



(11)

**EP 2 228 132 A1**

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:  
**15.09.2010 Patentblatt 2010/37**

(51) Int Cl.:  
**B01L 7/00 (2006.01)**

(21) Anmeldenummer: **09154744.8**

(22) Anmeldetag: **10.03.2009**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR  
HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL  
PT RO SE SI SK TR**

Benannte Erstreckungsstaaten:

**AL BA RS**

(71) Anmelder: **Qiagen GmbH  
40724 Hilden (DE)**

(72) Erfinder:

- Rothmann, Dr. Thomas  
40764, Langenfeld (DE)
- Himmelreich, Dr. Ralf  
40764, Langenfeld (DE)

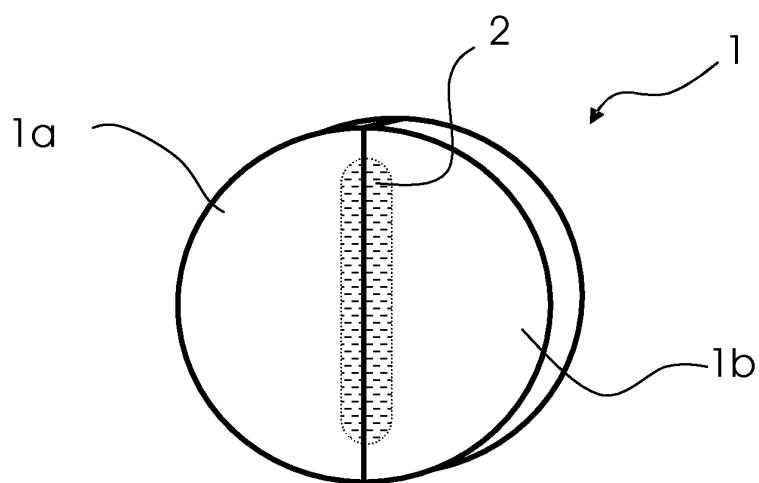
(74) Vertreter: **Gille Hrabal Struck Neidlein Prop Roos  
Patentanwälte  
Brucknerstrasse 20  
40593 Düsseldorf (DE)**

### (54) Isotherme PCR-Vorrichtung

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Durchführung einer Polymerase-Kettenreaktion, bei dem eine Reaktionsflüssigkeit zyklisch auf Denaturierungstemperatur, Annealingstemperatur und Elongationstemperatur gebracht wird, **dadurch gekennzeichnet, dass** ein Teil der Reaktionsflüssigkeit auf Denaturierungstemperatur gebracht wird, ein anderer Teil der Reaktionsflüssigkeit auf Annealingstemperatur gebracht wird und die beiden

Teile der Reaktionsflüssigkeiten zwecks Temperaturveränderung gemischt werden.

Die Erfindung betrifft ferner eine Kammer zur Durchführung des Verfahrens, die einen ersten und zweiten Bereich umfasst, wobei der erste Bereich mit einem Heizmittel der Kammer erwärmt und der zweite Bereich mit einem Kühlmittel der Kammer zeitgleich gekühlt werden kann.



**FIG. 1**

**Beschreibung**

**[0001]** Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Durchführung einer Polymerase-Kettenreaktion, die abgekürzt als PCR bezeichnet wird. Eine PCR dient der Vervielfältigung der Erbsubstanz DNA unter Verwendung des Enzyms DNA-Polymerase. Genauer gesagt kann mittels PCR nur ein kurzer, genau definierter Teil eines DNA-Strangs vervielfältigt werden. Bei der PCR dienen die Produkte vorheriger Zyklen als Ausgangsstoffe für den nächsten Zyklus. Es wird so eine exponentielle Vervielfältigung erreicht. Ein PCR-Prozess umfasst beispielsweise 12-50 Zyklen.

**[0002]** Ein Zyklus einer PCR beginnt mit einer Denaturierung. Die Reaktionsflüssigkeit mit der darin befindlichen doppelsträngigen DNA wird auf typischerweise 94-96 °C erhitzt, um die Stränge der DNA zu trennen. Anschließend wird die Reaktionsflüssigkeit mit den getrennten DNA-Strängen auf wenige Grad unter dem Schmelzpunkt der eingesetzten Primer abgekühlt, damit eine Primerhybridisierung erfolgt. Diese Temperatur liegt typischerweise bei 55-65 °C, Während der Primerhybridisierung wird die Temperatur von 55-65 °C ca. 30 Sekunden lang gehalten, um eine spezifische Anlagerung der Primer an die DNA zu ermöglichen. Abschließend wird die Reaktionsflüssigkeit auf eine Temperatur von typischerweise 68-72°C für etwa 30 Sekunden je 500 Basenpaare wieder erwärmt. Die genaue Temperatur hängt vom Arbeitsoptimum der verwendeten DNA-Polymerase ab. Dieser letzte Schritt eines Zyklus wird Elongation oder Amplifikation genannt. Dabei füllt die DNA-Polymerase die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden auf.

**[0003]** Aus der Druckschrift EP 0606961 B1 ist eine Vorrichtung zum schnellen Aufheizen und Abkühlen eines Reaktionsgefäßes auf verschiedene Temperaturen zur Durchführung einer Polymerase-Kettenreaktion bekannt. Die Vorrichtung umfasst zwei Flächen für den Kontakt mit dem Reaktionsgefäß, das dazwischen eingeschlossen ist. Eine Fläche dient als Heizung. Ein Hohlraum der Vorrichtung dient der Kühlung, indem Kühlluft in den Hohlraum eingeleitet wird. Darüber hinaus umfasst die Vorrichtung Sensoren, mit denen die jeweils gewünschte Temperatur gemessen und gesteuert wird. Nachteilhaft muss stets die gesamte Einrichtung gekühlt und anschließend wieder erwärmt werden, um die Temperaturwechsel zu bewirken. Es muss daher relativ viel Energie aufgewendet werden und die jeweils gewünschten Temperaturen der Reaktionsflüssigkeit werden relativ langsam erreicht.

