



(11) **EP 2 337 633 B1**

(12) **EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT**

(45) Veröffentlichungstag und Bekanntmachung des
Hinweises auf die Patenterteilung:
13.02.2013 Patentblatt 2013/07

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

(21) Anmeldenummer: **10795211.1**

(86) Internationale Anmeldenummer:
PCT/DE2010/075120

(22) Anmeldetag: **05.11.2010**

(87) Internationale Veröffentlichungsnummer:
WO 2011/054353 (12.05.2011 Gazette 2011/19)

(54) **VORRICHTUNG ZUR DURCHFÜHRUNG EINER PCR**

DEVICE FOR PERFORMING PCR

DISPOSITIF PERMETTANT DE METTRE EN UVRE UNE PCR

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AL 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 RS SE SI SK SM TR**

(30) Priorität: **05.11.2009 DE 102009044431**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
29.06.2011 Patentblatt 2011/26

(73) Patentinhaber: **FRIZ Biochem Gesellschaft für
Bioanalytik mbH
82061 Neuried (DE)**

(72) Erfinder:
• **HARTWICH, Gerhard
80639 München (DE)**
• **PERSIKE, Norbert
81539 München (DE)**

(74) Vertreter: **Graf Glück Habersack Kritzenberger
Hermann-Köhl-Straße 2a
93049 Regensburg (DE)**

(56) Entgegenhaltungen:
**EP-A2- 0 318 255 WO-A1-2008/146754
US-A1- 2002 081 669 US-A1- 2010 210 006**

EP 2 337 633 B1

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents im Europäischen Patentblatt kann jedermann nach Maßgabe der Ausführungsordnung beim Europäischen Patentamt gegen dieses Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist. (Art. 99(1) Europäisches Patentübereinkommen).

Beschreibung**Technisches Gebiet**

5 **[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Durchführung der Polymerasen-Kettenreaktion (PCR).

Stand der Technik

10 **[0002]** Die PCR ist eine für die Molekularbiologie grundlegende Methode, die der Vervielfältigung von DNA-Molekülen dient und den schnellen, empfindlichen Direktnachweis kleinster Mengen von DNA oder RNA erlaubt. In den vergangenen Jahren hat diese Methode die Labors erobert, da ihre Anwendung sehr breit und vielschichtig ist. Die PCR hat in fast allen Bereichen der Wissenschaft und Medizin, einschließlich der forensischen Medizin, der pränatalen Diagnostik, der Onkologie und nicht zuletzt in der mikrobiologischen Diagnostik Einzug gehalten. Beispielsweise ist die PCR auf dem Sektor der klinischen Diagnostik meist die Methode der Wahl um z. B. Krankheitserreger nachzuweisen. Ebenso wird
15 sie in der Lebensmittelindustrie als Nachweismethode für belastende Keime angewandt.

[0003] Bei der PCR handelt es sich um eine enzymatische Reaktion zur Amplifikation von Nukleinsäuremolekülen, die im Wesentlichen in einem wässrigen bzw. flüssigen Reaktionsgemisch mit sehr kleinen Volumina abläuft. Im Reaktionsgemisch befindet sich eine Nukleinsäure enthaltende Probe und die für die Reaktion notwendigen Primer, Nukleotide und eine Polymerase. Durch Zugabe von Puffern und vorzugsweise zweiwertigen Ionen wie z. B. Mg^{2+} wird das Reaktionsgemisch so eingestellt, dass die für die jeweilige Anwendungsart optimalen Reaktionsbedingungen herrschen.
20 **[0004]** Die Polymerase-Kettenreaktion beruht auf einem Zyklus aus drei, bei unterschiedlichen Temperaturen ablaufenden Schritten, nämlich Denaturierung, Hybridisierung und Verlängerung.

[0005] Bei der Denaturierung wird das Reaktionsgemisch auf eine Temperatur größer 90°C, vorzugsweise 94°C bis 95°C erhitzt. Dadurch trennen sich die beiden komplementären Stränge einer doppelsträngigen DNA, die DNA wird
25 "aufgeschmolzen" bzw. denaturiert und liegt in Einzelsträngen vor. Die Denaturierung ist ein sehr schneller Prozess und ist in der Regel innerhalb von Sekunden abgeschlossen.

[0006] Bei der Hybridisierung (auch "Annealing") wird die Temperatur auf eine sogenannte "Annealing-Temperatur" herabgesetzt. Bei dieser Temperatur verbinden sich die Primer mit der DNA, sie hybridisieren. Die "Annealing-Temperatur" richtet sich dabei nach Länge und Sequenz der Primer und kann aus diesen Eigenschaften spezifisch für jeden Primer bestimmt werden. In der Regel liegen die "Annealing-Temperaturen" in einem Temperaturbereich von 55°C bis
30 65°C, können anwendungsspezifisch jedoch auch niedriger oder höher eingestellt werden. Die Hybridisierung hat einen geringen Zeitbedarf und erfolgt innerhalb von Sekunden.

[0007] Für die Verlängerung, dem an das "Annealing" anschließenden Schritt, wird die Temperatur weiter erhöht, vorzugsweise auf 70°C bis 74°C. Dies ist die ideale Arbeitstemperatur für die in der Regel verwendeten Polymerasen, welche beginnend an den gebundenen Primern weitere Nukleotide an die entstehenden DNA-Stränge anbauen. Im angegebenen Temperaturbereich brechen zudem lose Verbindungen zwischen Primern und solchen Template-DNA-Abschnitten wieder auf, die nicht vollständig komplementär sind.
35

[0008] Der Verlängerungsschritt ist derjenige Schritt der PCR, der in der Regel den größten Zeitbedarf mit sich bringt. So ist beispielsweise die Arbeits- bzw. Reaktionsgeschwindigkeit der Polymerase zeitlimitierend, das heißt je kürzer die optimale Temperatur von etwa 70°C bis 74°C herrscht, desto kürzer bleiben auch die neu synthetisierten DNA-Stränge. In der Regel reichen auch im Verlängerungsschritt mehrere Sekunden (15 bis 60 Sekunden) aus, jedoch wird in Standard-PCR-Verfahren bei sehr langen zu synthetisierenden DNA-Molekülen eine Zeitspanne im Minutenbereich (von einer bis zu mehreren Minuten) zur DNA-Verlängerung gewählt.
40

[0009] Bei jeder Wiederholung obiger drei Schritte verdoppelt sich die Anzahl an kopierten DNA-Molekülen. Nach 20 Zyklen entstehen auf diese Weise aus einem einzigen DNA-Doppelstrang etwa eine Million Moleküle.
45

[0010] Die Anzahl der Zyklen kann je nach Anwendungsart, Beschaffenheit der Probe und den spezifischen Anforderungen und Reaktionsbedingungen entsprechend gewählt werden. Ebenso wird die Einstellung der Zeitspannen für die einzelnen Schritte an die spezifischen Anforderungen bestimmter Anwendungsarten angepasst.

[0011] Die oben aufgeführten Angaben beziehen sich im Wesentlichen auf Standard-PCR-Verfahren, in denen von einer doppelsträngig vorliegenden Proben-DNA Kopien erstellt werden. Es gibt jedoch eine ganze Reihe besonderer PCR-Verfahren, für die im Einzelfall die Bedingungen angepasst werden müssen. Ein Beispiel einer ganz speziellen PCR-Anwendung stellt die sogenannte RT-PCR (Reverse Transkriptase PCR) dar. Hierbei erfolgt mit Hilfe einer Reversen Transkriptase eine Amplifikation ausgehend von einer Proben-RNA. Dabei wird in einem ersten Schritt ein Hybrid-Doppelstrang RNA/DNA erzeugt, indem die Reverse Transkriptase einen zur vorliegenden Proben-RNA komplementären DNA-Strang synthetisiert. In einem zweiten Schritt, einer "gewöhnlichen" PCR, kann die so entstandene DNA nach Denaturierung des Hybrids wieder als Matrize verwendet werden.
50
55

[0012] Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang noch eine besondere Art der PCR, die Real-Time-PCR. Diese quantitative PCR Methode erfreut sich in den molekularbiologischen Labors immer größerer Beliebtheit, da sie eine

Detektion der Proben-DNA bzw. der Amplifikationsprodukte in Echtzeit und zugleich die Bestimmung der Menge einer Proben-DNA erlaubt.

[0013] Die Bestimmung der DNA-Menge am Ende einer PCR lässt aus vielerlei Gründen nicht direkt Rückschlüsse auf die Zahl der ursprünglich vorliegenden Moleküle zu, da z.B. am Anfang wie auch am Ende der PCR die Bedingungen für die Polymerasen nicht unbedingt optimal sind und daher die Amplifikation nicht über die ganze Reaktionszeit gleichmäßig abläuft. Daher kann die Quantifizierung am Ende einer PCR sehr ungenau sein. Wesentlich genauere Quantifizierungen sind möglich, wenn die Anzahl gebildeter DNA-Moleküle schon während der Reaktion, also nach jedem einzelnen Zyklus, erfasst wird. Diese Quantifizierung geschieht in der Regel über eine Fluoreszenzmarkierung der neu synthetisierten DNA-Moleküle. Besonders in der medizinischen Diagnostik aber auch in der Targetsuche und in der Grundlagenforschung ist eine Mengenbestimmung der Proben-DNA unumgänglich, weshalb in diesen Bereichen eine Quantifizierungsmöglichkeit in Echtzeit sehr gefragt ist.

[0014] Bei einer herkömmlichen PCR-Anwendung wird das Reaktionsgemisch, nämlich eine Nukleinsäure enthaltende Probe ("Template-DNA"), Primer, Nukleotide, Polymerase und Puffer in einem Reaktionsgefäß gemischt, wobei üblicherweise zwischen 10 µl und 100 µl Reaktionsgemisch im Reaktionsgefäß eingesetzt werden. Das Reaktionsgefäß wird in einer Aufnahmeeinheit fixiert und einer Anzahl an Temperaturzyklen ausgesetzt. Bei den Aufnahmeeinheiten handelt es sich in der Regel um temperierbare Metallblöcke, die mit Vertiefungen zur Aufnahme der Reaktionsgefäße ausgestattet sind. Bei den Reaktionsgefäßen, deren Fassungsvermögen in einem Bereich von etwa 200 µl bis 500 µl Volumen liegt, handelt es sich in der Regel um einzelne, verschließbare Gefäße oder um Streifen oder Platten mit mehreren Vertiefungen, sogenannte Multi-Well-Streifen bzw. -Platten. Anzahl und relative Abstände der Vertiefungen der Multi-Well-Platten oder -Streifen sind dabei auf die Vertiefungen der temperierbaren Metallblöcke abgestimmt, so dass eine Fixierung in den Metallblöcken möglich ist.

[0015] Bei allen in diesen herkömmlichen PCR-Anwendungen in der Regel eingesetzten Vorrichtungen werden die Temperaturzyklen durch ein immer wiederkehrendes Aufheizen und Abkühlen der temperierbaren Blöcke generiert, wobei die Steuerung meist über Peltier-Elemente erfolgt. Ein großer Nachteil an diesen sich wiederholenden Aufheiz- und Abkühlphasen ist der dafür notwendige Zeitaufwand.

[0016] Je nach Anbieter, Qualität und Preisklasse weisen die erhältlichen Vorrichtungen deutliche Unterschiede in Heiz- und Kühlraten der temperierbaren Blöcke auf. Als Faustwert für die Aufheizphase kann eine Rate von ca. 1°C bis 10°C pro Sekunde angegeben werden, die Kühlraten liegen noch etwas niedriger. Für das Erreichen der jeweilig gewünschten Zieltemperaturen pro Zyklus ist also ein Zeitaufwand zwischen 15 Sekunden und 2 Minuten erforderlich, womit sich bei 30 Zyklen für das Heizen und Kühlen ein Zeitbedarf von bis zu einer Stunde ergibt. Gerade für Labors mit hohem Probendurchsatz stellt dieser Zeitaufwand eine Limitierung ihrer Effizienz dar.

[0017] Bestrebungen zur Entwicklung alternativer, vor allem schnellerer und effizienterer Vorrichtungen zur Temperatur-Zyklisierung haben zum Beispiel dazu geführt, mehrere Temperiereinheiten bereitzustellen und die Proben zwischen den Temperiereinheiten zu bewegen. So offenbart beispielsweise die WO 90/05023 ein Gerät zum wahlweisen Einstellen der Temperatur einer Probe auf verschiedene Werte umfassend einen Probenaufnahmeblock mit hoher Wärmeleitfähigkeit und eine Vorrichtung zur Einstellung der Temperatur mit mindestens zwei thermostatisierbaren Körpern. Der Probenaufnahmeblock wird über eine Transporteinrichtung in Kontakt mit einem der Körper gebracht. Die Bewegung des Probenaufnahmeblockes erfolgt in Form einer Verschiebung, so dass zu einer definierten Zeit jede Probe einer bestimmten Temperatur ausgesetzt ist.

[0018] Daneben stellt die WO 2008/034896 A2 eine Vorrichtung zur Durchführung einer real-time PCR zur Verfügung, bei der jede Probe sequentiell mit unterschiedlichen Temperaturzonen in Kontakt gebracht werden kann, indem das Probengefäß, nämlich die Reaktionskammer, mittels eines Schrittmotors schrittweise von einer Temperaturzone zu einer anderen Temperaturzone bewegt wird.

[0019] Ferner beschreibt die US 2002/0110899 A1 einen "Rotations-Thermocycler" mit mehreren Stationen zur Aufnahme von Probengefäßen, wobei die Stationen zur Einstellung verschiedener Temperaturen ausgelegt sind. Die Proben können mit Mitteln zur Bewegung der Probengefäße schrittweise von einer Station zur nächsten bewegt werden. Damit kann jede Probe aufeinander folgend den verschiedenen Temperaturen ausgesetzt werden.

[0020] Die US 6,875,602 B2 offenbart einen tragbaren Thermocycler, bei dem mehrere Heizblöcke auf einer rotierenden Platte angeordnet sind. Die Probengefäße können in Form von Kapillarröhrchen ausgebildet und in Kassetten angeordnet sein und werden schrittweise zu den Heizblöcken bewegt. Die Kapillarröhrchen mit den aufgenommenen Proben werden durch die schrittweise Bewegung der Kassetten von einer Temperaturzone zu einer anderen Temperaturzone bewegt und damit aufeinanderfolgend den verschiedenen Temperaturen ausgesetzt.

