 1989, Dec 26:4, 237-44), umfaßt die Isolierung genomischer DNS, die Restriktionsendonuklease-Spaltung der DNS, eine Auftrennung der DNS-Fragmente, ein Transfer und eine Immobilisierung der DNS-Fragmente, die Präparation und Markierung der Hybridisierungs sonden, die Hybridisierung, die Detektion sowie die Korrelation und Interpretation. Der Nachteil dieser bisher nicht automatisierbaren Untersuchung ist, daß eine solche Analyse sehr arbeits- und zeitaufwendig ist (sie umfaßt 5 bis 10 Arbeitstage) und einen geringen Probendurchsatz aufweist (eine Arbeitskraft typisiert lediglich bis zu 50 Proben parallel), so daß sie sehr kostenintensiv ist.

[0006] Die Charakterisierung von Genomabschnitten, die anhand von DNS-Molekülen bzw. Ribonukleinsäuremolekülen (RNS-Molekülen) durch Hybridisation mit spezifischen Gensonden erfolgen kann (Leitch, A. R., Schwarzacher, T., Jackson, D. und Leitch I. J., 1994, In situ-Hybridisierung, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin Oxford), wird seit mehreren Jahren routinemäßig durchgeführt. Gensonden sind einsträngige Nukleinsäuremoleküle bekannter Nukleotidbasensequenz von optimaler Länge von 100 bis 300 Basen, die spezifisch mit einsträngigen Nukleinsäureabschnitten, bspw. eines Gens, zu einer doppelsträngigen Nukleinsäurepaarung führen und meist mit einem nichtradioaktiven oder radioaktiven Reporterelement (Marker), bspw. einem Fluoreszenzfarbstoff oder Radionukleotiden, versehen sind, welche der Detektion der Gensonden dienen. Man unterscheidet doppelsträngige DNS-Sonden, einzelsträngige RNA-Sonden, maßgeschneiderte synthetische Oligonukleotidsonden mit 10 bis 50 Basen Länge, Genom-Sonden und durch PCR hergestellte DNA-Sonden (Leitch, A. R., Schwarzacher, T., Jackson, D. und Leitch I. J., 1994, In situ-Hybridisierung, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin Oxford).

Bei der Hybridisierung unterscheidet man die Hybridisierung von Sonden mit isolierter einsträngiger Nukleinsäure (DNS oder RNS) und die s.g. in situ-Hybridisierung (vor Ort-Hybridisierung in Geweben, Zellen, Zellkernen und Chromosomen), bei der die Gensonde in der Zelle an eine gespreitete (einsträngige) Nukleinsäure (DNS oder RNS) koppelt (Leitch, A. R., Schwarzacher, T., Jackson, D. und Leitch I. J., 1994, In situ-Hybridisierung, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin Oxford). Bei dieser in situ-Hybridisierung ist besonders bedeutsam, daß die Zielsequenz und die Gewebemorphologie erhalten bleibt und daß das kon-

servierte Gewebe für die Sonde und die Nachweisreaktionen permeabel ist. Diese Permeabilität ist nicht immer vorhanden, was einen Nachteil dieser Methode darstellt.

5 Die Hybridisierung von Sonden mit isolierten und gespreiteten Chromosomen, die ebenfalls als in situ-Hybridisierung bezeichnet wird, umgeht den Nachteil der Permeabilitätsbarriere, da die Chromosomen für die Sonden frei zugänglich, bspw. auf einem Träger fixiert, vorliegen. (T. A. Brown, 1996, Gentechnologie für Einsteiger, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin Oxford).

10 Essentiell für die Hybridisierung ist das Vorliegen von einzelsträngigen Nukleinsäureziel- und Nukleinsäuresondenmolekülen, was meist durch die Hitzdenaturierung erfolgt, sowie die gewählte optimale Stringenz (Einstellung der Parameter: Temperatur, Ionenstärke, Konzentration helixdestabilisierender Moleküle), die gewährleistet, daß nur Sonden mit nahezu perfekt komplementären (einander entsprechenden) Sequenzen mit der Zielsequenz gepaart bleiben (Leitch, A. R., Schwarzacher, T., Jackson, D. und Leitch I. J., 1994, In situ-Hybridisierung, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin Oxford).

25 Klassische Anwendungen der Sondentechnik, die die Identifikation von unbekannten Organismen bzw. den Nachweis bestimmter Organismen in einem Organismengemisch ermöglichen, sind beispielsweise phylogenetische Studien oder der Nachweis von Keimen in der medizinischen Diagnostik. In beiden Bereichen basiert der Nachweis der Organismen häufig auf der Analyse der Gene für ribosomale RNS (rRNS, rDNS), welche wegen ihrer ubiquitären Verbreitung und der Existenz von variablen, artspezifischen Sequenzabschnitten für diesen Zweck besonders geeignet sind. Neben diesen Eigenschaften enthält die rDNS flankierende Sequenzabschnitte, die innerhalb des jeweiligen Organismenreiches stark konserviert sind. Gegen diese Abschnitte gerichtete Primersequenzen können zur speziesunabhängigen Amplifikation der rDNS eingesetzt werden (G. Van Camp, S. Chapelle, R. De Wachter; Amplification and Sequencing of Variable Regions in Bacterial 23S Ribosomal RNA Genes with conserved Primer Sequences. Current Microbiology, 1993, 27: 147-151 und W.G. Weisburg, S.M. Barns, D.A. Pelletier, D.J. Lane; 16S ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic studies. J. Bacteriol., 1991, 173: 697-703), wodurch die Sensitivität nachgeschalteter Nachweismethoden erheblich gesteigert wird.

50 In Abhängigkeit von der konkreten Zielstellung stehen verschiedene etablierte Verfahren zur rDNS gestützten Identifikation von Organismen zur Verfügung.

Für die Identifikation unbekannter Organismen wird in der Regel die gesamte (meist 16S) rDNS mit zwei universellen Primern per PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Auf diese Weise sind umfangreiche rDNS-Datenbanken entstanden, die gegenwärtig Sequenzen von mehreren 1000 Organismen enthalten (z.

B. RDP /Ribosomal Database Project II, Michigan state University, <http://www.cme.msu.edu/RDP/>) und die phylogenetische Zuordnung neuer Sequenzen erlauben. Dieses Verfahren erlaubt prinzipiell die Detektion jedes beliebigen Organismus, ist jedoch sehr zeitaufwendig und deshalb für diagnostische Anwendungen nicht geeignet. Außerdem ist der Prozeß mit einer Reihe von Fehlerquellen behaftet (F. Wintzingerode, U.B. Göbel, E. Stackebrand; Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. FEMS Microbiology Reviews, 1997, 21: 213-229), wobei insbesondere Rekombinationsprozesse und Punktmutationen während der PCR-Amplifikation zu falschen Ergebnissen führen.

Für diagnostische Anwendungen wurden eine Reihe von alternativen Techniken entwickelt. Mattsson und Johansson (J.G. Mattsson, K.E. Johansson; Oligonucleotide probes complementary to 16S rRNA for rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures. FEMS Microbiol Lett., 1993: 107 139-144) beschreiben ein Verfahren, bei dem ribosomale RNS aus Mycoplasmen isoliert, auf Filtern immobilisiert und durch Hybridisierung von drei unterschiedlichen spezifischen Oligonukleotide nachgewiesen wird. Dieses Verfahren ist relativ schnell, die Anzahl der zu identifizierenden Organismen und die Sensitivität des Nachweises ist jedoch begrenzt.

McCabe und Mitarbeiter (K.M. McCabe, Y.H. Zhang, B. L. Huang, E.A. Wagar, E. McCabe; Bacterial species identification after DNA amplification with a universal Pprimer pair. Mol. Genet. Metab, 1999; 66: 205-211) beschreiben ein Verfahren, bei dem rDNS aus auf Filterspots lysierten klinischen bakteriellen Isolaten durch Einsatz universeller Primer amplifiziert und anschließend durch Hybridisierung mit spezifischen Sonden identifiziert wird. Dieses Verfahren ist sensitiv; die Zahl der nachzuweisenden Spezies ist jedoch ebenfalls relativ eng begrenzt.

Bei einem von Oyarzabal und Mitarbeitern eingesetzten Verfahren (O.A. Oyarzabal, I.V. Wesley, K.M. Harmon, L. Schroeder-Tucker, J.M. Barbaree, L.H. Lauerman, S. Backert, D.E. Conner; Specific identification of Campylobacter fetus by PCR targeting variable regions of the 16S rDNA. Vet Microbiol, 1997, 58: 61-71), bei dem 16S rDNS einer Campylobacter-Spezies mittels spezifischer Sonden amplifiziert und die Größe des Produktes bestimmt wird, kann nur eine ja/nein Antwort für einen einzelnen spezifischen Keim generiert werden.

[0007] Das Dokument WO-A-9 533 846 beschreibt eine Vorrichtung, die einen Nukleinsäuren tragenden Chip in einer Reaktions Kammer aufweist, wobei die dem Chip gegenüberliegende Kammerwand aus einem optisch transparenten Material ist.

[0008] Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine Vorrichtung zur Vervielfältigung und Charakterisierung von Nukleinsäuren anzugeben, die eine nahezu gleichzeitige Vervielfältigung und Charakterisierung mit einem hohen Probendurchsatz ermöglicht, und somit die

Nachteile des Standes der Technik umgeht.

[0009] Die Aufgabe wird durch die kennzeichnenden Merkmale des ersten Patentanspruchs gelöst. Vorteilhaft Ausgestaltungen sind durch die nachgeordneten Ansprüche erfaßt.

[0010] Das Wesen der Erfindung besteht darin, daß durch die Vorrichtung die PCR und die parallele Hybridisierung gegen chipgebundene Nukleinsäure in einer temperatur- und durchflußsteuerbaren Zelle (Kammer) räumlich vereint sind. Dabei trägt die Kammer in ihrem Inneren einen Chip, der zwischen dem Kammerboden und der Detektionsfläche des Chips einen Kapillarspalt generiert, der die Probenflüssigkeit aufnimmt, wobei die Durchmischung der Probenflüssigkeit durch einen induzierten elektroosmotischen Fluß erfolgt.

Vorteilhaft bildet dabei die Kammer um den Kapillarspalt und den Chip ein Gasreservoir, durch das eine Gasreservoimase zum Kapillarspalt führt, welche einen Einlaß von einem Auslaß trennt, so daß über den Einlaß die Proben injizierbar sind, auf Grund der Kapillarkräfte von dem Einlaß in den Kapillarspalt gelangen und von diesem über den Auslaß abführbar sind. Beim befüllten Kapillarspalt ist auf Grund von Oberflächenspannungseffekten ein Luftspalt als Ring um den in der Kammer gelagerten Chip und den Kapillarspalt (der als Probenreservoir dient) generiert, so daß der Chip und der Kapillarspalt von dem Kammerkörper thermisch isoliert sind, was dazu führt, daß die Proben im Kammerpalt schnell durch Heiz- und Kühlelemente aufgeheizt und abgekühlt werden können, die gemeinsam mit Temperaturfühlern und Elektroden auf einem Kammerträger, der die Kammer haltet und mit ihr über den Kammerboden in wärmeleitenden Kontakt steht, plaziert ist. Dadurch daß der Kapillarspalt als Probenreservoir dient, ist die Verdunstungsrate der Probenflüssigkeit auch bei Temperaturen nahe des Siedepunkts der Probenflüssigkeit stark herabgesetzt, da die Probe nur über den Rand des Kapillarspalts verdunsten kann.

Der Kapillarspalt (das Probenreservoir) ist der Ort der Nukleinsäureamplifikation in der Probenflüssigkeit durch PCR mit spezifischen Primern sowie der genetischen Charakterisierung der Probe. Die markierten PCR-Produkte werden dabei durch die immobilisierten spezifischen Sonden, die auf dem Nukleinsäurechip gebunden sind, aus der Probenflüssigkeit gefischt. Die Kammer und der Chip sind optisch transparent und ermöglichen aufgrund ihrer Ausführung die on line Detektion des Markierungssignals der an die Sonden gebundenen PCR-Produkte.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung besitzt gegenüber den bisher verwendeten Verfahren den Vorteil, daß in einer minimalen Diagnosezeit mit minimalen Probenvolumina eine maximale genetische Typisierung unter Verwendung spezifischer Sonden automatisierbar und mit hohem Probendurchsatz in einer temperatur- und durchflußsteuerbaren Zelle möglich ist, wobei durch die PCR ein Hervorheben diagnostisch relevanter Genstrukturen gegenüber einem Sequenzhintergrund und

durch die nahezu gleichzeitige, parallele Hybridisierung der PCR-Produkte gegen die chipgebundene Nukleinsäure eine spezifische Detektion bewirkt wird.