**[0004]** Die Druckschrift EP 0 402 995 B1 offenbart eine Vorrichtung zum Beaufschlagen eines Reaktionsgefäßes mit mindestens zwei Temperaturwechseln. Die Vorrichtung weist Heizelemente zum Erwärmen mindestens einer Seitenwand eines ausgewählten Kammerabschnitts des Reaktionsgefäßes sowie Bewegungsmittel auf, die das Reaktionsgefäß und die Heizelemente entlang einer vorgegebenen Bahn relativ zueinander bewegen. Die Vorrichtung umfasst weiter Kühlelemente, die Kühlflüssigkeit über die Heizelemente fördern, um diese in sich wiederholenden Zeitabständen direkt abzukühlen, und die gemeinsam mit den Heizelementen bewegbar sind.

**[0005]** Aus der Druckschrift US 2003/00361 89 A1 ist ein Thermocycler für die Durchführung einer PCR bekannt, der ein Reaktionsgefäß mit besonders großer, der Wärmeübertragung dienenden Oberfläche umfasst, um so vor allem schnell kühlen zu können.

**[0006]** Die Durchführung einer PCR in einem mikrofluidischen System geht aus der US 6,171,850 B1 hervor.

**[0007]** Beim genannten Stand der Technik wird der gewünschte Temperaturwechsel allein durch Heizen oder Kühlen mit Hilfe von dafür vorgesehenen Heiz- oder Kühlelementen herbeigeführt. Erhitzt wird beim Stand der Technik beispielsweise mit Peltierelementen, Infrarotstrahlung oder einem heißen Fluid per Wärmeaustausch. Gekühlt wird beispielsweise mit einem kalten Fluid über Wärmeaustausch oder aber mit Hilfe von Peltierelementen. Für ein schnelles Ändern einer Temperatur wird relativ viel Energie benötigt. Ein Betrieb ohne externe Stromversorgung erfordert dann sehr leistungsfähige Batterien. Auch dauert es relativ lange, um den gewünschten Temperaturwechsel zu bewirken, wenn das Volumen der Reaktionsflüssigkeit mehr als einige wenige 1 00 µl beträgt,

**[0008]** Es ist aus "Kopp MU, Mello AJ, Manz A., Chemical amplification: continuousflow PCR on a chip, Sience, 1998 May 15; 280(5366):1046-8" bekannt, eine Reaktionsflüssigkeit für die Durchführung einer PCR durch ein mikrofluidisches System mit unterschiedlich temperierten Kammern zu pumpen. Zunächst gelangt die Reaktionsflüssigkeit in eine erste Kammer, die so stark erwärmt wird, dass die Reaktionsflüssigkeit die für die Denaturierung erforderliche Temperatur erreicht, die nachfolgend auch Denaturierungstemperatur genannt wird. Anschließend wird die Reaktionsflüssigkeit in eine nächste Kammer gepumpt, die so gekühlt wird, dass in dieser Kammer die Reaktionsflüssigkeit auf Annealingstemperatur gebracht wird, d. h. auf die Temperatur, die für die Primerhybridisierung benötigt wird. Eine dritte nachfolgende Kammer ist so temperiert, dass die Reaktionsflüssigkeit von der Annealingstemperatur auf die Temperatur erwärmt wird, die für die Amplifikation bzw. Elongation erforderlich ist, nachfolgend auch Elongationstemperatur genannt. Bei diesem Verfahren gelingt es, auf energetisch günstige Weise schnell die erforderlichen Temperaturen zu erreichen. Allerdings können nur kleine Flüssigkeitsvolumina eingesetzt werden. Es muss sehr exakt gepumpt werden, um so sicherzustellen, dass sich die Reaktionsflüssigkeit im jeweils gewünschten Bereich befindet. Ferner werden drei Kammern nebst Verbindungsleitungen benötigt, um die PCR durchführen zu können.

**[0009]** Aus der Druckschrift WO 03/007677 A2 ist bekannt, gemäß dem eine PCR-Kammer zwischen unterschiedlich beheizten Zonen zu verfahren, um so eine gewünschte Temperatur in einer Kammer einstellen zu können. Das hieraus bekannte Verfahren kann mit einem vergleichsweise niedrigen Energiebedarf durchgeführt werden, da neben der Reaktionsflüssigkeit nur noch die Wände der Kammer aufgeheizt und gekühlt werden müssen. Allerdings dient das Auf-

heizen und Kühlen der Wände nicht dem Erreichen des gewünschten Ergebnisses und ist lediglich aus technischen Gründen erforderlich, um das Verfahren durchführen zu können, Hinzu kommt, dass der Platzbedarf relativ groß ist.

[0010] Es ist Aufgabe der Erfindung, eine PCR energetisch günstig, schnell und einfach durchführen zu können.

[0011] Zur Lösung der Aufgabe wird eine erforderliche Temperatur einer Reaktionsflüssigkeit durch Mischen mit einer zweiten Flüssigkeit eingestellt, deren Temperatur sich geeignet von der Temperatur der Reaktionsflüssigkeit unterscheidet. Die zweite Flüssigkeit kann ebenfalls eine Reaktionsflüssigkeit sein. Da eine gewünschte Temperatur einer Reaktionsflüssigkeit durch Mischen von zwei zuvor unterschiedlich temperierten Flüssigkeiten erhalten wird, ist es nicht erforderlich, zusätzlich eine Reaktionskammer zu heizen oder zu kühlen, was energetisch aufwändig und zu großen zeitlichen Verzögerungen führen würde. Für die Durchführung des Verfahrens werden nur eine geeignet temperierbare Kammer sowie Mittel für das Mischen benötigt. Der Aufbau kann entsprechend einfach und kostengünstig sein.