[0021] Zwar geht bei allen genannten Vorrichtungen zur Durchführung einer PCR die Temperierung der Proben aufgrund des Transfers der Proben von einer Temperiereinheit zur nächsten schneller als bei herkömmlichen Vorrichtungen, bei denen ein wiederholtes Aufheizen und Abkühlen einer einzigen Temperiereinheit vorgesehen ist, jedoch stellt sich durchwegs das Problem, dass der Wärmeübertrag von der Temperiereinheit in das Probengefäß und damit auf die Probe nicht optimal ist. Durch die meist geringen Kontaktflächen zwischen Probengefäß und Temperiereinheit, beispielsweise bei Flachbodengefäßen, die auf einer temperierbaren Station abgestellt werden, sind längere Inkubations-

zeiten notwendig, um einen Temperaturübertrag auf die Probe zu gewährleisten, damit an jeder Stelle des Probenvolumens die gewünschte Temperatur erreicht wird und für die Dauer der gewünschten Reaktionszeit vorherrscht. Letztlich führen die beschriebenen Vorrichtungen also zu keiner deutlich spürbaren Zeitersparnis gegenüber herkömmlicher PCR-Geräte.

[0022] Bei einem weiteren alternativen Verfahren zur Durchführung einer PCR wird das Reaktionsgemisch durch einen Kanal bewegt, der wiederholt verschiedene Temperaturzonen durchläuft. Ein derartiges PCR-Verfahren und eine Vorrichtung zu dessen Durchführung wird beispielsweise in der EP 1 584 692 B1 offenbart. Hier werden Scheiben beschrieben, auf denen konzentrische Temperaturzonen z. B. mittels zweier Infrarot-Ringheizgeräte definiert werden. Ein Kanal durchläuft diese Temperaturzonen in Zick-Zack-Form. Das Reaktionsgemisch wird durch Rotation der Scheibe mittels Fliehkraft durch den Kanal bewegt und passiert somit die verschiedenen Temperaturzonen.

[0023] Nachteilig an der in der EP 1 584 692 B1 beschriebenen Vorrichtung ist, dass die Flussrate des Reaktionsgemisches und somit die Verweildauer in den einzelnen Temperaturzonen über die Rotationsgeschwindigkeit der Scheibe eingestellt wird. Diese Flussrate kann jedoch je nach Viskosität der eingesetzten Probe sehr unterschiedlich ausfallen, wodurch eine sinnvolle und gleichmäßige Thermozyklisierung für jede Probe neu ermittelt werden müsste. Die beschriebenen Scheiben stellen zudem ein sehr aufwändiges und damit teures Verbrauchsmaterial dar.

[0024] In der DE 694 29 038 T2 wird eine Vorrichtung zur Nukleinsäurevervielfältigung offenbart, die eine Kapillarröhren-Reaktionskammer, eine erste und zweite Heizeinrichtung sowie eine Positioniervorrichtung umfasst. Das Inkontaktbringen der Probe mit unterschiedlichen Temperaturbereichen erfolgt u.a. durch ein "Hindurchpumpen" der Probe durch die Kapillarröhre oder durch eine Bewegung der Heizeinrichtung. Sowohl ein Hindurchpumpen der Probe durch die Kapillarröhren als auch eine Bewegung der Heizeinrichtung ist umständlich und erfordert einen relativ hohen technischen Aufwand.

[0025] Aus der WO 2008/146754 A1 ist eine Vorrichtung zur Durchführung eines PCR-Verfahrens mit einer scheibenförmigen Probenzelle bekannt. Die Probenzelle weist einen Hohlraum zur Aufnahme einer Probe auf. Die Vorrichtung umfasst drei unabhängig voneinander regulierbare temperierbare Blöcke, wobei in bestimmten Positionen der Hohlraum der Probenzelle mit zwei der temperierbaren Blöcke in Kontakt steht. Nachteilig am Gegenstand der WO 2008/146754 A1 sind die relativ langen Zeiträume, die zur Anpassung der am Ort der Probe herrschenden Temperatur erforderlich sind.

[0026] Schließlich offenbart auch die US 2002/081669 A1 eine Vorrichtung zur Durchführung eines PCR-Verfahrens mit einer scheibenförmigen Probenzelle. Die Probenzelle weist eine Mehrzahl von Reaktionskammern auf. Die Vorrichtung umfasst drei unabhängig voneinander regulierbare temperierbare Blöcke, wobei in bestimmten Positionen eine Reaktionskammer der Probenzelle mit zwei der temperierbaren Blöcke in Kontakt steht. Nachteilig am Gegenstand der US 2002/081669 A1 sind wiederum die relativ langen Zeiträume, die zur Anpassung der am Ort der Probe herrschenden Temperatur erforderlich sind.

Darstellung der Erfindung

[0027] Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, eine Vorrichtung zur Durchführung einer PCR zur Verfügung zu stellen, die eine sehr schnelle Thermozyklisierung erlaubt und dabei einfach in der Handhabung und zugleich kostengünstig und universell einsetzbar ist.

[0028] Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die Vorrichtung gemäß dem unabhängigen Patentanspruch 1 gelöst. Weitere vorteilhafte Details, Aspekte und Ausgestaltungen der vorliegenden Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen, der Beschreibung, den Figuren und den Beispielen.

[0029] Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden folgende Abkürzungen und Begriffe benutzt:

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
A	Adenin
G	Guanin
C	Cytosin
T	Thymin
U	Uracil
Base	A, G, T, C oder U
bp	Basenpaar

EP 2 337 633 B1

	dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat; eine Mischung aus dATP (Desoxyadenosintriphosphat), dCTP (Desoxycytosintriphosphat), dGTP (Desoxyguanintriphosphat) und dTTP (Desoxythymintriphosphat) als Bausteine für die DNA-Synthese; äquivalent zu Nukleotide
5	Nukleinsäure-	Nukleinsäure nicht näher spezifizierter Basenlänge (z.B.
	Oligomer	Nukleinsäure-Oktamer: Eine Nukleinsäure mit beliebigem Rückgrat, bei der 8 Pyrimidin- oder Purin-Basen kovalent aneinander gebunden sind).
10	ns-Oligomer	Nukleinsäure-Oligomer
	Oligomer	Äquivalent zu Nukleinsäure-Oligomer.
15	Oligonukleotid	Äquivalent zu Oligomer oder Nukleinsäure-Oligomer, also z.B. ein DNA-, PNA- oder RNA-Fragment nicht näher spezifizierter Basenlänge.
	Oligo	Abkürzung für Oligonukleotid.
20	Basenabfolge	Äquivalent zu Sequenz.
	Nukleotide	Äquivalent zu dNTP.
	Sequenz	Genaue Abfolge der einzelnen Basen A, C, G, T (oder U) innerhalb eines Nukleinsäuremoleküls.
25	Nukleinsäure	Wenigstens zwei kovalent verbundene Nukleotide oder wenigstens zwei kovalent verbundene Pyrimidin- (z.B. Cytosin, Thymin oder Uracil) oder Purin-Basen (z.B. Adenin oder Guanin). Der Begriff Nukleinsäure bezieht sich auf ein beliebiges "Rückgrat" der kovalent verbundenen Pyrimidin- oder Purin-Basen, wie z.B. auf das Zucker-Phosphat Rückgrat der DNA, cDNA oder RNA, auf ein Peptid-Rückgrat der PNA oder auf analoge Strukturen (z.B. Phosphoramid-, Thio-Phosphat- oder Dithio-Phosphat-Rückgrat). Wesentliches Merkmal einer Nukleinsäure im Sinne der vorliegenden Erfindung ist es, dass sie natürlich vorkommende cDNA oder RNA sequenzspezifisch binden kann.
30		
	Matrize	Als "Vorlage" dienendes Nukleinsäuremolekül; äquivalent zu Probe, Proben-Nukleinsäure, Proben-DNA oder Template.
35	DNA	Desoxyribonukleinsäure
	RNA	Ribonukleinsäure
40	Template	Proben-Nukleinsäure, die mittels der PCR amplifiziert wird; äquivalent zu Matrize
	Primer	Kurzes, einzelsträngiges Oligonukleotid mit einer Basenabfolge komplementär zu einem Abschnitt der Proben-Nukleinsäure, das der Polymerase als Startpunkt für die Synthese dient; der Primer lagert sich in einem sog. Hybridisierungsschritt (auch: Annealing) an komplementäre Abschnitte der in Einzelsträngen vorliegenden Proben-Nukleinsäure an, wodurch ein kurzer, doppelsträngiger DNA-Abschnitt zur Verfügung steht, an dem die Polymerase ansetzt und durch Anfügen weiterer komplementärer Nukleotide den zweiten DNA-Strang synthetisiert.
45		
	Polymerase	Enzym, das doppelsträngige Nukleinsäuremoleküle synthetisiert, indem es einen vorliegenden Einzelstrang als Matrize nutzt und nach dessen Sequenz die Nukleotide für den komplementären Strang aneinanderfügt. In der PCR Methode wird eine thermostabile Polymerase, z.B. <i>Taq</i> -Polymerase (die ursprünglich aus einem thermophilen Organismus <i>Thermus aquaticus</i> isoliert wurde) eingesetzt, deren optimale Arbeitstemperatur in einem Bereich von 70°C bis 74°C liegt und die auch gegenüber Temperaturen von bis zu 100°C und mehr tolerant ist.
50		
55	Mismatch	Zur Ausbildung der Watson Crick Struktur doppelsträngiger Oligonukleotide hybridisieren die beiden Einzelstränge derart, dass die Base A (bzw. C) des einen Strangs mit der Base T (bzw. G) des anderen Strangs Wasserstoffbrücken ausbildet (bei RNA ist T durch Uracil ersetzt). Jede andere Basenpaarung

bildet keine Wasserstoffbrücken aus, verzerrt die Struktur und wird als "Mismatch" bezeichnet.

ss single strand (Einzelstrang)

5 ds double strand (Doppelstrang)

Zyklus Aufeinanderfolge von Denaturierung, Hybridisierung (auch Annealing) und Verlängerung

10 **[0030]** Die vorliegende Erfindung stellt eine Vorrichtung zur Durchführung eines PCR-Verfahrens zur Verfügung, wobei die Vorrichtung wenigstens eine im Wesentlichen die Form einer Scheibe aufweisende Probenzelle mit einem Hohlraum zur Aufnahme einer Probe aufweist. Der zur Aufnahme der Probe vorgesehene Hohlraum erstreckt sich über einen Kreissektor der Probenzelle mit einem Mittelpunktswinkel von zumindest 180°. Die Vorrichtung umfasst außerdem mindestens eine erste, eine zweite und eine dritte unabhängig voneinander regulierbare Temperiereinheit und mindestens ein Mittel zur Durchführung einer Drehbewegung der Probenzelle, wobei die drei Temperiereinheiten drei räumlich
15 voneinander getrennte Temperaturzonen definieren. Der zur Aufnahme der Probe vorgesehene Hohlraum kann aufgrund der Drehbewegung der Probenzelle durch die drei Temperaturzonen bewegt werden, wobei der Hohlraum unabhängig von der Position der Probenzelle mit zumindest zwei Temperaturzonen in Kontakt steht.

[0031] Aufgrund der Drehbewegung der Probenzelle und der damit verbundenen Bewegung der im Hohlraum aufgenommenen Probe durch die drei Temperaturzonen werden die zeitraubenden, wiederholten Aufheiz- und Abkühlschritte während einer PCR vermieden. Bei dem Mittel zur Durchführung einer Drehbewegung handelt es sich bevorzugt um eine Achse, die durch einen entsprechenden Antrieb in Rotation versetzt wird. Die Probenzelle wird bevorzugt so auf der Achse fixiert, dass die Achse in einer im Wesentlichen senkrechten Richtung die Probenzelle durchdringt. Ganz besonders bevorzugt durchdringt die Achse die Probenzelle näherungsweise in einem Bereich um deren Mittelpunkt. Durch eine beispielsweise rotationssymmetrische Anordnung der einzelnen Temperiereinheiten um diese rotierbare
25 Achse wird die Probenzelle mittels einer Drehbewegung gleichmäßig durch die Temperaturzonen hindurch bewegt.

[0032] Der erfindungsgemäße gleichzeitige Kontakt des zur Aufnahme der Probe vorgesehenen Hohlraumes mit zumindest zwei Temperaturzonen wirkt sich positiv auf Effektivität und Schnelligkeit einer PCR-Reaktion aus. Einzelne Abschnitte des Hohlraumes, welche jeweils ein Teilvolumen der Probe aufnehmen, stehen mit je einer Temperaturzone in Kontakt. Der Temperaturangleich dieser geringeren Teilvolumina an die zur Durchführung der PCR-Reaktion notwendigen Temperaturen erfolgt aufgrund des verminderten Volumens sehr schnell. Zudem können sich in verschiedenen Hohlraumabschnitten gleichzeitig unterschiedliche Temperaturen einstellen. Die Verminderung des zu temperierenden Volumens und die Parallelisierung der Heiz- und Kühlschritte für einzelne Teilvolumina führen zu einer Zeitersparnis von bis zu zwei Minuten pro PCR-Zyklus.

[0033] Aufgrund der schnellen Temperaturwechsel können zudem unerwünschte Nebenreaktionen minimiert werden. So werden beispielsweise die bei langsamer Abkühlung immer wieder auftretenden, "zufälligen" Hybridisierungen von Primern und/oder Template-DNA drastisch reduziert, was dazu führt, dass die PCR während der gesamten Reaktionszeit gleichmäßig abläuft. Ebenso wird durch die schnellen Temperaturwechsel die Fehlerhäufigkeit der Polymerase vermindert, da sich bei langsamen Temperaturübergängen über längere Zeiträume vorherrschende Temperaturen ergeben, bei denen die Polymerase zwar aktiv ist, aber nicht optimal arbeiten kann und daher fehleranfällig ist.

40 **[0034]** Erfindungsgemäß steht der zur Aufnahme der Probe vorgesehene Hohlraum unabhängig von der Position der Probenzelle mit zumindest zwei Temperaturzonen in Kontakt. Dadurch wird gewährleistet, dass die PCR-Reaktion zu jedem Zeitpunkt und bei jeder Umdrehungsposition der Probenzelle aufgrund der oben erwähnten positiven Effekte effektiver und schneller abläuft.