[0011] Die erfindungsgemäße Vorrichtung findet z.B. für die gleichzeitige Erkennung von verschiedenen mikrobiellen Krankheitserregern (bspw. auf Basis der 16S oder 23S rRNA-Analyse), das Screening nach Resistenzen einzelner krankheitserregender Mikroorganismen oder eine genomische Typisierung diagnostisch relevanter Allelstrukturen von Eukaryontenzellen Verwendung, wobei die parallele Erkennung durch den Chip mit seinen unterschiedlichen, für die verschiedenen Zielsequenzen spezifischen Sonden ermöglicht wird.

[0012] Die Erfindung soll nachstehend anhand der schematischen Zeichnungen und der Anwendungsbeispiele näher erläutert werden. Es zeigen:

- Fig. 1: eine prinzipielle Darstellung einer möglichen Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Vervielfältigung und Charakterisierung von Nukleinsäuren,
- Fig. 2: einen Querschnitt entlang der Ebene A-A gemäß der Fig. 1,
- Fig. 3: eine Draufsicht auf die Vorrichtung gemäß der Fig. 1,
- Fig. 4: eine schematische Darstellung der Ansicht der Unterseite der Vorrichtung gemäß Fig. 1,
- Fig. 5: einen Querschnitt entlang der Ebene B-B gemäß der Fig. 4,
- Fig. 6: eine schematische Darstellung der Draufsicht auf den Kammerträger der Vorrichtung gemäß der Fig. 1,
- Fig. 7: einen Querschnitt entlang der Ebene C-C gemäß der Fig. 6,
- Fig. 8: eine Schematische Darstellung einer möglichen Quadrupolanordnung auf dem Kammerträger der Vorrichtung gemäß der Fig. 1,
- Fig. 9: einen Querschnitt entlang der Ebene D-D gemäß der Fig. 8,
- Fig. 10a: eine schematische Darstellung einer möglichen Positionierung einer Probenflüssigkeit innerhalb der Vorrichtung gemäß Fig. 1,
- Fig. 10b: einen Querschnitt entlang der Ebene E-E gemäß der Fig. 10a,
- Fig. 11: eine schematische Blockdarstellung eines möglichen Einbaus der Vorrichtung gemäß Fig. 1 in ein Analysensystem,
- Fig. 12a: eine Angabe der Abmessungen einer Vorrichtung gemäß der Fig. 1 in Millimetern,
- Fig. 12b: eine Angabe der Abmessungen einer Vorrichtung gemäß der Fig. 2 in Millimetern,
- Fig. 12c: eine Angabe der Abmessungen einer Vorrichtung gemäß der Fig. 3 in Millimetern,
- Fig. 13: eine schematische Darstellung des optischen Strahlengangs durch die Vorrichtung

gemäß Fig. 1,

Fig. 14: eine schematische Darstellung einer Ausführungsform eines Chips der Vorrichtung gemäß Fig. 1 und

5 Fig. 15: eine schematische Darstellung sekundärer und tertiärer Amplifikationsprodukte des Chips gemäß Fig. 14.

[0013] Die in Fig. 1 gezeigte Vorrichtung 20 zur Vervielfältigung und

[0014] Charakterisierung von Nukleinsäuren besteht aus einem Kammerkörper 1 und einem Kammerträger 5. Der Kammerkörper 1 ist mit einer Auflagefläche 4 versehen über die er mit dem Kammerträger 5 dichtend in Verbindung steht, so daß eine Probenkammer 3 ausgebildet ist. Diese Probenkammer 3 besteht aus einem Gasreservoir 6 sowie einem Kapillarspalt 7 und ist mit zumindest einem Einlaß 81 und zumindest einem Auslaß 82 versehen. Der Einlaß 81 und der Auslaß 82 führen in die Probenkammer 3 und werden von einer zwischengeordneten Gasreservoirnase 9 des Gasreservoirs 6 beabstandet. Der Kammerkörper 1, der bspw. durch eine nicht im einzelnen dargestellte Verklebung oder Verschweißung mit einem Kammerträger 5 unlösbar in dichtender Verbindung steht, haltet einen Chip 2, bspw. einen Nukleinsäure-Chip. Dieser Chip 2, der Detektionsflächen 12 in Form von Spots 13 trägt, ist in dem Kammerkörper 1 derart gehalten, daß die Detektionsflächen 12 in Form der Spots 13 der Oberfläche des Kammerträgers 5 zugewandt gegenüber und durch die Berandung 42 des Kammerkörpers 1 von dem Kammerträgers 5 gleichmäßig beabstandet positioniert sind, so daß der Chip 2 und der Kammerträger 5, wie in Fig. 2 gezeigt den Kapillarspalt 7, der als Probenreservoir dient, generieren. Dieser Kapillarspalt 7 nimmt die Probenflüssigkeit 19 auf.

Der Kammerkörper 1 besteht bspw. aus optisch transparenten Kunststoff oder Glas, wobei die Probenkammer 3, die einen Raum zum Einfüllen der Probenflüssigkeit 19 darstellt, durch Fräsen und der Einlaß 81 sowie der Auslaß 82, die Leitwege für die Probenflüssigkeit darstellen, durch Bohren in den Kammerkörper 1 eingebracht werden können.

Der Nukleinsäure-Chip 2 besteht bekannter Maßen aus einem optisch transparenten Träger, dessen Material bspw. Silizium oder Glas sein kann, und aus auf diesem Träger immobilisierten Nukleinsäuremolekülen spezifischer Sequenz (z.B. Sonden).

Die Probenkammer 3 umfaßt das Gasreservoir 6 und den Kapillarspalt 7, wobei sich in dem Gasreservoir 6 beim Einfüllen der Probenflüssigkeit 19 auf Grund von Oberflächenspannungseffekten Gas und Luftblasen sammeln, so daß der Chip 2 und der Kapillarspalt 7 vom Kammerkörper 1 thermisch isoliert werden. Der Kapillarspalt 7, der das Probenreservoir (bspw. mit einem Volumen von 1,8 µl) ausbildet, gewährleistet, daß die Detektionsfläche 12 vollständig mit der Probenflüssigkeit 19 benetzt wird.

Der Einlaß 81 und der Auslaß 82 dienen der Leitung der Probenflüssigkeit 19, wodurch ein Befüllen und Entleeren der Probenkammer 3, und somit infolge der wirkenden Kapillarkräfte auch ein Befüllen und Entleeren des Kapillarspalt 7, ermöglicht ist.

Der Einlaß 81 und der Auslaß 82, die bspw. wie in Fig. 1 gezeigt nebeneinander verlaufen können, sind durch eine Gasreservoireinmündung 9 voneinander räumlich getrennt, so daß verhindert wird, daß die Probenflüssigkeit 19 vom Einlaß 81 zum Auslaß 82 fließt, ohne in den Kapillarspalt 7 zu gelangen.

Der Kammerträger 5, der optisch transparent und gut wärmeleitend ist besteht bspw. aus Glas, und ist, wie in den Fig. 4, 6 und 8 gezeigt, mit Mitteln zur Temperaturbeaufschlagung 17, bspw. in Form miniaturisierter Heizer, und mit miniaturisierten Temperaturfühlern 16 sowie Elektroden eines Quadropol 18 versehen, so daß ein Temperieren der Probenflüssigkeit 19 sowie ein Durchmischen der Probenflüssigkeit 19 durch einen induzierten elektroosmotischen Fluß ermöglicht ist. Bei einer anderen, nicht im einzelnen dargestellten Ausführungsform der Vorrichtung 20 kann der Kammerkörper 1 mit den Mitteln zur Temperaturbeaufschlagung 17 und den miniaturisierten Temperaturfühlern 16 sowie den Elektroden des Quadropol 18 versehen sein.

[0015] Die Temperaturfühler 16 können bspw. als Nickel-Chrom-Dickfilm-Widerstandstemperaturfühler ausgeführt sein. Die Länge der Temperaturfühler 16 beträgt bspw. in dem Fall, daß der Kammerträger 1 eine Fläche von 8 x 8 mm aufweist und der Chip 2 eine Fläche von 3 x 3 mm oder kleiner besitzt, 10,4 mm und die Breite der Temperaturfühler 16 beträgt in diesem Beispiel 50 µm, so daß der Widerstand bei 20°C 4 kOhm und der Temperaturkoeffizient TK_R bei 0°C 1500 ppm beträgt. Alternativ dazu können die Temperaturfühler 16 auch als optisch transparente Dünnschichten ausgeführt sein. Die Mittel zur Temperaturbeaufschlagung 17 können bspw. als Nickel-Chrom-Dickfilm-Widerstandsheizler ausgeführt sein. Bei den Dimensionen des vorangegangenen Beispiels haben die Mittel zur Temperaturbeaufschlagung 17 eine Länge von 2,6 mm und eine Breite von acht Einzelbahnen zu je 50 µm Breite, so daß der Widerstand bei 20°C 300 Ohm beträgt. Alternativ dazu können die Mittel zur Temperaturbeaufschlagung 17 auch als optisch transparente Dünnschichten ausgeführt sein.

Der Quadropol 18 kann bspw. als Gold-Titan-Elektroden ausgeführt sein. Bei den Dimensionen des vorangegangenen Beispiels haben diese Elektroden eine Länge von 2,2 mm und eine Breite von 0,5 mm. Der Quadropol dient der Induktion eines elektroosmotischen Flusses, was zum Durchmischen der Probenflüssigkeit 19 in der Probenkammer 1 führt. Alternativ dazu kann der Quadropol 18 auch als optisch transparente Dünnschicht ausgeführt sein.

[0016] Die Fig. 2 zeigt den Kammerkörper 1, der über die Auflagefläche 4 mit dem Kammerträger 5 in starrer, unlösbarer Verbindung steht. Diese Verbindung kann

bspw. durch Verkleben hergestellt sein. Alternativ dazu besteht bspw. auch die Möglichkeit, daß der Kammerträger 5 und der Kammerkörper 1 durch Verschmelzen miteinander verbunden bzw. einstückig gefertigt sind.

5 Zwischen dem Kammerträger 5 und den durch den Kammerkörper 1 über dessen Berandung 42 gehaltenen Chip 2 befindet sich der Kapillarspalt 7 (der als Probenreservoir dient), der auf Grund seiner Kapillarwirkung befähigt ist, Probenflüssigkeit aus der Probenkammer 3 aufzunehmen.

10 **[0017]** Durch den Kammerkörper 1 führen der Einlaß 81 und der Auslaß 82 in das Gasreservoir 6 der Probenkammer 3, so daß durch den Einlaß 81 Probenflüssigkeit 19 über das Gasreservoir 6 in den Kapillarspalt 7 einfüllbar und über den Auslaß 82 abführbar ist. Der Chip 2 besteht wie der Kammerträger 1 aus optisch transparenten bzw. durchsichtigem Material, wie z.B. Glas, so daß über eine konische Öffnung im Kammerkörper 1, der einen Sichtkegel bildenden durchgehenden Ausnehmung 11, optische und photometrische Auswertungen, wie bspw. Fluoreszenzmessungen, von der Detektionsfläche 12 möglich sind.

20 **[0018]** Die Fig. 3 zeigt den Einlaß 81 und den Auslaß 82 sowie die Ausnehmung 11, durch die die Detektionsfläche 12 mit Spots 13 des Chips 2 optisch zugänglich sind. Diese optische Zugänglichkeit ermöglicht die o.g. optische und photometrische Auswertungen der Signale, die von der Detektionsfläche 12 ausgehen, im Beispiel die nicht dargestellten Fluoreszenzsignale.