[0012] Zur Lösung dieser Aufgabe wird in einer Ausführungsform der Erfindung im Rahmen der Durchführung einer PCR Reaktionsflüssigkeit, die zuvor auf Denaturierungstemperatur gebracht worden ist und deren Temperatur daher oberhalb der Temperatur liegt, die für die Amplifikation bzw. Elongation erforderlich ist, mit Reaktionsflüssigkeit gemischt, die zuvor auf Annealingstemperatur gebracht worden ist und deren Temperatur daher unterhalb der Temperatur liegt, die für die Amplifikation erforderlich ist. Es wird so erreicht, dass der Teil der Reaktionsflüssigkeit, der von der Annealingstemperatur auf die Elongationstemperatur zu bringen ist, durch das Mischen sehr schnell in gewünschter Weise erwärmt wird. Da für das Erwärmen Reaktionsflüssigkeit eingesetzt wird, die ohnehin gekühlt werden muss, wird das gewünschte Ergebnis auf energetisch günstige Weise erreicht. Es können größere Mengen an Flüssigkeit in gewünschter Weise schnell und einfach in gewünschter Weise temperiert werden,

[0013] Die Temperatur einer Reaktionskammer nebst weiteren daran beteiligten Einrichtungen muss nicht während der Temperaturänderungen der Flüssigkeiten ebenfalls entsprechend aktiv geändert werden. Hierdurch wird vor allem Energie eingespart, was beispielsweise für Batterie betriebene Vorrichtungen wichtig ist. Eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens eignet sich daher insbesondere für den mobilen Einsatz, welche durch eine interne Energieversorgung wie Batterie, Brennstoffzelle und/ oder durch Solarzellen mit Energie versorgt wird.

[0014] In einer Ausführungsform der Erfindung wird das Verhältnis zwischen den beiden Flüssigkeitsvolumina der zu mischenden Reaktionsflüssigkeiten bzw. Flüssigkeiten so gewählt, dass durch das Mischen der wärmeren (Reaktions-)flüssigkeit mit der kälteren (Reaktions-)flüssigkeit die Elongationstemperatur weder unterschritten noch überschritten werden kann. Es muss also nicht zusätzlich temperiert werden, um die gewünschte Elongationstemperatur zu erreichen.

[0015] In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird die PCR in einer Kammer durchgeführt, die einen ersten und einen davon räumlich anderen zweiten Bereich umfasst. Der erste Bereich dieser Kammer wird so beheizt, dass eine in diesem Bereich befindliche Reaktionsflüssigkeit auf Denaturierungstemperatur erwärmt werden kann. Der zweite Bereich wird so gekühlt, dass eine in diesem zweiten Bereich befindliche Reaktionsflüssigkeit auf Annealingstemperatur abgekühlt werden kann. Der erste Bereich ist vom zweiten Bereich räumlich getrennt. Bei dieser Ausführungsform der Erfindung wird der Teil der Reaktionsflüssigkeit, der sich im ersten Bereich befindet, auf Denaturierungstemperatur erwärmt und gehalten, bis in diesem Teil der Reaktionsflüssigkeit die vorhandenen Doppelstränge einer DNA im gewünschten Umfang getrennt worden sind. Im zweiten Bereich der Kammer wird die dort befindliche Reaktionsflüssigkeit auf Annealingstemperatur abgekühlt und gehalten, bis im gewünschten Umfang die Primerhybridisierung erfolgt ist, anschließend werden die beiden Teile der Reaktionsflüssigkeit mit Hilfe eines Röhrelements gemischt, um so die Elongationstemperatur zu erreichen.

[0016] Zwar wird durch dieses Verfahren die Effizienz eines Zyklus im Vergleich zum Stand der Technik reduziert, bei dem stets das gesamte Reaktionsvolumen nacheinander die drei Schritte eines Zyklus durchlaufen. Wie Versuche gezeigt haben, kann dies dadurch kompensiert werden, indem mehr Zyklen durchlaufen werden. Der Geschwindigkeitsvorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist so groß, dass das gewünschte Endergebnis trotz einer größeren Anzahl an Zyklen dennoch in kürzerer Zeit im Vergleich zu klassischen PCR-Verfahren erhalten wird. Versuche haben insbesondere auch ergeben, dass es sich nicht nachteilhaft auswirkt, wenn ein Teil der Reaktionsflüssigkeit im Anschluss an die Denaturierung nicht wie beim Stand der Technik sofort auf die Annealingstemperatur abgekühlt wird, sondern zunächst auf Elongationstemperatur gebracht und gehalten wird.

[0017] In einer Ausführungsform der Erfindung ist die Kammer, in der die PCR anspruchsgemäß durchgeführt wird, flach ausgestaltet. Eine Kammer ist flach ausgestaltet, wenn die Breite und/ oder Tiefe der Kammer die Höhe der Kammer um ein Mehrfaches übersteigt. Es stehen so einerseits große Wärmeübertragungsflächen bereit, um den ersten Bereich zu erwärmen und den zweiten Bereich zu kühlen. Andererseits gelingt es so, die in beiden Bereichen befindlichen Flüssigkeiten hinreichend während des Erwärmens bzw. Kühlens voneinander getrennt zu halten.

[0018] Um die gewünschte räumliche Trennung von Teilen der Reaktionsflüssigkeiten während des Erwärmens bzw. Kühlens verbessert aufrecht zu erhalten, wird in einer Ausführungsform der Erfindung ein Röhrelement so positioniert, dass das Röhrelement zur räumlichen Trennung beiträgt. Befindet sich beispielsweise der erste Bereich in einer linken Kommerhälfte und der zweite Bereich in einer rechten Kammerhälfte, so wird das Röhrelement so platziert und ausgerichtet, dass es die linke Kommerhälfte von der rechten trennt, wenn Reaktionsflüssigkeit gekühlt bzw. erwärmt werden soll. Das Röhrelement erstreckt sich dann entlang der Grenze zwischen erstem und zweitem Kammerbereich und trennt

so räumlich die beiden Teile der Reaktionsflüssigkeit.

[0019] Das Röhrelement kann zum Beispiel Teil eines Magnetührers oder aber mit einer in die Kammer hineinreichende Welle verbunden sein. Handelt es sich um einen Magnetührer, so gelingt die gewünschte Ausrichtung beispielsweise mittels eines geeigneten ausgerichteten Magnetfeldes.