[0035] Erfindungsgemäß weist die Probenzelle im Wesentlichen die Form einer Scheibe auf und der zur Aufnahme der Probe vorgesehene Hohlraum erstreckt sich über einen Kreissektor mit einem Mittelpunktswinkel von zumindest 180°. Bevorzugt erstreckt sich der Hohlraum über einen Kreissektor mit einem Mittelpunktswinkel von näherungsweise 360°. Ebenso bevorzugt sind Ausführungsformen bei denen sich der zur Aufnahme der Probe vorgesehene Hohlraum über einen Kreissektor mit einem Mittelpunktswinkel von rund 225° oder rund 270° erstreckt. Durch die flache Grundform der Scheibe und dem in der Scheibe angeordneten Hohlraum, welcher beispielsweise über ein spanendes Fertigungsverfahren, wie z. B. Fräsen in die Scheibe eingebracht ist, ist das Oberfläche/Volumen-Verhältnis für einen möglichst schnellen Wärmeübertrag optimal ausgelegt.

55 **[0036]** Besonders vorteilhaft weist der zur Aufnahme der Probe in der Probenzelle vorgesehene Hohlraum in den Ausführungsformen, in denen er sich über einen Kreissektor mit einem Mittelpunktswinkel von näherungsweise 360° erstreckt, im Wesentlichen die Form eines Hohlzylinders auf. Unter dem Ausdruck "im Wesentlichen die Form eines Hohlzylinders aufweisend" ist zu verstehen, dass die Form des zur Aufnahme der Probe vorgesehenen Hohlraums von einem idealen Hohlzylinder abweicht, da zumindest eine, in der Regel aber zwei Öffnungen zum Einfüllen der Probe vorgesehen sind. Der Hohlraum weist also zwei Enden auf und ist nicht zu einem idealen Hohlzylinder geschlossen. In Ausführungsformen, in denen sich der Hohlraum über einen Kreissektor mit einem Mittelpunktswinkel kleiner 360°

erstreckt, nimmt der Hohlraum entsprechend bevorzugt die Form von Teilen eines Hohlzylinders ein.

[0037] Durch die Wahl eines Hohlzylinders bzw. von Teilen eines Hohlzylinders wird ein gutes Verhältnis von Oberfläche zu Volumen erreicht. Die Radien des Hohlzylinders sind dabei so gewählt, dass das für eine PCR notwendige Reaktionsvolumen vom Hohlzylinder aufgenommen werden kann. Der Hohlzylinder endet in der Regel in zwei Öffnungen, die dem Einfüllen der Proben dienen. Bei Einfüllen der Probe durch eine Öffnung kann die im Hohlzylinder enthaltene Luft durch die zweite Öffnung entweichen und die Probe wird dadurch gleichmäßig verteilt. Nach dem Befüllen können die Öffnungen durch geeignete Stopfen oder durch Laborfett und Cyanoacrylat flüssigkeitsdicht verschlossen werden.

[0038] Besonders bevorzugt sind Ausführungsformen, bei denen mehrere Hohlzylinder konzentrisch in der Probenzelle ausgebildet sind, oder aber mehrere Teile eines Hohlzylinders konzentrisch und/oder auf einer Kreislinie in der Probenzelle angeordnet sind. Dadurch können mehrere PCR-Anwendungen parallel mittels einer einzigen Probenzelle durchgeführt werden.

[0039] Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Probenzelle zweiteilig in Form einer Haltevorrichtung für eine Kapillare und einer Kapillare zur Aufnahme der Probe ausgebildet ist, wobei die Kapillare im Klemmsitz mit der Haltevorrichtung verbunden ist. Insbesondere bevorzugt weist die Haltevorrichtung dabei im Wesentlichen die Form einer Scheibe mit einer Oberseite, einer Unterseite und einem Scheibenrand auf und zur Aufnahme der Kapillare ist eine Ausnehmung an der Oberseite, an der Unterseite oder am Scheibenrand vorgesehen. Besondere Vorteile ergeben sich, wenn es sich um eine umlaufende Ausnehmung handelt, da sich in diesem Fall die Möglichkeit bietet, beispielsweise eine längere Kapillare oder aber zwei oder mehrere kürzere Kapillaren in beliebiger Anordnung einzuklemmen, wodurch wiederum mehrere PCR-Anwendungen parallel mittels einer einzigen Probenzelle durchgeführt werden können.

[0040] Die Kapillare ist im günstigsten Fall so im Klemmsitz in der Ausnehmung der Haltevorrichtung befestigt, dass lediglich höchstens der halbe Umfang der Kapillarenwand von der Ausnehmung aufgenommen ist. Dadurch ist gewährleistet, dass zumindest der halbe Umfang der Kapillarenwand an der Oberseite, an der Unterseite oder am Scheibenrand der Haltevorrichtung mit deren Oberfläche bzw. deren Rand abschließen oder darüber hinausragen, wodurch ein ausreichender Kontakt zu den Temperiereinheiten und der damit verbundene optimale Wärmeübertrag sichergestellt wird.

[0041] Die mit der Haltevorrichtung verbundenen Kapillaren sind beispielsweise aus Polypropylen, aus Polycarbonat oder aus Teflon hergestellt und können zum Beispiel nach dem Befüllen mit der Probe dicht verschlossen werden, indem sie an beiden Enden über einer kleinen Flamme zugeschmolzen werden.

[0042] Vorteilhaft weisen die erste, die zweite und die dritte Temperiereinheit jeweils mindestens einen temperierbaren Block auf. Die temperierbaren Blöcke sind dabei aus einem gut wärmeleitfähigen Material, vorzugsweise aus Metall, besonders bevorzugt aus Aluminium, gefertigt. Diese Blöcke können mittels eines geeigneten Bauteils zur Energieübertragung, bevorzugt z.B. mittels einer Heizmatte oder eines Peltierelementes und mittels eines geeigneten Bauteils zur Temperaturmessung, z.B. mittels eines Platinwiderstands mit Hilfe einer geeigneten Regelelektronik (z.B. einem PID-Regler) auf die gewünschten Temperaturen gebracht werden.

[0043] Die mittels der Temperiereinheiten definierten Temperaturzonen können mit geeigneten, isolierenden Materialien ausgedehnt oder erweitert werden. So kann beispielsweise über einen, über zwei oder über alle drei temperierbaren Blöcke ein größer dimensionierter, offener Hohlkörper aus Polystyrolschaumstoff (Styropor), gestülpt sein, wodurch eine gewünschte Temperatur in nahezu dem gesamten Hohlkörperinnenraum mittels des temperierbaren Blockes eingestellt werden und damit die Temperaturzone erweitert werden kann. Gleichzeitig werden die einzelnen Temperaturzonen dadurch gegeneinander isoliert. Neben Styropor eignen sich als isolierende Materialien etliche aus der Wärmedämmung bekannte Stoffe wie zum Beispiel mineralische Fasern in Form von Steinwolle oder Glaswolle, aber auch Holzwolle, Hanf, Filz oder Kork.

[0044] Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung weisen die temperierbaren Blöcke der ersten, der zweiten und der dritten Temperiereinheit jeweils eine Einkerbung zur wenigstens teilweisen Aufnahme der Probenzelle auf. Durch die Einkerbungen werden zumindest die Randbereiche der Probenzelle von den temperierbaren Blöcken derart aufgenommen, dass sie von drei Seiten vom temperierbaren Block umgeben sind und der Hohlraum mit der Probe zwischen die Blöcke eingeschoben vorliegt. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist der Hohlraum so im Randbereich der Probenzelle angeordnet, dass die den Hohlraum umgebende Wand der Probenzelle sowohl auf der Oberseite der vorzugsweise scheibenförmigen Probenzelle, als auch auf der Unterseite und am Scheibenrand eine Dicke von weniger als 500 µm aufweist. Die Probe steht somit auf drei Seiten in engem Kontakt mit dem jeweiligen temperierbaren Block, was zu einer schnellen Temperaturanpassung der im Hohlraum befindlichen Probe führt.

[0045] Besonders bevorzugt kann die Spaltbreite der Einkerbung durch eine geeignete Verstelleinheit wie z.B. Langlöcher variiert und dadurch der Kontakt zwischen Probenzelle und Block optimal eingestellt werden. Dadurch wird zum einen ein guter Wärmeübertrag gewährleistet, zum anderen können Probenzellen unterschiedlicher Abmessungen und Geometrien verwendet werden. Zusätzliches Einbringen von Schmiermittel, vorzugsweise Mineralöl ermöglicht eine reibungsarme Bewegung der Probenzelle und führt zudem zu einer verbesserten Wärmeübertragung.

[0046] Besonders bevorzugt weist die einer Temperiereinheit zugewandte Wand der Probenzelle zumindest im Bereich

des zur Aufnahme der Probe vorgesehenen Hohlraums eine Dicke von weniger als 500 μm , ganz besonders bevorzugt von weniger als 300 μm und insbesondere bevorzugt von weniger als 200 μm auf. Die Dicke der Wand der Probenzelle nimmt Einfluss auf die Rate der Wärmeübertragung, das heisst, je dünner die Wand, desto schneller wird die Wärme von den Temperiereinheiten auf die Probe übertragen. Gleichzeitig kann aber aus Stabilitätsgründen die Wanddicke nicht beliebig reduziert werden. Sowohl Wärmeübertrag als auch Stabilität sind wiederum abhängig von der Art des verwendeten Materials, weshalb die Wanddicke je nach Material und Geometrie der Probenzelle festgelegt wird.

[0047] Bevorzugt weist die Probenzelle einen Durchmesser zwischen 10 mm und 50 mm, besonders bevorzugt einen Durchmesser zwischen 20 mm und 30 mm auf. Die Dicke der Probenzelle beträgt bevorzugt zwischen 0,2 mm und 1,5 mm, besonders bevorzugt rund 1 mm. Der zur Aufnahme der Probe vorgesehene Hohlraum besitzt bevorzugt eine Tiefe von 0,1 mm bis 0,8 mm, besonders bevorzugt eine Tiefe von 0,5 mm, und endet in zwei Öffnungen. Der Hohlraum weist bevorzugt ein Volumen zwischen 1 μl und 50 μl , besonders bevorzugt ein Volumen von 20 μl auf und kann somit das benötigte Reaktionsvolumen eines PCR Ansatzes aufnehmen.

[0048] Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist in dem zur Aufnahme der Probe vorgesehenen Hohlraum der Probenzelle ein zur Detektion von Nukleinsäureoligomer-Hybridisierungsereignissen eingerichteter und ausgelegter Sensor, insbesondere ein zur oberflächensensitiven Detektion von Nukleinsäureoligomer-Hybridisierungsereignissen eingerichteter und ausgelegter Sensor vorgesehen. Der Sensor besteht dabei im Wesentlichen aus einer modifizierten Oberfläche, wobei die Modifikation in der Anbindung wenigstens einer Art von Sonden-Nukleinsäureoligomeren besteht. Mit dem Begriff "Oberfläche" wird jedes Trägermaterial bezeichnet, das geeignet ist direkt oder nach entsprechender chemischer Modifizierung derivatisierte oder nicht-derivatisierte Sonden-Nukleinsäureoligomere kovalent oder über andere spezifische Wechselwirkungen zu binden. Der feste Träger kann aus leitfähigem oder nicht leitfähigem Material bestehen. Verfahren zur Immobilisierung von Nukleinsäureoligomeren an einer Oberfläche sind dem Fachmann bekannt.

[0049] Vorteilhaft handelt es sich um einen zur spektroskopischen, elektrochemischen oder elektrochemolumineszenten Detektion von Nukleinsäureoligomer-Hybridisierungsereignissen eingerichteten und ausgelegten Sensor. Eine oberflächensensitive Detektion ermöglicht die Detektion von ausschließlich an die Oberfläche gebundenen Signal-Nukleinsäureoligomeren.

[0050] Besonders bevorzugt handelt es sich bei dem Sensor um einen zur elektrochemischen Detektion von Nukleinsäureoligomer-Hybridisierungsereignissen eingerichteten und ausgelegten DNA-Chip. In diesem Fall weist die modifizierte Oberfläche zumindest 2 räumlich im Wesentlichen abgetrennte Bereiche, bevorzugt zumindest 4 und insbesondere zumindest 12 räumlich im Wesentlichen abgetrennte Bereiche auf. Besonders bevorzugt weist die modifizierte Oberfläche zumindest 32, insbesondere zumindest 64, ganz besonders bevorzugt zumindest 96 räumlich im Wesentlichen abgetrennte Bereiche auf.

[0051] Unter "räumlich im Wesentlichen abgetrennten Bereichen" werden Bereiche der Oberfläche verstanden, die ganz überwiegend durch Anbindung einer bestimmten Art von Sonden-Nukleinsäureoligomeren modifiziert sind. Lediglich in Gebieten, in denen zwei solche räumlich im Wesentlichen abgetrennte Bereiche aneinander grenzen, kann es zu einer Vermischung von verschiedenen Arten von Sonden-Nukleinsäureoligomeren kommen.

[0052] Ein ganz besonderer Vorteil ergibt sich dadurch, dass zusätzlich eine vierte Temperiereinheit vorgesehen ist, wobei die vierte Temperiereinheit eine vierte räumlich von den drei Temperaturzonen getrennte Temperaturzone definiert.

[0053] Durch das Bereitstellen einer vierten, durch eine vierte Temperiereinheit definierten und räumlich von den drei Temperaturzonen der erfindungsgemäßen Vorrichtung getrennten Temperaturzone wird es ermöglicht, Teilbereiche der Probenzelle, insbesondere den Innenbereich der Probenzelle einer Temperatur auszusetzen, die sich von den zur Durchführung der PCR erforderlichen Temperaturen unterscheidet. Durch die Wahl der Geometrie des temperierbaren Blocks der vierten Temperiereinheit und durch die Wahl der Anordnung in der Vorrichtung kann der Bereich der Probenzelle, der sich in der vierten Temperaturzone befindet, festgelegt werden. Ebenso kann die Dauer und die Häufigkeit der Inkubation in der vierten Temperaturzone durch die Einstellung der Drehgeschwindigkeit der Probenzelle, frei gewählt werden.

[0054] Die vierte Temperaturzone erweist sich als besonders vorteilhaft für eine Detektion von Nukleinsäureoligomer-Hybridisierungsereignissen mittels eines Sensors. Dabei wird der Bereich der Probenzelle, in dem sich der Sensor befindet, in der vierten Temperaturzone positioniert, wodurch optimale Temperaturbedingungen für eine Detektion geschaffen werden. Insbesondere bei der Verwendung eines DNA-Chips als Sensor kann eine für diese Art der Detektion günstige Temperatur von rund 50°C eingestellt werden.