25 **[0019]** In der Fig. 4 sind die auf der Unterseite des transparenten Kammerträgers 5 befindlichen Mittel zur Temperaturbeaufschlagung 17 inklusive Leiterbahnen 1517 und Anschlußflächen 1417 gezeigt. Die Mittel zur Temperaturbeaufschlagung 17 bestehen im Beispiel aus acht einzelnen parallel geschalteten mikrostrukturierten Widerstandsheizleitungen 171, durch die der unter dem Kammerkörper 1 befindliche Kammerträger 5 und mit ihm die eingefüllte Probenflüssigkeit 19 im Kapillarspalt 7 homogen beheizbar ist. Die Widerstandsleitungen 171 der Mittel zur Temperaturbeaufschlagung 17, die mit einer unterschiedlichen, definiert vorgebbaren Temperatur beaufschlagbar sind, besitzen solche Dimensionen, daß die o.g. optische Zugänglichkeit der Detektionsflächen 12 des Chips 2 gewährleistet ist.

30 **[0020]** Die Fig. 5 zeigt die Positionierung der Mittel zur Temperaturbeaufschlagung 17 an der dem Kammerkörper 1 abgewandten Seite des Kammerträgers 5, welcher den Kammerkörper 1 mit dem gehaltenen Chip 2 trägt.

35 **[0021]** In der Fig. 6 ist ein auf der Oberseite des transparenten Kammerträgers 5 gelagerter Temperaturfühler 16 inklusive Leiterbahnen 1516 und Anschlußflächen 1416 dargestellt. Der Temperaturfühler 16 ist dabei um die Detektionsfläche 12 des Chips 2 gelagert, so daß die genannte optische Zugänglichkeit der Detektionsfläche 12 gewährleistet ist. Der Temperaturfühler 16 sind durch eine in der Abbildung nicht dargestellten Passivierungsschicht elektrisch gegenüber nachfolgenden

Elementen der Vorrichtung 20 und gegenüber der Probenflüssigkeit 19 elektrisch isoliert.

[0022] Fig. 7 zeigt die Positionierung des Temperaturfühlers 16 an der dem Kammerkörper 1 zugewandten Oberflächenseite des Kammerträgers 5, welche gleichzeitig die Oberflächenseite des Kammerträgers 5 ist, mit der der durch den Kammerkörper 1 gehaltene Chip 2 den Kapillarspalt 7 generiert.

[0023] Die Fig. 8 zeigt einen auf die, nicht im einzelnen dargestellte Passivierungsschicht des Temperaturfühlers 16 aufgetragenen Quadrupol 18 inklusive zugeordneter Leiterbahnen 1518 und Anschlußflächen 1418. Der Quadrupol 18 steht in elektrisch leitendem Kontakt mit der Probenflüssigkeit 19, so daß durch das alternierende Anlegen einer Spannung von +1 V an zwei Elektroden 181 des Quadrupol 18 eine durch den elektroosmotischen Fluß induzierbare Verwirbelung in dem mit Probenflüssigkeit 19 befüllten Kapillarspalt 7 hervorgerufen ist. Ist ein anderes Paar Elektroden 181 des Quadrupols 18 unter Spannung gesetzt, so verändern sich die Verwirbelungsbedingungen. Durch ständiges Alternieren der Paare von Elektroden 181, die unter Spannung gesetzt werden, erfolgt eine effektive Vermischung der Probenflüssigkeit 19. Die angelegte Niederspannung von nur einem Volt wird verhindert, daß die Probenflüssigkeit 19 im Kapillarspalt 7 elektrochemischen Veränderungen unterliegt und sich bspw. Gasblasen bilden. Der Quadrupol 18 ist dabei, wie in dieser Figur dargestellt, so ausgebildet, daß die optische Zugänglichkeit der Detektionsfläche 12 gewährleistet ist. Alternativ dazu kann der Quadrupol 18 auch als optisch transparente Dünnschicht ausgeführt sein.

[0024] Die Fig. 9 zeigt die Positionierung des Quadrupols 18 an der dem Kammerkörper 1 zugewandten Oberflächenseite des Kammerträgers 5. Die Fig. 10a und b zeigen schematisch die sich durch Kapillarkräfte zwischen Kammerkörper 1 und Kammerträger 5 im Kapillarspalt 7 gelagerte Probenflüssigkeit 19.

Aufgrund der Größe des Gasreservoirs 6 sind, getrieben von der Minimierung der Grenzflächenenergie, etwaige, nicht im einzelnen dargestellte Luftblasen aus dem Kapillarspalt 7 in das Gasreservoir 6 der Probenkammer 3 ableitbar. Dadurch bildet sich um die Probenflüssigkeit 19 ein Luftring, der diese und den Chip 2 von dem Kammerkörper 1 thermisch isoliert, so daß die Probenflüssigkeit 19 im Kapillarspalt 7 bei geringem Energieverbrauch schnell aufgeheizt und abgekühlt werden kann. Gleichzeitig ist dadurch die Verdunstungsrate der Probenflüssigkeit 19 auch bei Temperaturen nahe des Siedepunktes stark herabgesetzt, da die Probenflüssigkeit 19 nur über den Rand des Kapillarspaltes 7 verdunsten kann. Hinzu kommt, daß der Bedarf an Probenflüssigkeit 19 gering ist (im µl-Bereich) Probenreservoir 7, da der Kapillarspalt 7 nur geringes Raumvolumen ausbildet, wodurch die benötigten Probenvolumina sehr klein sind.

Aufgrund der beschriebenen guten thermischen Isolation des Chips 2 und der Probenflüssigkeit 19 gegenüber

dem Kammerkörper 1 sowie des geringen Volumens der Probenflüssigkeit 19, lassen sich die für Mikrothermocycler üblichen, von Posner u.a. beschriebenen Heiz- und Kühlraten erreichen (S. Posner, T. Schulz, U. Dillner, V. Baier, J.M. Köhler, D. Schimkat, G. Mayer, A. Siebert; Chip elementes for fast thermocycling, Sensors and Actuators A, 1997, 62: 672-675). Gleichzeitig ist die Temperaturhomogenität der Probenflüssigkeit 19 und der Wärmeeintrag in die Probenflüssigkeit 19, die im Kapillarspalt 7 zwischen dem Chip 2 und dem temperierbaren Kammerträger 5 positioniert ist, aufgrund des großen Heizflächen-zu-Probenvolumenverhältnisses in hohem Maße gewährleistet.

[0025] Figur 11 zeigt den Einbau der Vorrichtung 20 zur Vervielfältigung und Charakterisierung von Nukleinsäuren in ein Analysesystem 200. Das Analysesystem 200 besteht dabei aus einem Temperaturregler 21, einer Vermischungssteuerung 22, elektrischen Leitungen 23, 24, 33, 34, einem Gesamteinlaß 25, einem Abfallgefäß 26, einem Konditionierer 27, Ventilen/Pumpen 28, Vorratsbehältern 29, Verbindungsschläuchen 30, einer Konditionierersteuerung 31, einer Automatensteuerung 32, einem Steuerrechner 35, einem Rechnerbus 36 und einem Pipettierautomaten 37. Die Vorrichtung 20 steht über den Einlaß 81 und den Auslaß 82 unmittelbar mit dem Konditionierer 27 und dem Abfallgefäß 26 sowie über die elektrischen Leitungen 23 und 24 unmittelbar mit dem Temperaturregler 21 und der Vermischungssteuerung 22 in Verbindung, wobei der Temperaturregler mit den Temperaturfühlern 16 und den Mitteln zur Temperaturbeaufschlagung 17 und die Vermischungssteuerung mit dem Quadrupol 18 gekoppelt ist. Bei der in das Analysesystem 200 eingebauten Vorrichtung 20 zur Vervielfältigung und Charakterisierung von Nukleinsäuren ist die Probenflüssigkeit 19 über den Pipettierautomaten 37 aus nicht im einzelnen dargestellten Mikroplates in den Gesamteinlaß 25 pipettierbar. Durch die Ventile und Pumpen 28, die mit dem Gesamteinlaß 25 in flüssigkeitsleitender Verbindung steht, ist die Probenflüssigkeit 19 durch die Verbindungsschläuche 30 in den Konditionierer 27 leitbar, wobei der Konditionierer 27 zur Aufarbeitung der Probenflüssigkeit 19 dient (bspw. pH-Wert-Einstellung und Ausfiltrieren störender Substanzen). Die Pufferflüssigkeiten und Reaktionslösungen für diese Aufarbeitung sind aus den Vorratsbehältern 29, die mit dem Konditionierer 29 in flüssigkeitsleitender Verbindung stehen, zuführbar. Der Pipettierautomat 37 und der Konditionierer 29 stehen mit der Konditionierersteuerung 31 und der Automatensteuerung 32 über die elektrischen Leitungen 33 in Verbindung und dienen der Kontrolle und Regelung dieser. Der Einlaß 81 und der Auslaß 82 des Kammerkörpers 1, die in das Gasreservoir 6 führen, dienen der Flüssigkeitsleitung von dem Konditionierer 29 über den Kapillarspalt 7 hin zum Abfall 26.

In der Vorrichtung 20 ist die Probenflüssigkeit 19 im Bereich des Kapillarspaltes 7 mittels des Temperaturreglers 21 und der Vermischungssteuerung 22 tempe-

rierbar und vermischbar. Der Kapillarspalt 7 ist dadurch der Ort der Verstärkung und Charakterisierung einer Nukleinsäure, im Beispiel der Target-DNS.

[0026] Die Figuren 12a bis c zeigen am Beispiel einer Ausführungsform der Vorrichtung 20, daß der Kammerkörper 1 eine Länge und Breite von 8 mm sowie Höhe von 3 mm aufweist, das Gasreservoir Länge und Breite von 5,4 mm sowie eine Höhe von 0,5 bis 0,8 mm besitzt, der Kammerträger 5 eine Dicke von 0,9 mm, die Ausnehmung 11 auf ihrer, dem Chip 2 zugewandten Seite einen Durchmesser von 2,8 mm und der Einlaß 81 und der Auslaß 82 einen Durchmesser von 0,5 mm besitzen, wobei der Einlaß 81 und der Auslaß 82, sowie die Ausnehmung 11 gegenüber dem Kammerträger 5 eine Neigung von 70 aufweisen.

In der Abb. 13 ist der optische Strahlengang durch eine weitere Ausführungsform der Vorrichtung 20, bei der die Auflagefläche 4 mit dem Kammerträger 5 über eine zusätzliche Dichtfläche 43 lösbar und dichtend verbunden ist, für die Dunkelfeld Fluoreszenzabbildung der Detektionsfläche 12 Chips 2 gezeigt. Das Anregungslicht wird, wie dargestellt, durch den Dunkelfeldspiegel 38 auf die Detektionsfläche 12 entlang des Anregungslichtstrahlengangs 39 gelenkt. Das Fluoreszenzlicht, das von der Detektionsfläche 12 ausgeht, wird entlang des Detektionslichtstrahlengangs 40 auf ein Mikroskopobjektiv 41 gelenkt. Dabei beträgt im Beispiel der Abstand zwischen dem Dunkelfeldspiegel 38 und der Detektionsfläche 12 ca. 4,6 mm und der Abstand zwischen der Detektionsfläche 12 und dem Mikroskopobjektiv 41 ca. 22,0 mm.

[0027] Das optische Auslesen des Wechselwirkungssignals zwischen der in Fig. 14 gezeigten Target-DNS 50 und der Sonden-DNS 56, 57, 58, 59 auf der Oberfläche des Chips 2 kann aufgrund der Konstruktion der Vorrichtung 20 online erfolgen.

Der Chip 2 ist so in dem Kammerkörper 1 gehalten, daß er in einem weiten Raumwinkel mittels Licht durchstrahlt werden kann, so daß online oder in situ die Hybridisierung mittels der markierten Sonden 56, 57, 58, 59, z.B. Fluoreszenzmessungen, verfolgbar sind. Die Anordnung und Größe des Temperaturfühlers 16 und des Quadrupols 19 ist so gestaltet, daß der Strahlengang für die Online Detektion bzw. die nachfolgende in situ Detektion nicht gestört wird und die Detektion der Wechselwirkungen auf den Spots 13 durch alle Formen der optischen Detektion oder Spektroskopie (z.B. Photometrie, Differentialphotometrie, konfokale Fluoreszenzmessung, Dunkelfeld Fluoreszenzmessung, Durchlicht Fluoreszenzmessung, Auflicht Fluoreszenzmessung usw.) auswertbar sind, wobei die Label 60 und Messmethode aufeinander abgestimmt sein müssen.