5 [0020] In einer Ausführungsform der Erfindung können die beiden Bereiche der Kammer durch ein Trennmittel voneinander getrennt werden, um so einen Teil der Reaktionsflüssigkeit in der ersten Kammer heizen zu können, ohne dass sich dieser Teil der Flüssigkeit mit dem zweiten Teil der Reaktionsflüssigkeit vermischen kann, der währenddessen gekühlt wird. Ein solches Trennmittel kann Pressmittel umfassen, die den Grenzbereich zwischen erstem und zweitem Bereich zusammenpressen und so die beiden Bereiche gegeneinander abdichten.

10 [0021] In einer Ausführungsform der Erfindung besteht die Hülle der Kammer aus verformbaren Material. Das Mischen wird bewirkt, in dem Teile der Kammer zusammengedrückt und anschließend wieder entspannt werden.

[0022] Die zu kühlenden bzw. zu heizenden Wände der Kammer bestehen vorzugsweise aus einem Material, welches Wärme gut zu leitenden vermag im Vergleich zu einem bandförmig verlaufenden Wandbereich, der zwischen dem zu heizenden und dem zu kühlenden Bereich liegt. Diese Ausführungsform einer Kammer trägt weiter dazu bei, dass das

15 Verfahren energetisch günstig durchgeführt werden kann.

[0023] Die Energieversorgung erfolgt insbesondere mittels einer Batterie, einer Solarzelle und/oder einer Brennstoffzelle, also allgemein durch eine interne Energieversorgung, damit das Verfahren mobil unabhängig von einer externen Energieversorgung durchgeführt werden kann. Gerade bei einer internen Energieversorgung kommt es darauf, möglichst wenig Energie zu verbrauchen.

20 [0024] Um eine PCR durchführen zu können, umfasst die in der Kammer befindliche Reaktionsflüssigkeit hitzestabile Polymerase, Nukleotidte, Primer, Salz und pH-Puffer sowie Templat-Nukleinsäure RNA oder DNA.

[0025] Es ist grundsätzlich auch möglich, dass eine weitere Flüssigkeit, die keine Reaktionsflüssigkeit ist, eingesetzt wird, um durch Mischen die gewünschten Temperaturen schnell zu erreichen. Grundsätzlich ist es möglich, die vorgenannten vorteilhaften Ausführungsformen auf diesen Fall entsprechend zu übertragen. Im Unterschied zu dem Fall, dass ausschließlich Reaktionsflüssigkeit eingesetzt wird, ist es dann aber nicht erforderlich, die weitere Flüssigkeit exakt auf Denaturierungstemperatur zu erwärmen oder aber exakt auf Annealingstemperatur zu kühlen. Statt dessen kann die kühlere oder wärmere Temperatur so gewählt werden, dass das Verfahren optimiert durchgeführt werden kann. In Betracht kommen vor allem Flüssigkeiten wie Öl oder flüssiges Metall. Geeignete Öle sind im Bereich der Mineralöle (Typenbezeichnung "PCR-grade") und Siliconöle (Typenbezeichnung DC200) zu finden. An Flüssigmetallen sind die Produkte der Firma Coollaboratory (Ebendorf; Deutschland) geeignet. So kann beispielsweise eine RealTime PCR unter

Anwesenheit von ca. 10 mg "Coollaboratory Liquid MetalPad for PS3<sup>®</sup>" oder 50 mg "Coollaboratory Liquid Pro" erfolgreich durchgeführt werden.

35 [0026] Die Öle bzw. Metalle bilden in der PCR Reaktion eine zweite Phase, die einerseits leicht von der Reaktionsflüssigkeit getrennt werden können und andererseits die PCR nicht gefährden. Bei dieser Ausführungsform schwimmt beispielsweise ein Öl zunächst auf der Reaktionsflüssigkeit und wird zusammen mit einem dafür geeigneten Bereich der Reaktionskammer auf eine geeignete Temperatur erhitzt. Zeitgleich wird die Reaktionsflüssigkeit in einem unteren Kammerbereich gekühlt und auf Annealingstemperatur gebracht. Um zu gegebener Zeit die Elongationstemperatur zu erreichen, wird das Öl mit der Reaktionsflüssigkeit gemischt. Soll im Anschluss daran die Reaktionsflüssigkeit auf Denaturierungstemperatur gebracht werden, so wird beispielsweise die Kammer so um 180° gedreht, dass der beheizte Bereich der Kammer sich dann unten befindet und der gekühlte Bereich oben. Wird das Mischen gestoppt, so gelangt das Öl aufgrund der Schwerkraft in den gekühlten Kammerbereich der Reaktionskammer. Die Reaktionsflüssigkeit gelangt dann in den Bereich der Kammer, der erhitzt wird. Die Reaktionsflüssigkeit wird so auf die Denaturierungstemperatur gebracht und das Öl auf eine geeignet tiefe Temperatur, um so die Reaktionsflüssigkeit zu gegebener Zeit durch Mischen wieder rasch und auf energetisch günstige Weise abkühlen zu können.

40 [0027] Wird flüssiges Metall anstelle eines Öls eingesetzt, so schwimmt die Reaktionsflüssigkeit auf dem flüssigen Metall, wenn nicht gemischt wird. Im Prinzip kann daher das gleiche Verfahren durchgeführt werden, wie zuvor am Beispiel des Öls beschrieben worden ist.

45 [0028] Wird eine Flüssigkeit eingesetzt, die keine Reaktionsflüssigkeit ist, so kommt es bei den zuvor beschriebenen Verfahren also darauf an, dass sich diese Flüssigkeit von der Reaktionsflüssigkeit trennen lässt, was insbesondere dann leicht möglich ist, wenn die Trennung aufgrund der Schwerkraft zwangsläufig einsetzt, sobald nicht aktiv zum Beispiel durch Rühren mit einem Röhrelement gemischt wird.