[0055] Die vorliegende Erfindung umfasst auch die Verwendung der erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Durchführung einer PCR, insbesondere zur Durchführung einer Real-Time PCR.

[0056] Bei Verwendung der erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Durchführung einer PCR, kann besonders vorteilhaft ein Analyseverfahren in einem externen Detektionssystem an die PCR angeschlossen werden. Als externes Detektionssystem kommt beispielsweise eine miniaturisierte Gelelektrophorese-Kapillare in Frage. Um Kontaminationsgefahren durch einen Flüssigkeitstransfer von der Probenzelle zur Gelelektrophorese-Kapillare weitestgehend auszuschließen

ßen, ist es sinnvoll ein "quasi geschlossenes" System auszubilden. Zu diesem Zweck weist die Wand der Probenzelle in einem Bereich, in dem der Hohlraum ausgebildet ist, bevorzugt eine kreisförmige Sollbruchstelle auf. Die Sollbruchstelle ist dabei genau an den Durchmesser der Kapillare angepasst, so dass durch Aufdrücken der Kapillare auf die Sollbruchstelle die Wand der Probenzelle an dieser Stelle durchbrochen wird, die Kapillare dadurch flüssigkeitsdicht in die Wand der Probenzelle eindringen kann und die im Hohlraum befindliche Flüssigkeit durch Kapillarkräfte in die Kapillare gezogen wird.

[0057] Die erfindungsgemäße Vorrichtung zur Durchführung einer PCR kann in ganz besonders vorteilhafter Weise in Kombination mit einem Verfahren zur Detektion von Nukleinsäureoligomer-Hybridisierungsereignissen als Endpunktanzeige und/oder in Echtzeit eingesetzt werden. Die Detektion der PCR-Produkte erfolgt dabei durch einen zur Detektion von Nukleinsäureoligomer-Hybridisierungsereignissen eingerichteten und ausgelegten Sensor, der in dem zur Aufnahme der Probe vorgesehenen Hohlraum der Probenzelle vorgesehen ist. Besonders bevorzugt handelt es sich um einen zur oberflächensensitiven Detektion von Nukleinsäureoligomer-Hybridisierungsereignissen eingerichteten und ausgelegten Sensor.

[0058] Besonders bevorzugt handelt es sich bei dem Verfahren zur Detektion von Nukleinsäureoligomer-Hybridisierungsereignissen um ein Endpunktverfahren zur Detektion der PCR-Produkte umfassend die Schritte Bereitstellen einer modifizierten Oberfläche, wobei die Modifikation in der Anbindung wenigstens einer Art von Sonden-Nukleinsäureoligomeren besteht, Bereitstellen wenigstens einer Art von Signal-Nukleinsäureoligomeren, wobei die Signal-Nukleinsäureoligomere mit zumindest einem Detektionslabel modifiziert sind und die Signal-Nukleinsäureoligomere einen zu den Sonden-Nukleinsäureoligomeren komplementären oder weitgehend komplementären Abschnitt besitzen, Bereitstellen einer Probe mit Target-Nukleinsäureoligomeren, Inkontaktbringen einer definierten Menge der Signal-Nukleinsäureoligomere mit der modifizierten Oberfläche und Inkontaktbringen der Probe und der darin enthaltenen Target-Nukleinsäureoligomere mit der modifizierten Oberfläche, Detektion der Signal-Nukleinsäureoligomere und Vergleich der bei der Detektion der Signal-Nukleinsäureoligomere erhaltenen Werte mit Referenzwerten. Die Signal-Nukleinsäureoligomere besitzen dabei eine größere Anzahl an Basen als die Sonden-Nukleinsäureoligomere und weisen zumindest einen Andockabschnitt auf, wobei der Andockabschnitt keine zu einem Abschnitt der Sonden-Nukleinsäureoligomere komplementäre oder weitgehend komplementäre Struktur aufweist und wobei die Target-Nukleinsäureoligomere einen zu dem Andockabschnitt komplementären oder weitgehend komplementären Abschnitt besitzen.

[0059] Durch den Andockabschnitt erfolgt die Assoziation der Target-Nukleinsäureoligomere an die Signal-Nukleinsäureoligomere mit sehr hoher Rate. In anderen aus dem Stand der Technik bekannten Verdrängungsassays zur Detektion von Nukleinsäureoligomer-Hybridisierungsereignissen liegen Sonden-Nukleinsäureoligomere und Signal-Nukleinsäureoligomere bei Zugabe der Target-Nukleinsäureoligomere bzw. Sonden-Nukleinsäureoligomere und Target-Nukleinsäureoligomere bei Zugabe der Signal-Nukleinsäureoligomere als hybridisierter Doppelstrang vor. Vor einer Bindung der zugegebenen Nukleinsäureoligomer-Komponente müssen entsprechend die Bindungen des hybridisierten Doppelstrangs gelöst werden.

[0060] Im Gegensatz dazu besitzen die beiden Nukleinsäureoligomer-Komponenten Sonden-Nukleinsäureoligomere und Signal-Nukleinsäureoligomere gemäß dem oben beschriebenen Verfahren eine unterschiedliche Anzahl an Basen. Die Signal-Nukleinsäureoligomere weisen eine größere Zahl an Basen auf und stellen einen Andockabschnitt zur Verfügung, der in einem nicht-hybridisierten Zustand vorliegt, da er keine zu einem Abschnitt der Sonden-Nukleinsäureoligomere komplementäre oder weitgehend komplementäre Struktur aufweist.

[0061] Gleichzeitig weisen nun aber die Target-Nukleinsäureoligomere einen zu dem Andockabschnitt komplementären oder weitgehend komplementären Abschnitt auf. Bei Zugabe der Target-Nukleinsäureoligomere können diese direkt ohne vorherige Verdrängung einer hybridisierten Komponente an diesen Andockabschnitt binden. Im Zuge der nachfolgenden Hybridisierung mit den Signal-Nukleinsäureoligomeren muss zwar die hybridisierte Nukleinsäureoligomer-Komponente verdrängt werden, allerdings erfolgt diese Verdrängung aufgrund der bereits erfolgten Hybridisierung mit dem Andockabschnitt mit einer deutlich höheren Geschwindigkeit.

[0062] Ein weiteres Verfahren zur Detektion von Nukleinsäureoligomer-Hybridisierungsereignissen, das in besonders vorteilhafter Weise unter Verwendung der erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Durchführung einer PCR, insbesondere einer real-time PCR durchgeführt werden kann, umfasst die Schritte Bereitstellen einer modifizierten Oberfläche, wobei die Modifikation in der Anbindung wenigstens einer Art von Sonden-Nukleinsäureoligomeren besteht, Bereitstellen einer Probe mit Target-Nukleinsäureoligomeren, Bereitstellen einer Lösung mit wenigstens einer Art von Signal-Nukleinsäureoligomeren, wobei die Signal-Nukleinsäureoligomere mit zumindest einem Detektionslabel modifiziert sind, die Signal-Nukleinsäureoligomere einen zu den Sonden-Nukleinsäureoligomeren komplementären oder weitgehend komplementären Abschnitt besitzen und die Signal-Nukleinsäureoligomere einen zu den Target-Nukleinsäureoligomeren komplementären oder weitgehend komplementären Abschnitt besitzen, Vermischen der Lösung mit Signal-Nukleinsäureoligomeren und der Probe mit Target-Nukleinsäureoligomeren, Inkontaktbringen des Gemisches von Signal-Nukleinsäureoligomeren und Target-Nukleinsäureoligomeren mit der modifizierten Oberfläche, Detektion der Signal-Nukleinsäureoligomere durch eine oberflächensensitive Detektionsmethode, Amplifizierung der Target-Nukleinsäureoligomere, Detektion der Signal-Nukleinsäureoligomere durch eine oberflächensensitive Methode, Vergleich der bei den beiden De-

tektionen der Signal-Nukleinsäureoligomere erhaltenen Werte.

[0063] Unter einer "weitgehend komplementären Struktur" werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung Sequenzabschnitte verstanden, bei denen maximal 20% der Basenpaare Mismatches ausbilden. Bevorzugt handelt es sich bei einer "weitgehend komplementären Struktur" im Rahmen der vorliegenden Erfindung um Sequenzabschnitte, bei denen maximal 15% der Basenpaare Mismatches ausbilden. Besonders bevorzugt handelt es sich bei einer "weitgehend komplementären Struktur" um Sequenzabschnitte, bei denen maximal 10% der Basenpaare Mismatches ausbilden und ganz besonders bevorzugt um Sequenzabschnitte, bei denen maximal 5% der Basenpaare Mismatches ausbilden.

[0064] Die Detektion der Signal-Nukleinsäureoligomere erfolgt besonders bevorzugt durch eine oberflächensensitive Detektionsmethode, da in diesem Fall ausschließlich die an die Oberfläche gebundenen Signal-Nukleinsäureoligomere detektiert werden. Besonders bevorzugt sind in diesem Zusammenhang spektroskopische, elektrochemische und elektrochemolumineszente Methoden. Als spektroskopisches Verfahren wird besonders eine Detektion der Fluoreszenz, insbesondere der Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) der Signal-Nukleinsäureoligomere bevorzugt.

[0065] Zur oberflächensensitiven elektrochemischen Detektion werden bevorzugt Cyclovoltametrie, Amperometrie, Chronocoulometrie, Impedanzmessung oder Scanning Electrochemical Microscopy (SECM) eingesetzt.

[0066] Die vorliegende Erfindung umfasst auch ein Verfahren zur Durchführung einer PCR unter Verwendung der erfindungsgemäßen Vorrichtung, wobei die Probenzelle durch die räumlich voneinander getrennten Temperaturzonen mittels einer Drehbewegung bewegt wird. Mit der Wahl der Drehgeschwindigkeit der Probenzelle und deren Abstimmung auf die Geometrie der temperierbaren Blöcke wird die Verweildauer der Probe in den verschiedenen Temperaturzonen und damit die Dauer der Schritte eines PCR-Zyklus festgelegt. Da die verschiedenen Temperaturen bereits durch die Temperiereinheiten vorgegeben sind, können mit einer einzigen Parametereinstellung, nämlich der Einstellung der Drehgeschwindigkeit der Probenzelle alle notwendigen Parameter für die PCR-Zyklen festgelegt werden. Dies führt zu einer anwenderfreundlichen Benutzung der Vorrichtung, da eine komplizierte und aufwändige Programmierung entfällt. Bevorzugt wird die Probenzelle mit konstanter Geschwindigkeit bewegt.

[0067] Insbesondere bevorzugt wird ein Verfahren zur Durchführung einer PCR unter Verwendung der erfindungsgemäßen Vorrichtung bereitgestellt, in dem sich der DNA-Chip während der Durchführung einer elektrochemischen Detektion von Nukleinsäureoligomer-Hybridisierungsereignissen in der vierten Temperaturzone befindet. Die zur elektrochemischen Detektion mit Hilfe eines DNA-Chips günstigen Temperaturen unterscheiden sich in der Regel von den für die PCR-Schritte erforderlichen Temperaturen. Durch die vierte Temperaturzone können PCR und Detektion bei den jeweils vorteilhaften Temperaturen ablaufen.

[0068] Ein besonderer Vorteil ergibt sich aus der Verwendung der erfindungsgemäßen Vorrichtung in einem der oben dargestellten Verfahren dadurch, dass PCR-Reaktion und z. B. die Detektion von DNA-Molekülen in einer einzigen Probenzelle durchgeführt werden können und kein Pipettierschritt zum Probentransfer, also kein sogenanntes "liquid handling" notwendig ist.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0069] Die Erfindung soll nachfolgend anhand von Ausführungsbeispielen im Zusammenhang mit den Figuren näher erläutert werden. Es wird aber ausdrücklich darauf hingewiesen, dass die Erfindung nicht auf die angegebenen Beispiele beschränkt sein soll. Es zeigen

Fig. 1 eine schematische Darstellung einer Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Durchführung einer PCR,

Fig. 2a eine schematische Darstellung einer Probenzelle mit vier Temperiereinheiten,

Fig. 2b eine schematische Darstellung mehrerer Probenzellen mit Temperiereinheiten zur parallelen Durchführung mehrerer getrennter PCR-Reaktionen,

Fig. 3 eine perspektivische Darstellung einer Ausführungsform einer Probenzelle,

Fig. 4 eine perspektivische Darstellung einer Probenzelle mit integriertem Sensor,

Fig. 5a in Draufsicht eine Ausführungsform einer zweiteiligen Probenzelle,

Fig. 5b eine schematische Darstellung eines vertikalen Schnittes der Probenzelle aus Figur 5a,

Fig. 5c eine schematische Darstellung eines vertikalen Schnittes einer weiteren Ausführungsform einer zweiteiligen Probenzelle und

Fig. 6 das Ergebnis einer vergleichenden PCR in einem Standard-PCR-Thermocycler und der erfindungsgemäßen Vorrichtung.

[0070] Die Figur 1 zeigt eine schematische Darstellung einer Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung 1 zur Durchführung einer PCR. Im vorliegenden Beispiel umfasst die erfindungsgemäße Vorrichtung 1 eine erste 2a, eine zweite 2b und eine dritte 2c unabhängig voneinander regulierbare Temperatureinheit, wodurch drei Temperaturzonen, im vorliegenden Beispiel 96°C, 55°C und 72°C, definiert werden. Die drei Temperatureinheiten 2a, 2b, 2c weisen jeweils einen temperierbaren Block 6 auf. Die drei Blöcke 6 sind aus einem gut wärmeleitfähigen Material, vorzugsweise Aluminium gefertigt, sie können aber auch aus anderen geeigneten Metallverbindungen bestehen. Zur Einstellung der gewünschten Temperatur eines jeden Blockes 6 weist die Vorrichtung 1 ein geeignetes Mittel zum Energieübertrag 13, vorzugsweise eine Heizmatte oder ein Peltierelement und ein Mittel zur Temperaturmessung, vorzugsweise einen Platinwiderstand oder ein Digitalthermometer auf. Mittels einer geeigneten Regelelektronik (z.B. PI- oder PID-Regler) können die drei Blöcke 6 exakt temperiert und damit die Temperaturzonen so definiert werden, dass die für eine PCR-Reaktion günstigen Temperaturen herrschen.

