

(19)



(11)

EP 1 780 290 A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
02.05.2007 Patentblatt 2007/18

(51) Int Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01) **B01L 7/00** (2006.01)
B01L 3/00 (2006.01)

(21) Anmeldenummer: **06022542.2**

(22) Anmeldetag: **27.10.2006**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR
HU IE IS IT LI LT LU LV MC NL PL PT RO SE SI
SK TR**
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL BA HR MK YU

(30) Priorität: **28.10.2005 DE 102005051850**

(71) Anmelder: **Fraunhofer-Gesellschaft zur
Förderung der angewandten Forschung e.V.
80686 München (DE)**

(72) Erfinder:
• **Drost, Stephan, Dr.-Ing.**
82061 Neuried (DE)
• **Strohhöfer, Christof, Dr.**
81369 München (DE)
• **Meixner, Leonhard**
81243 München (DE)

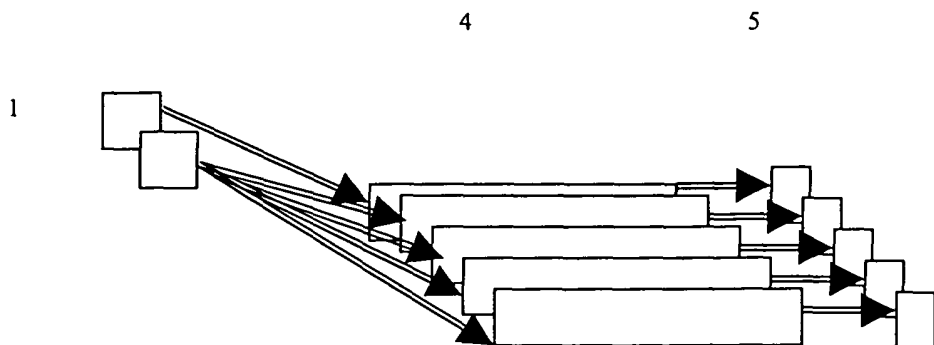
(74) Vertreter: **Fuchs Mehler Weiss & Fritzsche
Naupliastrasse 110
81545 München (DE)**

(54) **Vorrichtung zur Vervielfältigung und Detektion von Nukleinsäuren**

(57) Es wird eine Vorrichtung zur Vervielfältigung und Detektion von Targetsustanzen, insbesondere von Nukleinsäuren, aus einer Probe beschrieben. Die Vorrichtung umfasst mindestens zwei Vervielfältigungsmodu-

dule sowie mindestens zwei Detektionsmodule, die auf einem Bauteil angeordnet sind, wobei die Vervielfältigungsmodule über eine jeweils individuell anzusteuern- de Temperierungseinheit temperierbar sind.

Fig. 1



EP 1 780 290 A2

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft eine Vorrichtung bzw. ein Array zur Vervielfältigung und Detektion von Targets Substanzen, insbesondere von Nukleinsäuren aus einem biologischen Material oder einer Probe.

[0002] Die Vervielfältigung und Detektion von Nukleinsäuren spielt eine wichtige Rolle z.B. in der Forensischen Analytik, in der Krebsforschung oder in der Lebensmitteldiagnostik.

[0003] Dabei geht es darum, bestimmte Nukleinsäuren zu detektieren, aus denen sich z.B. auf eine kriminelle Täterschaft, die Disposition für eine Erbkrankheit oder die gentechnische Modifikation eines Lebensmittels schließen lässt. Herkömmliche Methoden zur Detektion bestimmter Nukleinsäuren sind hinlänglich bekannt, so z.B. Gel- oder Kapillarelektrophorese, Southern Blot, Immunoassays oder Hybridisierung mit gelabelten Nukleinsäuresonden. Hierzu werden Reaktionschips, Kartuschen, Elektrophoresekammern o. ä., sowie die entsprechenden Geräte zum Auslesen dieser Vorrichtungen verwendet.

[0004] Da in den genannten sowie vielen anderen Fällen die interessierenden Nukleinsäuremoleküle häufig nur in sehr geringer Menge und noch dazu in unmittelbarer Nachbarschaft zu einer Vielzahl anderer Nukleinsäuremoleküle vorkommen, müssen erstere erst gezielt und spezifisch vervielfältigt werden. Hierzu sind aus dem Stand der Technik sogenannte Vervielfältigungs- oder Amplifikationsverfahren wie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder SDA bekannt. Diese Verfahren werden in der Regel in sogenannten Thermocyclern durchgeführt.

[0005] Um beide Verfahren durchzuführen, ist folglich ein großer Maschinenpark erforderlich, der seinerseits ein gut ausgestattetes Labor erforderlich macht. Ein Einsatz außerhalb des Labors ist daher nicht ohne weiteres möglich. Dies erschwert z.B. die Arbeit bei epidemiologischen Untersuchungen im Feld, forensischen Untersuchungen am Tatort, Routineuntersuchungen in der Arztpraxis etc.

[0006] Überdies müssen die zu detektierenden Nukleinsäuren zunächst in die Vervielfältigungsvorrichtung gegeben werden, und anschließend die vervielfältigten Moleküle in die Detektionsvorrichtung. Jeder Transferschritt führt daher einerseits zu Material- und Zeitverlusten und birgt andererseits die Gefahr der Kontamination mit Fremd-Nukleinsäuren.

[0007] Ferner sind aus dem Stand der Technik Vorrichtungen bekannt, in denen Vervielfältigungsfunktion und Detektionsfunktion integriert sind. Diese Vorrichtungen vermeiden die oben genannten Probleme.

[0008] In einigen Fällen sind die genannten Funktionseinheiten in Form eines Arrays derart miniaturisiert, dass sie auf einem kleinen Träger Platz finden ("Lab on a Chip"). Dabei stehen die einzelnen Reaktionskammern über miniaturisierte Kanäle in Verbindung, und die Reaktionsflüssigkeiten werden mittels geeigneter Mikro-

pumpen und Ventile sowie über die Kapillarkraft von einer Kammer in die nächste transportiert (Mikrofluidik). Solche Chips oder auch Kartuschen werden dabei in spezielle angepasste Apparaturen angeordnet, welche die notwendigen Steuer- und Betriebseinheiten, z. B. Pumpen sowie Heiz- und Kühlelemente etc. aufweisen und die Reaktionen, Detektionen etc. steuern und auswerten.