50 [0029] Es ist auch möglich, dass insgesamt drei verschiedene Flüssigkeiten eingesetzt werden, so zum Beispiel ein Flüssigmetall, eine Reaktionsflüssigkeit sowie ein Öl. Es ist zweckmäßig, das Öl in einem oberen Bereich der Kammer zu erwärmen und das Flüssigmetall in einem unteren Bereich dann zu kühlen. Grundsätzlich ist es aber auch nicht ausgeschlossen, dass der obere Bereich gekühlt und der untere erwärmt wird. Die dazwischen befindliche Reaktionsflüssigkeit wird mit der erwärmten Flüssigkeit gemischt, wenn die Temperatur der Reaktionsflüssigkeit erhöht

werden soll. Die dazwischen befindliche Reaktionsflüssigkeit wird mit der gekühlten Flüssigkeit gemischt, wenn die Temperatur der Reaktionsflüssigkeit geeignet herabgesetzt werden soll.

[0030] Nachfolgend wird die Erfindung anhand eines Ausführungsbeispiels näher erläutert.

[0031] Figur 1 zeigt eine Ansicht auf eine flach ausgestaltete Kammer 1, in der eine PCR durchgeführt wird. Die Kammer 1 weist eine kreisrunde Grundfläche auf, deren Durchmesser um ein Mehrfaches größer ist als die Höhe der Kammer. Eine links gezeigte Hälfte 1a der Kammer ist mit nicht dargestellten Heizmitteln versehen, um diesen linken Kammerbereich 1a beheizen zu können. Eine rechts gezeigte Kommerhälfte 1b ist mit Kühlmitteln versehen, die die rechte Kammerhälfte 1b zu kühlen vermögen. In der Kammer 1 befindet sich ein Rührstab 2 eines Magnetrührers. In der Grundstellung trennt dieser die linke Kammerhälfte 1a von der rechten Kammerhälfte 1b. Als Heiz- und Kühlmittel eignen sich die bekannten, beispielsweise eingangs genannten Mittel für diese und für andere Ausführungsformen der Erfindung.

[0032] Figur 2a zeigt einen seitlichen Schnitt eines weiteren Ausführungsbeispiels einer erfindungsgemäßen Kammer. In Figur 2b wird eine zugehörige Ansicht gezeigt. Die links gezeigte Kommerhälfte kann mit einem ersten Peltierelement 3 beheizt werden. Die rechts gezeigte Kommerhälfte kann mit einem zweiten Peltierelement 4 gekühlt werden.

[0033] Die Höhe der Kammer mit quadratischer Grundfläche beträgt 1 mm. Breite und Länge bzw. Tiefe der Kammer betragen 10 mm. Das Kamervolumen liegt bei ca. 100 µl. In der Kammer 1 befindet sich wiederum ein Rührstab 2 eines Magnetrührers.

[0034] Im Rahmen eines Ausführungsbeispiels wurde eine quantitative Real Time PCR mit genetischer DNA des Bakteriums *Escherichia coli* untersucht.

[0035] Folgende PCR-Primer wurden eingesetzt:

EFwd: CGATGATGCTACCCCTGAAAAACT

ERev: TATTGTCGCTTGAAGTGATTCCTC

EPro: "6-Fam"-CGTTGTTAAGTCAATGGAAAACCTG- BHQ1

[0036] Die qPCR wurde jeweils mit einer Standard-Verdünnungsreihe genetischer DNA von *E. coli* angesetzt. Pro 25 µl PCR Endvolumen wurden 20 ng / 2 ng / 0,2 ng / 0,02 ng von genetischer *Escherichia coli* DNA, also unterschiedliche Mengen für Eichmessungen eingesetzt. Dazu wurden in ein PCR Tube 1 2,5 µl QIAGEN QuantiTect Probe PCR Mastermix, 0,1 µl EFwd (5 pmol/µl); 0,1 µl ERev (5 pmol/µl); 0,05 µl EPro(5 pmol/µl), 10,25 µl bidestilliertes Wasser und 2 µl *E.coli* Standard-Verdünnungslösung gestartet. Die Zyklus-Bedingungen sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

	3-Step-Cycling		4-Step-Cycling		
35	Taq Aktivierung	3 min	95°C	3 min	95°C
	40 cycles	4 sec	95°C	4 sec	95°C
		4 sec	56°C	4 sec	72°C
		8 sec	72°C	4 sec	56°C 72°C
40	Final Elongation	1 min	72°C	1 min	72°C
	Hold infinite	∞	4°C	∞	4°C

[0037] Die Auswertung der qPCR zeigt, dass auch unter den ungewöhnlichen 4-Schritt Cycling Bedingungen erfolgreich eine PCR durchzuführen ist. Die Standards im Amplification Plot (Fig. 3) bzw. in der Auswertungsgrafik (Fig. 4) unterscheiden sich nicht signifikant von einander.

[0038] Da während der PCR ein Bereich der Kammer konstant erhitzt wird und ein anderer Bereich der Kammer konstant gekühlt wird, wird relativ wenig Energie benötigt, um die PCR durchzuführen. Der Aufbau der Kammer nebst zugehörigen Einrichtungen ist einfach und daher preiswert. Der einfache Aufbau ermöglicht eine kleine Bauform der Gesamtvorrichtung, mit der das Verfahren durchgeführt wird.

[0039] Eine Simulation hat ergeben, dass das Verfahren selbst dann vergleichsweise schnell durchgeführt werden kann, wenn als Flüssigkeit ausschließlich Reaktionsflüssigkeit eingesetzt wird. Es ergeben sich also auch Geschwindigkeitsvorteile, was wiederum den Energieverbrauch auch aus diesem Grund zu senken vermag.

55

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Durchführung einer Polymerase-Kettenreaktion, bei dem eine Reaktionsflüssigkeit zyklisch auf De-

naturierungstemperatur, Annealingstemperatur und Elongationstemperatur gebracht wird, **dadurch gekennzeichnet, dass** eine Temperatur der Reaktionsflüssigkeit durch Mischen mit einer wärmeren oder kühleren Flüssigkeit geändert wird.

