



(12) **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(43) Veröffentlichungstag:
23.11.2011 Patentblatt 2011/47

(51) Int Cl.:
B01F 11/00 (2006.01) **B01F 13/00 (2006.01)**
B01F 15/02 (2006.01) **B01L 3/00 (2006.01)**

(21) Anmeldenummer: **10005124.2**

(22) Anmeldetag: **17.05.2010**

(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 SE SI SK SM TR
Benannte Erstreckungsstaaten:
BA ME RS

(71) Anmelder:
• **Roche Diagnostics GmbH**
68305 Mannheim (DE)
Benannte Vertragsstaaten:
DE
• **F. Hoffmann-La Roche AG**
4070 Basel (CH)
Benannte Vertragsstaaten:
AL AT BE BG CH CY CZ 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 SM TR

(72) Erfinder:
• **Effenhauser, Dr. Carlo**
69469 Weinheim (DE)
• **Würl, Susanne**
68167 Mannheim (DE)
• **Böhm, Christoph**
68519 Viernheim (DE)

(74) Vertreter: **Durm & Partner**
Moltkestrasse 45
76133 Karlsruhe (DE)

(54) **Verfahren und Vorrichtung zum Durchmischen einer Flüssigkeit mit einem mikrofluidischen Testelement, sowie Testelement**

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft ein Testelement sowie eine Vorrichtung und ein Verfahren zum Erzeugen einer durchmischten Flüssigkeit mittels eines mikrofluidischen, rotierenden Testelements (2) mit einem Substrat und einer mikrofluidischen Kanalstruktur (10) zur Aufnahme der Flüssigkeit. Das Verfahren umfasst das Rotieren des Testelements (2) mit der Flüssigkeit gemäß eines Rotationsprofils, das wenigstens zwei Zyklen umfasst, wobei in einem Zyklus die folgenden Schritte ausgeführt werden: Beschleunigen der Rotation des Testelements (2) mit einer Beschleunigung a_1 bis zum Erreichen einer ersten End-Winkelgeschwindigkeit ω_1 und anschließend das Beschleunigen der Rotation des Testelements (2) mit einer Beschleunigung a_2 bis zum Erreichen einer zweiten End-Winkelgeschwindigkeit ω_2 . Die Beschleunigung a_1 und die Beschleunigung a_2 sind entgegengerichtet. Wenigstens eine der Beschleunigungen a_1, a_2 und/oder wenigstens eine der End-Winkelgeschwindigkeiten ω_1, ω_2 ändert sich von einem Zyklus zum nächsten Zyklus, wodurch ein gleichmäßiger Transport von in der Flüssigkeit enthaltenen Molekülen an eine aktive Oberfläche in der Kanalstruktur (10) erzielt wird.

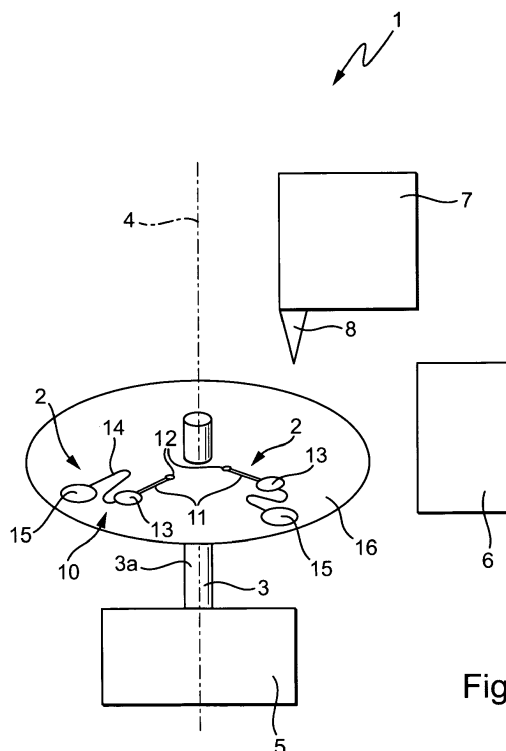


Fig. 1

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Durchmischen einer Flüssigkeit mittels eines mikrofluidischen Testelements, das ein Substrat und eine Kanalstruktur aufweist und mit einer Winkelgeschwindigkeit um eine Rotationsachse rotiert. Die Erfindung betrifft auch eine Vorrichtung zum Durchmischen einer Flüssigkeit sowie das Testelement selbst.

[0002] Mikrofluidische Testelemente werden beispielsweise zum Analysieren von Flüssigkeitsproben und zum Durchmischen einer Flüssigkeit vorwiegend in diagnostischen Tests (In-Vitro-Diagnostik) eingesetzt. Bei derartigen Tests werden beispielsweise Körperflüssigkeitsproben auf einen darin enthaltenen Analyten für medizinische Zwecke untersucht.

[0003] Ein Anwendungsgebiet von mikrofluidischen Testelementen sind sogenannte Microarrays oder Festphasentests, die auf Festphasenbindungsreaktionen basieren. Eine Gruppe derartiger Tests sind Sandwichtests, bei denen ein festphasengebundener erster Bindungspartner eine spezifische Bindungsreaktion mit einem Analyten in der Flüssigkeit eingeht. Der Analyt wiederum kann durch das "Andocken" eines Markierungsmoleküls (Label) sichtbar gemacht werden. Die Sichtbarmachung kann beispielsweise durch Lumineszenz oder Fluoreszenz oder andere Formen der Labelung erfolgen, wie etwa durch Enzyme in Enzymimmunoassays.

[0004] Da bei Einsatz kleiner Probenvolumina häufig eine geringe Konzentration des Analyten vorliegt, werden sogenannte Spotttests durchgeführt, bei denen der festphasengebundene Reaktionspartner nicht die gesamte Bodenfläche einer Inkubationskammer bedeckt, sondern nur einzelne Bereiche bzw. Punkte davon. Durch die Verwendung von Spots erfolgt also eine Konzentration des Analyten und des Labels an den einzelnen Spots in der Kammer. Insbesondere bei geringer Konzentration ist die Dichte des Analyten und des Labels im Bereich der Spots erheblich höher als bei vollflächiger Aufbringung des festphasengebundenen Reaktionspartners. Für viele Tests hat sich eine Anordnung von mehreren (drei bis zehn) Spots für den gleichen Parameter (Analyten) als geeignet erwiesen. Die Spots werden einzeln ausgewertet. Aus den Ergebnissen wird ein Mittelwert gebildet. Bei einigen Tests ist auch eine andere, vorzugsweise höhere Anzahl von Spots pro Parameter vorteilhaft. Damit eine aussagekräftige Mittelwertauswertung erfolgen kann, müssen die Analyten und Label möglichst gleichmäßig über alle Spots verteilt sein.

[0005] Genau wie bei den Microarrays ist auch bei biochemischen Reaktionskammern mit Oberflächensensoren und einer entsprechenden Messtechnik eine gleichmäßige Abbindung der Analyten notwendig, insbesondere wenn eine optische Auswertung erfolgt, beispielsweise durch Bilderkennung. Gleiches gilt auch für vollflächig beschichtete (aktive) Oberflächen. Diese können beispielsweise ein Gel (Hydrogel mit Festphasenreaktionspartner) am Boden der Kammer oder eine großporige

3D-Matrix als Alternative zu einer planen Oberfläche sein.