[0009] In der Schrift "Flow-through polymerase chain reaction in chip thermocyclers" (Schnegaß & Köhler 2001, Rev. in Mol. Biotechnol. 82; 101) werden solche "Labs on a Chip" vorgestellt. Als Vervielfältigungsmethode wird dabei ausschließlich PCR erwähnt, bei der der Erfolg der Vervielfältigung auf die Abarbeitung von Thermocyclern angewiesen ist. Die Autoren beschreiben einen Chip, der einen mäanderförmigen Kanal aufweist, unter dem in geordneter Anordnung Heizelemente verschiedener Temperatur angeordnet sind. Wird die Reaktionsflüssigkeit mit geeigneter Geschwindigkeit durch den Kanal gepumpt, durchläuft sie die für den Ablauf der PCR erforderlichen Temperaturcyclen, und die Nukleinsäuren werden vervielfältigt.

[0010] Da der Vervielfältigungsfaktor exponentiell von der Anzahl der Thermocyclen abhängt, ist in einem solchen "Lab on a Chip" der Vervielfältigungsfaktor bereits festgelegt. Solche Chips sind daher nicht sehr variabel und folglich für verschiedene Verwendungszwecke nicht zu gebrauchen.

[0011] Allerdings sind diese aus dem Stand der Technik bekannten Vorrichtungen in der Regel für die parallele Untersuchung vieler Proben auf ein und dieselbe Nukleinsäure ausgelegt. So können z.B. in einigen Vorrichtungen 96 Lebensmittelproben verschiedenster Herkunft gleichzeitig parallel auf das Vorhandensein eines bestimmten Gens untersucht werden, z. B. auf ein Antibiotikaresistenzgen, das auf eine gentechnische Modifikation schließen lässt.

[0012] Die gleichzeitige Untersuchung einer Probe auf das Vorhandensein einer Vielzahl von Nukleinsäuren (so, wie es z.B. für die Proteomik bzw. Genomik oder die schnelle Infektionsdiagnose wünschenswert wäre) ermöglichen diese Vorrichtungen hingegen nicht. Die oben genannte Schrift schlägt daher den seriellen Durchsatz mehrerer Proben nacheinander vor. Neben dem Zeitverlust birgt dieses Vorgehen jedoch auch die Gefahr der Kontamination einer Probe mit Produkten aus dem vorherigen Durchlauf.

[0013] Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, eine Vorrichtung zur Vervielfältigung und Detektion von Nukleinsäuren aus einem biologischen Material oder einer Probe bereitzustellen, die die vorgenannten Nachteile nicht aufweist und mit der insbesondere mittels einem Probeauftrag in einem Vorgang eine Mehrzahl verschiedener Targets Substanzen, wie z. B. Nukleinsäuren, z. B. von unterschiedlichen Infektionserregern detektiert werden können. Diese Aufgabe wird mit den Merkmalen des vorliegenden Anspruchs 1 gelöst.

[0014] Demnach ist eine Vorrichtung in Form eines Arrays zur Vervielfältigung und Detektion von Targetmole-

külen aus einem biologischen Material oder einer Probe vorgesehen, die mindestens zwei Vervielfältigungsmodule sowie mindestens zwei Detektionsmodule, aufweist, wobei die Vervielfältigungsmodule jeweils über eine individuell anzusteuernde Temperierungseinheit temperiert werden, und wobei die Vervielfältigungs- und Detektionsmodule auf einem Bauteil angeordnet sind. Abgesehen von einer Abdeckung sowie gegebenenfalls vorliegenden Sondermodulen bzw. -einheiten ist das Bauteil einstückig ausgebildet.

[0015] Die erfindungsgemäße Vorrichtung oder Chip ist zweckmäßigerweise zur Aufnahme in einer Steuer- und/oder Bedienungseinheit (Basisgerät) angepasst, wobei diese Einheit, die zum Betrieb der Vorrichtung notwendigen Steuer-, insbesondere Temperier-, Pump-, und Detektionselemente aufweist. Diese Elemente können mittels eines Rechners steuerbar sein.

[0016] Eine solche Vorrichtung ermöglicht es, eine einzige Probe simultan auf mehrere Targets Substanzen, insbesondere Nukleinsäuren zu testen. Damit verbunden ist ein enormer Geschwindigkeitsgewinn gegenüber herkömmlichen Verfahren, der es ermöglicht, den Durchsatz eines Labors zu erhöhen und so intensive Screeningarbeiten, wie sie z.B. in der Epidemiologie oder der Krebsdiagnostik erforderlich sind, zu beschleunigen.

[0017] Durch die jedem Vervielfältigungsmodul zugeordnete individuell anzusteuernde Temperierungseinheit kann in jedem Vervielfältigungsmodul eine für die jeweilige Targetreaktion bzw. das jeweilige zu detektierende Targetmaterial individuell einstellbare Abfolge von Dauer, Temperatur und Anzahl der Zyklen durchgeführt werden, und so die für ein zu detektierendes Target sowie den hierfür jeweils eingesetzten Amplifikationsenzymen und Denaturierungsbedingungen in jedem einzelnen Fall zu optimieren, ohne dabei parallel ablaufende Vorgänge zu stören. Bevorzugte Targets sind Nukleinsäuren. Die Ansteuerung kann dabei in einfacher Weise über einen programmierbaren PC erfolgen. In jedem individuell anzusteuernenden Vervielfältigungsmodul kann auch eine entsprechende Multiplex-Vervielfältigung durchgeführt werden. Diese sind typischerweise auf 3 - 4 Targetsequenzen beschränkt.

[0018] Da die einzelnen Module auf einem Bauteil angeordnet sind, entfällt ein Umpipettieren der jeweiligen Probe bzw. des Vervielfältigungsprodukts von einem Modul zum nächsten. Des weiteren erhöht sich die Durchsatzgeschwindigkeit, und es wird die Kontaminierungsgefahr reduziert und der Materialverlust minimiert. Da sämtliche Steuerelemente in der Steuer- und Bedienungseinheit angeordnet sind, ist es möglich, allein durch die Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Vorrichtung als Chip, insbesondere als Mikrochip oder als Kartusche ein variables und hoch portables System bereitzustellen, das lediglich eine größere Bedieneinheit und die für den jeweiligen Verwendungszweck geeigneten Chips umfasst. Für die Durchführung der Analysen ist daher kein eigenes Labor erforderlich, so dass auch eine Ver-

wendung "im Feld", also z.B. am Ort eines Verbrechens oder bei einer epidemiologischen Studie in einem Entwicklungsland oder in einer Arztpraxis, ohne weiteres möglich ist.

5 **[0019]** In einer alternativen Ausführungsform kann die Vorrichtung zum Nachweis von Bakterien ausgelegt sein.