- 5      2. Verfahren zur Durchführung einer Polymerase-Kettenreaktion nach Anspruch 1 , **dadurch gekennzeichnet, dass** ein Teil der Reaktionsflüssigkeit auf Denaturierungstemperatur gebracht wird, ein anderer Teil der Reaktionsflüssigkeit auf Annealingstemperatur gebracht wird und die beiden Teile der Reaktionsflüssigkeiten zwecks Temperaturveränderung gemischt werden.
- 10     3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Verhältnis zwischen den beiden Flüssigkeitsvolumina des ersten und zweiten Teils der zu mischenden Flüssigkeiten so eingestellt wird, dass durch das Mischen der wärmeren Flüssigkeit mit der kühleren Flüssigkeit die Elongationstemperatur erhalten wird.
- 15     4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, **dadurch gekennzeichnet, dass** der erste Teil der Reaktionsflüssigkeit in einem ersten Bereich einer Kammer auf Denaturierungstemperatur erwärmt wird, der zweite Teil der Reaktionsflüssigkeit in einem zweiten Bereich der Kammer auf Annealingstemperatur gekühlt wird und anschließend mit Hilfe eines in der Kammer befindlichen Röhrelements die unterschiedlich temperierten Teile der Reaktionsflüssigkeiten gemischt werden.
- 20     5. Verfahren nach einem der drei vorhergehenden Ansprüche, bei dem im Anschluss an das Mischen wieder ein Teil der Reaktionsflüssigkeit auf Denaturierungstemperatur und ein anderer Teil der Reaktionsflüssigkeit wieder auf Annealingstemperatur gebracht wird und zwar insbesondere in einem ersten und einem zweiten Bereich einer Kammer.
- 25     6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Reaktionsflüssigkeit in einer flach ausgestalteten Kammer zyklisch auf Denaturierungstemperatur, Annealingstemperatur und Elongationstemperatur gebracht wird.
- 30     7. Verfahren nach einem der fünf vorhergehenden Ansprüche, bei dem ein Röhrelement die zwei Teile der Reaktionsflüssigkeit voneinander trennt, wenn diese auf Denaturierungstemperatur bzw. Annealingstemperatur gebracht werden.
- 35     8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Höhe der Kammer maximal 2 mm, vorzugsweise maximal 1 mm beträgt.
- 40     9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Breite, Tiefe oder Durchmesser der Kammer wenigstens 5 mm, vorzugsweise wenigstens 10 mm beträgt.
- 45     10. Kammer zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der vorhergehenden Ansprüche, die einen ersten und zweiten Bereich umfasst, wobei der erste Bereich der Kammer mit einem Heizmittel versehen ist und der zweite Bereich mit einem Kühlmittel.
- 50     11. Kammer nach dem vorhergehenden Anspruch mit Mitteln für das Mischen einer in der Kammer befindlichen Flüssigkeit.
- 55     12. Kammer nach einem der beiden vorhergehenden Ansprüche mit einer in der Kammer befindlichen Reaktionsflüssigkeit, die Polymerase, Nukleotid, Primer, Salz und pH Puffer sowie Templat-Nukleinsäure RNA oder DNA umfasst,
- 60     13. Kammer nach einem der drei vorhergehenden Ansprüche mit einem bandförmigen Wandbereich, der aus einem Material besteht, dessen Wärmeleitfähigkeit gering ist im Vergleich zu dem Material von angrenzenden Wandbereichen der Kammer, wobei sich der bandförmige Wandbereich zwischen dem ersten und zweiten Bereich der Kammer befindet.
- 65     14. Kammer nach einem der vier vorhergehenden Ansprüche mit Mitteln zur Ausrichtung des Röhrelements derart, dass im ausgerichteten Zustand das Röhrelement den ersten Kammerbereich vom zweiten Kammerbereich trennt.
- 70     15. Vorrichtung umfassend eine Kammer nach einem der fünf vorhergehenden Ansprüche mit einer internen Energieversorgung für die Durchführung einer PCR,