[0071] Die Temperatureinheiten 2a, 2b, 2c sind auf einer Bodenplatte 10 so angeordnet, dass sie im Wesentlichen die Eckpunkte eines Dreiecks beschreiben und ihr relativer Abstand und/oder ihre relative Position zueinander frei einstellbar ist. Grundsätzlich können die Temperatureinheiten aber auch in beliebigen anderen Geometrien angeordnet sein. Mittig zwischen den Temperatureinheiten 2a, 2b, 2c ist ein Mittel 3, 4 zur Durchführung einer Drehbewegung der Probenzelle 5 vorgesehen. Im dargestellten Beispiel umfasst das Mittel zur Durchführung einer Drehbewegung eine Achse 4, die mit der Probenzelle 5 verbunden ist, und einen Elektromotor 3. Die Probenzelle 5 des dargestellten Beispiels ist, wie es beispielhaft aus der Figur 3 ersichtlich ist, im Wesentlichen scheibenförmig ausgebildet, wobei sich der zur Aufnahme der Probe vorgesehene Hohlraum 8 über einen Kreissektor mit einem Mittelpunktswinkel von annähernd 360° erstreckt.

[0072] Jeder Block 6 der drei Temperatureinheiten 2a, 2b, 2c weist eine Einkerbung 7 auf, die zur wenigstens teilweisen Aufnahme der Probenzelle 5 ausgebildet ist. In der erfindungsgemäßen Vorrichtung 1 liegt die an der Achse 4 fixierte Probenzelle 5 in jeden Block 6 teilweise eingeschoben vor, so dass die Probenzelle 5 in jeweils einem oder mehreren Teilbereichen in den drei Temperaturzonen angeordnet ist und der Hohlraum 8 unabhängig von der Position der Probenzelle 5 mit drei Temperaturzonen in Kontakt steht.

[0073] Die Temperatureinheiten 2a, 2b, 2c weisen eine geeignete Verstelleinheit 15, vorzugsweise Langlöcher auf, über die die Spaltbreite der Einkerbungen 7 variiert und genau an die Dicke der Probenzelle 5 angepasst werden kann. Durch die geeignete Wahl der Geometrie der Blöcke 6 und durch die freie Einstellung des Abstandes der Blöcke 6 zueinander kann der Einschubbereich und die Einschubtiefe der Probenzelle 5 in die einzelnen Einkerbungen 7 reguliert werden. Dadurch kann die Größe und Anzahl der Teilbereiche der Probenzelle 5, die sich in den einzelnen Temperaturzonen befinden, festgelegt werden. Im vorliegenden Ausführungsbeispiel wurde ein Verhältnis 2:1 des Bereiches der Temperaturzone mit 72°C zu den Bereichen der Temperaturzonen mit 96°C bzw. 55°C gewählt. Zwischen den Blöcken 6 ist jeweils ein Luftspalt vorgesehen, um einen Wärmeübertrag zwischen den Blöcken 6 zu verhindern.

[0074] Über den Antrieb 3 und die Achse 4 wird die Probenzelle 5 in Rotation versetzt, so dass die einzelnen Teilbereiche der Probenzelle 5 durch die drei Temperaturzonen geführt werden. Das Einbringen eines Schmiermittels (z.B. Mineralöl) bewirkt eine reibungsarme Rotation der Probenzelle 5 sowie einen verbesserten Wärmeübertrag.

[0075] Durch Variation der Drehgeschwindigkeit bzw. Rotationsfrequenz kann die Zeit, in der die kritischen Temperaturen für die PCR-Reaktion an den einzelnen Teilbereichen der Probenzelle 5 anliegen, variiert werden.

[0076] Die in Figur 2a dargestellte Ausführungsform weist eine vierte Temperatureinheit 2d auf, wodurch eine vierte, räumlich von den drei Temperaturzonen getrennte Temperaturzone definiert wird. Die vierte Temperatureinheit 2d kann einen in der Probenzelle 5 enthaltenen Sensor 12 (siehe Figur 4), vorzugsweise einen DNA-Chip auf einer bestimmten Temperatur halten. Eine weitere Ausführungsform der Vorrichtung 1 mit mehreren Einkerbungen 7 in jedem temperierbaren Block 6 ist in der Figur 2b gezeigt. Mittels dieser Ausführungsform können mehrere getrennte PCR-Reaktionen parallel in einer Vorrichtung durchgeführt werden.

[0077] Die Figur 3 zeigt eine perspektivische Darstellung einer Ausführungsform einer Probenzelle 5. Die Probenzelle 5 weist eine flächige Grundform, vorzugsweise eine Zylinderform auf und besteht aus einem Kunststoff, der eine Temperaturbeständigkeit bis zumindest 100°C aufweist. Zur Beobachtung des Probenverhaltens ist es vorteilhaft, wenn es sich um einen transparenten Kunststoff handelt.

[0078] Die Probenzelle 5 weist bevorzugt einen Durchmesser d zwischen 10 mm und 50 mm und eine Dicke b zwischen 0,2 mm und 1,5 mm auf. Der zur Aufnahme der Probe vorgesehene Hohlraum 8 erstreckt sich über einen Kreissektor mit einem Mittelpunktswinkel von annähernd 360° und besitzt im Wesentlichen die Form eines Hohlzylinders mit einer bevorzugten Tiefe t von 0,1 mm bis 0,8 mm, welcher in zwei Öffnungen 11 endet. Der Hohlraum 8 weist ein Volumen zwischen 1 µl und 50 µl, bevorzugt 20 µl auf und kann somit das benötigte Reaktionsvolumen eines PCR Ansatzes aufnehmen.

[0079] Die Probenzelle 5 weist eine Bohrung 9 auf, mittels derer die Probenzelle 5 in der erfindungsgemäßen Vorrichtung 1 an einem Mittel 3,4 zur Durchführung einer Drehbewegung der Probenzelle 5, bevorzugt an einer rotierbaren

Achse 4, befestigt ist.

[0080] Zum Abdichten der Probenzelle 5 werden die Öffnungen 11 des Hohlraumes 8 nach Befüllen mit dem PCR-Reaktionsgemisch mit Laborfett, z.B. glisseal®N und Cyanoacrylat oder durch einen geeigneten Stopfen 16, vorzugsweise aus Gummi oder Kunststoff verschlossen.

[0081] Die Figur 4 zeigt eine perspektivische Darstellung einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Probenzelle 5 mit einem integrierten Sensor 12. Die zylinderförmige Probenzelle 5 weist einen Hohlraum 8 zur Aufnahme der Proben auf. Daneben ist eine Bohrung 9 vorgesehen, mittels derer die Probenzelle 5 in der erfindungsgemäßen Vorrichtung an einem Mittel zur Durchführung einer Drehbewegung der Probenzelle, bevorzugt an einer rotierbaren Achse, befestigt ist. Bei dem Sensor 12 handelt es sich im vorliegenden Ausführungsbeispiel um einen DNA-Chip. Der das PCR-Reaktionsgemisch enthaltende, im Wesentlichen die Form eines Hohlzylinders aufweisende Hohlraum 8, ist durch einen abzweigenden Kanal 8.1, der mit der Sensoroberfläche in Verbindung steht, erweitert. Dadurch gelangt die zu analysierende Probe, das PCR-Reaktionsgemisch, zu dem Sensor 12. Im dargestellten Ausführungsbeispiel wird mit Hilfe des integrierten Sensors 12 eine elektrochemische Detektion der PCR-Produkte durchgeführt und der Sensor 12 dazu über eine herausgeführte PCB-Leiterplatte 17 kontaktiert.

[0082] In den Figuren 5a, 5b und 5c sind weitere Ausführungsformen einer Probenzelle 5 mit Hohlraum 8, nämlich zweiteilige Ausführungsformen dargestellt. In der zweiteiligen Ausführungsform ist die Probenzelle 5 als Haltevorrichtung für eine Kapillare ausgebildet und der zur Aufnahme der Probe vorgesehene Hohlraum 8 ist durch eine Kapillare gebildet. Die Haltevorrichtung 5 weist zur Aufnahme der Kapillare 8 eine Ausnehmung 18 auf, in welche die Kapillare 8 zur klemmschlüssigen Verbindung eingeklemmt ist. Die Figur 5a zeigt eine Draufsicht auf eine zweiteilige Ausführungsform während die Figur 5b einen vertikalen Schnitt durch die in Figur 5a gezeigte Probenzelle darstellt, bei der eine umlaufende Ausnehmung 18 zur klemmschlüssigen Aufnahme der Kapillare 8 auf der Oberseite der scheibenförmigen Haltevorrichtung 5 verläuft. Die im Klemmsitz mit der Haltevorrichtung 5 verbundene Kapillare 8 nimmt einen Kreis Sektor mit einem Mittelpunktswinkel α von rund 170° ein. Die Figur 5c zeigt einen vertikalen Schnitt durch eine weitere zweiteilige Ausführungsform, bei der eine umlaufende Ausnehmung 18 zur klemmschlüssigen Aufnahme der Kapillare 8 am Scheibenrand der Haltevorrichtung 5 verläuft.

Beispiel 1: Herstellung einer Probenzelle

[0083] Die Probenzelle wird aus zwei Kunststoffteilen, nämlich einem den zur Aufnahme der Probe vorgesehenen Hohlraum enthaltenden, unteren Teil und einem oberen Teil aufgebaut.

[0084] Durch ein spanendes Fertigungsverfahren wie zum Beispiel Fräsen wird aus einem Polymethylmethacrylat-Rohling das untere, den Hohlraum enthaltende Kunststoffteil einer Probenzelle mit einem ungefähren Durchmesser von 15 mm und einer Dicke von rund 1 mm gefertigt, wobei ein ungefähr 0,5 mm tiefer Hohlraum 8 in Form eines Hohlzylinders eingefräst wird, welcher in zwei durchgehenden Öffnungen 11 endet. Im Zentrum des unteren Teils der Probenzelle wird eine Bohrung 9 eingebracht.

[0085] Zur Fertigstellung der Probenzelle wird eine Acrylglasscheibe mit einem geeigneten Klebstoff auf das untere Kunststoffteil aufgeklebt. Die Acrylglasscheibe wird dabei flüssigkeitsdicht mit dem unteren, formgebenden Acrylglasteil verbunden. Als Klebstoff für Acrylglas kann z.B. Cyanoacrylat oder Dichlormethan verwendet werden, für andere Polymere können z.T. andere Klebstoffe notwendig sein. Nach Befüllen der Zelle mit dem PCR-Reaktionsgemisch können die Öffnungen 11 des Hohlraumes 8 durch Laborfett (z.B. glisseal®N) und Cyanoacrylat oder durch einen geeigneten Gummistopfen verschlossen werden.

[0086] Für Ausführungsformen mit verbesserter Wärmeübertragung von den Temperiereinheiten 2a, 2b, 2c auf die Probenzelle 5 können Materialien mit höherer Wärmeleitfähigkeit verwendet oder die Wandstärken der Materialien reduziert werden. Ebenso sind andere Verfahren zur Verbindung des unteren, formgebenden Kunststoffteiles der Probenzelle 5 mit der oberen Kunststoffscheibe wie z.B. Schweißverfahren wie Laser-Kunststoffschweißen denkbar.

[0087] Alternative Hohlraum-Geometrien mit gegebenenfalls eingebauten Sensoren 12 können in spanenden Fertigungsverfahren, über urformende Verfahren (z.B. Spritzgusstechnik), durch stereolithographische oder andere geeignete Verfahren hergestellt werden. Ein integrierter Sensor 12 kann beispielsweise über eine herausgeführte PCB-Leiterplatte 17 kontaktiert werden, wie in Figur 4 dargestellt ist. Daneben können in eine Probenzelle 5 mehrere getrennte Hohlräume 8 mit mehreren separaten Öffnungen 11 eingebracht werden, wodurch mehrere PCR-Reaktionen in einer Probenzelle 5 parallel ablaufen können. Auch in diesem Fall ist es möglich über einen gemeinsamen oder mehrere Sensoren 12, (z.B. pro Hohlraum 8 ein Sensor 12) die Proben zu analysieren.

[0088] Weitere alternative Ausführungsformen einer Probenzelle 5 ermöglichen einen kontaminationsfreien "quasi geschlossenen" Flüssigkeitstransfer vom Hohlraum 8 der Probenzelle 5 zu einem externen Detektionssystem, beispielsweise einer miniaturisierten Gelelektrophorese-Kapillare. Dazu weist die Wand der Probenzelle in einem Bereich, in dem der Hohlraum 8 ausgebildet ist, eine im Wesentlichen kreisförmige Sollbruchstelle auf. Die Sollbruchstelle kann z.B. durch passgenaue Verringerung der Wandstärke eingeführt werden. Durch Aufdrücken der Kapillare an dieser Stelle wird die Wand der Probenzelle 5 durchstoßen und die Kapillare gelangt in Verbindung mit dem Hohlraum 8 und

der darin befindlichen Probe, welche durch Kapillarkräfte in die Kapillare gesogen wird.

[0089] Ebenso möglich sind Ausführungsformen, die an der Sollbruchstelle zusätzlich eine "weibliche" Verbindungs-
seite (Innenkegel) einer Luer-Lock Verbindung aufweisen. Durch Aufbringen der "männlichen" Gegenseite (Außenkegel)
einer Luer-Lock-Verbindung, beispielsweise einer Spritze oder Kanüle, kann die Sollbruchstelle durchstoßen und ein
"quasi geschlossenes" System zwischen Hohlraum der Probenzelle und Innenraum der Spritze geschaffen werden.

Beispiel 2: Durchführung einer vergleichenden PCR

[0090] Die PCR (= Polymerase Chain Reaction) stellt eine Standardmethode der Molekularbiologie dar, die 1984 von
Kary Mullis entwickelt wurde. Sie erlaubt es, durch einfache Versuchsanordnungen spezifische DNA-Sequenzen zu
amplifizieren (= vermehren). Somit kann aus einem großen Gen eine bestimmte Sequenz (die z.B. für ein Stoffwechsel-
Protein codiert) isoliert und vermehrt werden. Als Marker, die diese spezifische Sequenz eingrenzen, werden Primer
verwendet, an die die DNA-Polymerase andocken kann.