[0020] In einer bevorzugten Ausgestaltung der Erfindung ist vorgesehen, dass die Vorrichtung außerdem mindestens ein Modul zur Extraktion von Nukleinsäuren aufweist, das auf demselben gemeinsamen Bauteil angeordnet ist.

10 **[0021]** Auf diese Weise wird die Extraktion der Nukleinsäuren aus der Probe bzw. dem biologischen Material in die Vorrichtung integriert, was die oben genannten Vorteile noch erhöht.

15 **[0022]** Bevorzugt ist die Anzahl der Vervielfältigungs- und Detektionsmodule gleich, und die Anzahl der Extraktionsmodule ist kleiner oder gleich der Anzahl der Vervielfältigungsmodule.

20 **[0023]** Besonders bevorzugt sind sogar zwei oder mehr Module zur Extraktion von Nukleinsäuren auf dem gemeinsamen Bauteil angeordnet. Auf diese Weise kann in jedem Extraktionsmodul ein anderes Extraktionsverfahren gewählt werden, um Artefakte durch ein weniger geeignetes Verfahren auszuschließen, oder es können unterschiedliche Proben oder Materialien gleichzeitig extrahiert und einer Analyse zugeführt werden.

25 **[0024]** Es kann jedoch auch sinnvoll sein, die zu vervielfältigenden Nukleinsäuren gesondert zu extrahieren und erst dann in die Vorrichtung einzubringen. Dies ist z.B. der Fall, wenn es sich um eine sehr feste Probe handelt, für deren Extraktion mechanische Kraft erforderlich ist, oder wenn das zu untersuchende Material sehr wenig Nukleinsäuren enthält, sodass die extrahierte Nukleinsäure durch Verwendung einer großen Material- oder Probenmenge erst noch angereichert werden muss.

30 **[0025]** In einer besonders bevorzugten Ausgestaltung der Erfindung ist vorgesehen, dass das gemeinsame Bauteil, das Extraktionsmodul, das Vervielfältigungsmodul und/oder das Detektionsmodul überwiegend oder ganz aus einem Polymermaterial gefertigt sind. Geeignete Polymermaterialien sind Polyamide, Polycarbonate, PMMA, Polysulfone, Polyetherketone, Polyester, Polyethylen, PET, ein cycloolefinisches Polymer (COC) wie z. B. TOPAS, Polyacetate, Polymethane. In einer weiteren bevorzugten Ausführung kann die Detektionseinheit aus einem für eine verwendete Detektionsstrahlung besonders geeigneten zweiten Material bestehen.

35 **[0026]** Auf diese Weise entsteht eine kostengünstig herzustellende, leichte, inerte und leicht zu entsorgende Vorrichtung, die üblicherweise eine geringe Wärmeaufnahme aufweist. Letzteres trägt dazu bei, die Geschwindigkeit des Verfahrens zu erhöhen, da die während des Vervielfältigungsschritts (bei nicht isothermen Vervielfältigungsverfahren) abgearbeiteten Thermocyclen schneller durchlaufen werden können.

[0027] Ebenso kann das Bauteil ganz oder teilweise auch aus einem anorganischen Material, wie z. B. Metall, Silicium, Keramik und/oder Glas bestehen.

[0028] In einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung der Erfindung ist vorgesehen, dass die einzelnen Module Reaktionskammern aufweisen, die über Mikrokanäle mit einer Querschnittsfläche von insbesondere $< 1 \text{ mm}^2$ bzw. mit Querschnitten von ca. $0,005$ bzw. $0,007 \text{ mm}^2$ bis ca. 1 mm^2 bzw. $0,8 \text{ mm}^2$ in Verbindung stehen, über die das bio-logische Material, die Probe, die extrahierten Nukleinsäuren oder die Vervielfältigungsprodukte weitertransportiert werden.

Die Kammern bestehen zum Beispiel aus Vertiefungen in dem gemeinsamen Bauteil.

Die Kanäle können einen beliebigen Querschnitt aufweisen und beispielsweise viereckig, kreisförmig oder U-förmig ausgestaltet sein.

[0029] Besonders bevorzugt weisen diese Kanäle einen Durchmesser von $0,1 - 1 \text{ mm}$, insbesondere einen Durchmesser von $0,2 - 0,8$ bzw. $0,4 - 0,6 \text{ mm}$ auf. Bei einem U-förmigen bzw. eckigen Querschnitt beziehen sich diese Werte auf den durchschnittlichen Durchmesser der in etwa dem Durchmesser eines gleichgroßen kreisförmigen Querschnittes entspricht.

[0030] Solche Strukturen lassen sich je nach verwendetem Material durch Spritzguss, Mikrospritzguss, Abformen, Prägen, Ätzen, Photolithografie, Mikrosandstrahlen, Lasern oder Laminat von Folien mit und ohne Ausnehmungen herstellen.

[0031] Die Flüssigkeit wird dabei durch geeignete Pumpen und Ventile sowie über Kapillarkräfte von einem Modul zum nächsten bzw. von einer Reaktionskammer in die nächste transportiert.

[0032] Ebenso kann bevorzugt vorgesehen sein, dass die Benetzungseigenschaften der Kanäle gezielt beeinflusst werden. So kann z.B. die Oberfläche am Ausgang einer Kammer hydrophob ausgebildet sein, um ein Auslaufen von Reaktionsflüssigkeit während einer Reaktion zu verhindern.

[0033] Bevorzugt ist vorgesehen, dass die Kanäle nach oben hin geschlossen ausgebildet sind. Dieses Merkmal ist erforderlich, um eine übermäßige Verdunstung des Reaktionsflüssigkeit zu verhindern, birgt aber die Gefahr der Blasenbildung, die zu einer Unterbrechung des Flusses führen würde.

[0034] Aus diesem Grunde ist besonders bevorzugt vorgesehen, dass die Kanäle nach oben hin offen ausgestaltet sind und mit einer flüssigkeitsundurchlässigen, aber gasdurchlässigen Struktur abgedeckt sind. Hierbei kann es sich z.B. um eine Folie handeln, die beispielsweise aus PTFE gefertigt ist.

[0035] In einer weiteren, bevorzugten Ausgestaltung weist die Steuereinheit und/oder die erfindungsgemäße Vorrichtung mindestens zwei Temperatursensoren auf. Diese sind z.B. den Vervielfältigungsmodulen zugeordnet und ermöglichen die Kontrolle und Steuerung der Temperierungseinheiten.

[0036] In einer ebenfalls bevorzugten Ausgestaltung

ist das gemeinsame Bauteil in die Steuer-/Bedienereinheit (Basisgerät) einsetzbar, in der auch die Temperierungseinheiten und/oder Temperatursensoren angeordnet sind.