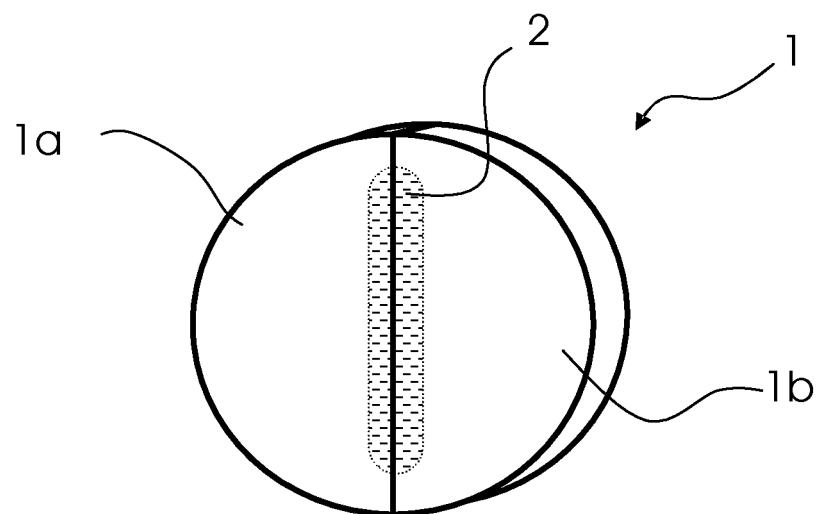


FIG. 1

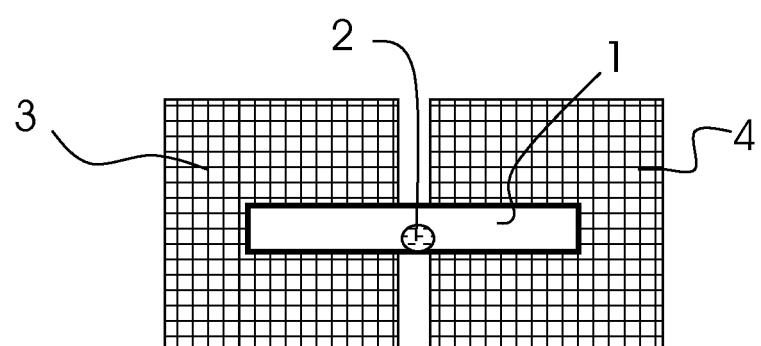


FIG. 2a

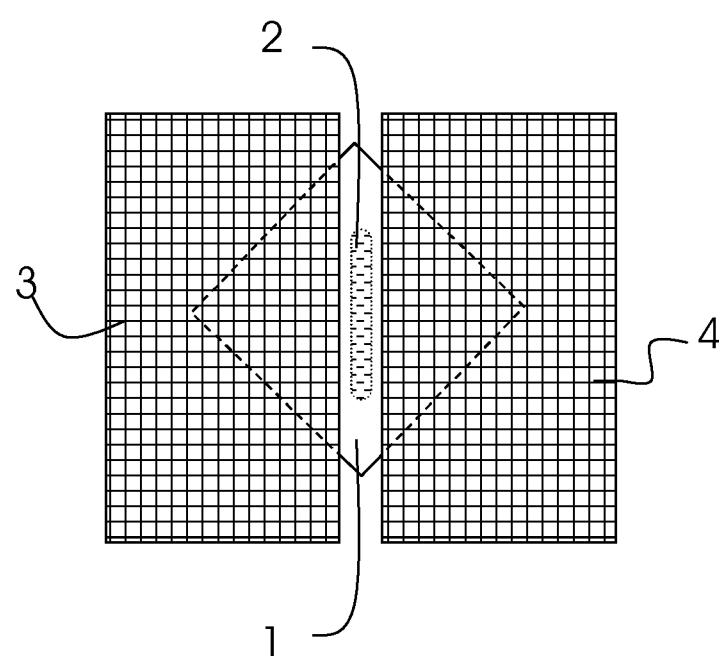
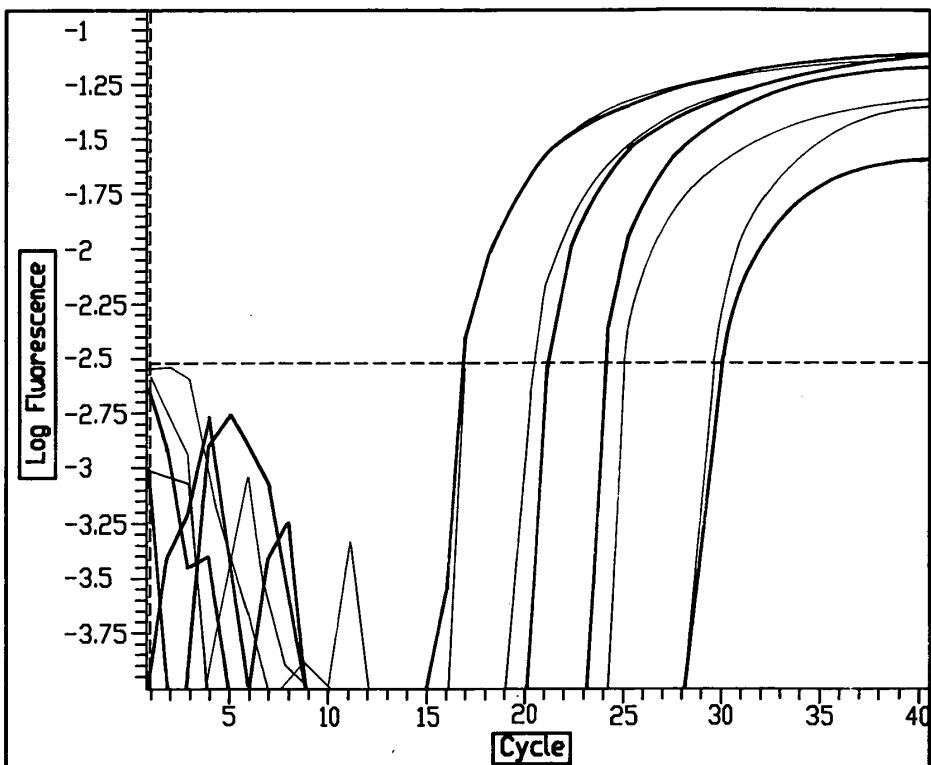