[0091] Für eine Standard PCR Reaktion wird ein sog. Mastermix vorbereitet. Dazu wird ein Reaktionsgefäß, z.B. ein
2 ml Mikro-Schraubdeckel-Röhrchen entsprechend gekennzeichnet und in einem Kühlrack (0°C - 4°C) platziert. Die
Primer (Konzentration meist 10 µM), der dNTP-Mix (c je dNTP 25 µM; dNTP = Desoxyribonukleosidtriphosphate, i.e.
DNA-Bausteine), Standard PCR-Puffer und MgAc (100 mM) werden in den Röhrchen vorgelegt und gründlich durch-
mischt.

[0092] Das zu vervielfältigende DNA-Template (i.e. das isolierte, aufgereinigte und zur Vervielfältigung vorgesehene
DNA-Material) wird in 0,2 ml oder 0,5 ml fassende PCR-Reaktionsgefäße, auch PCR-Tubes (im Kühl-Rack bei ca. 0°C
- 4°C) vorgelegt (i.d.R. 5 bis 10 µl) und mit Mastermix auf i.d.R. 20 µl bis 50 µl ergänzt. Für eine Negativprobe wird in
einem PCR-Tube statt des DNA-Templates (DNAfreies) Wasser vorgelegt und mit Mastermix auf das entsprechende
Endvolumen aufgefüllt.

[0093] Unmittelbar vor Start der PCR-Reaktion wird die Polymerase in die bereitgestellten PCR-Tubes (mit Template
und Mastermix bzw. mit Wasser und Mastermix im Falle der Negativprobe) gegeben und durch mehrmaliges Ansaugen
und Entleeren der Pipette durchmischt.

[0094] Im Thermocycler werden die Schritte Denaturierung, Annealing (Primerhybridisierung) und Elongation wieder-
holt durchgeführt. Zur Denaturierung werden die doppelsträngigen DNA-Templates auf 94 - 96°C erhitzt, um die Stränge
zu trennen. Im ersten Zyklus wird die DNA oft für längere Zeit erhitzt (Initialisierung), um sicherzustellen, dass sich
sowohl die Ausgangs-DNA als auch die Primer vollständig voneinander getrennt haben und nur noch Einzelstränge
vorliegen. Bei der Primerhybridisierung wird ca. 30 Sekunden lang eine Temperatur eingestellt, die eine spezifische
Anlagerung der Primer an die DNA erlaubt. Die genaue Temperatur wird hierbei durch die Länge und die Sequenz der
Primer bestimmt (meist im Temperaturbereich von ca. 55 - 65°C). Die DNA-Polymerase füllt die fehlenden Stränge mit
freien Nukleotiden auf. Sie beginnt am 3'-Ende des angelagerten Primers und folgt dann dem DNA-Template-Strang.
Der Primer wird nicht wieder abgelöst, er bildet den Anfang des neuen Einzelstrangs. Die Temperatur hängt vom Ar-
beitsoptimum der verwendeten DNA-Polymerase ab (in der Regel ca. 68 - 72°C). Dieser Schritt dauert etwa 30 Sekunden
je 500 Basenpaare, variiert aber in Abhängigkeit von der verwendeten DNA-Polymerase.

[0095] Für den hier beschriebenen Vergleich der Standard-PCR wurde ein BioRad Thermocycler (Modell iCycler)
verwendet. Es wurden 100 µl gemeinsamer Mastermix für alle durchgeführten Reaktionen angesetzt, wie in der unten
stehenden Tabelle 1 aufgeführt. 20 µl Template (DNA-Extrakt von *Legionella pneumophila*, ca. 100 DNA-Kopien / 5 µl)
wurden mit 80 µl Mastermix, versetzt mit Taq-Polymerase (BioTaq von BIOLINE), gemischt und in 4 Ansätze zu je 25
µl aufgeteilt (einer für die PCR im Standard-PCR Thermocycler, drei für die PCR unter Verwendung der erfindungsge-
mäßigen Vorrichtung). Daneben wurde eine Negativ-Kontrolle (5 µl Wasser plus 20 µl Mastermix mit Polymerase, Standard-
Thermocycler) angesetzt. Sämtliche PCR Bedingungen sind in Tabelle 1 angegeben. Die verwendete Vorrichtung zur
Durchführung der PCR und die Probenzelle sind im Zusammenhang mit den Figuren 1 bis 4 und dem Beispiel 1 be-
schrieben.

Tabelle 1:

Mastermix		
	Volumen [µl]	
Foreward Primer (10 µM)	6,30	
Reverse Primer (10 µM)	6,30	
PCR-Puffer*	21,00	
MgAc (100 mM)	2,63	

(fortgesetzt)

Mastermix			
DNTP-Mix (25 mM)	0,84		
Taq-Polymerase (BioTaq)	0,53		
H2O	62,40		
Gesamt	100,00		
Parameter der PCR unter Verwendung eines Standard-Thermocyclers			
Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklenzahl	
96	300	1	
96	10	40	
55	15	40	
72	15	40	
72	60	1	
4	hold		
Parameter der PCR unter Verwendung der erfindungsgemäßen Vorrichtung			
A) Denaturierung			
Block	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
A	96	300	Rotation mit ca. 5 Umdrehungen/min.
B	96	300	
C	96	300	
B) PCR			
A	96	Abhängig von Rotationsgeschwindigkeit und Blockgeometrie	40
B	55		40
C	72		40
* (5 x Bicine Puffer, 250 mM bicine/KOH, pH 8.2; 575 mM K-acetate, 40% glycerol (v/v), Bicine = N,N-Bis(2-hydroxyethyl) Glycine)			

[0096] Durch Verwendung der erfindungsgemäßen Vorrichtung konnte die Reaktionszeit der PCR von ca. 45 min (Standard-PCR) auf 25 min verkürzt werden. Optimierte Heizblockgeometrien und minimierte Wanddicken der Probenzelle sollten eine weitere Reduktion der Reaktionszeit für eine PCR auf ca. 10 min oder darunter erlauben.

[0097] Das Ergebnis der PCR wurde anhand einer Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Die Agarose-Gelelektrophorese ist ein Verfahren, bei dem DNA-Fragmente, im speziellen Beispiel die PCR-Produkte, anhand ihrer Größe identifiziert werden können. Die DNA wird dabei in ein Agarosegel eingebracht und anschließend eine Spannung angelegt. Daraufhin bewegen sich kürzere DNA-Fragmente schneller auf den Pluspol zu als längere DNA-Fragmente. Die Länge des PCR-Produkts kann durch einen Vergleich mit einer DNA-Leiter, die DNA-Fragmente bekannter Größe enthält und parallel zur Probe im Gel mitläuft, bestimmt werden.

[0098] Die Figur 6 zeigt eine Fotografie der mittels Gelelektrophorese analysierten PCR-Produkte, die in den in Tabelle 1 zusammengefassten Versuchen erhalten wurden. In der Figur 6 ist die gelelektrophoretische Analyse mittels Standard-PCR Reaktion in einem Standard Cycler erhaltenen PCR Produkte mit A bezeichnet. Die in einem Standard Cycler durchgeführte Negativkontrolle mittels Standard-PCR Reaktion ist mit B bezeichnet. Die gelelektrophoretische Analyse der PCR Produkte, die unter Verwendung der erfindungsgemäßen Vorrichtung erhalten wurden, sind in Abhängigkeit von der Rotationsgeschwindigkeit der Probenzelle mit C (0,5 Umdrehungen pro Minute), D (1 Umdrehung pro Minute) und E (2 Umdrehungen pro Minute) bezeichnet. Mit F ist eine DNA-Leiter gekennzeichnet.

[0099] Aus der Figur 6 geht eindeutig hervor, dass durch eine Standard-PCR Reaktion in einem Standard Cycler das

selbe erwartete ca. 150 Basen lange PCR-Produkt erhalten wie bei Durchführung der PCR in einer erfindungsgemäßen Vorrichtung bei drei verschiedenen Rotationsgeschwindigkeiten der Probenzelle.

Bezugszeichenliste

5

[0100]

10

15

20

25

30

- 1 Vorrichtung zur Durchführung einer PCR
- 2a erste Temperiereinheit
- 2b zweite Temperiereinheit
- 2c dritte Temperiereinheit
- 2d vierte Temperiereinheit
- 3 Elektromotor
- 4 Achse
- 5 Probenzelle
- 6 temperierbarer Block
- 7 Einkerbung
- 8 Hohlraum
- 8.1 abzweigender Kanal
- 9 Bohrung
- 10 Bodenplatte
- 11 Öffnungen
- 12 Sensor
- 13 Mittel zum Energieübertrag
- 14 Mittel zur Temperaturmessung
- 15 Verstelleinheit
- 16 Stopfen
- 17 PCB-Leiterplatte
- 18 Ausnehmung
- d Durchmesser
- b Dicke der Probenzelle
- t Tiefe des Hohlraums

35

Patentansprüche

1. Vorrichtung (1) zur Durchführung eines PCR-Verfahrens umfassend

40

45

- wenigstens eine im Wesentlichen die Form einer Scheibe aufweisende Probenzelle (5) mit einem Hohlraum (8) zur Aufnahme einer Probe, wobei der zur Aufnahme der Probe vorgesehene Hohlraum (8) sich über einen Kreissektor der Probenzelle (5) mit einem Mittelpunktswinkel von zumindest 180° erstreckt,
- mindestens eine erste (2a), eine zweite (2b) und eine dritte (2c) unabhängig voneinander regulierbare Temperiereinheit (2a, 2b, 2c), wobei die drei Temperiereinheiten (2a, 2b, 2c) drei räumlich voneinander getrennte Temperaturzonen definieren und
- mindestens ein Mittel (3, 4) zur Durchführung einer Drehbewegung der Probenzelle (5), wobei der zur Aufnahme der Probe vorgesehene Hohlraum (8) aufgrund der Drehbewegung der Probenzelle (5) durch die drei Temperaturzonen bewegt werden kann und der Hohlraum (8) unabhängig von der Position der Probenzelle (5) mit zumindest zwei Temperaturzonen in Kontakt steht.

50

2. Vorrichtung (1) nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** der zur Aufnahme der Probe vorgesehene Hohlraum (8) sich über einen Kreissektor der Probenzelle (5) mit einem Mittelpunktswinkel von annähernd 360° erstreckt.

55

3. Vorrichtung (1) nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet, dass** der zur Aufnahme der Probe in der Probenzelle (5) vorgesehene Hohlraum (8) näherungsweise die Form eines Hohlzylinders aufweist.

4. Vorrichtung (1) nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Probenzelle (5) zweiteilig in Form einer Haltevorrichtung für eine Kapillare und einer Kapillare zur Aufnahme der Probe ausgebildet

ist, wobei die Kapillare im Klemmsitz mit der Haltevorrichtung verbunden ist.

5. Vorrichtung (1) nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Haltevorrichtung für die Kapillare im Wesentlichen in Form einer Scheibe mit einer Unterseite, einer Oberseite und einem Scheibenrand ausgebildet ist, wobei zur Aufnahme der Kapillare eine Ausnehmung an der Oberseite und/oder an der Unterseite und/oder am Scheibenrand vorgesehen ist.
6. Vorrichtung (1) nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die erste (2a), die zweite (2b) und die dritte (2c) Temperiereinheit jeweils mindestens einen temperierbaren Block (6) aufweisen.
7. Vorrichtung (1) nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet, dass** die temperierbaren Blöcke (6) der ersten (2a), der zweiten (2b) und der dritten (2c) Temperiereinheit jeweils eine Einkerbung (7) zur wenigstens teilweisen Aufnahme der Probenzelle (5) aufweisen.
8. Vorrichtung (1) nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die einer Temperiereinheit (2a, 2b, 2c) zugewandte Wand der Probenzelle (5) zumindest im Bereich des zur Aufnahme der Probe vorgesehenen Hohlraums eine Dicke von weniger als 500 μm aufweist.
9. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** in dem zur Aufnahme der Probe vorgesehenen Hohlraum (8) der Probenzelle (5) ein zur Detektion von Nukleinsäureoligomer-Hybridisierungsereignissen eingerichteter und ausgelegter Sensor (12), insbesondere ein zur oberflächensensitiven Detektion von Nukleinsäureoligomer-Hybridisierungsereignissen eingerichteter und ausgelegter Sensor (12) vorgesehen ist.
10. Vorrichtung nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet, dass** es sich um einen zur spektroskopischen, elektrochemischen oder elektrochemolumineszenten Detektion von Nukleinsäureoligomer-Hybridisierungsereignissen eingerichteten und ausgelegten Sensor (12) handelt.
11. Vorrichtung nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet, dass** es sich um einen zur elektrochemischen Detektion von Nukleinsäureoligomer-Hybridisierungsereignissen eingerichteten und ausgelegten DNA-Chip (12) handelt.
12. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** eine vierte Temperiereinheit (2d) vorgesehen ist, wobei die vierte Temperiereinheit (2d) eine vierte räumlich von den anderen Temperaturzonen getrennte Temperaturzone definiert.
13. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 12 zur Durchführung einer PCR, insbesondere zur Durchführung einer Real-Time PCR.
14. Verfahren zur Durchführung einer PCR unter Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Probenzelle (5) mit konstanter Geschwindigkeit durch die räumlich voneinander getrennten Temperaturzonen bewegt wird.
15. Verfahren zur Durchführung einer PCR unter Verwendung einer Vorrichtung nach Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet, dass** sich der DNA-Chip (12) während der Durchführung einer elektrochemischen Detektion von Nukleinsäureoligomer-Hybridisierungsereignissen in der vierten Temperaturzone befindet.

Claims

1. A device (1) for carrying out a PCR method, comprising

- at least one test cell (5), substantially in the form of a disc, with a cavity (8) for receiving a test sample, wherein the cavity (8) provided to receive the test sample extends over a circular sector of the test cell (5) with a central angle of at least 180°,
- at least one first (2a), one second (2b) and one third (2c) independently controllable temperature control unit (2a, 2b, 2c), wherein the three temperature control units (2a, 2b, 2c) define three spatially separate temperature zones and
- at least one means (3, 4) for performing a rotary movement of the test cell (5), wherein the cavity (8) provided to receive the test sample can be moved through the three temperature zones due to the rotary movement of

the test cell (5), and the cavity (8) is in contact with at least two temperature zones irrespective of the position of the test cell (5).