[0028] Die Abb. 14 zeigt die schematische Darstellung des Chips 2, der die Primer 54 (A) und 53 (B') trägt, wobei diese den spezifischen Sequenzbereich der Target-DNS 50, also die Sequenzen A,X,S1,X,B und B',X,S1',X,A', entsprechen. Die Sequenzen A und B bzw. A' und B' definieren den für alle Spezies identischen Be-

reich der Target-DNS 50 beziehungsweise der einsträngigen AB-Target-DNS 51 und A'B'-Target-DNS 52. Auf dem Chip 2 sind im Beispiel über Spacer 55 Sonden 56, 57, 58 und 59 immobilisiert, die Sequenzen tragen, die spezifisch für die Target-DNS 50 einer bestimmter Herkunft sind, d.h. in dem dargestellten Beispiel hybridisieren nur die Sonden 56 und 57 mit den Sequenzen S1 und S1' an die Verstärkungsprodukte der Target-DNS 50 (gezeigt in Fig. 15). An den Sonden 58 und 59 mit den Sequenzen S2 und S2' findet hingegen keine Hybridisierung statt.

Die Primer 53 und 54 tragen bspw. eine Fluoreszenzmarkierung 60, die durch den Verstärkungsprozeß in die sekundären Amplifikationsprodukte 61 und 62 einbaubar ist, wodurch die Hybridisierung an den Sonden 56 und 57 während der Verstärkung durch Fluoreszenzmessung detektierbar ist, so daß die Entscheidung ermöglicht wird, ob die Target-DNS 50 zwischen den Sequenzbereichen A und B bzw. A' und B' die Sequenz S1 bzw. S1' und/oder die Sequenz S2 bzw. S2' aufweist. Da die Sonden-Sequenzen bspw. für eine bestimmte Spezies spezifisch sein können, kann mit diesem Verfahren der Nachweis der Anwesenheit einer bestimmten Spezies in einer Probe erbracht werden.

[0029] Figur 15 zeigt die schematische Darstellung der sekundären und tertiären Amplifikationsprodukte 61, 62 und 63, die mittels der Vorrichtung 20 erzeugbar sind. Die Menge an sekundärem Amplifikationsprodukt 61 und 62 wird dabei ab dem zweiten Reaktionszyklus innerhalb des Kapillarspalts 7 mit jedem Zyklus nahezu verdoppelt, so daß die Konzentration an sekundärem Amplifikationsprodukt nach einigen Zyklen ausreicht, um an die Sonden 56, 57, die an den Spots 13 immobilisiert sind, zu hybridisieren, wobei eine Verlängerung der Sonden 56, 57 komplementär zum sekundären Amplifikationsprodukt 61, 62 stattfindet. Dieses tertiäre Amplifikationsprodukt 63 aus Sonden 56, 57 und sekundären Amplifikationsprodukt 61, 62 kann bspw. über ein Label 60, das an die eingesetzten Primer 53, 54 gekoppelt ist, mittels Fluoreszenzdetektion nachgewiesen werden.

[0030] In einem ersten Anwendungsbeispiel soll der spezifische Nachweis von einzelnen Mikroorganismenspezies beschrieben werden:

Der Chip 2 der Vorrichtung 20 ist in diesem Beispiel ein DNA-Chip und dient, während oder nach der DNS-Amplifikation, der Detektion der Verstärkungsprodukte und ggf. auch der Bereitstellung von Festphasengekoppelten DNS-Primern (Abb. 14 und 15). Bspw. wird eine Sequenz S1 die spezifisch ist für eine Spezies (z.B. *Escherichia coli*) durch den thermischen Amplifikationsprozeß (z.B. PCR) so häufig aus einer Vielzahl von möglichen Targets heraus kopiert, daß die sichere Erkennung dieser Sequenz durch Hybridisierung an den Sonden 56, 57, 58 und 59 und Fluoreszenzmessung auf der Detektionsfläche 12 möglich wird. Sind mehrere Sequenzen bekannt, die jeweils spezifisch sind für z.B. eine Spezies, einen Stamm oder eine Krankheit und die alle zwi-

schen zwei konservierten, in allen Fällen identischen Bereichen liegen, so lassen sich durch Immobilisierung der entsprechenden Sonden auf dem Chip 2 alle Spezies, Stämme bzw. Krankheiten parallel mit nur einer thermischen Amplifikationsreaktion in der Vorrichtung 20 nachweisen. Durch Verwendung von mehreren Primerpaaren 53, 54 läßt sich der Anwendungsbereich erweitern. Die Fluoreszenzdetektion der tertiären Amplifikationsprodukte 63 erfolgt im einfachsten Fall durch Fluoreszenzmarkierung 60 der Primer 53, 54. Andere Markierungsarten, wie bspw. Interkalatoren, Radioisotope, FRET-Systeme, fluoreszenzmarkierte Nukleotide usw. sind dadurch nicht ausgeschlossen.

Der in der Vorrichtung 20 ablaufende molekularbiologische Prozeß soll nachfolgend anhand der Abb. 14 und 15 beschrieben werden.

Die einer biologischen Probe entstammende Target-DNS 50 wird zusammen mit Primern 53, 54, die gelabelt sein können 60, in das Probenreservoir (den Kapillarspalt) 7 gegeben. Die Spots 13 des Chips 2 auf der Detektionsfläche 12 tragen über Spacer 55 Sonden-DNS mit Sequenzen S1, S1', S2, S2' usw., die dadurch charakterisiert sind, daß sie komplementär zu denen sein können, die in der Target-DNS 50 vorkommen. In dem in Abb. 14 dargestellten Beispiel beinhaltet die Target-DNS 50 Sequenzen, die komplementär zu den Sonden 56 und 57 sind. Jede Sequenz S1, S1' und S2, S2', usw. der Sonden (56, 57, 58, 59) wurde so gewählt, daß sie spezifisch für eine spezielle Fragestellung ist. Gilt es zum Beispiel bestimmte Krankheitserreger mittels der Vorrichtung 20 zu detektieren, so seien S1 und S1' spezifisch für den Erreger *Bacillus cereus*, S2 und S2' für den Erreger *Campylobacter jejuni* usw.. Befindet sich lediglich der Erreger *Bacillus cereus* in einer Stuhlprobe, so wird sich nach der sachgerechten Aufarbeitung der Probe eine Target-DNS 50 in der Probenflüssigkeit befinden, die nur die Sequenzen S1 und S1' beinhaltet. Um diese nun detektierbar auf der Detektionsfläche 12 zur Hybridisierung zu bringen, muß im allgemeinen die Anzahl der Kopien an Target-DNS 50 signifikant erhöht werden. Daher wird eine rauschunterdrückende, spezifische DNS-Amplifikationsmethode in dem Probenreservoir (Kapillarspalt) 7 durchgeführt. Zu diesem Zweck werden zwei Primer 53, 54 mit Sequenzen A und B', die für alle Erreger gleich sind ausgesucht, die alle möglichen erregerspezifischen Sonden-Sequenzen (S1, S2, S3 ...) einrahmen (so wie in Abb. 14 die Sequenzen S1 bzw. S1' von den Sequenzen A und B' eingerahmt werden). Dann wird, wie bei der PCR, die Target-DNS 50 bei ca. 90 °C denaturiert, die Primer 53, 54 annealieren bei ca. 65°C an B bzw. A' und es wird bei ca. 70°C eine Primer-Extensions-Reaktion durchgeführt, die die Target-DNS 51, 52 doppelsträngig macht. Das erhaltene Produkt ist dann das primäre Amplifikationsprodukt mit der Sequenz A,X,S1,X,B,Y bzw. B',X,S1',X,A',Y. Es wird der Zyklus aus Denaturierung, Annealieren und Extension wiederholt, woraufhin man das sekundäre Amplifikationsprodukt 61,62 (siehe Abb. 15) erhält. Durch erneutes

mehrfaches Wiederholen des Amplifikationszykluses wird die Zahl der sekundären Amplifikationsprodukte 61, 62 jeweils nahezu verdoppelt. Dadurch steigt die Konzentration an DNS, die die Sequenzen S1 und S1' beinhalten derart an, daß eine sichere Detektion der Hybridisierung an den Sonden 56, 57 möglich wird. Unspezifisch an den Spots bindende DNS, die sich noch in der Probenflüssigkeit befindet, wird von dem Amplifikationsprozeß nicht erfaßt, wodurch die Selektivität des Gesamtverfahrens stark erhöht wird.

Auf diese Weise wird hochspezifisch und hochempfindlich *Bacillus cereus* nachgewiesen. Anstelle des PCR Protokolls können auch andere Verstärkungsverfahren zu Anwendung gelangen.

Durch den Einbau der Vorrichtung 20 zur Vervielfältigung und Charakterisierung von Nukleinsäuren in das Analysesystem 200 (Abb. 11) besteht die Möglichkeit, die Prozesse der Aufarbeitung von Proben automatisch und kontinuierlich durchzuführen.

[0031] In einem zweiten Anwendungsbeispiel soll ein paralleler Nachweis von bakteriellen Erregern in Stuhlproben beschrieben werden:

Der Chip 2 der Vorrichtung 20 ist bei diesem Beispiel ein DNA-Chip und dient dem parallelen Nachweis mehrerer bakterieller Erreger in humanen oder tierischen Stuhlproben.

Aus jeder Stuhlprobe wird die Gesamt-DNS mittels Standardtechniken (z.B. mit Hilfe des dafür vorgesehenen Kits der Firma Qiagen) isoliert. Die DNA wird in ein für die Anwendung in der Vorrichtung 20 geeignetes Volumen eines standardisierten, gegebenenfalls kommerziell verfügbaren Puffersystems aufgenommen, in dem eine PCR-Amplifikation durchgeführt werden kann. Dieses enthält neben der Pufferkomponente mindestens eine thermostabile Polymerase, ein gegebenenfalls isomolares Gemisch der vier natürlichen Desoxynukleotidtriphosphate, ein divalentes Salz, gegebenenfalls Komponenten zur Steigerung der Effektivität der PCR, sowie Bausteine zum Labeln der PCR-Produkte (z.B. fluoreszenz-, Biotin- oder ähnlich markierte Desoxynukleotidtriphosphate).

Für den Nachweis der Organismen findet ein Chip 2 Verwendung, auf dessen Oberfläche Oligonukleotid-Sonden 56, 57, 58, 59 immobilisiert sind, die komplementär zu einem oder mehreren variablen Bereichen der 16S rRNS Gene und/oder der 23S rRNS Gene und/oder der innergenischen Bereiche zwischen 16S und 23S rRNS Gen verschiedener nachzuweisender Organismen sind. Die Sonden 56, 57, 58, 59 sind beispielsweise gerichtet gegen eine oder mehrere der entsprechenden Sequenzen von *Aeromonas spec.* und/oder *Bacillus cereus* und/oder *Campylobacter jejuni* und/oder *Clostridium difficile* und/oder *Clostridium perfringens* und/oder *Plesiomonas shigelloides* und/oder *Salmonella spec.* und/oder *Shigella spec.* und/oder *Staphylococcus aureus* und/oder *Tropheryma whippellii* und/oder *Vibrio cholerae* und/oder *Vibrio parahaemolyticus* und/oder *Yersinia enterocolitica*.