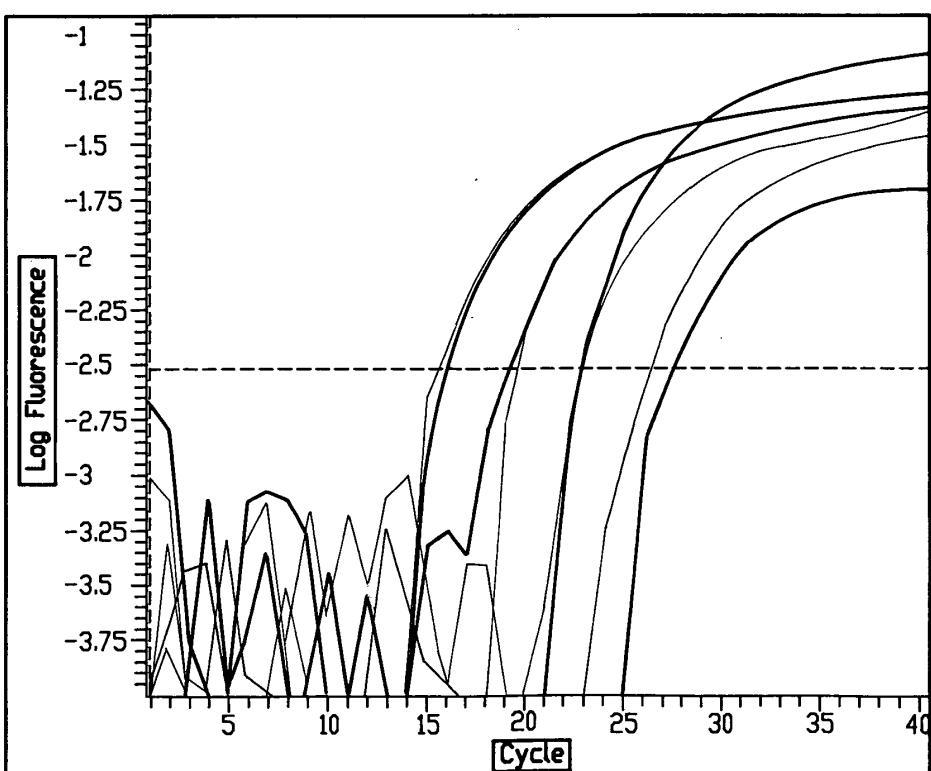
FIG. 2b

3-Schritt



4-Schritt

FIG.3



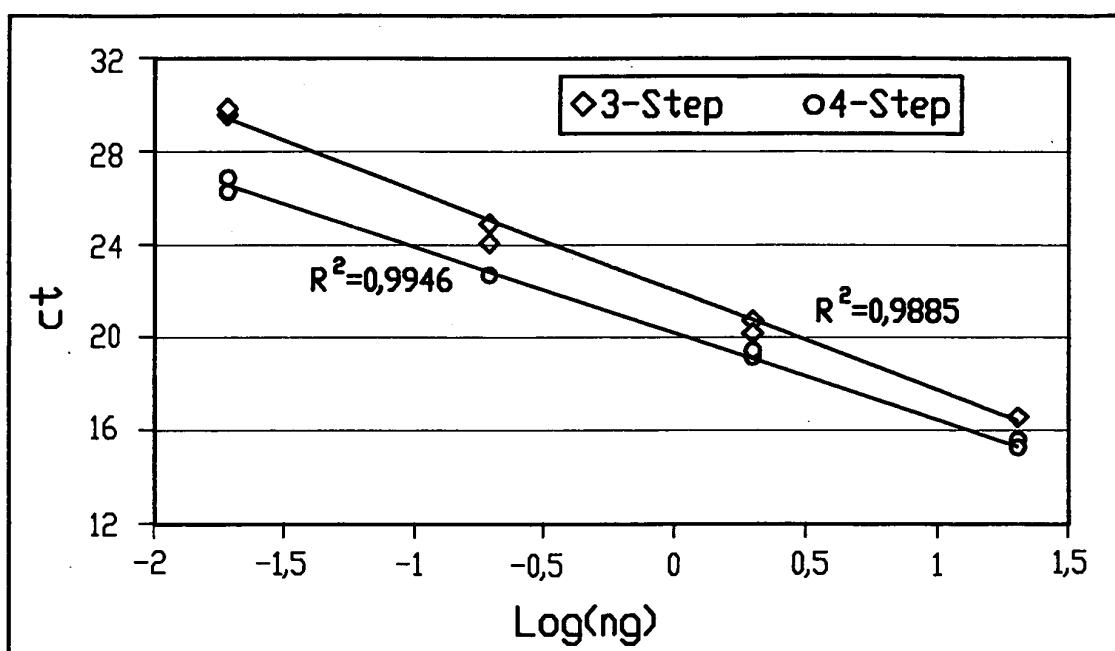


FIG.4



## EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung  
EP 09 15 4744

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betreff Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (IPC)
X	US 2002/127152 A1 (BENETT WILLIAM J [US] ET AL) 12. September 2002 (2002-09-12) * Zusammenfassung * * Absätze [0023] - [0025], [0032], [0040] - [0050]; Abbildungen 5,6 *	1-15	INV. B01L7/00
X	----- US 2008/176292 A1 (UGAZ VICTOR M [US] ET AL) 24. Juli 2008 (2008-07-24) * Zusammenfassung * * Absätze [0009] - [0011], [0027], [0028], [0034], [0048]; Abbildungen 5a,5b *	1-15	
X	----- EP 1 464 399 A (HITACHI LTD [JP]) 6. Oktober 2004 (2004-10-06) * Zusammenfassung * * Absätze [0011], [0012], [0018] - [0032]; Abbildungen 5,6 *	1	
X	----- US 2008/153152 A1 (WAKABAYASHI AKIRA [JP] ET AL) 26. Juni 2008 (2008-06-26) * Zusammenfassung * * Absätze [0014] - [0026], [0135] - [0144]; Abbildung 4 *	1	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (IPC)
X	----- DE 10 2004 050139 A1 (FRAUNHOFER GES FORSCHUNG [DE]) 20. April 2006 (2006-04-20) * Absatz [0040]; Abbildung 3 *	10-15	B01L F28C B01F
A	----- US 2004/132051 A1 (ANDERSEN MARK R [US]) 8. Juli 2004 (2004-07-08) * Zusammenfassung *	1	
A	----- * Absätze [0004] - [0007], [0050] - [0058]; Abbildungen 1,6a,6b *	10-15	
A	----- EP 1 860 060 A (MICRONAS HOLDING GMBH [DE]) 28. November 2007 (2007-11-28) * das ganze Dokument *	1	
	-----	1-9	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
2	Recherchenort Den Haag	Abschlußdatum der Recherche 31. Juli 2009	Prüfer Sinn, Cornelia
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument ..... & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur			

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT  
ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 09 15 4744

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am  
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

31-07-2009

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 2002127152	A1	12-09-2002	WO	02072267 A1		19-09-2002
US 2008176292	A1	24-07-2008		KEINE		
EP 1464399	A	06-10-2004	JP	2004305009 A		04-11-2004
			US	2004197810 A1		07-10-2004
US 2008153152	A1	26-06-2008		KEINE		
DE 102004050139	A1	20-04-2006		KEINE		
US 2004132051	A1	08-07-2004		KEINE		
EP 1860060	A	28-11-2007	US	2009017505 A1		15-01-2009

**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 Patentdokumente**

- EP 0606961 B1 [0003]
- EP 0402995 B1 [0004]
- US 20030036189 A1 [0005]
- US 6171850 B1 [0006]
- WO 03007677 A2 [0009]

**In der Beschreibung aufgeführte Nicht-Patentliteratur**

- **Kopp MU ; Mello AJ ; Manz A.** Chemical amplification: continuousflow PCR on a chip. *Science*, 15. Mai 1998, vol. 280 (5366), 1046-8 [0008]