[0037] In ersterem Falle ist es erforderlich, dass eine gute thermisch leitende Verbindung zwischen der Temperierungseinheit und dem gemeinsamen Bauteil, insbesondere dem Vervielfältigungsmodul besteht, damit die Thermocyclen schnell abgearbeitet werden können, ohne dass erst umgebendes Material langwierig erhitzt werden muss. Das Basisgerät kann überdies z.B. eine oder mehrere Ultraschallquellen, Pumpen für die Mikrofluidik, Ventile oder optische Detektoren wie Kameras oder Photomultiplier und Photodioden als Einzeldetektor oder in Arrayform aufweisen.

[0038] Diese Ausgestaltung ist besonders vorteilhaft, weil sie die Verwendung von kostengünstig hergestellten Einweg-Bauteilen, insbesondere aus Polymer, erlaubt, da die erwähnten Funktionalitäten wie Temperierungseinheiten, Temperatursensoren, Ultraschall-Erzeugungseinheiten oder Antriebe für Rührer, aber auch Pumpen für die Mikrofluidik oder Ventile, im Basisgerät verbleiben.

[0039] Besonders bevorzugt ist vorgesehen, dass die Temperierungseinheit des Vervielfältigungsmoduls ein Peltier-Element umfasst. Peltierelemente sind leicht anzusteuern und ermöglichen eine schnelle und genaue Erzeugung einer gewünschten Temperatur. Überdies sind sie imstande, sowohl Wärme als auch Kälte zu erzeugen. Durch die Anordnung von Peltierelementen direkt auf einer der Flüssigkeit abgewandten Oberfläche der erfindungsgemäßen Vorrichtungen, insbesondere auf den Oberflächen der Vervielfältigungseinheiten, kann eine extrem schnelle Temperierung, d. h. Heizung und/oder Kühlung erreicht werden. Auf diese Weise wird eine weitere Beschleunigung der jeweiligen Untersuchung ermöglicht. In einer zweckmäßigen Ausgestaltung sind die Peltierelemente nicht in der Vorrichtung bzw. Polymerkartusche integriert.

[0040] In alternativen Ausführungsformen ist jedoch auch die Verwendung von Luft-Anblaseeinrichtungen, Mikrowellen, IR-Strahlern, Heizwiderständen, Heiz- bzw. Kühlflüssigkeit oder leitfähigen und resistiven Polymeren vorgesehen. Letztere können direkt in das Material des Bauteils eingearbeitet sein. Außerdem sind sämtliche Kombinationen der genannten Temperierungseinheiten denkbar.

[0041] In einer besonders bevorzugten Ausgestaltung der Erfindung ist vorgesehen, dass in dem Vervielfältigungsmodul eine Nukleinsäure-Amplifikationsreaktion durchführbar ist. Hierbei kann es sich z.B. um PCR (Polymerase-Kettenreaktion), rtPCR (reverse Transkriptions-PCR), real-time PCR (Echtzeit-PCR), NASBA (Nukleinsäure-Sequenzbasierte Amplifikation), LCR (Ligase-Kettenreaktion), RCA (Rolling Circle Amplifikation), oder SDA (Strand-Displacement-Amplifikation) handeln.

[0042] Die genannten Verfahren lassen sich im Groben in isotherme und nicht-isotherme Amplifikationsver-

fahren unterteilen. Dabei ist zu beachten, dass bei isothermen Amplifikationsverfahren keine Thermocylen abgearbeitet werden. Gleichwohl ist die erfindungsgemäße Vorrichtung auch bei diesen Verfahren mit den genannten Vorteilen verwendbar.

[0043] In jedem Fall ist es erforderlich, dass während des Vervielfältigungsschritts den zu vervielfältigenden Nukleinsäuren Primer, Mononukleotide und eine oder mehrere Polymerase hinzugefügt werden. Bevorzugt ist daher vorgesehen, dass die erfindungsgemäße Vorrichtung eine Einrichtung zur Abgabe von Primern, Mononukleotiden und/oder einer oder mehrerer Polymerasen aufweist. Diese kann ebenfalls sowohl auf dem gemeinsamen Bauteil als auch auf dem Basisgerät angeordnet sein. Die Erfindung betrifft daher auch einen Reaktionskit, der diese Substanzen zusammen mit erfindungsgemäßer Vorrichtung enthält.

[0044] Weiterhin ist bevorzugt vorgesehen, dass es sich bei den Temperatursensoren um Thermoelemente, Thermowiderstände, Silizium-Sensoren, PTC- bzw. NTC-Elemente oder Platin-Sensoren (PT 100, PT 1000) handelt.

[0045] Ebenso kann es sich bei den Temperatursensoren um Elemente aus Chromogenen Polymeren handeln, deren Farbe sich in Abhängigkeit von der Temperatur ändert.

[0046] So kann z.B. der Boden einer Kammer aus Chromogenem Polymer bestehen, während deren Deckel transparent ausgebildet ist. Die Temperaturmessung erfolgt dann mit einem Photodetektor durch den Deckel der Kammer. Ein Photodetektor kann eine Photodiode oder eine Kamera umfassen. Derartige Messungen sind auch als Reflektionsmessung oder als Transmissionsmessung durchführbar.

[0047] Ebenso kann es sich bei den Temperatursensoren um partikuläre Elemente handeln, die der Reaktionsflüssigkeit beigegeben werden und die ihre optischen Eigenschaften, so z.B. ihre Transmission, Farbe, Fluoreszenz oder Phosphoreszenz in Abhängigkeit von der Temperatur ändern.

[0048] Vorteil all dieser Verfahren ist, dass die genannten Sensoren in unmittelbarer Nähe zur Probe liegen und nur eine geringe eigene Wärmeaufnahme haben, so dass sehr genaue Messungen möglich sind. Außerdem vermindert die Tatsache, dass all diese Messungen berührungslos sind, die Gefahr der Kontamination.

[0049] In einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung der Erfindung ist vorgesehen, dass die Extraktion in dem Extraktionsmodul auf chemischem Wege erfolgt. Dies kann z.B. durch enzymatischen Verdau und/oder durch übliche Fällungsverfahren geschehen.

[0050] Ebenso kann vorgesehen sein, dass die Extraktion in dem Extraktionsmodul mittels Ultraschall erfolgt. Bei Verwendung einer geeigneten Frequenz und Leistung werden Zellwände und Membranen aufgeschlossen, so dass die Nukleinsäuren aus dem Zellinnern austreten können.

[0051] Ultraschall kann ebenso für das Mischen der

Reaktionsflüssigkeit in einem der Module verwendet werden. Allerdings kommen hierfür andere Frequenzen und Leistungen in Betracht.