[0006] Daneben werden mikrofluidische Testelemente auch bei Tests verwendet, bei denen in der Reagenzkammer ein Reagenz in flüssiger Form oder als Feststoff vorliegt, der auf dem Testelement eingetrocknet ist. Derartige Trockenreagenzien müssen vor der Analyse aufgelöst und homogenisiert werden. Es ist jeweils ein gleichmäßiges Durchmischen bzw. Anlösen notwendig. Der Begriff "Durchmischen" umfasst dabei neben dem Auflösen eines Feststoffes in einer Flüssigkeit (Homogenisieren mit einem flüssigen Lösungsmittel) auch die Möglichkeit, dass zwei Flüssigkeiten miteinander gemischt werden, wenn das Reagenz beispielsweise in flüssiger Form vorliegt.

[0007] Ein wichtiger Bestandteil bei den oben genannten Tests und der Analyse einer Probenflüssigkeit sind Testträger, auf denen mikrofluidische Testelemente mit Kanalstrukturen zur Aufnahme einer Flüssigkeitsprobe angeordnet oder integriert sind. Um die Durchführung aufwendiger, mehrstufiger Testführungen ("Testprotokolle") zu ermöglichen, umfassen die Kanalstrukturen häufig eine Vielzahl von Kanalabschnitten, Kammern und fluidischen Ventilen zur Ablaufsteuerung.

[0008] Testträger und mikrofluidische Testelemente bestehen aus einem Trägermaterial, häufig aus einem Substrat aus Kunststoffmaterial. Geeignete Materialien sind beispielsweise COC (Cyclo-Olephin-Copolymer) oder Kunststoffe wie PMMA (Polymethylmethacrylat), Polycarbonat oder Polystyrol. Die Kanalstruktur des Testträgers ist von dem Substrat und einem Deckel oder einer Deckschicht umschlossen. Hergestellt wird eine derartige Kanalstruktur durch eine drei-dimensionale Strukturierung der Kunststoffteile, beispielsweise durch Spritzgießtechniken oder andere Verfahren. Es ist auch möglich, die Struktur durch materialabtragende Verfahren, wie beispielsweise Fräsen oder Laserablation einzubringen.

[0009] Die Steuerung des Flüssigkeitstransports innerhalb der Kanalstrukturen und die Steuerung des Prozessablaufes kann mit internen (innerhalb des fluidischen Testelements) oder mit externen (außerhalb des fluidischen Testelements) Maßnahmen erfolgen. Die Steuerung kann durch Anwendung von Druckunterschieden oder durch Änderung von Kräften hervorgerufen werden, beispielsweise durch Änderung der Wirkrichtung der Schwerkraft.

[0010] Eine gezielte Steuerung des Flüssigkeitsflusses kann innerhalb der Kanalstruktur durch die Rotation eines Testelements erzielt werden. Die erzeugten Kräfte können durch Steuerung der Änderung der Rotationsgeschwindigkeit oder der Drehrichtung oder durch den Abstand von der Drehachse vorgenommen oder durch Ausnutzung von Dichteunterschieden in der Flüssigkeit erzeugt werden (z. B. beim Auflösen eines Feststoffs). Beispielsweise können die mikrofluidischen Testelemente in einer rotierenden Scheibe in Form einer Compactdisc (CD) angeordnet sein. Eine Gegenüberstellung

verschiedener Methoden ist beispielsweise aus Marc Madou, et al.; Lab on CD; Annual Review of Biomedical Engineering, 2006.8, Page 601 to 628 (online@http://bioenc.annualreviews.org) bekannt.

[0011] Analysesysteme mit rotierenden Biosensoren sind beispielsweise auch aus den folgenden Veröffentlichungen bekannt:

1. Peytavi, et al.; Microfluidic Device for Rapid (< 15 Min.) Automated Microarray Hybridization, 2005, Clinical Chemistry; page 1.138 to 1.844; (online published at DOI: 10.1373/clin_chem.2005.052845)

2. Guangyao, Jia, et al.; Dynamic Automated DNA Hybridization on a CD (Compact Disc) Fluid Platform; Sensors and Actuators B 114 (2006); page 173 to 181; (online at www.sciencedirect.com)

3. Grumann; Readout of Diagnostic Assays on a Centrifugal Microfluidic Platform; Oktober 2005; Dissertation an der Universität Freiburg

4. S. Lutz, et al.; Unidirectional Shake-Mode for Mixing Highly Wetting Fluids on Centrifugal Platforms; 12th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Live Science; October 12 to 16, 2008; San Diego, California, USA

[0012] Um das Vermischen von Flüssigkeiten bei rotierenden Scheiben zu verbessern, schlägt Grumann (3) in seiner Dissertation zwei Möglichkeiten vor: Im ersten Konzept werden paramagnetische Polymerkugeln (Beads) in die Mischkammer gegeben und bei Rotation der Disc über ortsfeste Permanentmagnete periodisch ausgelenkt. Die Relativbewegung der Beads gegenüber der Flüssigkeit beschleunigt das Mischen. Im zweiten Konzept wird die Disc nicht mit einer konstanten Frequenz rotiert, sondern unter sich periodisch änderndem Drehsinn einem sogenannten Shake-Mode unterworfen, so dass auf Grund von Trägheitseffekten der Flüssigkeiten das Mischen verbessert und beschleunigt wird.

[0013] Im "Shake-Mode" wird die Rotationsfrequenz bis zu einer End-Winkelgeschwindigkeit der rotierenden Scheibe konstant beschleunigt und anschließend mit einer zweiten Beschleunigung (Verzögerung), die der ersten entgegengerichtet ist, zunächst bis zum Stillstand abgebremst. Anschließend wird die Scheibe in die Gegenrichtung beschleunigt, bis eine zweite End-Winkelgeschwindigkeit erreicht ist. Anschließend wird die Disc wieder gebremst und nach dem Stillstand erneut in Gegenrichtung beschleunigt. Die erste und die zweite Beschleunigung und die erste und zweite End-Winkelgeschwindigkeit sind jeweils betragsmäßig gleich, jedoch ist die Drehrichtung entgegengesetzt. Dieser "Shake-Mode" wird in Fachkreisen auch "Euler-Mischen" genannt, da bei der Beschleunigung der Scheibe neben der bei konstant rotierenden Scheiben auftretenden Zentrifugalkraft und Corioliskraft eine weitere Kraftkomponen-

te hinzukommt, die Eulerkraft. Die Eulerkraft ist proportional zur zeitlichen Änderung der Winkelgeschwindigkeit, während die Zentrifugalkraft proportional zum Quadrat der Winkelgeschwindigkeit und die Corioliskraft proportional zur Winkelgeschwindigkeit ist.