Die Oligonukleotid Sonden 56, 57, 58, 59 werden in Spots 13 angeordnet, so daß jeder einzelne Spot 13 eine Vielzahl von Oligonukleotid Sonden (z.B. die Sonde 56) der gleichen Sequenz enthält. Die Immobilisierung der Sonden 56, 57, 58, 59 erfolgt entweder an deren 3'-Ende oder am 5' Ende bzw. an einer internen Position, wobei gegebenenfalls das 3' Ende der Sonden 56, 57, 58, 59 z.B. durch Aminierung blockiert wird, so daß es als Substrat für DNS-Polymerasen nicht dienen kann. Die Auswahl der Sonden 56, 57, 58, 59 erfolgt so, daß einerseits jede der Sonden eine hohe Sequenzspezifität für den zu detektierenden Organismus aufweist und andererseits in den Genomen der Keime in einer geringen Distanz von der Bindungsstelle der spezifischen Sonden Motive existieren, die für alle oder für Gruppen der zu detektierenden Organismen die gleiche Sequenz besitzen.

Gegen diese Motive werden universelle Primer 53, 54 gerichtet, die dazu geeignet sind, bei allen nachzuweisenden Organismen einen Sequenzabschnitt, der die Bindungsstelle der auf dem Chip 2 immobilisierten Sonden enthält, mittels PCR zu amplifizieren. Diese Primer 53, 54 werden der, aus der Stuhlprobe isolierten, in der Amplifikationslösung (Probenflüssigkeit 19) aufgenommenen DNS, zugesetzt. Gegebenenfalls kann der Primer 53, 54, der während der nachfolgenden PCR Amplifikation die Synthese des Stranges spezifiziert, der die zur auf dem Chip 2 immobilisierten Probe komplementäre Sequenz enthält als markierte Komponente zugesetzt werden.

Das Amplifikationsgemisch wird in die mit einem beschriebenen Chip 2 versehene Vorrichtung 20 gefüllt. Die Lösung in der Vorrichtung 20 wird einem zyklischen Temperaturregime unterworfen, so daß die Target-DNS 50 nach einem typischen PCR-Mechanismus amplifiziert und gegebenenfalls gleichzeitig markiert wird. Nach hinreichender Amplifikation erfolgt ein Hybridisierungsschritt, bei dem die mit den universellen Primern 53, 54 amplifizierten Targetsequenzen mit den spezifischen, auf dem Chip 2 immobilisierten Sonden 56, 57, 58, 59 hybridisieren.

Nach Abschluß der Reaktion folgt ein Spülschritt, bei dem nicht mit dem Chip verknüpfte und unspezifisch gebundene DNS Moleküle entfernt werden.

Anschließend erfolgt Detektion der auf dem Chip 2 verbliebenen Markierung. In der Stuhl-Probe anwesende Organismen werden über die Markierung der für sie spezifischen Proben-Spots 13 auf dem Chip 2 identifiziert.

[0032] Um Probenflüssigkeiten 19 bspw. aus Stuhlproben oder Gewebe zu erhalten sind eine Vielzahl von Aufarbeitungsschritte notwendig. Es müssen Zellen aufgeschlossen werden, Proteine, Lipide und Feststoffe abgetrennt werden und die DNS aufgearbeitet und gereinigt werden. Die für die Verwendung der Vorrichtung notwendigen Enzyme, Primer und sonstigen Substanzen müssen ebenfalls der Probenflüssigkeit 19 zugeführt werden. Diese Schritte lassen sich durch den Ein-

bau der Vorrichtung 20 zur Vervielfältigung und Charakterisierung von Nukleinsäuren in das Analysesystem 200, daß u.a. aus Pumpen und Ventilen 28, die die Flüssigkeiten bewegen und Steuern, aus Filtern und Reaktionskammern (Konditionierer 27), in denen die einzelnen Prozessschritte nacheinander durchgeführt werden und aus Voraratsbehältern 29, die die dazu notwendigen Chemikalien liefern, besteht (gezeigt in Fig. 11), automatisch und kontinuierlich durchführen. Dabei werden die Proben durch einen Pipettierroboter 37 aus einem nicht im einzelnen dargestellten Standardbelieferungssystem in den Gesamteinlaß 25 zur Konditionierung eingefüllt. Die durch das Analysesystem 200 aufgearbeiteten Proben gelangen über den Einlaß 81 in die Vorrichtung 20, so das eine Vervielfältigung und Charakterisierung von Nukleinsäuren der Proben automatisiert durchgeführt werden kann. Der gesamte Prozeß wird von einem Steuerrechner 35 überwacht, der über einen Rechnerbus 36 mit elektronischen Reglern und Kontrollgeräten 21, 22, 31, 32 verbunden ist.

[0033] Alle in der Beschreibung, den nachfolgenden Ansprüchen und der Zeichnung dargestellten Merkmale können sowohl einzeln als auch in beliebiger Kombination miteinander erfindungswesentlich sein.

Bezugszeichenliste

[0034]

- | | | |
|----|-------|--|
| 30 | 1 - | Kammerkörper |
| | 2 - | Chip |
| | 3 - | Probenkammer |
| | 4 - | Auflagefläche |
| | 5 - | Kammerträger |
| 35 | 6 - | Gasreservoir |
| | 7 - | Kapillarspalt |
| | 81 - | Einlaß |
| | 82 - | Auslaß |
| | 9 - | Gasreservoirnase |
| 40 | 11 - | Ausnehmung |
| | 12 - | Detektionsfläche |
| | 13 - | Spot |
| | 14 - | Anschlußflächen |
| | 15 - | Leiterbahn |
| 45 | 16 - | Temperaturfühler |
| | 17 - | Mittel zur Temperaturbeaufschlagung |
| | 171 - | Widerstandsleitungen |
| | 18 - | Quadrupol |
| | 181 - | Elektroden |
| 50 | 19 - | Probenflüssigkeit |
| | 20 - | Vorrichtung |
| | 21 - | Temperaturregler |
| | 22 - | Vermischungssteuerung |
| | 23 - | elektrische Leitungen für die Temperaturreg- |
| 55 | | elung |
| | 24 - | elektrische Leitungen für die Quadrupolre- |
| | | elung |
| | 25 - | Gesamteinlaß |

26 -	Abfall	
27 -	Konditionierer	
28 -	Pumpen/Ventile	
29 -	Vorratsbehälter	
30 -	Verbindungsschläuche	5
31 -	Konditionierersteuerung	
32 -	Automatensteuerung	
33 -	elektrische Leitungen für die Konditionierer-	
	steuerung	
34 -	elektrische Leitungen für die Automaten-	10
	steuerung.	
35 -	Steuerrechner	
36 -	Rechnerbus	
37 -	Pipettierautomat (Pipettierroboter)	
38 -	Dunkelfeldspiegel	15
39 -	Anregungslichtstrahlengang	
40 -	Detektionslichtstrahlengang	
41 -	Mikroskopobjektiv	
42 -	Berandung	
43 -	Dichtfläche	20
50 -	Target-DNS	
51 -	AB Target-DNS	
52 -	A'B' Target-DNS	
53 -	Primer B'	
54 -	Primer A	25
55 -	Spacer	
56 -	Sonde S1	
57 -	Sonde S1'	
58 -	Sonde S2	
59 -	Sonde S2'	30
60 -	Label	
61 -	sekundäres Amplifikationsprodukt	
62 -	sekundäres Amplifikationsprodukt	
63 -	tertiäres Amplifikationsprodukt	
200 -	Analysesystem	35
1416 -	Anschlußflächen des Temperaturfühlers	
1417 -	Anschlußflächen des Heizers	
1418 -	Anschlußflächen des Quadrupols	
1516 -	Leiterbahn des Temperaturfühlers	
1517 -	Leiterbahn Heizers	40
1518 -	Leiterbahn Quadrupols	
A-A -	Schnittebene	
B-B -	Schnittebene	
C-C -	Schnittebene	
D-D -	Schnittebene	45
E-E -	Schnittebene	

Patentansprüche

1. Vorrichtung zur Vervielfältigung und Charakterisierung von Nukleinsäuren in einem Reaktionsraum, **dadurch gekennzeichnet, dass** ein optisch transparenter Kammerkörper (1), der einen optisch durchlässigen Chip (2) mit daran gebundenen Nukleinsäuren und einer Detektionsfläche (12) enthält, dichtend auf einem optisch transparenten Kammerträger (5) so aufgebracht ist, dass eine

Probenkammer (3) mit einem Kapillarspalt (7) zwischen dem Kammerträger (5) und der Detektionsfläche (12) des Chips (2) gebildet wird, die temperaturund durchflussteuerbar ist.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Mittel zur Temperaturregulation mit dem Kammerträger (5) verbunden sind und ein schnelles Beheizen und/oder Kühlen der Probenkammer (3) mit dem Kapillarspalt (7) erlauben.

3. Vorrichtung nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Mittel zur Temperaturregulation sich auf der dem Kammerkörper (1) zugewandten Seite des Kammerträgers (5) befinden.

4. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Mittel zur Temperaturregulation (16, 17) in Form optisch transparenter Dünnschichten und/oder derart fein strukturiert ausgeführt sind, dass die optische Transparenz des Chips (2) mindestens im Bereich der auf der Detektionsfläche (12) in Spots gebundenen Nukleinsäuren unbeeinflusst bleibt.

5. Vorrichtung nach dem Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Mittel zur Temperaturregulation mikrostrukturierte Heizelemente (17), bevorzugt Nickel-Chrom-Dickfilm-Widerstandsheizer und/oder mikrostrukturierte Temperaturfühler (16), bevorzugt Nickel-Chrom-Dickfilm-Widerstandsfühler umfassen.

6. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Kammerträger (5) Systeme zur Durchmischung der Probenflüssigkeit umfasst, die in Form optisch transparenter Dünnschichten und/oder derart fein strukturiert ausgeführt sind, dass die optische Transparenz des Chips (2) mindestens im Bereich der auf der Detektionsfläche (12) in Spots gebundenen Nukleinsäuren unbeeinflusst bleibt, wobei es sich bevorzugt um ein Quadrupol System zur Induktion eines elektroosmotischen Flusses handelt.

7. Vorrichtung nach dem Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Quadrupol System als Gold-Titan-Elektroden ausgeführt ist.

8. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Kammerträger (5) und der Kammerkörper (1) bevorzugt aus Glas und/oder einem optisch durchlässigem Kunst-

stoff, besonders bevorzugt aus Polycarbonat und/oder Polymethanethylacrylat bestehen.

9. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Kammerträger (5) aus wärmeleitendem Material besteht.

10. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Chip aus Glas und/oder Silizium besteht.

11. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Kammerkörper (1) mindestens im Bereich des Chips (2) eine optisch durchlässige konische Aussparung aufweist.

12. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Kammerkörper über einen räumlich voneinander getrennten Einlass (81) und Auslass (82) zum Beladen des Probenraums (3) und des Kapillarspalts (7) verfügt.

13. Vorrichtung nach Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Einlass (81) und Auslass (82) einseitig zum Chip (2) angeordnet und von einer Gasreservoirmase (9) getrennt sind.

14. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Kammerkörper (1) mit dem Kammerträger (5) dichtend unlösbar durch Verkleben und/oder Verschweißen oder lösbar über eine zusätzliche Dichtfläche (43) verbunden ist.

15. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Detektionsfläche (12) in Form von Spots ausgebildet ist, an denen Sonden (56, 57, 58, 59) in Form von Nukleinsäuremolekülen immobilisiert sind, wobei es sich bei den Nukleinsäuremolekülen bevorzugt um DNS-Moleküle und/oder RNS-Moleküle handelt.

16. Vorrichtung nach Anspruch 15, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Sonden (56, 57, 58, 59) über Spacer (55) immobilisiert sind.

17. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Auswertung der Chip-basierten Charakterisierung von Nukleinsäuren durch Formen der optischen Detektion und/

oder Spektroskopie erfolgen kann, besonders bevorzugt durch Durchlicht-Fluoreszenzmessung, Dunkelfeld-Fluoreszenzmessung, konfokale Fluoreszenzmessung, Aufricht-Fluoreszenzmessung, Photometrie und/oder Differential-Photometrie.

18. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche zur nahezu gleichzeitigen Amplifikation und Chip-basierten Charakterisierung von Nukleinsäuren.

19. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche 1-17 zur nahezu gleichzeitigen Amplifikation durch PCR und Chip-basierten Charakterisierung von Nukleinsäuren.