[0052] Ebenso kann aber die Extraktion in dem Extraktionsmodul und/oder das Mischen in einem der Module durch Rühren erfolgen. Entscheidend sind hier die auftretenden Scherkräfte, die durch Wahl einer geeigneten Drehzahl bzw. eines geeigneten Rührers entsprechend eingestellt werden können.

[0053] Eine Variante dieser Ausgestaltung ist die Extraktion oder das Vermischen mittels magnetischer Teilchen, die durch ein von außen angelegtes rotierendes Magnetfeld in Bewegung versetzt werden. Hier kann es sich z.B. um die bekannten Rührfische handeln, aber auch um magnetische Mikropartikel. Besonders bevorzugt ist dabei, wie schon erwähnt, vorgesehen, dass der magnetische Antrieb im Basisgerät angeordnet ist.

[0054] Es versteht sich von selbst, dass die genannten Verfahren zur Extraktion und/oder zum Mischen beliebig miteinander kombiniert werden können, um die Effizienz der Extraktion und/oder des Mischens zu verbessern.

[0055] Bevorzugt ist bei dieser Ausgestaltung insbesondere vorgesehen, dass der Auslaßkanal des Extraktionsmoduls einen Querschnitt hat, der kleiner ist als der der magnetischen Teilchen, bzw. das magnetische Teilchen verwendet werden, deren Querschnitt größer ist als der des Auslaßkanals. Auf diese Weise wird verhindert, dass die die zum Rühren bzw. Extrahieren verwendeten Teilchen weitertransportiert werden.

[0056] In einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung der Erfindung ist vorgesehen, dass die Kammern der Extraktions- und/oder der Vervielfältigungsmodul von Ausnehmungen im Material des Bauteils umgeben sind.

[0057] Diese Ausnehmungen können insbesondere in Form von nach oben geschlossenen Kanälen ausgebildet sein und dienen einerseits dazu, die Kammern thermisch zu isolieren und so die Abarbeitung der Thermocylen zu beschleunigen. Andererseits werden durch die thermische Isolierung Spannungen im Material aufgrund unterschiedlicher Temperaturen reduziert. Schließlich können diese Ausnehmungen auch der akustischen Isolierung der Kammern dienen. Dies erhöht z.B. die Effizienz bei der Verwendung von Ultraschall zum Mischen bzw. zum Extrahieren der Nukleinsäuren.

[0058] Prinzipiell können die Ausnehmungen z. B. mittels einer Abdeckung zu Kanälen geschlossen sein. Sie sind üblicherweise mit Luft, Gas oder einer Flüssigkeit gefüllt oder weisen ein Vakuum auf. Es kann aber auch vorgesehen sein, dass die Temperierung der Kammern über diese Kanäle erfolgt. In diesem Fall werden z.B. kalte bzw. warme Flüssigkeiten in die Kanäle geleitet. In einer Ausführungsform ist das Basisgerät zum Bereitstellen der kalten und der warmen Flüssigkeit ausgelegt. Mit Vorteil ist somit ein schneller Temperaturwechsel der Vervielfältigungsmodul erzielbar.

[0059] In einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist vorgesehen, dass das Detektionsmodul in das Vervielfältigungsmodul

integriert ist. Auf diese Weise wird es ermöglicht, den Fortgang der Vervielfältigungsreaktion in Echtzeit zu verfolgen. Die entsprechenden Verfahren sind als online-PCR oder Real-Time-PCR bekannt.

[0060] Die Detektion der Vervielfältigungsprodukte erfolgt dabei z.B. mittels FRET (Fluoreszenz-Resonanzenergie-Transfer) oder durch Quenchen von Fluoreszenzmolekülen. Prinzipiell kann die Detektion auch durch Messung eines elektrischen Stroms oder Spannung erfolgen, die durch eine geeignete elektrochemische Reaktion erzeugt wird.

[0061] In einer anderen erfindungsgemäßen Ausgestaltung ist vorgesehen, dass die Detektion der vervielfältigten Nukleinsäuren in dem Detektionsmodul mittels Elektrophorese, Southern Blot, Immunoassay oder Hybridisierung mit gelabelten Nukleinsäuresonden erfolgt.

[0062] In einer alternativen Ausgestaltung sind zur Detektion der vervielfältigten Nukleinsäuren elektrochemische oder massensensitive Detektoren wie ein Schwingquarz oder ein Oberflächenwellenbauelement vorgesehen, die an ihrer Oberfläche eine Fänger-Nukleinsäure aufweisen.

[0063] Bei dem biologischen Material handelt es sich bevorzugt um Material ausgewählt aus der Gruppe enthaltend Blut, Serum, Liquor, Urin, Sputum, Stuhl, Pflanzenmaterial und Gewebeproben.

[0064] Anwendungsgebiete sind hier z.B. die Forensik, die medizinische Diagnostik oder die Erbgutanalyse.

[0065] Bei der Probe handelt es sich hingegen bevorzugt um eine Probe aus der Gruppe enthaltend Wasser, flüssige Lebensmittel, feste Lebensmittel, Babynahrung, Bodenproben, und Luftproben. Anwendungsgebiete sind hier z.B. die Umwelt-, die Wasser- oder die Lebensmittelanalytik, insbesondere die Analytik betreffend gentechnisch veränderte Lebensmittel.

[0066] Ferner ist ein Verfahren zur Extraktion, Vervielfältigung und Detektion von Nukleinsäuren aus einem biologischen Material oder einer Probe vorgesehen, bei dem eine Vorrichtung gemäß einem der vorherigen Ansprüche verwendet wird.

[0067] Die Erfindung wird nachfolgend mit Bezug auf die beiliegenden Figuren beispielhaft erläutert.

[0068] Fig. 1 zeigt eine schematische Darstellung der erfindungsgemäßen Vorrichtung mit Auftrags-, Vervielfältigungs- und Detektionseinheiten.

[0069] Fig. 2 zeigt eine schematische Darstellung eines erfindungsgemäßen Analysechips mit Extraktions- und Vervielfältigungseinheit.

[0070] Fig. 3 zeigt einen Querschnitt durch eine solche erfindungsgemäße Vorrichtung.

[0071] Fig. 4 zeigt eine beispielhafte Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung.