[0014] Lutz et al. (4) haben in Studien herausgefunden, dass das Euler-Mischen verbessert werden kann, wenn die Beschleunigung (Änderung der Drehwinkelgeschwindigkeit) nicht um den Nullpunkt (Frequenz = Null bzw. Winkelgeschwindigkeit = Null) stattfindet, sondern mit einem Offset. Nach Lutz wird die rotierende Disc ebenfalls konstant beschleunigt, bis eine erste End-Winkelgeschwindigkeit erreicht wird. Anschließend wird die Disc abgebremst, bis eine zweite End-Winkelgeschwindigkeit erreicht ist, danach folgt wiederum ein Beschleunigen. Die erste und zweite End-Winkelgeschwindigkeit unterscheiden sich betragsmäßig. Die Rotationsrichtung wird jedoch nicht geändert. Dieser als "unidirektionaler Shake-Mode" bezeichnete Mischvorgang hat sich zumindest in Systemen bewährt, bei denen sich an die Reaktionskammer oder Mischkammer eine Kanalstruktur anschließt, die eine Kombination aus Siphon- und Flüssigkeitsventil aufweist. Der unidirektionale Shake-Mode soll verhindern, dass Flüssigkeit bei geringen Drehgeschwindigkeiten bzw. beim Stillstand kapillar getrieben durch den Siphon hindurchtreten kann.

[0015] Trotz intensiver Untersuchungen in unterschiedlichen Richtungen und trotz der erzielten Fortschritte besteht im Stand der Technik weiterhin ein großer Bedarf daran, das Durchmischen von Flüssigkeiten und eine (homogene) Verteilung von Komponenten in einer Flüssigkeit innerhalb von Prozesskammern eines rotierenden Testelements zu verbessern. Dabei soll vorwiegend die Homogenität innerhalb des Flüssigkeitsraums verbessert werden und, wenn möglich, gleichzeitig die Prozessdauer reduziert werden.

[0016] Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es somit, ein verbessertes Verfahren und eine verbesserte Vorrichtung zum Durchmischen von Flüssigkeiten vorzuschlagen.

[0017] Gelöst wird die vorliegende Aufgabe durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 1 sowie durch eine Vorrichtung mit den Merkmalen des Anspruchs 12 und durch ein Testelement mit den Merkmalen des Anspruchs 13.

[0018] Das erfindungsgemäße Verfahren zum Durchmischen einer Flüssigkeit mittels eines mikrofluidischen Testelements, das ein Substrat und eine mikrofluidische Kanalstruktur mit einer Mischkammer aufweist, setzt voraus, dass das mikrofluidische Testelement mit einer Winkelgeschwindigkeit ω um eine Rotationsachse rotiert, die sich bevorzugt durch das Testelement erstrecken kann. Beispielsweise kann die Rotationsachse eine zentrale Rotationsachse durch den Mittelpunkt des Testelements oder durch den Schwerpunkt sein. Bevorzugt ist das Testelement als Testträger ausgebildet oder in einen Testträger integriert. Der Testträger rotiert um eine Rotationsachse, die sich bevorzugt durch den Testträger er-

streckt und bevorzugt zentral angeordnet ist.

[0019] Das mikrofluidische Testelement rotiert gemäß eines Rotationsprofils, das wenigstens zwei Zyklen umfasst und bei dem sich die Winkelgeschwindigkeit innerhalb eines Zyklus ändert. Das Rotationsprofil ist dabei als eine zeitliche Abfolge von mehreren Winkelendgeschwindigkeiten zu verstehen, die in Zyklen unterteilt sind. Ein Zyklus umfasst das Beschleunigen der Rotation des Testelements mit zumindest einer ersten Beschleunigung a_1 bis zum Erreichen einer ersten End-Winkelgeschwindigkeit ω_1 und nach Erreichen der ersten End-Winkelgeschwindigkeit ω_1 das Beschleunigen der Rotation des Testelements mit zumindest einer zweiten Beschleunigung a_2 bis zum Erreichen einer zweiten End-Winkelgeschwindigkeit ω_2 . Die beiden Beschleunigungen a_1 und a_2 sind entgegengerichtet. Ein Zyklus ist so definiert, dass er die zeitliche Abfolge der Winkelgeschwindigkeit definiert, wobei beispielsweise die erste End-Winkelgeschwindigkeit zweimal in einem Zyklus enthalten ist. Findet die Änderung der Winkelgeschwindigkeit um den Nullpunkt (Stillstand; $f = 0$) herum statt, so kann ein Zyklus durch die Nulldurchgänge definiert werden. Ein Zyklus schließt dann jeweils drei Nulldurchgänge an, wobei zwei aufeinander folgende Zyklen Z_1 , Z_2 einen gemeinsamen Nulldurchgang haben. Der Zyklus entspricht folglich einer Periode, also dem kleinsten zeitlichen Intervall, nachdem sich ein Vorgang wiederholt. Dabei müssen die End-Winkelgeschwindigkeiten und/oder die Beschleunigungen nicht gleich oder konstant sein.

[0020] Das Rotationsprofil weist eine Mehrzahl von Zyklen auf, wobei sich das Rotationsprofil ebenfalls periodisch wiederholen kann, so dass sich die Reihenfolge der Zyklen nach einer vorgegebenen Zykluszahl (größer 2) wiederholt. Dies ist jedoch nicht zwingend erforderlich.

[0021] Erfindungsgemäß werden zum Erzeugen einer (vorzugsweise homogen) durchmischten Flüssigkeit wenigstens eine der Beschleunigungen a_1 , a_2 und/oder wenigstens eine der End-Winkelgeschwindigkeiten ω_1 , ω_2 von einem Zyklus zum nächsten geändert. Es wurde erkannt, dass sich durch die Aneinanderreihung unterschiedlicher Zyklen die Homogenität der durchmischten Flüssigkeit deutlich verbessern lässt. Auch hat die Anwendung unterschiedlicher Zyklen positive Auswirkungen auf die Mischzeit, die verringert wird.

[0022] Neben den oben gestellten Aufgaben löst das erfindungsgemäße Verfahren auch das Problem, dass ein "Verarmen" der Flüssigkeit am Analyt erfolgt, wenn der Analyt in der Flüssigkeit beispielsweise an der Festphase des Mikroarrays abbindet und daher der festphasennahe Teil der Flüssigkeit wenig bzw. weniger Analytmoleküle aufweist. Durch das erfindungsgemäße Verfahren wird sichergestellt, dass (kontinuierlich) Analyt aus den festphasenfernen Flüssigkeitsbereichen der Kammer zu den verarmten Flüssigkeitsbereichen nachgeliefert wird. Somit wird also der Massentransport innerhalb der Flüssigkeit durch das Verfahren ebenso optimiert wie das Vermischen.

[0023] Es wurde erkannt, dass sich bei Rotationsprofilen, die in allen Zyklen jeweils dieselben Beschleunigungen und dieselben End-Winkelgeschwindigkeiten aufweisen, in der Kanalstruktur, insbesondere in einer Flüssigkeitskammer bzw. Mischkammer, wiederholende Muster ausbilden. Diese wiederkehrenden Strömungsmuster wiederholen sich mit jedem Zyklus (Schwingung) und sind charakteristisch für die gewählte Beschleunigung und End-Frequenz des Schüttelns (Shake-Mode) bzw. der End-Winkelgeschwindigkeit. Insbesondere bei einem periodischen Shake-Mode mit konstanter Beschleunigung und konstanter Endfrequenz mit Drehrichtungswechsel sind diese Muster sehr ausgeprägt.