2. The device (1) according to claim 1, **characterised in that** the cavity (8) provided to receive the test sample extends over a circular sector of the test cell (5) with a central angle of approximately 360°.
3. The device (1) according to claim 2, **characterised in that** the cavity (8) provided to receive the test sample in the test cell (5) has approximately the form of a hollow cylinder.
4. The device (1) according to one of the preceding claims, **characterised in that** the test cell (5) is built in two parts in the form of a holding device for a capillary and a capillary for receiving the test sample, said capillary being connected to said holding device in a clamp seat.
5. The device (1) according to claim 4, **characterised in that** the holding device for the capillary has substantially the form of a disc with a lower side, an upper side, and a disc edge, a recess being provided in the upper side and/or in the lower side and/or in the disc edge to receive the capillary.
6. The device (1) according to one of the preceding claims, **characterised in that** the first (2a), the second (2b) and the third (2c) temperature control units each have at least one temperature controllable block (6).
7. The device (1) according to claim 6, **characterised in that** the temperature controllable blocks (6) of the first (2a), the second (2b) and the third (2c) temperature control units each have a notch (7) for at least partially receiving the test cell (5).
8. The device (1) according to one of the preceding claims, **characterised in that** the wall of the test cell (5) facing toward a temperature control unit (2a, 2b, 2c), has a thickness of less than 500 μm , at least in the region of the cavity provided to receive the test sample.
9. The device according to one of the preceding claims, **characterised in that** a sensor (12) adapted and designed for detection of nucleic acid oligomer hybridising events, in particular a sensor (12) adapted and designed for surface-sensitive detection of nucleic acid oligomer hybridising events, is provided in the cavity (8) of the test cell (5) provided to receive the test sample.
10. The device according to claim 9, **characterised in that** the sensor is a sensor (12) adapted and designed for spectroscopic, electrochemical or electro-chemiluminescent detection of nucleic acid oligomer hybridising events.
11. The device according to claim 9, **characterised in that** the sensor is a DNA chip (12) adapted and designed for electrochemical detection of nucleic acid oligomer hybridising events.
12. The device according to one of the preceding claims, **characterised in that** a fourth temperature control unit (2d) is provided, said fourth temperature control unit (2d) defining a fourth temperature zone that is spatially separate from the other temperature zones.
13. Use of a device according to one of claims 1 to 12 for carrying out PCR, in particular for carrying out real-time PCR.
14. A method for carrying out PCR with use of a device according to one of claims 1 to 12, **characterised in that** the test cell (5) is moved at constant speed through the spatially separate temperature zones.
15. A method for carrying out PCR with use of a device according to claim 12, **characterised in that** the DNA chip (12) is located in the fourth temperature zone during electrochemical detection of nucleic acid oligomer hybridising events.

Revendications

1. Dispositif (1) pour effectuer un procédé de PCR comprenant
 - au moins une cellule d'échantillon (5) présentant essentiellement la forme d'un disque, comprenant une cavité (8) pour recevoir un échantillon, sachant que la cavité (8) prévue pour recevoir l'échantillon s'étend sur un

secteur circulaire de la cellule d'échantillon (5) avec un angle au centre d'au moins 180°,

- au moins une première (2a), une deuxième (2b) et une troisième (2c) unités tempérées (2a, 2b, 2c) pouvant être réglées indépendamment l'une de l'autre, sachant que les trois unités tempérées (2a, 2b, 2c) définissent

trois zones de température séparées physiquement l'une de l'autre et
- au moins un moyen (3, 4) pour effectuer une rotation de la cellule d'échantillon (5), sachant que la cavité (8) prévue pour recevoir l'échantillon peut être déplacé du fait de la rotation de la cellule d'échantillon (5) à travers les trois zones de température et la cavité (8) est en contact avec au moins deux zones de température, indépendamment de la position de la cellule d'échantillon (5).

2. Dispositif (1) selon la revendication 1, **caractérisé en ce que** la cavité (8) prévue pour recevoir l'échantillon s'étend sur un secteur circulaire de la cellule d'échantillon (5) avec un angle au centre s'approchant de 360°.

3. Dispositif (1) selon la revendication 2, **caractérisé en ce que** la cavité (8) prévue pour recevoir l'échantillon dans la cellule d'échantillon (5) présente approximativement la forme d'un cylindre creux.

4. Dispositif (1) selon l'une des revendications précédentes, **caractérisé en ce que** la cellule d'échantillon (5) est formée en deux parties sous la forme d'un dispositif de fixation pour un tube capillaire et sous la forme d'un tube capillaire pour recevoir l'échantillon, sachant que le tube capillaire est relié au dispositif de fixation en position serrée.

5. Dispositif (1) selon la revendication 4, **caractérisé en ce que** le dispositif de fixation pour le tube capillaire est formé essentiellement sous forme d'un disque avec une face inférieure, une face supérieure et une bordure de disque, sachant que pour recevoir le tube capillaire, un évidement est prévu sur la surface supérieure et/ou sur la face inférieure et/ou sur la bordure de disque.

6. Dispositif (1) selon l'une des revendications précédentes, **caractérisé en ce que** la première (2a), la deuxième (2b) et la troisième (2c) unités tempérées présentent respectivement au moins un bloc (6) pouvant être mis en température.

7. Dispositif (1) selon la revendication 6, **caractérisé en ce que** les blocs (6) pouvant être mis en température de la première (2a), la deuxième (2b) et la troisième (2c) unités tempérées présentent respectivement une encoche (7) pour recevoir la cellule d'échantillon (5) au moins partiellement.

8. Dispositif (1) selon l'une des revendications précédentes, **caractérisé en ce que** la paroi de la cellule d'échantillon (5) tournée vers une unité tempérée (2a, 2b, 2c) présente, au moins au niveau de la cavité prévue pour recevoir l'échantillon, une épaisseur inférieure à 500 µm.

9. Dispositif (1) selon l'une des revendications précédentes, **caractérisé en ce que** dans la cavité (8) de la cellule d'échantillon (5) prévue pour recevoir l'échantillon, un capteur (12) installé et conçu pour la détection d'hybridations d'oligomères d'acide nucléique est prévu, en particulier un capteur (12) installé et conçu pour la détection sensible en surface d'hybridations d'oligomères d'acide nucléique.

10. Dispositif selon la revendication 9, **caractérisé en ce qu'il** s'agit d'un capteur (12) installé et conçu pour la détection spectroscopique, électrochimique ou électrochimiluminescente d'hybridations d'oligomères d'acide nucléique.

11. Dispositif selon la revendication 9, **caractérisé en ce qu'il** s'agit d'une puce à ADN (12) installée et conçue pour la détection électrochimique d'hybridations d'oligomères d'acide nucléique.

12. Dispositif selon l'une des revendications précédentes, **caractérisé en ce qu'une** quatrième unité tempérée (2d) est prévue, sachant que la quatrième unité de température (2d) définit une quatrième zone de température séparée physiquement des autres zones de température.

13. Emploi d'un dispositif selon l'une des revendications 1 à 12 pour effectuer une PCR, en particulier pour effectuer une PCR en temps réel.

14. Procédé pour effectuer une PCR en employant un dispositif selon l'une des revendications 1 à 12, **caractérisé en ce que** la cellule d'échantillon (5) est déplacée à vitesse constante à travers les zones de température séparées physiquement les unes des autres.

15. Procédé pour effectuer une PCR en employant un dispositif selon la revendication 12, **caractérisé en ce que** la puce à ADN (12) se trouve dans la quatrième zone de température pendant qu'une détection électrochimique d'hybridations d'oligomères d'acide nucléique est effectuée.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Fig. 1