[0072] Wie in Fig. 1 dargestellt, weist die erfindungsgemäße Vorrichtung ein oder auch mehrere Einlässe bzw. Auftragseinrichtungen (1) für verschiedene aus einer Probe gewonnenen Flüssigkeiten mit bereits extrahierten nachzuweisenden Targets, insbesondere Nukleinsäuren auf. Diese werden dann auf 4 verschiedene Nu-

kleinvervielfältigungseinheiten (4) geleitet, in denen diese bei unterschiedlichen Bedingungen bezüglich Enzymen, Temperatur und Zykluslänge vervielfältigt werden und anschließend im Detektor (5) detektiert werden. In diesem Falle wird die Nukleinsäureextraktion außerhalb der erfindungsgemäßen Vorrichtung durchgeführt.

[0073] Gemäß einer erfindungsgemäß bevorzugten Ausführungsform enthält das Chip-Polymerbauteil zusätzlich eine Aufschlusseinrichtung (2), insbesondere Nukleinsäureextraktionseinheit. Im gezeigten Beispiel von Fig. 2 wird ausgehend von einem Probenauftrag (1) die Probe zu jeweils 2 verschiedenen Extraktionseinheiten (2) geleitet und dort verschiedenen Extraktionsverfahren unterzogen. Das Extraktionsverfahren selbst kann mittels Rühren und/oder Ultraschall oder auch durch Beaufschlagung mittels plötzlicher Druckentlastung durchgeführt werden. Auch chemisch ausgelöste Verfahren, z. B. durch pH-Änderung sind möglich. Mittels der erfindungsgemäßen Vorrichtung können gleichzeitig winzige Mengen einer einzigen Probe völlig verschiedenen Bedingungen in den Extraktionseinheiten (2) behandelt und die so erhaltenen Extrakte anschließend auf verschiedene Vervielfältigungseinheiten (4) geleitet werden, wo sie in jeder Einheit individuell und gezielt bei unterschiedlicher Temperatur, Zyklusdauer und Enzymen vervielfältigt werden.

[0074] Wie in Fig. 3 dargestellt umfasst die erfindungsgemäße Vorrichtung ein Polymergrundbauteil (9), welches ein oder auch mehrstöckig ausgebildet ist. In dem Polymergrundbauteil (9) sind Mikrokanäle (8) angeordnet, in denen die jeweiligen Extraktions- bzw. Vervielfältigungsreaktionen durchgeführt werden. Die Vorrichtung wird mittels einer Abdeckung (11) verschlossen. Auf der gegenüberliegenden Seite des Kanals (8) ist ein Temperatursensor (7) angeordnet, dem auf der gegenüberliegenden Seite eine Temperiereinheit (6), insbesondere Peltier-element gegenüberliegt. In einer weiteren Ausführung kann anstatt des Peltierelementes (6) oder zusätzlich zu diesem ein Ultraschallkopf (nicht gezeigt) oder auch ein anderes Bauteil wie beispielsweise ein Rührer angeordnet sein, der das im Reaktionsraum bzw. Kanal (8) vorliegende Reaktionsmedium mischt und/oder aufschließt. Neben dem Reaktionsraum (8) kann ein Isolierraum (10) angeordnet sein, der eine seitliche Ausbreitung der Temperatur zu weiteren (nicht dargestellten) Reaktionseinheiten isoliert. Prinzipiell kann der Raum auch als Kanal ausgebildet sein und durch Beaufschlagen mittels eines Gases oder Fluids der Temperierung dienen. Alternativ kann die Abdeckung (11) als Flüssigkeitsdichte und gasdurchlässige Folie ausgebildet sein.

[0075] Eine weitere beispielhafte Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung, die zur Vervielfältigung und Detektion von Targets Substanzen dient ist in Fig. 4 dargestellt. Die Vorrichtung umfasst das Polymergrundbauteil (9) und die Abdeckung (11). Das Polymergrundbauteil (9) weist zwei Einlässe (1), drei weitere Einlässe (3), drei Vervielfältigungseinheiten bzw. -module (4),

zwei davon getrennte Detektionsmodule (5) und drei Auslässe (14) auf. Die Einlässe (1) und die weiteren Einlässe (3) sind mit den drei Vervielfältigungsmodulen (4) mittels Mikrokanälen (8) verbunden. Ebenso sind die drei Vervielfältigungsmodule (4) mit den drei Auslässen (14) mittels Mikrokanälen (8) verbunden. Dabei sind zwei der drei Vervielfältigungsmodule (4) über jeweils ein Detektionsmodul (5) mit zwei der drei Auslässe (14) gekoppelt. Isolerräume (10), die als Ausnehmungen ausgebildet sind, sind um eines der drei Vervielfältigungsmodule (4) angeordnet. Ein drittes der drei Vervielfältigungsmodule (4) umfasst bereits das dazugehörige Detektionsmodul (5). Jedem der drei Vervielfältigungsmodule (4) ist eine Temperierungseinheit (6) zugeordnet, die jeweils ein Peltier-Element umfasst. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist ausschließlich eine Temperierungseinheit (6) eingezeichnet. Um die Temperaturzyklen steuern zu können, ist jedem der drei Vervielfältigungsmodule (4) ebenfalls ein Temperatursensor zugeordnet. Eine nicht eingezeichnete Betriebseinheit umfasst die Temperatursensoren und die Temperierungseinheiten (6). Beide werden in einer Betriebsphase auf das Polymergrundbauteil (9) und die Abdeckung (11) angeordnet, insbesondere aufgedrückt.

[0076] Die Abdeckung (11) ist zur besseren Veranschaulichung getrennt von dem Polymergrundbauteil (9) eingezeichnet. Sie wird bei der Herstellung der Vorrichtung auf dem Polymergrundbauteil (9) fest und dauerhaft angeordnet. Die Abdeckung (11) enthält zumindest teilweise ein Polymermaterial, das bei der Wellenlänge des verwendeten optischen Detektionsverfahrens durchsichtig ist. Wird beispielsweise als Detektionsverfahren ein Fluoreszenzverfahren eingesetzt, ist die Abdeckung bei der Anregungswellenlänge und bei der Wellenlänge der aus den Detektionsmodulen (5) emittierten Fluoreszenzstrahlung durchlässig. Das Polymergrundbauteil (9) umfasst ebenfalls ein Polymermaterial.