[0024] Bei biochemischen Assays mit einer Mehrzahl von Detektionssots (Array-Spots) führt das konstante Schütteln dazu, dass sich das Strömungsmuster auf der Array-Oberfläche "einbrennt". In diesem Fall können die Array-Spots (Detektionsorte) nicht an beliebigen Orten in die Kammer eingebracht werden, sondern müssten in Abhängigkeit des Rotationsprofils ausgewählt werden. Das Ankoppeln einer in der Flüssigkeit gleichverteilten Analytmenge an unterschiedlichen Orten auf der Kammeroberfläche ist somit unterschiedlich effizient. Um systemische Schwankungen zu eliminieren, werden zur Steigerung der Präzision bei Biosensoren im Array-Format jeweils mehrere Array-Spots durch Mittelwertbildung aus den tatsächlichen Spot-Ist-Werten ausgewertet. Die Ausbildung von Strömungsmustern verzerrt jedoch das Messergebnis, so dass diese Methode hier deutliche Nachteile aufweist.

[0025] Ausgehend von der Erkenntnis, dass bei mikrofluidischen Verhältnissen im Gegensatz zur Makrofluidik stets laminare Strömungsverhältnisse vorliegen, wurde erkannt, dass eine Teilbefüllung der Kammer einen negativen Einfluss auf die Strömungsverhältnisse einer (runden) Kammer hat und somit auch einen negativen Einfluss auf die Mischungsverhältnisse. Bei den kleinen Dimensionen der Mischkammern und Kanalstrukturen des mikrofluidischen Testelements und den typischen erreichbaren Strömungsgeschwindigkeiten von mehreren mm/sec kann von laminaren Bedingungen ausgegangen werden. So wurde im Rahmen der Erfindung erkannt, dass die besten Mischeffekte bei einer runden Kammerform erreicht werden, bei der auch die Wände der Kammer im Wesentlichen glatt sind. In den Raum hineinragende Rührelemente oder ähnliche Elemente wirken sich nicht messbar bis negativ aus. Im Rahmen der Versuche wurde weiter erkannt, dass die runde Kammer bevorzugt kreisrund und nicht elliptisch ist. Da bei den rotierenden Testelementen die Form einer flachen Scheibe gewählt wird und eine optische Auswertung über die Oberfläche der Scheibe erfolgt, wurde erkannt, dass eine Kammer in Form einer Zylinderscheibe optimal ist. Besonders bevorzugt weist diese einen kreisrunden Grundriss auf. Dabei hat sich ein Verhältnis von Kammerdurchmesser zu Höhe der Kammer von 1 zu 1 als ideal erwiesen. Dieses "Aspektverhältnis" soll also bevorzugt nahe

1 liegen und unter Berücksichtigung der typischen systemischen Randbedingungen maximal 4 betragen. Der Quotient von Oberfläche A zu Volumen V sollte aufgrund der Untersuchungen bei konstantem Volumen einen Wert zwischen 1 und 3,5 haben. Dabei ist die Flüssigkeitskammer derart anzuordnen, dass sich die (bevorzugt durch das Testelement erstreckende) Rotationsachse, um die sich das Testelement dreht, nicht durch die Flüssigkeitskammer erstreckt. Vielmehr ist die Flüssigkeitskammer bevorzugt von der Rotationsachse beabstandet.

[0026] In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens sind die Beträge der Beschleunigungen a_1 und a_2 in einem Zyklus verschieden. Die Ausbildung konstanter Strömungsmuster in der Flüssigkeitskammer wird schon innerhalb eines Zyklus verhindert.

[0027] Bevorzugt ist wenigstens eine der Beschleunigungen a_1 , a_2 während eines Zyklus veränderlich. Die eine oder beide Beschleunigungen a_1 , a_2 ändern sich also innerhalb des Zyklus. Im Rahmen der Erfindung wurde erkannt, dass alternativ wenigstens eine der Beschleunigungen a_1 , a_2 während eines Zyklus konstant sein kann, bevorzugt beide Beschleunigungen. Die Änderung der Winkelgeschwindigkeit innerhalb des Zyklus ändert sich also kontinuierlich (konstant). Da ein Zyklus im Verhältnis zum Rotationsprofil und somit zur gesamten Mischdauer relativ kurz ist, bilden sich innerhalb der Periodendauer (Zyklusdauer) keine stehenden, gleichbleibenden Strömungsmuster aus. Es hat sich jedoch gezeigt, dass mit einer konstanten Beschleunigung innerhalb eines Zyklus die Mischergebnisse von (annähernd) gleicher Qualität sind wie bei sich ändernden Beschleunigungen während des Zyklus. Allerdings ist die Steuerung der Rotation mit einer konstanten Beschleunigung deutlich einfacher zu realisieren.

[0028] Es hat sich auch gezeigt, dass die Mischeffizienz mit höheren Amplituden (größere End-Winkelgeschwindigkeiten ω_1 , ω_2) effektiver ist als die Mischeffizienz mit geringen Amplituden (ω_1 , ω_2). Bei gleicher Beschleunigung ist folglich die Mischeffizienz mit einer längeren Periodendauer und weniger Zyklen (Assay-Intervall) effektiver als mit einer demzufolge kurzen Periodendauer und vielen Zyklen pro Untersuchung, also bei gleicher Gesamt-Mischdauer. Gemäß des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Drehrichtung des Testelements beim Erreichen der ersten End-Winkelgeschwindigkeit ω_1 gleich oder entgegengerichtet zu der Drehrichtung des Testelements beim Erreichen der zweiten End-Winkelgeschwindigkeit ω_2 .

[0029] In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Drehrichtung entgegengesetzt. Folglich findet eine Umkehr der Drehrichtung statt, während zwischen der ersten und zweiten End-Winkelgeschwindigkeit eine Beschleunigung auf das rotierende Testelement ausgeübt wird. Die "Schwingung" findet also um den Nullpunkt der Frequenz statt. Nach Erreichen der ersten End-Winkelgeschwindigkeit ω_1 wird durch Erreichen einer zweiten Be-

schleunigung a_2 folglich das rotierende Testelement so weit abgebremst, bis es zum Stillstand kommt und dann mit der gleichen zweiten Beschleunigung a_2 weiter beschleunigt, bis die zweite End-Winkelgeschwindigkeit ω_2 erreicht ist. Im Rahmen der Erfindung wurde erkannt, dass eine bessere Durchmischung erfolgt, wenn sich die Drehrichtung des Testelements ändert. Zum Zeitpunkt des Nulldurchgangs (Frequenz $f = 0$, Drehwinkelgeschwindigkeit $\omega = 0$) wirken auf die Flüssigkeit in dem Testelement keine Zentrifugalkraft und keine Corioliskraft. Zu der weiterhin wirkenden Eulerkraft tritt die Kapillarkraft als vorherrschende Komponente hinzu, die durch die Anordnung und Geometrie der Kapillarstrukturen gegeben ist. Durch das kurzzeitige (dominante) Wirken der Kapillarkraft wird das Mischergebnis insgesamt verbessert. Wichtig ist jedoch, dass die Geometrie, insbesondere ein sich an die Mischkammer anschließender Siphon, entsprechend ausgebildet ist, so dass ein Durchbrechen des Siphons verhindert wird.