Claims

1. Device for amplifying and characterizing nucleic acids in a reaction chamber, **characterized in that** an optically transparent chamber body (1), which contains an optically transparent chip (2) having nucleic acids bound thereto and a detection area (12), is sealingly placed on an optically transparent chamber support (5), so that a sample chamber (3) having a capillary gap (7) is formed between the chamber support (5) and the detection area (12) of the chip (2), the chamber being temperature-adjustable and flow-controllable.
2. Device according to claim 1, **characterized in that** the temperature adjustment means are connected with the chamber support (5) and enable a rapid heating and/or cooling of the sample chamber (3) having the capillary gap (7).
3. Device according to claim 2, **characterized in that** the temperature adjustment means are situated on the side of the chamber support (5) facing towards the chamber body (1).
4. Device according to any one of the preceding claims, **characterized in that** the temperature adjustment means (16, 17) are configured in the form of optically transparent thin films and/or are so finely structured that the optical transparency of the chip (2) remains unaffected at least in the area of the nucleic acids bound in spots on the detection area (12).
5. Device according to claim 4, **characterized in that** the temperature adjustment means comprise micro-structured heating elements (17), preferably nickel-chromium-thick film-resistance heaters and/or micro-structured temperature sensors (16), preferably nickel-chromium-

thick film-resistance sensors.

6. Device according to any one of the preceding claims,
characterized in that the chamber support (5) comprises systems for thoroughly mixing the sample liquid, which are configured in the form of optically transparent thin films and/or are so finely structured that the optical transparency of the chip (2) remains unaffected at least in the area of the nucleic acids bound in spots on the detection area (12), whereby preferably a quadrupole system for inducing an electro-osmotic flow is concerned.
7. Device according to claim 6,
characterized in that the quadrupole system is realized as gold-titanium electrodes.
8. Device according to any one of the preceding claims,
characterized in that the chamber support (5) and the chamber body (1) preferably consist of glass and/or an optically transparent synthetic material, particularly preferably of polycarbonate and/or polymethane ethyl acrylate.
9. Device according to any one of the preceding claims,
characterized in that the chamber support (5) consists of a thermally conducting material.
10. Device according to any one of the preceding claims,
characterized in that the chip consists of glass and/or silicon.
11. Device according to any one of the preceding claims,
characterized in that the chamber body (1) comprises at least in the area of the chip (2) an optically transparent conical recess.
12. Device according to any one of the preceding claims,
characterized in that the chamber body has an inlet (81) and an outlet (82) spatially separate from each other, for charging the sample chamber (3) and the capillary gap (7).
13. Device according to claim 12,
characterized in that the inlet (81) and the outlet (82) are arranged unilaterally to the chip (2) and are separated by a gas reservoir nose (9).
14. Device according to any one of the preceding claims,
characterized in that the chamber body (1) is sealingly and unreleasably connected with the chamber

support (5) by an adhesive and/or weld connection, or is releasably connected through an additional sealing surface (43).

15. Device according to any one of the preceding claims,
characterized in that the detection area (12) is configured in the form of spots, to which probes (56, 57, 58, 59) in the form of nucleic acid molecules are immobilized, said nucleic acid molecules preferably being DNA molecules and/or RNA molecules.
16. Device according to claim 15,
characterized in that the probes (56, 57, 58, 59) are immobilized through spacers (55).
17. Device according to any one of the preceding claims,
characterized in that the evaluation of the chip-based characterization of nucleic acids may ensue by forms of the optical detection and/or spectroscopy, particularly preferably by transmission light fluorescence measurement, dark field fluorescence measurement, confocal fluorescence measurement, reflective light fluorescence measurement, photometry and/or differential photometry.
18. Use of a device according to any one of the preceding claims for an almost simultaneous amplification and chip-based characterization of nucleic acids.
19. Use of a device according to any one of the claims 1 to 17 for an almost simultaneous amplification by PCR and for a chip-based characterization of nucleic acids.

Revendications

1. Dispositif de multiplication et de caractérisation d'acides nucléiques dans un espace de réaction, **caractérisé en ce qu'un** corps optiquement transparent de chambre (1) qui contient une microplaque optiquement translucide (2) comportant des acides nucléiques qui lui sont liés et une surface de détection (12), est disposé sur un porte-chambre optiquement transparent (5) de façon à faire étanchéité, de manière telle qu'une chambre d'essai (3) avec une fente capillaire (7) entre le porte-chambre (5) et la surface de détection (12) de la microplaque (2) est formée, pilotable en température et en débit.
2. Dispositif selon la revendication 1,
caractérisé en ce que les moyens de régulation en température sont reliés avec le porte-chambre (5) et autorisent un chauffage et/ou un refroidissement rapide de la chambre d'essai (3) avec la fente ca-

pillaire (7).

3. Dispositif selon la revendication 2,
caractérisé en ce que les moyens de régulation en température figurent sur le côté du porte-chambre (5) dirigé vers le corps de chambre (1).

4. Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes,
caractérisé en ce que les moyens de régulation en température (16, 17) sont réalisés sous la forme de couches minces optiquement transparentes et/ou structurées assez finement pour que la transparence de la microplaquette (2) demeure inchangée au moins dans la zone des acides nucléiques liés par points à la surface de détection (12).

5. Dispositif selon la revendication 4,
caractérisé en ce que les moyens de régulation en température comprennent des éléments chauffants (17) microstructurés, de préférence des chauffages à résistance en couche épaisse nickel-chrome et/ou des capteurs de température (16) microstructurés, de préférence des capteurs à résistance en couche épaisse nickel-chrome.

6. Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes,
caractérisé en ce que le porte-chambre (5) comprend des systèmes pour mélanger le liquide d'essai réalisés sous la forme de couches minces optiquement transparentes et/ou structurées assez finement pour que la transparence de la microplaquette (2) demeure inchangée au moins dans la zone des acides nucléiques liés par points à la surface de détection (12), s'agissant de préférence d'un système quadripôle pour l'induction d'un écoulement électro-osmotique.

7. Dispositif selon la revendication 6,
caractérisé en ce que le système quadripôle est réalisé en tant qu'électrodes or-titane.

8. Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes,
caractérisé en ce que le porte-chambre (5) et le corps de chambre (1) sont constitués de préférence de verre et/ou d'une matière synthétique optiquement translucide, de manière particulièrement préférée en polycarbonate et/ou en acrylate d'éthyle de polyméthane.

9. Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes,
caractérisé en ce que le porte-chambre (5) se constitue de matériau conducteur de la chaleur.

10. Dispositif selon l'une quelconque des revendica-

tions précédentes,

caractérisé en ce que la microplaquette est en verre et/ou en silicium.

11. Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes,
caractérisé en ce que le corps de chambre (1) présente un creux conique optiquement translucide au moins dans la zone de la microplaquette (2).

12. Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes,
caractérisé en ce que le corps de chambre dispose d'une admission (81) et d'une évacuation (82) séparées spatialement l'une de l'autre pour charger la chambre d'essai (3) et la fente capillaire (7).

13. Dispositif selon la revendication 12,
caractérisé en ce que l'admission (81) et l'évacuation (82) sont disposées unilatéralement par rapport à la microplaquette (2) et séparées par un nez de réservoir à gaz (9).

14. Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes,
caractérisé en ce que le corps de chambre (1) est relié au porte-chambre (5) de façon inséparable et en formant étanchéité, par collage et/ou soudage, ou, de façon amovible, au travers d'une surface d'étanchéité (43) supplémentaire.

15. Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes,
caractérisé en ce que la surface de détection (12) est constituée sous forme de points où des sondes (56, 57, 58, 59) sont immobilisées sous forme de molécules d'acide nucléique, les molécules d'acide nucléique étant de préférence des molécules d'ADN ou d'ARN.

16. Dispositif selon la revendication 15,
caractérisé en ce que les sondes (56, 57, 58, 59) sont immobilisées au travers de pièces d'écartement (55).

17. Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes,
caractérisé en ce que l'exploitation de la caractérisation d'acides nucléiques basée sur microplaquette peut se réaliser sous la forme de la détection optique et/ou par spectroscopie, de manière particulièrement préférée par mesure de fluorescence de transparence, mesure de fluorescence de champ sombre, mesure de fluorescence confocale, mesure de fluorescence en éclairage direct, photométrie et/ou photométrie différentielle.

18. Utilisation d'un dispositif selon l'une quelconque

des revendications précédentes pour l'amplification et la caractérisation basée sur microplaquette quasi-simultanées d'acides nucléiques.

19. Utilisation d'un dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes 1 à 17 pour l'amplification PCR et la caractérisation basée sur microplaquette quasi-simultanées d'acides nucléiques.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