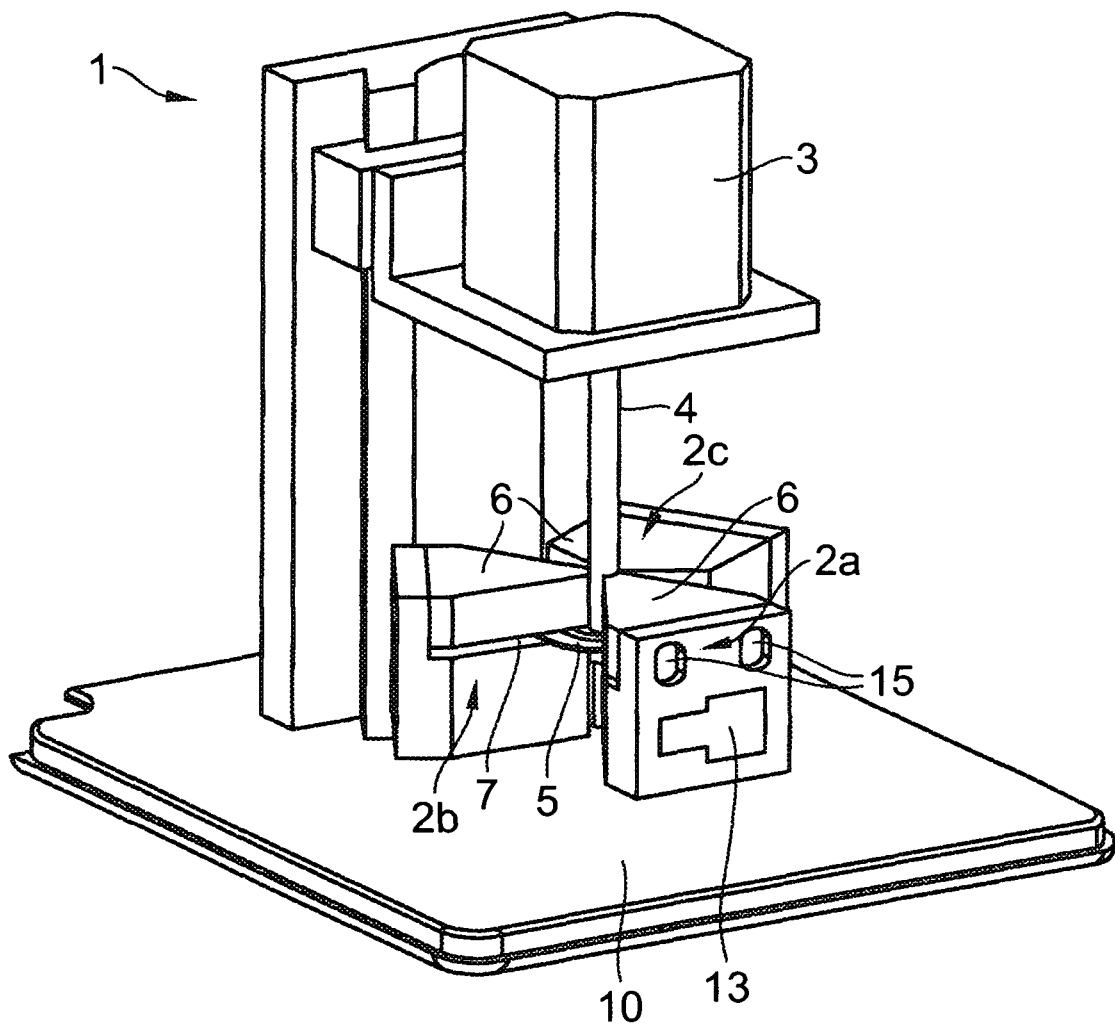


Fig. 2a

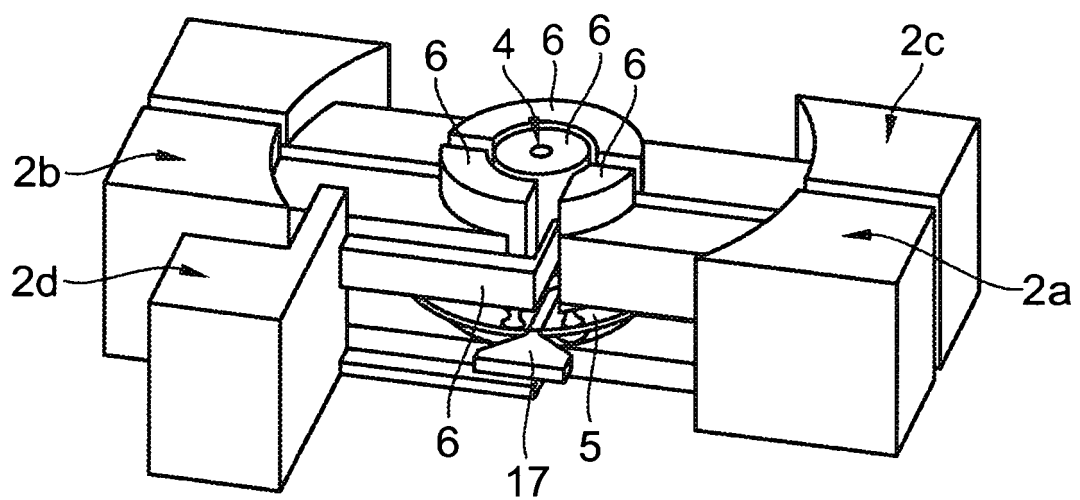


Fig. 2b

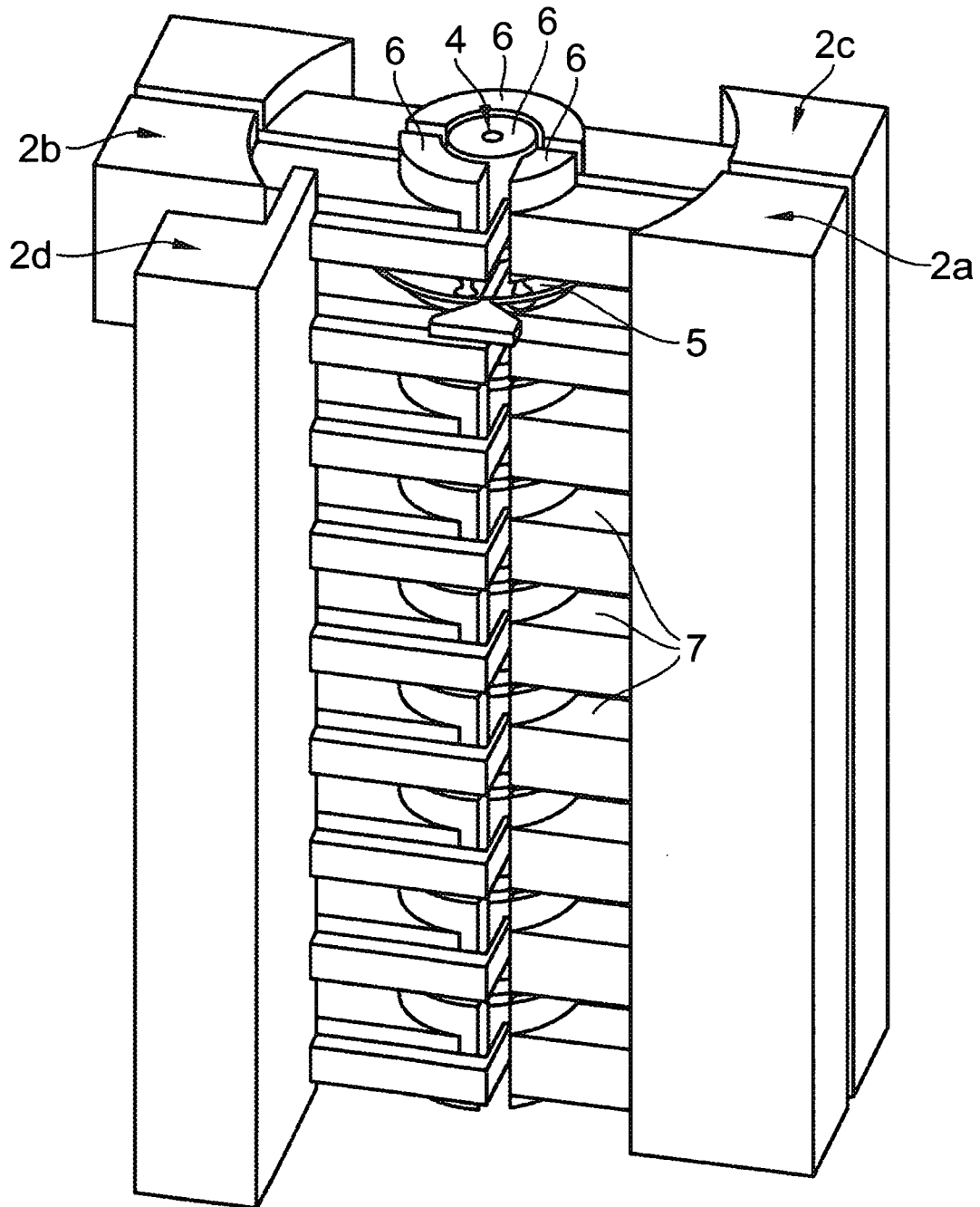


Fig. 3

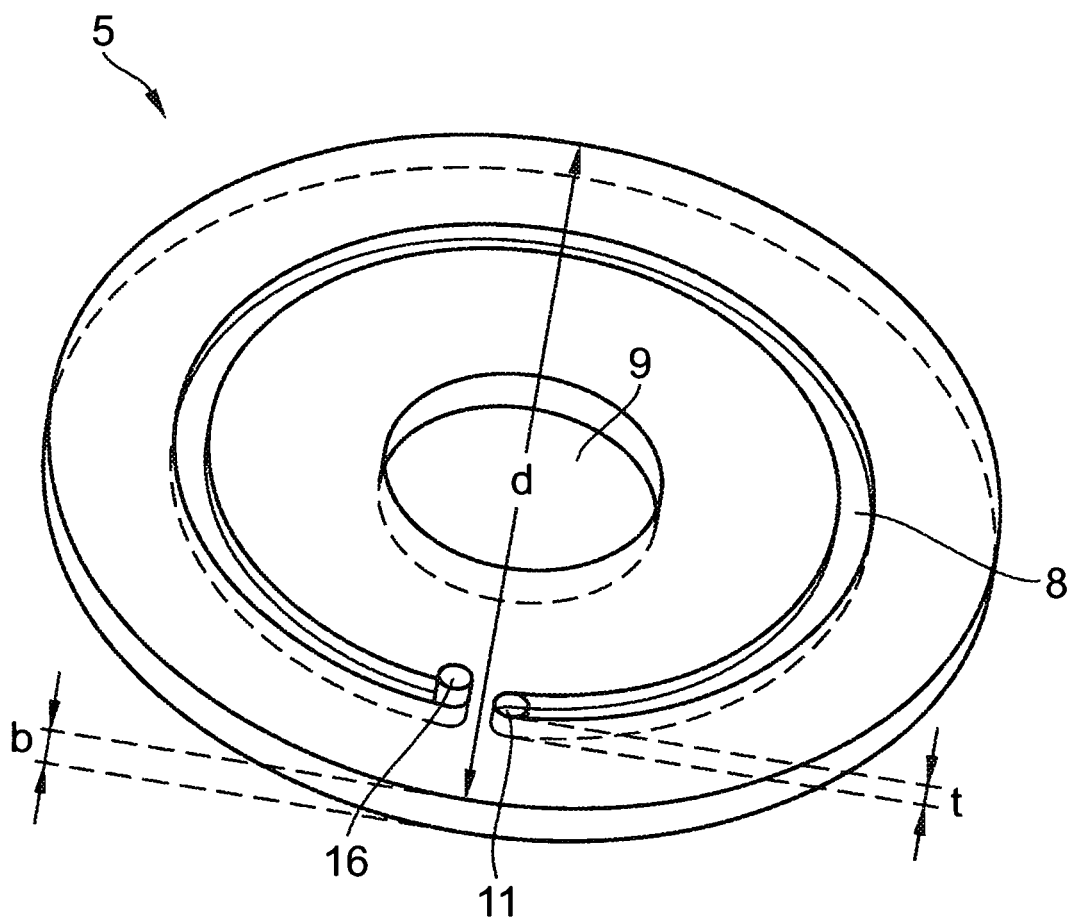


Fig. 4

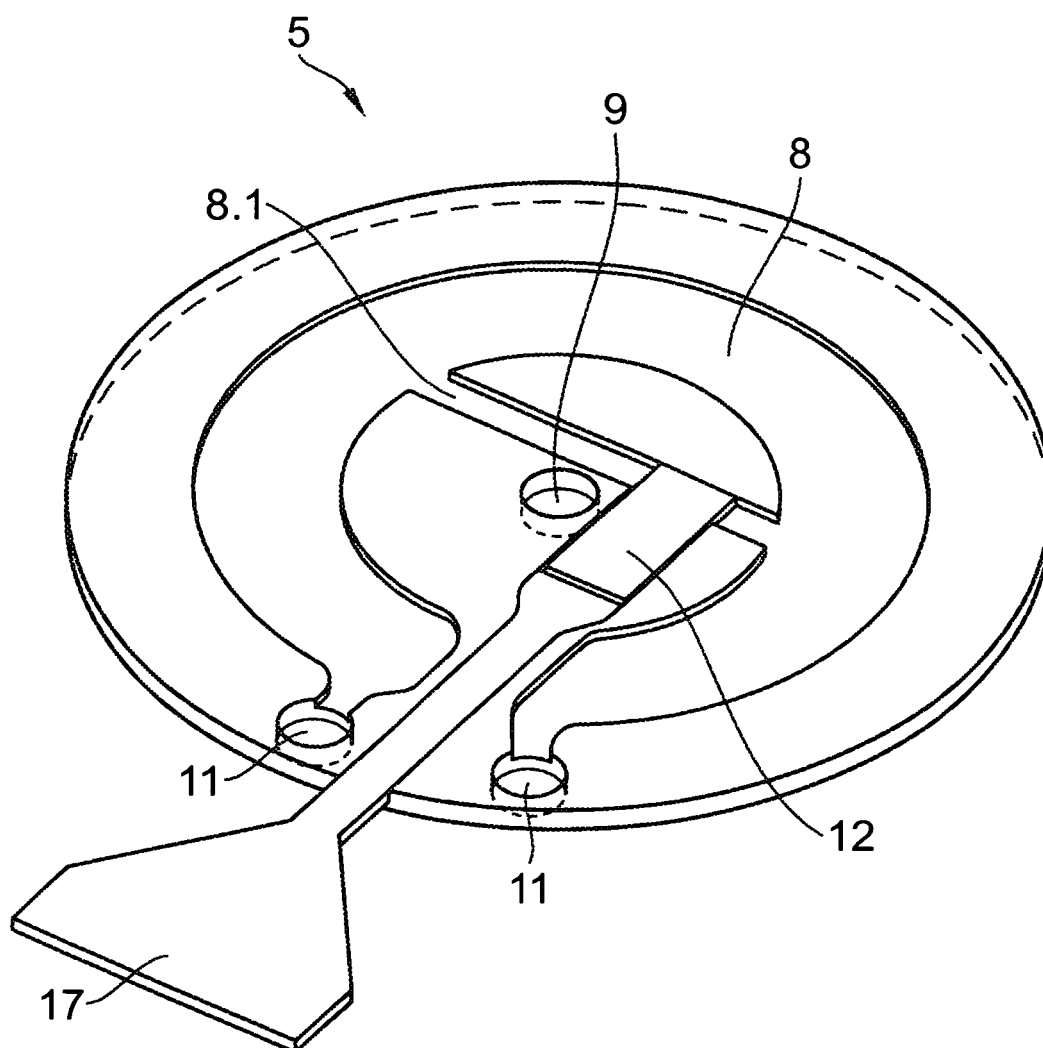


Fig. 5a

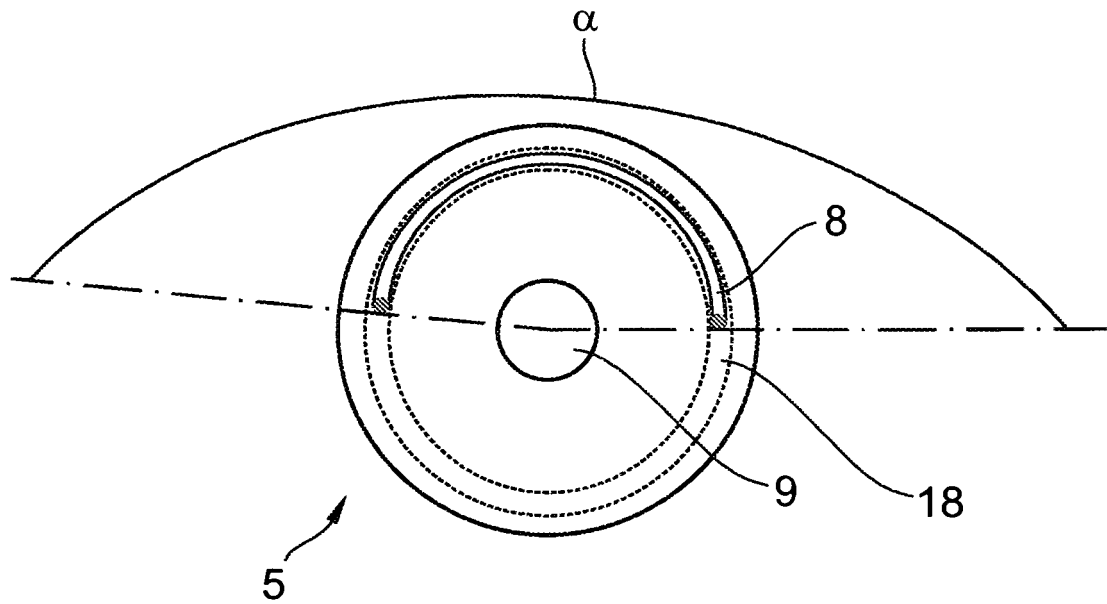


Fig. 5b

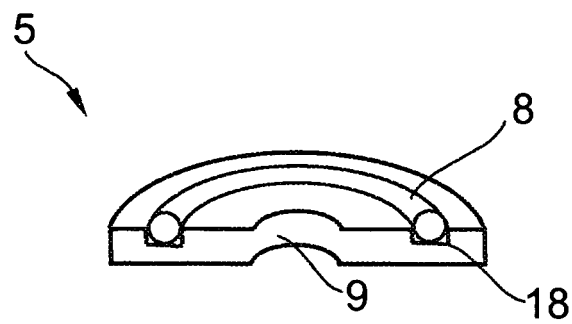


Fig. 5c

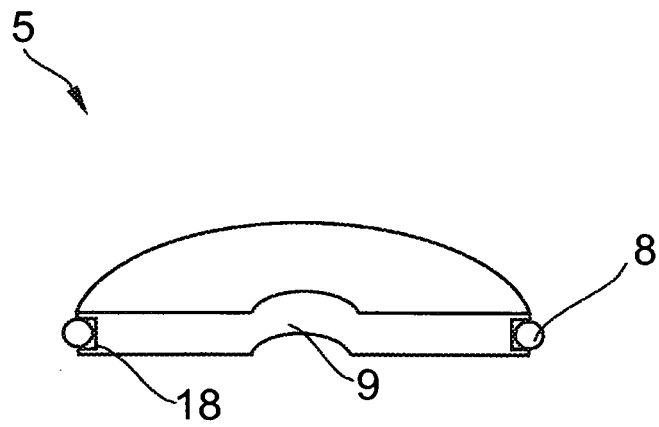
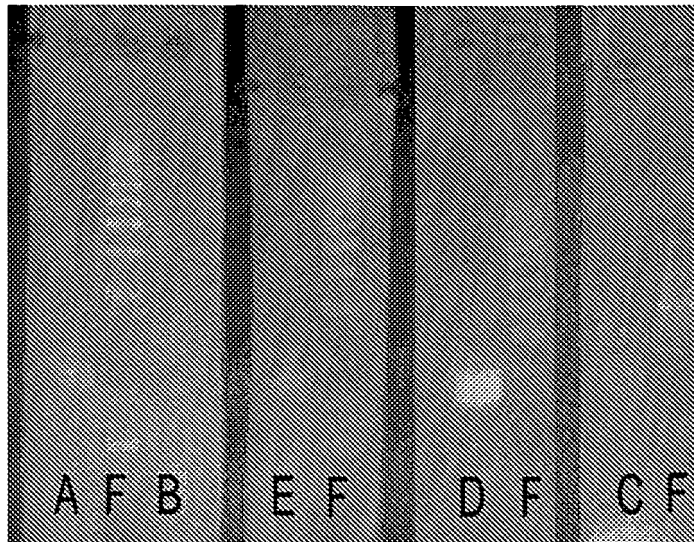


Fig. 6



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

- WO 9005023 A [0017]
- WO 2008034896 A2 [0018]
- US 20020110899 A1 [0019]
- US 6875602 B2 [0020]
- EP 1584692 B1 [0022] [0023]
- DE 69429038 T2 [0024]
- WO 2008146754 A1 [0025]
- US 2002081669 A1 [0026]