[0030] Im Rahmen der Erfindung wird unter dem Begriff "Durchmischen" nicht nur das Auflösen eines Feststoffes in einer Flüssigkeit und das Mischen mehrerer Flüssigkeiten verstanden, sondern auch der gleichmäßige Transport von in der Flüssigkeit gelösten Bestandteilen, um beispielsweise ein Verarmen der Lösung mit Reagenz bzw. Analyt an einer Bindephase (Festphase) zu vermeiden. Nach der Reaktion einzelner Analytmoleküle mit Fängermolekülen der Bindephase erfolgt ein Verarmen des Analyten in der Flüssigkeit in dem Bereich der Bindephase. Durch das Mischen wird der Transport von Analytmolekülen innerhalb der Flüssigkeit derart sichergestellt, dass eine kontinuierliche Nachlieferung der Analytmoleküle aus entfernten Bereichen zu den Flüssigkeitszonen nahe der Bindephase erfolgt, um möglichst alle im Rahmen der relevanten Gleichgewichts-Reaktion möglichen Analytmoleküle an die Bindephase (bzw. an deren Fängermoleküle) zu binden, was die Empfindlichkeit des Nachweisverfahrens erhöht. Das erreichte Ziel ist somit ein Anreichern möglichst aller Analytmoleküle aus der Flüssigphase an der Bindephase. Der Begriff "Durchmischen" schließt also auch diesen Ausgleich der Analytmoleküle innerhalb der Flüssigkeit ein.

[0031] Die Erfindung wird nachfolgend anhand von in den Figuren dargestellten besonderen Ausführungsformen näher erläutert. Die dort dargestellten Besonderheiten können einzeln oder in Kombination verwendet werden, um bevorzugte Ausgestaltungen der Erfindung zu schaffen. Die beschriebenen Ausführungen stellen keine Einschränkung der durch die Ansprüche in ihrer Allgemeinheit definierten Erfindung dar. Es zeigen:

Fig. 1 eine Vorrichtung zum homogenen Durchmischen einer Flüssigkeit;

Fig. 2 einen Testträger mit einem erfindungsgemäßen Testelement;

- Fig. 3 ein Diagramm mit der zeitlichen Abfolge der Winkelgeschwindigkeit im "Standard-Shake-Mode";
- Fig. 4 ein Diagramm mit der zeitlichen Abfolge der Winkelgeschwindigkeit bei geänderten End-Winkelgeschwindigkeiten;
- Fig. 5a-c je ein Diagramm mit der zeitlichen Abfolge der Winkelgeschwindigkeit bei unterschiedlichen Beschleunigungen;
- Fig. 6 ein weiteres Diagramm der zeitlichen Abfolge der Winkelgeschwindigkeit im "Zufalls-Shake-Mode";
- Fig. 7 eine Tabelle zur Gegenüberstellung verschiedener Shake-Modi;
- Fig. 8 ein Diagramm zum Vergleich zweier Shake-Modi;
- Fig. 9 ein Diagramm mit dem zeitlichen Verlauf zweier "Zufalls-Shake-Modes".

[0032] Figur 1 zeigt eine Vorrichtung 1 zum homogenen Durchmischen einer Flüssigkeit mit einem Testelement 2, das in der Vorrichtung 1 gehalten wird. Die Vorrichtung 1 umfasst eine Halterung 3 zur Aufnahme des Testelements 2, die um eine Rotationsachse 4 drehbar ist. Die zwei Testelemente 2 sind in einem Testträger 16 integriert. Die drehbare Halterung 3 mit ihrer Welle 3a wird von einem Antrieb 5 derart bewegt, dass die Halterung 3 mitsamt des gehaltenen Testträgers 16 mit einer einstellbaren veränderlichen Winkelgeschwindigkeit um die Rotationsachse 4 dreht. Der Antrieb 5 wird von einer Steuerungseinheit 6 gesteuert, wobei ein Bewegungsablauf festgelegt werden kann, der bevorzugt als Rotationsprofil in der Steuerungseinheit 6 hinterlegt ist. Das Rotationsprofil kann beispielsweise aus mehreren Steuerungsbefehlen bestehen, mit der die Rotationsgeschwindigkeit (Winkelgeschwindigkeit), die Beschleunigung, die Haltezeit, während der die End-Winkelgeschwindigkeit konstant gehalten wird, und die Drehrichtung festgelegt sind. Das Rotationsprofil kann entweder in einem Speicher der Vorrichtung 1 hinterlegt sein oder durch manuelle Einstellung der obigen Parameter an der Vorrichtung eingestellt oder aus den Parametern erzeugt werden.

[0033] In der gezeigten Ausführungsform umfasst die Vorrichtung 1 eine optische Mess- und Auswerteeinheit 7 mit einem optischen Sensor 8. Eine in dem Testelement 2 aufgenommene Flüssigkeit kann analysiert und gemessen werden. Dabei können die im Stand der Technik bekannten Ermittlungsverfahren angewendet werden.

[0034] Das mikrofluidische Testelement 2 umfasst eine mikrofluidische Kanalstruktur 10, die einen Kanalabschnitt 11 aufweist, der sich von einer Öffnung 12 zu

einer mikrofluidischen Flüssigkeitskammer 13 erstreckt. Die Flüssigkeitskammer 13 ist über einen Siphonkanal 14 mit einer Sammelkammer 15 fluidisch verbunden, die auch als Waste-Chamber bezeichnet wird. Die Testelemente 2 sind in dem Testträger 16 eingebettet, der als runde Scheibe (Disc) ausgebildet ist und durch den sich die Rotationsachse 4 erstreckt. Die Kanalstruktur 10 wird von einem Substrat und einer nicht gezeigten Deckschicht umschlossen, die den Testträger 16 von oben abdeckt.

[0035] Die Halterung 3 in der Vorrichtung 1 ist als Welle 3a ausgebildet, die konzentrisch zur Rotationsachse 4 verläuft. Selbstverständlich ist es auch möglich, andere Halterungen 3 vorzusehen, beispielsweise eine Haltescheibe, ein Rotor oder eine Spannvorrichtung mit äußeren Klammern, in die das Testelement eingespannt wird. Neben der zentralen Welle 3a ist es möglich, den Testträger mit einem oder mehreren Testelementen um eine außerzentrische (exzentrische) Rotationsachse rotieren zu lassen. Die Rotationsachse kann sich dabei beispielsweise durch den Schwerpunkt des Testträgers 16 erstrecken, um räumlichen Strukturen in dem Testträger 16 bzw. den Testelementen 2 zu berücksichtigen und eine Umwucht beim Rotieren zu vermeiden. Die Rotationsachse muss nicht zwingend vertikal ausgerichtet sein. Sie kann auch schräg im Raum verlaufen unter einem Raumwinkel $\vartheta \neq 0$ gegenüber der Vertikalen.