[0077] Die aus einer Probe gewonnene Flüssigkeit mit extrahierten Targets wird über die Einlässe (1) dem Polymergrundbauteil (9) zugeführt. An den weiteren Einlässen (3) werden die für die Vervielfältigung nötigen Substanzen dem Polymergrundbauteil (9) zugeleitet. Über Mikrokanäle (8) und durch Anlegen eines Druckunterschiedes zwischen den Einlässen (1) und den weiteren Einlässen (3) sowie den Auslässen (14) werden die Flüssigkeiten mit den Targets sowie die für die Vervielfältigung eingesetzten Substanzen den drei Vervielfältigungsmodulen (4) zugeführt. Die zu vervielfältigende Nukleinsäure wird mit Hilfe von Temperaturzyklen, die von den drei Temperierungseinheiten (6) erzeugt werden, multipliziert. Bei zwei der drei Vervielfältigungsmodulen (4) wird die erzeugte Nukleinsäure zwei Detektionsmodulen (5) zugeleitet und dort mittels Fluoreszenzverfahren erfasst. Bei dem dritten der Vervielfältigungsmodulen (4) erfolgt die Detektion bereits in der kombinierten Einheit, umfassend das Vervielfältigungsmodul (4) und das Detektionsmodul (5). Die Abdeckung (11) dient der Führung der Flüssigkeiten und verhindert ein Ver-

dunsten der Flüssigkeiten. Weiter verhindert sie ein Eindringen von Partikeln und anderen störenden Substanzen während eines Transports in die Ausnehmungen des Polymergrundbauteils (9). Die Abdeckung (11) ist so ausgebildet, dass sie an den Einlässen (1), den weiteren Einlässen (3) sowie den Auslässen (14) einfach geöffnet werden kann. Das Öffnen kann beispielsweise mittels Durchstechen der Abdeckung (11) erfolgen.

[0078] Somit können vorteilhafterweise aus einer Probe mehrere Nukleinsäuren gleichzeitig und parallel vervielfältigt und nachgewiesen werden. Vorteilhafterweise können die Temperaturzyklen für die Vervielfältigung in den drei Vervielfältigungsmodulen (4) unterschiedlich sein, da jedem Vervielfältigungsmodul (4) eine eigene Temperierungseinheit (6) zugeordnet ist.

[0079] In einer alternativen, nicht gezeigten Ausführung sind Extraktionsmodule zwischen den Einlässen 1 und den Vervielfältigungsmodulen (4) geschaltet.

[0080] In einer weiteren alternativen Ausführung umfassen die Detektionsmodule (5) elektrochemische Detektoren. Die elektrochemischen Detektoren weisen ein Array von Elektroden auf.

25 Patentansprüche

1. Vorrichtung zur Vervielfältigung und Detektion von Targetsubstanzen, insbesondere von Nukleinsäuren, aus einer Probe, umfassend mindestens zwei Vervielfältigungsmodulen sowie mindestens zwei Detektionsmodulen, wobei die Vervielfältigungs- und Detektionsmodule auf einem Bauteil angeordnet sind, und die Vervielfältigungsmodulen über eine jeweils individuell anzusteuernde Temperierungseinheit temperierbar sind.
2. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** sie mindestens ein Modul zur Extraktion von Nukleinsäuren enthält, das auf dem Bauteil angeordnet ist.
3. Vorrichtung gemäß einem der vorherigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Bauteil, das Extraktionsmodul, das Vervielfältigungsmodul und/oder das Detektionsmodul aus einem Polymermaterial bestehen.
4. Vorrichtung gemäß einem der vorherigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die einzelnen Module über Mikrokanäle mit einer Querschnittsfläche kleiner gleich 1 mm² in Verbindung stehen, über die das biologische Material, die Probe, die extrahierten Nukleinsäuren oder die Vervielfältigungsprodukte weitertransportiert werden.
5. Vorrichtung gemäß Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Mikrokanäle unterschiedliche Benetzungseigenschaften aufweisen.

6. Vorrichtung gemäß Anspruch 4 oder 5, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Kanäle mittels einer Abdeckung verschlossen sind, die eine flüssigkeitsundurchlässige, aber gasdurchlässige Struktur aufweist. 5
7. Vorrichtung gemäß einem der vorherigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Vorrichtung außerdem mindestens zwei Temperatursensoren aufweist. 10
8. Vorrichtung gemäß einem der vorherigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** das gemeinsame Bauteil zur Aufnahme in eine Betriebseinheit angepasst ist, in dem die Temperierungseinheiten und/oder Temperatursensoren angeordnet sind. 15
9. Vorrichtung gemäß einem der vorherigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Temperierungseinheit ein Peltier-Element aufweist. 20
10. Vorrichtung gemäß einem der vorherigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Temperatursensoren Thermoelemente, Platin-Sensoren, Thermowiderstände, Silizium-Sensoren oder PTC- bzw. NTC-Elemente und/oder Elemente aus chromogenen Polymeren, deren Farbe sich in Abhängigkeit von der Temperatur ändert, sind. 25
11. Vorrichtung gemäß einem der vorherigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Kammern der Extraktions- und/oder der Vervielfältigungsmodule von Ausnehmungen im Material des Bauteils umgeben sind. 30
35
12. Vorrichtung gemäß einem der vorherigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** eines der mindestens zwei Detektionsmodule in eines der mindestens zwei Vervielfältigungsmodule integriert ist. 40
13. Vorrichtung gemäß einem der vorherigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** eines der mindestens zwei Detektionsmodule einem der mindestens zwei Vervielfältigungsmodule nachgeschaltet ist. 45
14. Kit of Parts umfassend eine Vorrichtung nach einem der vorherigen Ansprüche zusammen mit Amplifikationsenzymen, Trenngelen, Ultrafiltrationsmembranen und/oder Markern. 50
15. Verwendung einer Vorrichtung gemäß einem der vorherigen Ansprüche zur Extraktion, Vervielfältigung und Detektion von Targets Substanzen, insbesondere von Nukleinsäuren, aus einem biologischen Material oder einer Probe. 55