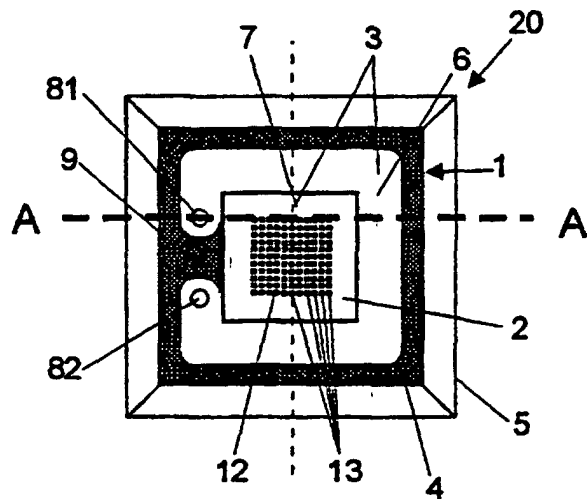


Fig. 1

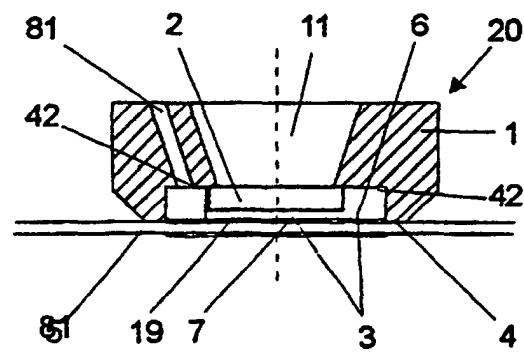


Fig. 2

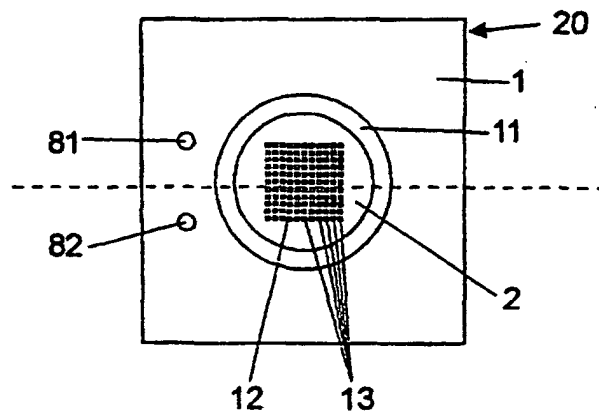


Fig. 3

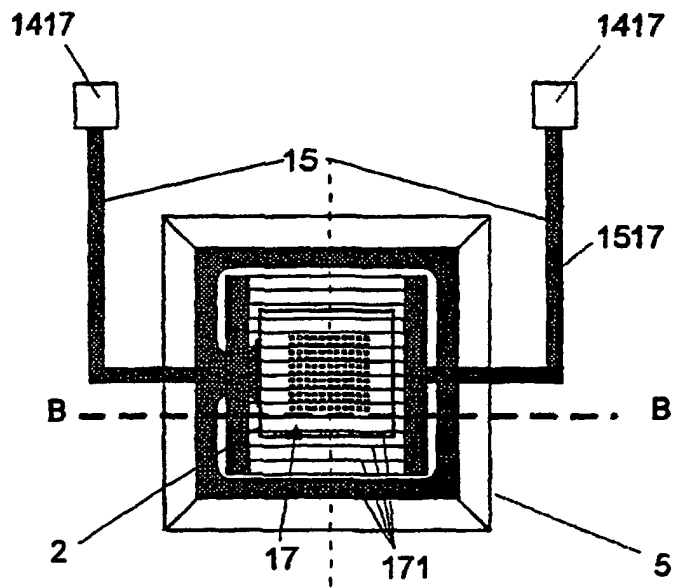


Fig. 4

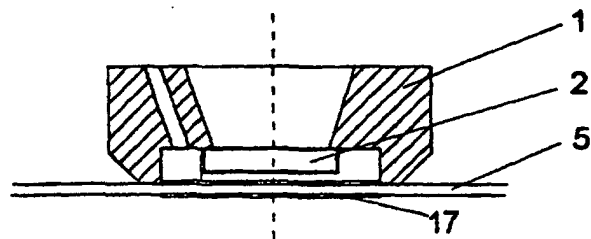


Fig. 5

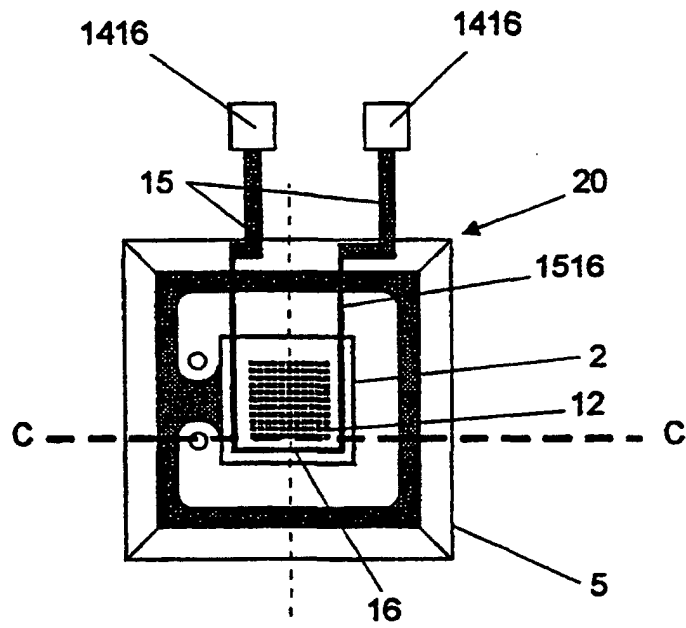


Fig. 6

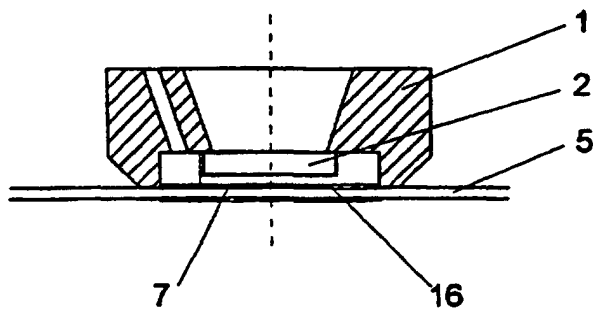


Fig. 7

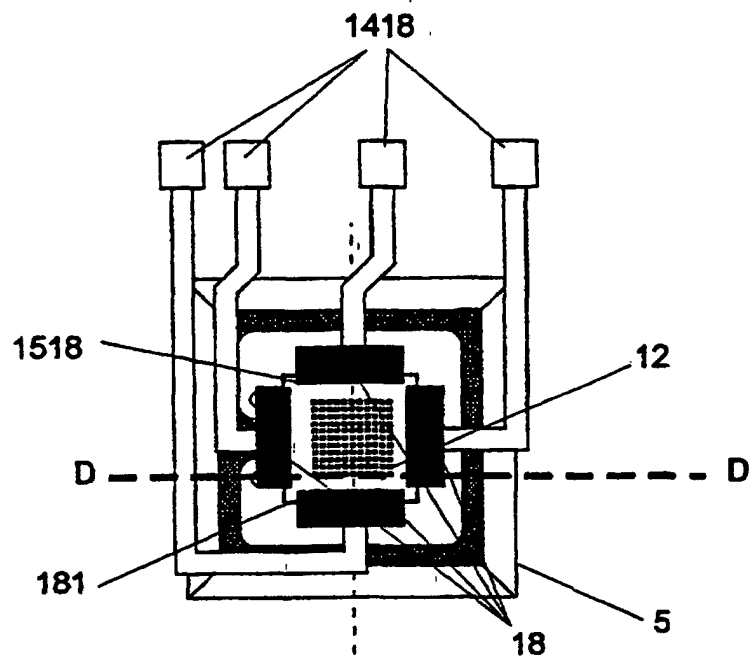


Fig. 8

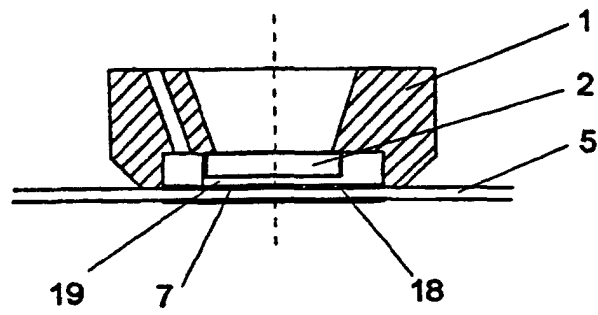


Fig. 9