[0036] Der Testträger 16 in Figur 2 zum homogenen Durchmischen einer Flüssigkeit umfasst ein Testelement 2 mit einer Kanalstruktur 10. Die Kanalstruktur 10 hat zwei Öffnungen 12a, 12b, an die sich zwei nebeneinander verlaufende Kanalabschnitte 11a, 11b bis zu zwei Zwischenkammern 17a, 17b erstrecken. So können beispielsweise zwei Flüssigkeiten gleichzeitig zugeführt werden. Die Zwischenkammern 17a, 17b stehen über einen weiteren Kanal 18a bzw. 18b mit je einer Öffnung 19a, 19b in Fluidverbindung. Über die Öffnungen 19a, b kann der die Flüssigkeit aufnehmende Kanalabschnitt bei Mehrfachnutzung zuverlässig entlüftet werden. Ein sich an die Zwischenkammern 17a, 17b anschließender Kanalabschnitt 20a, 20b führt zu einem fluidischen Ventil 21, durch das Flüssigkeiten aus den Zwischenkammern 17a, 17b gesteuert in die Flüssigkeitskammer 13 geleitet werden können. Das fluidische Ventil 21 hat einen Luftauslass 22 zum Entlüften, der über einen Luftkanal 23 für die Entlüftung des fluidischen Ventils 21 und daran angeschlossener Fluidikbereiche (z. B. Kammer 13) sorgt.

[0037] Sobald Flüssigkeit aus den Zwischenkammern 17a, 17b in die Flüssigkeitskammer 13 gelangt ist, kann ein Durchmischen stattfinden. An die Flüssigkeitskammer 13 schließt sich ein Siphonkanal 14 an, der die Flüssigkeitskammer 13 mit einer Sammelkammer 15 verbindet.

[0038] Werden zwei unterschiedliche Flüssigkeiten getrennt in den Zwischenkammern 17a, 17b gelagert und in die Flüssigkeitskammer 13 gegeben, so findet eine Durchmischung beider Flüssigkeiten auf Grund von Dif-

fusion statt. Dieser Prozess dauert jedoch sehr lange, häufig mehrere Stunden. Um dies zu beschleunigen, wird im Stand der Technik ein Standard-Shake-Mode (Standard-Eulermischen) verwendet, bei dem die Rotationsgeschwindigkeit des Testträgers 16 bzw. des Testelements 2 verändert wird, Figur 3. Die Änderung der Frequenz beschreibt eine "Schwingung" mit Nulldurchgang ($f = 0$) zwischen einer ersten Endfrequenz von $f_1 = +40$ Hz und einer zweiten Endfrequenz $f_2 = -40$ Hz. Die ausgeübten Beschleunigungen a_1 , a_2 sind betragsmäßig gleich. Die Periodendauer ist somit konstant. Als Zyklusdauer (Periodendauer) wird die Zeit zwischen dem ersten Erreichen der ersten Endfrequenz f_1 und dem nächsten Erreichen der ersten Endfrequenz f_1 verstanden.

[0039] Im Rahmen der Erfindung wurde mit diesem "Standard-Eulermischen" erkannt, dass die Formgebung der Flüssigkeitskammer 13 einen Einfluss auf die Mischgeschwindigkeit hat. So wurde am Beispiel einer Flüssigkeitskammer 13 mit einem konstanten Volumen von 10 Mikrolitern ($10 \mu\text{l}$), die in dem scheibenförmigen Testträger 16 mit einer Höhe von 2,7 bis 3 mm angeordnet ist, erkannt, dass eine runde Flüssigkeitskammer 13 vorteilhaft ist. Bevorzugt ist die Flüssigkeitskammer 13 als runde Zylinderscheibe mit einer Höhe kleiner der Höhe des Testträgers 16. ausgebildet. Besonders bevorzugt ist ein kreisrunder Grundriss der Zylinderscheibe. Der Quotient aus dem Durchmesser der kreisrunden Zylinderscheibe und der Höhe des Zylinders sollte möglichst nahe eins liegen. Bei einem Quotienten von 1,25, einem Kammerdurchmesser r_1 von 2,5 mm und einer Höhe h_1 von 2 mm wird bereits nach 5 Sekunden eine homogene Durchmischung zweier Plasma enthaltenden Flüssigkeiten erzielt, während bei einem Durchmesser r_2 von 4 mm und einer Höhe h_2 von 0,8 mm eine homogene Durchmischung erst nach 10 Sekunden erfolgt. Es wurde erkannt, dass das Verhältnis von Oberfläche A zu Volumen V entscheidend ist. Bevorzugt ist der Quotient nahe 1. Die erste Kammer hat einen Quotienten $Q_1 = A_1 / V_1 = 2,6$ während die zweite Kammer einen Quotienten $Q_2 = A_2 / V_2 = 3,5$ aufweist. Die Kammer mit dem kleineren Quotienten erzielt schneller eine homogene Durchmischung.

[0040] Durch Verwendung eines erfindungsgemäßen Rotationsprofils mit unterschiedlichen Zyklen kann die Mischeffizienz weiter gesteigert werden. So wurde erkannt, dass erfindungsgemäß von einem Zyklus Z_1 zum nächsten Zyklus Z_2 wenigstens eine der Beschleunigungen a_1 , a_2 und/oder wenigstens eine der End-Winkelgeschwindigkeiten ω_1 , ω_2 verändert werden muss. Die Inkubationsdauer unter Mischen über der Festphase des Microarrays lässt sich damit auf wenige Minuten reduzieren, während die Güte der Nachlieferung von Analyten an die Nachweis-Oberfläche und die Homogenität der Abbindung auf der Festphase deutlich verbessert werden.

[0041] Figur 4 zeigt ein Rotationsprofil, bei dem nur die End-Winkelgeschwindigkeiten ω_1 , ω_2 von Zyklus zu Zyklus verändert wurden. Die Beschleunigungen a_1 , a_2

sind in allen Zyklen gleich. In dieser bevorzugten Ausführungsform sind die erste und zweite Beschleunigung a_1 , a_2 betragsmäßig gleich.

[0042] Die Figuren 5a bis c zeigen jeweils einen Ausschnitt eines Rotationsprofils für die Winkelgeschwindigkeit. Bei allen Profilen ändern sich sowohl die Beschleunigungen a_1 , a_2 als auch die End-Winkelgeschwindigkeiten ω_1 , ω_2 in den jeweiligen Zyklen. Gezeigt werden dabei jeweils exemplarisch zwei Zyklen Z_1 , Z_2 .

[0043] In Figur 5a ist die erste Beschleunigung a_{11} im ersten Zyklus Z_1 verschieden von der ersten Beschleunigung a_{12} im zweiten Zyklus Z_2 . Gleichzeitig ist die erste End-Winkelgeschwindigkeit ω_{11} des ersten Zyklus verschieden von der ersten End-Winkelgeschwindigkeit ω_{12} des zweiten Zyklus. Gleiches gilt für die zweite Beschleunigung a_{21} , a_{22} und die zweite End-Winkelgeschwindigkeit ω_{21} und ω_{22} . Innerhalb eines Zyklus ist die jeweilige Beschleunigung a_1 , a_2 konstant und ändert sich nicht.