Fig. 1

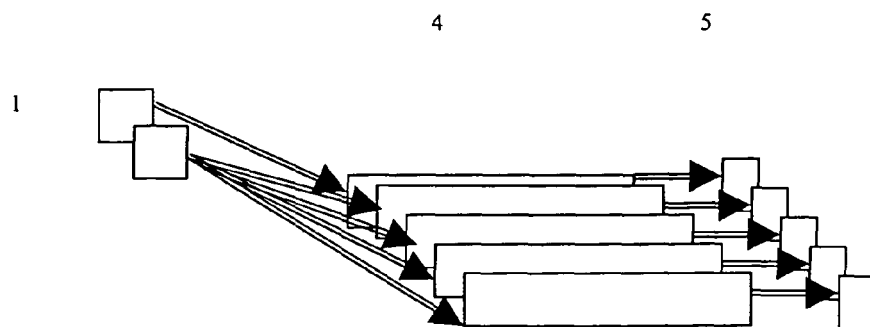


Fig. 2

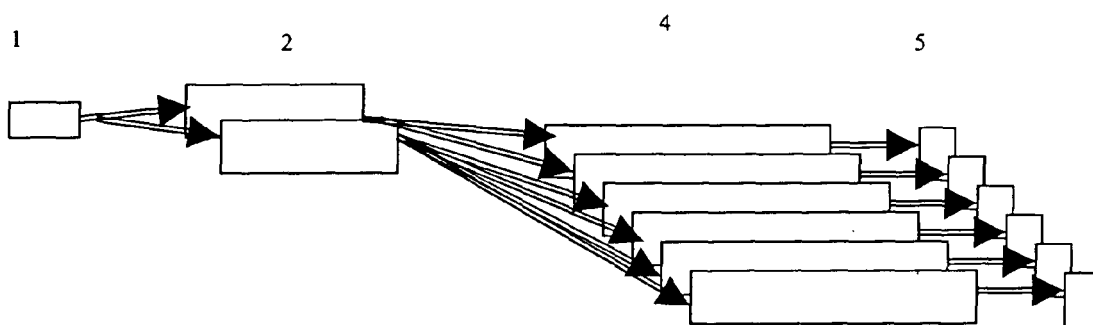


Fig. 3

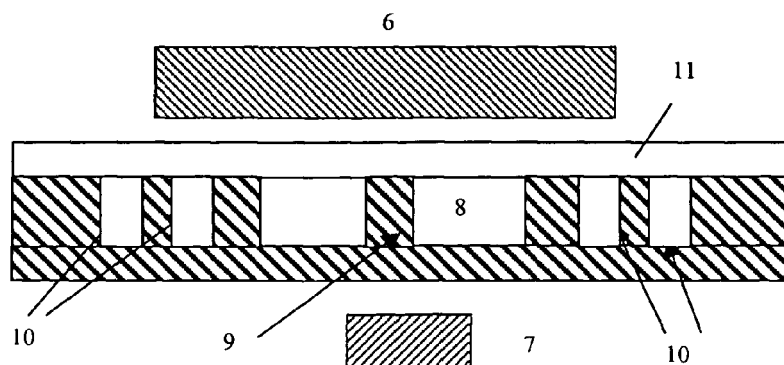
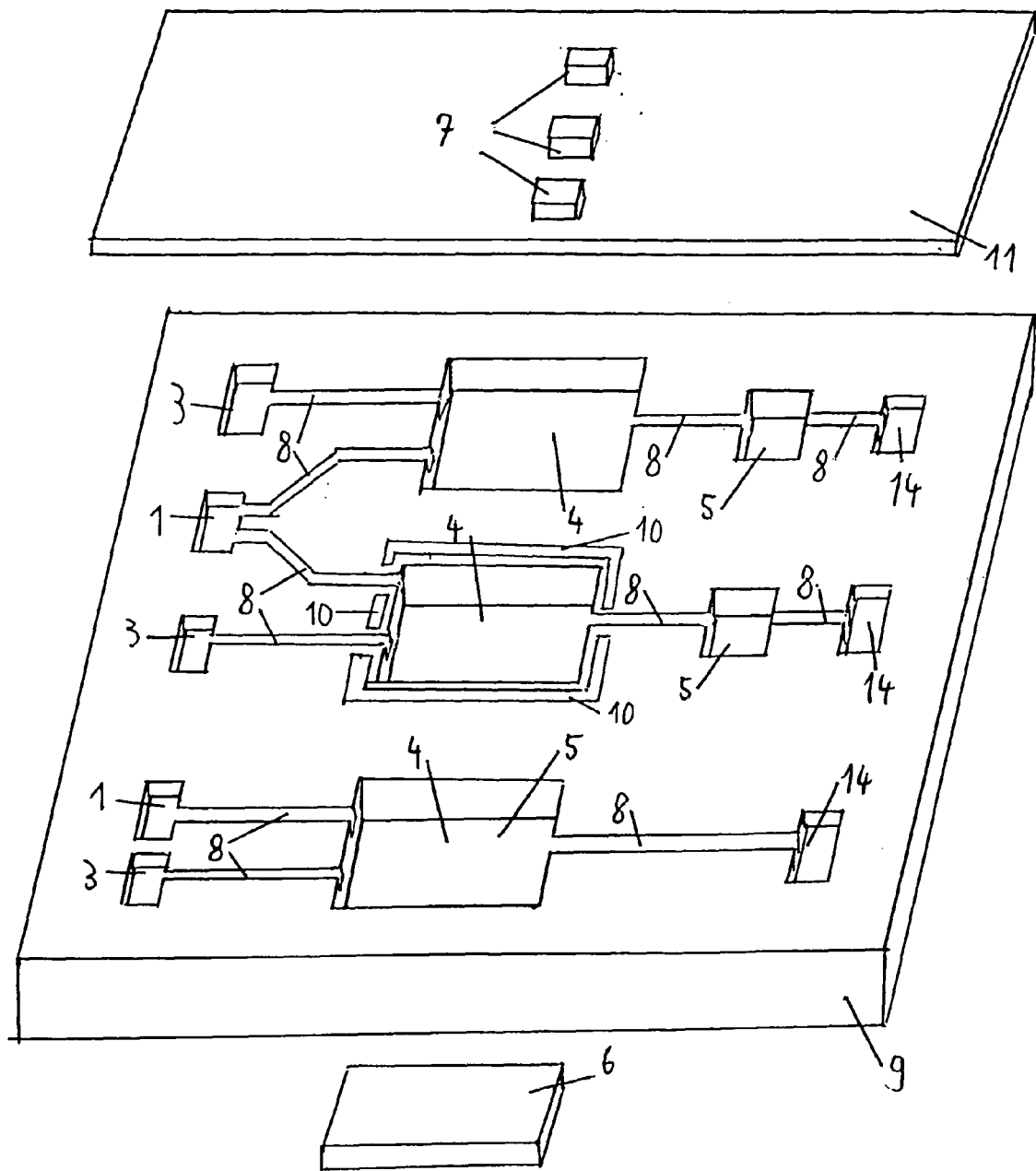


Fig. 4



IN DER BESCHREIBUNG AUFGEFÜHRTE DOKUMENTE

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde ausschließlich zur Information des Lesers aufgenommen und ist nicht Bestandteil des europäischen Patentdokumentes. Sie wurde mit größter Sorgfalt zusammengestellt; das EPA übernimmt jedoch keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

In der Beschreibung aufgeführte Nicht-Patentliteratur

- **SCHNEGAß ; KÖHLER.** Flow-through polymerase chain reaction in chip thermocyclers. *Rev. in Mol. Biotechnol.*, 2001, vol. 82, 101 **[0009]**