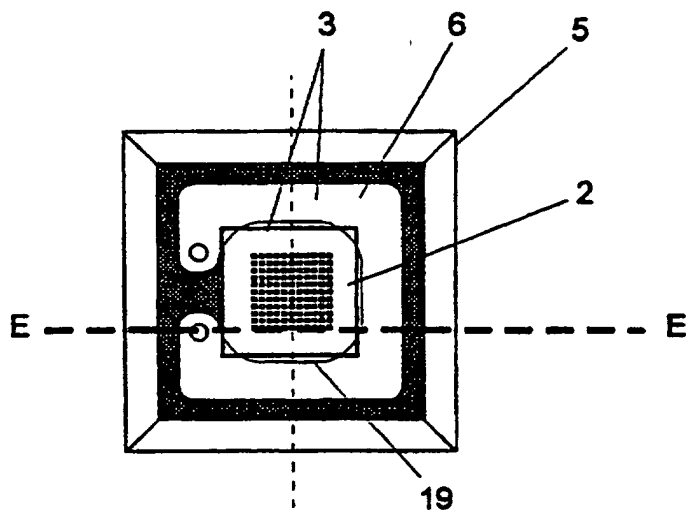


Fig. 10a

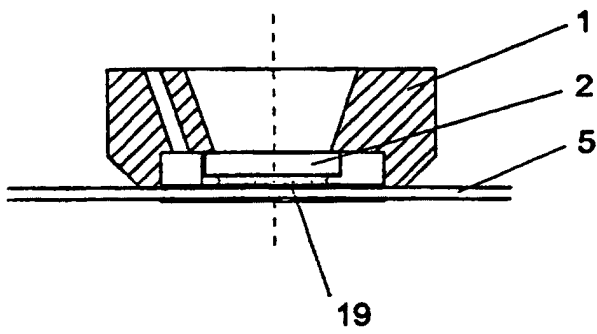


Fig. 10b

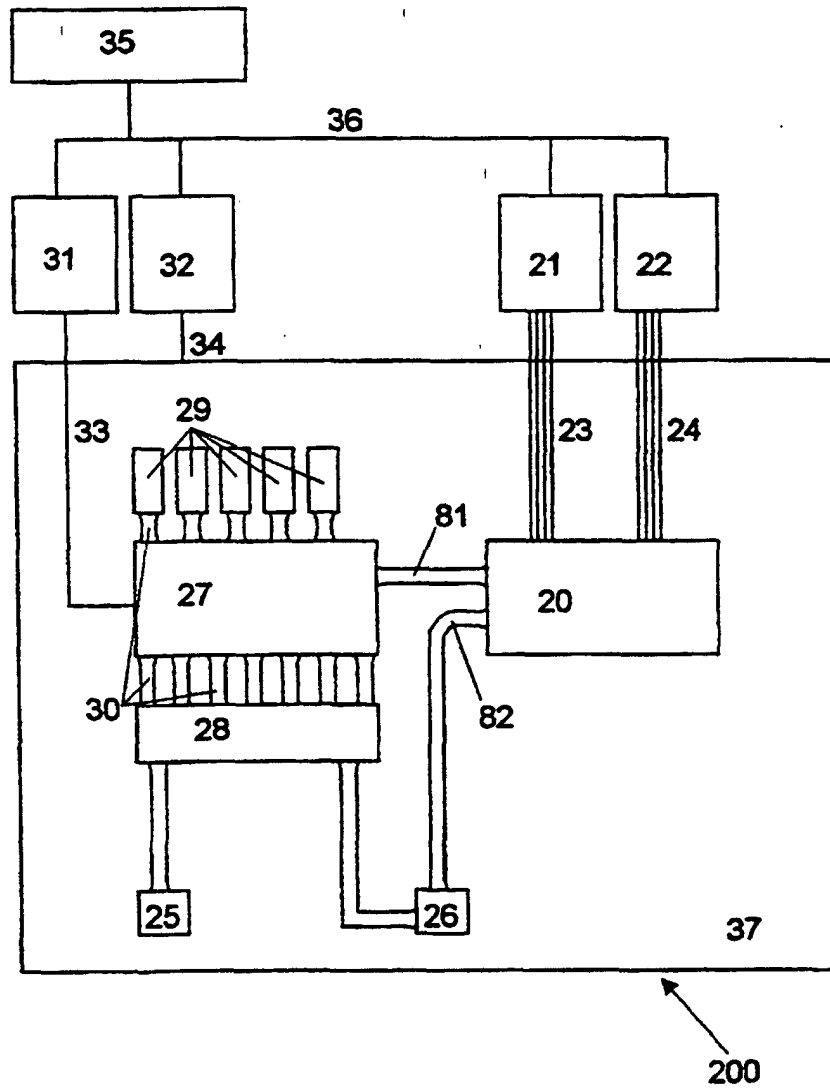


Fig. 11

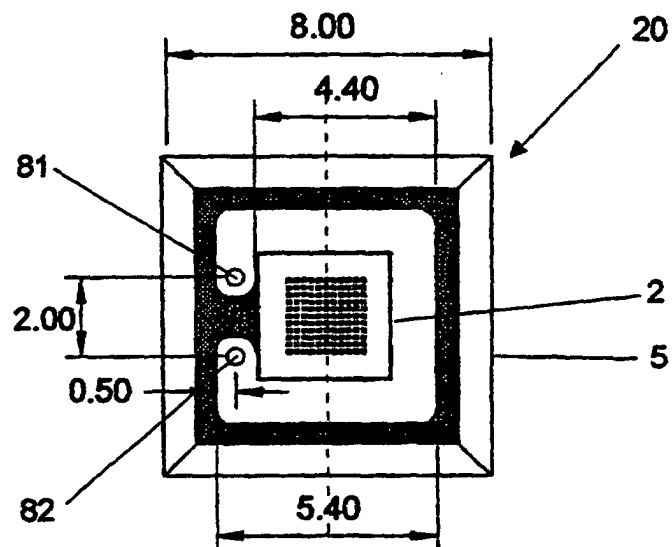


Fig. 12a

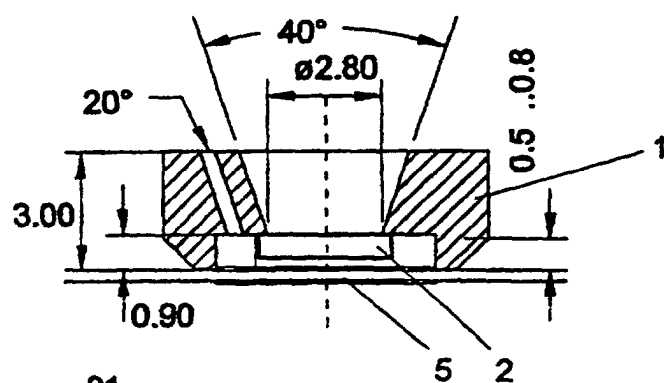


Fig. 12b

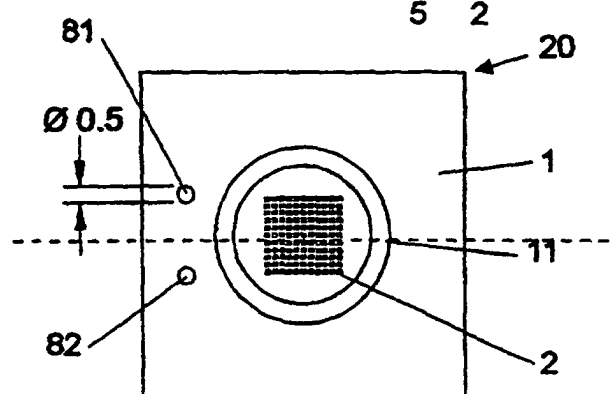


Fig. 12c

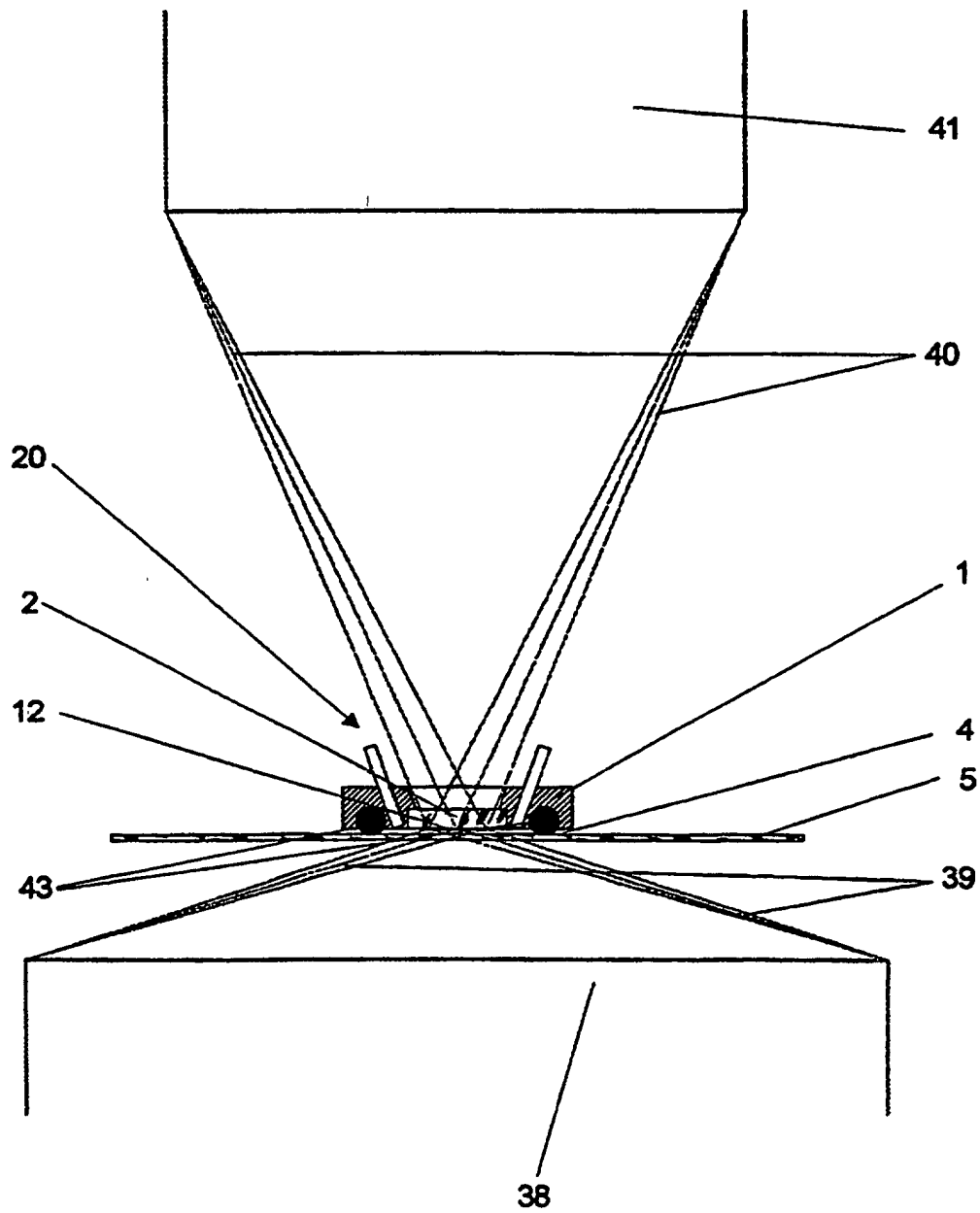


Fig. 13

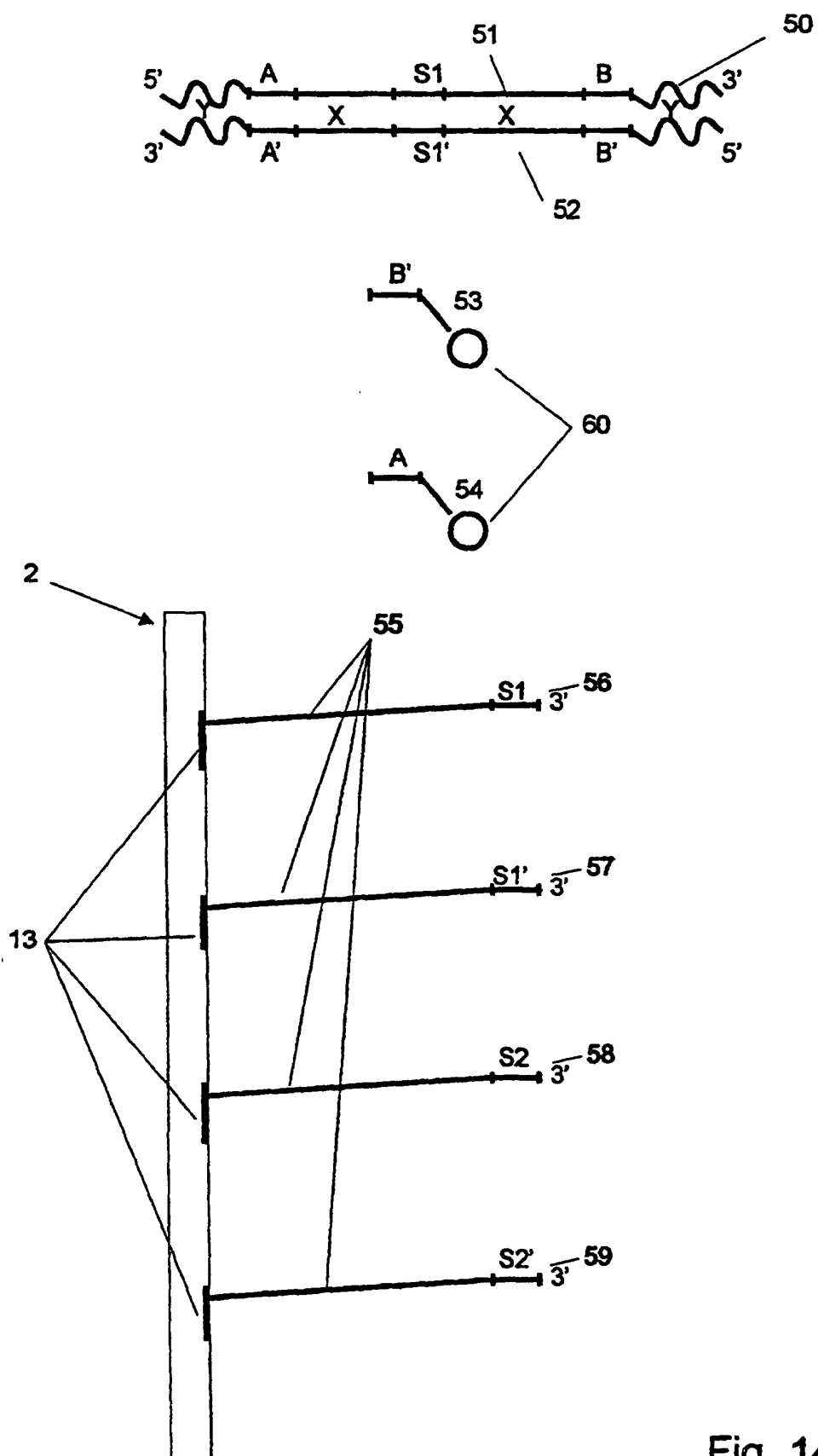


Fig. 14

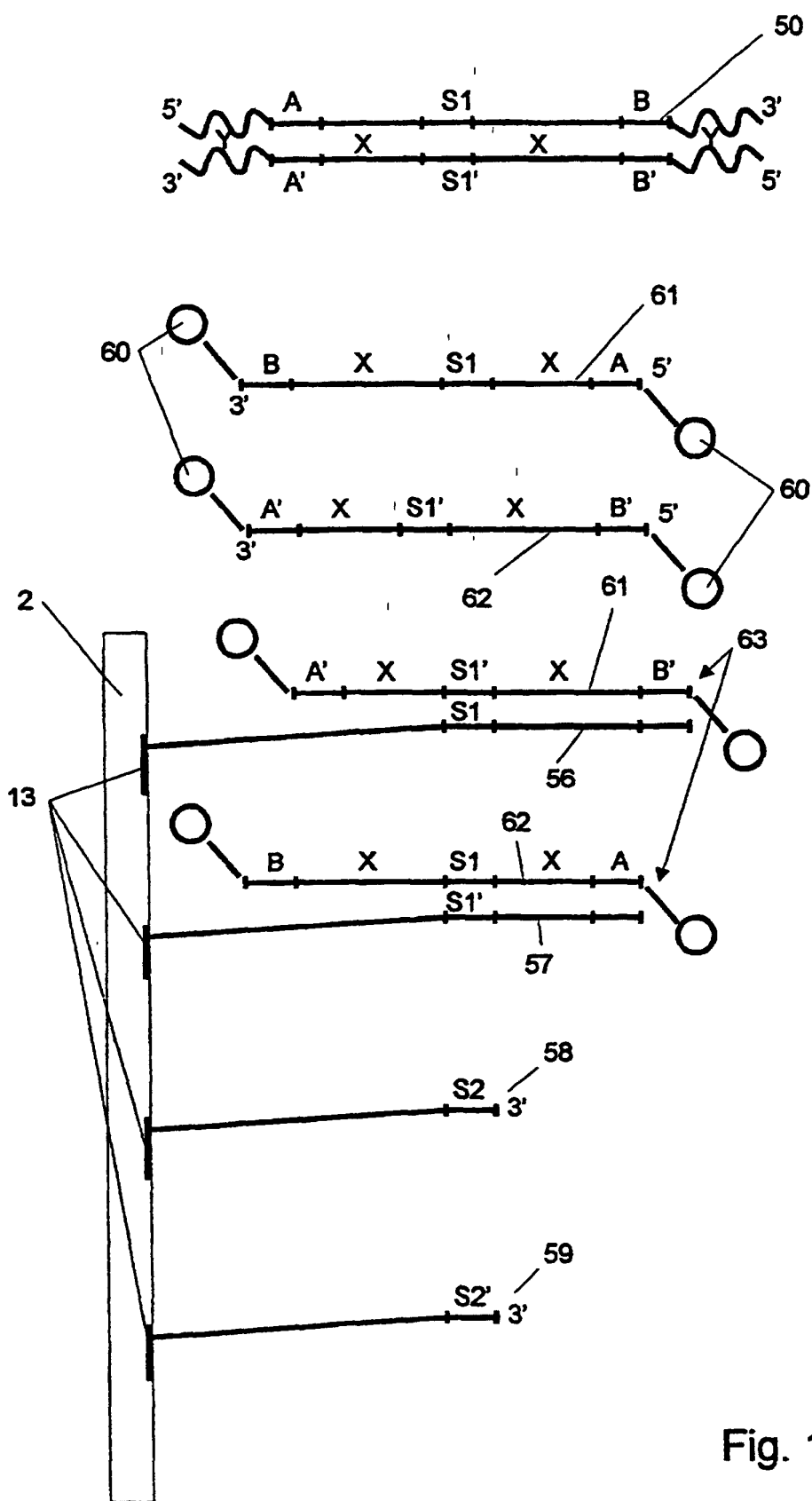


Fig. 15