[0044] In einer bevorzugten Ausführungsform ist wenigstens eine der Beschleunigungen a_1 , a_2 während eines Zyklus Z veränderlich. Beispielsweise kann die jeweilige Beschleunigung a_1 , a_2 aus zwei Teilbeschleunigungen a_{1a} , a_{1b} bzw. a_{2a} , a_{2b} bestehen. Beispielsweise können die jeweiligen Beschleunigungen a_a , a_b jeweils konstant sein. Bevorzugt sind sie voneinander verschieden. Die Beschleunigungen a_a , a_b können jedoch auch veränderlich sein, so dass im Diagramm keine Gerade, sondern eine Kurve dargestellt wäre.

[0045] Bevorzugt besteht ein Zyklus aus einem ersten Teilzyklus Z_{T1} bis zum Erreichen der ersten End-Winkelgeschwindigkeit ω_1 und aus einem sich daran anschließenden zweiten Teilzyklus Z_{T2} bis zum Erreichen der zweiten End-Winkelgeschwindigkeit ω_2 . Die Rotation des Testelements erfolgt in wenigstens einem der beiden Teilzyklen Z_{T1} , Z_{T2} mit wenigstens zwei Beschleunigungen a_a , a_b .

[0046] Figur 5b ist zu entnehmen, dass der erste Zyklus Z_1 aus den beiden Teilzyklen Z_{T11} und Z_{T21} besteht. Im ersten Teilzyklus Z_{T11} erfolgt die Rotation des Testelements zunächst mit der Beschleunigung a_{11a} und anschließend mit einer zweiten Beschleunigung a_{11b} , die in dieser Ausführungsform von der ersten Teilbeschleunigung a_{11a} verschieden ist. Der zweite Teilzyklus Z_{T21} des ersten Zyklus weist ebenfalls zwei Beschleunigungen a_{21a} und a_{21b} auf.

[0047] In einer bevorzugten Ausführungsform ist wenigstens eine der beiden Teilbeschleunigungen a_a , a_b in wenigstens einem der Teilzyklen Z_{T1} , Z_{T2} gleich Null. Für die vorgegebene Zeitdauer T_P (Plateauzeit, Haltezeit), während der die Beschleunigung a_a , a_b gleich Null ist, findet folglich keine Änderung der Winkelgeschwindigkeit statt, so dass für die Zeitdauer T_P das Testelement mit einer konstanten Geschwindigkeit rotiert. Bevorzugt ist jedoch wenigstens eine der Teilbeschleunigungen a_a , a_b ungleich Null. Ein derartiges Rotationsprofil hat sich insbesondere bei biochemischen Tests und Tests in der Immunologie als vorteilhaft erwiesen, wenn während der

Phasen mit einer konstanten Rotation (Beschleunigung gleich Null) ein Abbinden stattfindet.

[0048] Selbstverständlich kann die Beschleunigung in einem Teilzyklus a_1 , a_2 auch aus mehr als zwei Teilbeschleunigungen a_a , a_b , a_c ... bestehen. Denkbar ist, dass noch vor Erreichen der End-Winkelgeschwindigkeit die Rotation des Testelementes mit einer konstanten Winkelgeschwindigkeit (ungleich der End-Winkelgeschwindigkeit) erfolgt, also mit einer Beschleunigung gleich Null, und anschließend erneut die Rotation beschleunigt wird, bis die End-Winkelgeschwindigkeit erreicht wird.

[0049] Bevorzugt ist wenigstens eine der Teilbeschleunigungen beim Erreichen einer der End-Winkelgeschwindigkeiten gleich Null. Das Testelement wird dann mit der End-Winkelgeschwindigkeit des Zyklus für eine vorgegebene Zeitdauer T_p konstant rotiert, also nicht beschleunigt. Figur 5c zeigt ein derartiges Rotationsprofil, bei dem die Beschleunigungen a_{1b} und a_{21b} im ersten Zyklus gleich Null sind. Die Rotation des Testelementes mit einer konstanten Geschwindigkeit findet hier beim Erreichen der End-Winkelgeschwindigkeiten ω_{11} , ω_{21} im ersten Zyklus Z_1 statt. Im Rahmen der Erfindung wurde erkannt, dass die Rotation für ein vorgegebenes Zeitintervall T_p mit der End-Winkelgeschwindigkeit positive Auswirkungen auf das Abbinden der Moleküle auf der aktiven Oberfläche hat. Die Zeitdauern T_{p1} und T_{p2} innerhalb eines Zyklus können gleich oder unterschiedlich voneinander sein. Sie können von Zyklus zu Zyklus variieren oder sich wiederholen.

[0050] In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens sind die Beschleunigungen des Rotationsprofils mit einer Zufallszahl kodiert; sie werden aus der Zufallszahl gebildet. Bevorzugt werden zusätzlich oder optional die End-Winkelgeschwindigkeiten ω_1 , ω_2 aus einer Zufallszahl gebildet. Beispielsweise können für jede anzuwendende Beschleunigung und End-Winkelgeschwindigkeit eine Zufallszahl verwendet werden, die innerhalb der systemisch vorgegebenen Grenzen der Vorrichtung liegen. In den ausgeführten Beispielen ist der Betrag der End-Winkelgeschwindigkeit systembedingt auf 100 Hz beschränkt, so dass die durch eine Zufallszahl ermittelten End-Winkelgeschwindigkeiten ebenfalls betragsmäßig nicht größer als 100 Hz werden können. Gleichzeitig muss bei dem hier verwendeten Testelement 2 der Betrag der End-Winkelgeschwindigkeit systembedingt größer oder gleich 20 Hz sein, da sonst der sich an die Flüssigkeitskammer 13 anschließende Siphonkanal 14 durchbricht und Flüssigkeit entweicht.

[0051] Die Zufallszahl ist bevorzugt eine "echte Zufallszahl". Beispielsweise können die Kreiszahl π oder die Eulerzahl $e = 2,718281828459...$ verwendet werden. Diese als echte Zufallszahlen bezeichneten Zahlen eignen sich besonders für ein "chaotisches Eulermischen". Die Zufallszahl wird als Matrix für die Wahl der "zufälligen" Prozessparameter verwendet. Beispielsweise können Werte der Beschleunigungen und/oder der End-Winkelgeschwindigkeiten aus je zwei aufeinander

folgenden Ziffern der Zufallszahl gebildet werden. Alternativ kann jede Ziffer verwendet werden, die mit einem konstanten Faktor, z. B. 10, multipliziert wird.

[0052] Am Beispiel der Zahl $\pi = 3,141592653589793...$ folgt daraus, dass das Testelement 2 im ersten Zyklus Z_1 von einer ersten End-Winkelgeschwindigkeit $\omega_1 = 31$ Hz (Anfangsgeschwindigkeit) mit einer zweiten Beschleunigung $a_2 = -41$ Hz/sec beschleunigt wird bis zum Erreichen einer zweiten End-Winkelgeschwindigkeit $\omega_2 = -59$ Hz. Das Testelement 2 wird also zunächst gebremst und dann mit geänderter Rotationsrichtung beschleunigt. Anschließend wird es mit der ersten Beschleunigung $a_1 = 26$ Hz/sec beschleunigt. Auch dieser Vorgang umfasst ein Bremsen, einen (kurzen) Stillstand mit Drehrichtungsumkehr und ein Beschleunigen. Die erste Beschleunigung a_1 ist der zweiten Beschleunigung a_2 entgegengerichtet und weist folglich ein positives Vorzeichen auf. Das Testelement 2 wird bis zum Erreichen der ersten End-Winkelgeschwindigkeit $\omega_1 = 53$ Hz mit der ersten Beschleunigung a_1 beschleunigt. Diese erste End-Winkelgeschwindigkeit ω_1 gehört bereits zum zweiten Zyklus Z_2 des Rotationsprofils.

[0053] Für den zweiten Zyklus Z_2 des Rotationsprofils werden die nachfolgenden Ziffern der Zahl π ausgewählt, so dass die zweite Beschleunigung des zweiten Zyklus $a_2 = -58$ Hz/sec ist. Alle nachfolgenden Beschleunigungen und End-Winkelgeschwindigkeiten der einzelnen Zyklen werden entsprechend ausgewählt.

[0054] Dieses Rotationsprofil eines " π -Shake-Modes" (π -Eulermischen) ist in Figur 6 dargestellt. Bei dem Rotationsprofil werden sowohl die End-Winkelgeschwindigkeiten ω_1 , ω_2 als auch die Beschleunigungen a_1 , a_2 von Zyklus zu Zyklus verändert werden. Der Betrag der maximal auftretenden End-Winkelgeschwindigkeit ω_1 , ω_2 beträgt in diesem Anwendungsbeispiel systembedingt 100 Hz. Deutlich zu erkennen ist, dass die Zyklen unterschiedliche Zyklusdauern haben, was aus den unterschiedlichen Beschleunigungen bzw. End-Winkelgeschwindigkeiten folgt.

[0055] Der Nachweis der verbesserten Durchmischung eines Analyten in einer Flüssigkeit durch Einsatz eines chaotischen Euler-Rotationsprofils, bei dem sowohl die Beschleunigungen wie auch die End-Winkelgeschwindigkeiten von einem Zyklus zum nächsten verändert werden, ist in der Tabelle in Fig. 7 gezeigt. Dazu wurden drei Spots eines festphasengebundenen Reaktionspartners in einer Flüssigkeitskammer 13 platziert. Ein Analyt (in diesem Fall ein Protein), der in einer Flüssigkeit enthalten ist, wurde durch eine optische Auswertung mit einer Belichtungszeit von 10 Sekunden ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert MW der gemessenen Signale über verschiedene Testelemente. Als Signal gilt der Mittelwert aus den Spot-Integralen (= Spot-Signale). Je höher der Mittelwert und je geringer der Variationskoeffizient, desto vorteilhafter ist die Art des Mischens für die Microarrays.

[0056] In Figur 7 sind die Messergebnisse zweier Messungen gezeigt. Sowohl in der ersten (1.) als auch in der

zweiten (2.) Messung wird ein Standardschütteln (Standard-Eulermischen) mit gleich bleibenden Beschleunigungen und gleich bleibenden End-Winkelgeschwindigkeiten über alle Zyklen verglichen mit einem "chaotischen Eulermischen", bei dem die Beschleunigungen a_1 , a_2 konstant sind und die End-Winkelgeschwindigkeiten ω_1 , ω_2 innerhalb der Inkubationsdauer variieren und Zeitintervalle der konstanten Rotation sich mit aktiven Mischphasen während der Inkubation abwechseln. In der ersten Messung werden beim chaotischen Eulermischen etwa 5 % mehr Signale (Counts) ermittelt, während der Variationskoeffizient VK von 27 % auf 21 % gesunken ist. Auch bei der zweiten Messung mit einer geänderten Proteindichte in der Flüssigkeit ergibt sich eine Erhöhung des Mittelwerts der detektierten Signale (Counts). In diesem Fall liegt die Erhöhung bei 11 %. Gleichzeitig verbessert sich der Variationskoeffizient VK von 26 % auf 17 %. Aus beiden Werten lässt sich erkennen, dass eine deutlich verbesserte Homogenität erzielt wurde.

[0057] In Figur 8 wird das Standard-Eulermischen (Kurve A) mit dem chaotischen Eulermischen (Kurve B) auf Grundlage der Zahl π (π -Eulermischen) verglichen. Zum Nachweis der Homogenität wurde ein BI-DIG-Modellsystem eingesetzt, bei dem der Boden der Flüssigkeitskammer 13 mit einem TRSA-BI-Streptavidin ge-coatet ist. Auf dem Boden sind einzelne Spots mit einem BI-RPLA-DIG (BI-Rinderplasmaalbumin-DIG) angeordnet, wobei die Bodenfläche um die Spots mit Biotin geblockt (beschichtet) ist. Nachgewiesen wird ein Anti-DIG-Latex als Modell-Analyt in einer Probenflüssigkeit. In Figur 8 ist jeweils der Median der gemessenen, signalgebenden Fluoreszenzsignale (FS) (counts) über den einzelnen (nummerierten) Spots (S) der Kammer 13 dargestellt. Der Vergleich der beiden Kurven zeigt, dass bei dem chaotischen Eulermischen deutlich geringere Ausreißer der einzelnen Spots zu detektieren sind als beim Standardmischen. Auch in diesem Fall ist die Variation der einzelnen Spots geringer. Es erfolgt also eine bessere Verteilung des in der Flüssigkeit enthaltenen Analyten, was ein Indikator für eine bessere Durchmischung der Flüssigkeit ist.

[0058] Figur 9 zeigt den Vergleich zweier Messungen bei einem "chaotischen Euler-Mischen". Auch hier sind jeweils der Median der gemessenen, signalgebenden Fluoreszenzsignale (FS) (counts) über den einzelnen (nummerierten) Spots (S) einer Kammer gezeigt. Bis auf jeweils einen Ausreißer an je einem Spot zeigt das Messergebnis eine geringe Varianz über alle Spots. Es erfolgt somit eine sehr gute Gleichverteilung, da der Variationskoeffizient gering ist. Die beiden Ausreißer waren bei diesem Versuch erwartet worden, da sie systembedingt sind. Dass beide Ausreißer an unterschiedlichen Spots detektiert wurden, hängt damit zusammen, dass keine idealgleichen Matrizen (gecoatete Flüssigkeitskammern) zur Verfügung standen. Allerdings ist der deutliche Trend zu erkennen, dass durch eine Veränderung der Beschleunigungen und der End-Winkelgeschwindigkei-

ten von Zyklus zu Zyklus innerhalb eines Rotationsprofils die Durchmischung einer Flüssigkeit deutlich verbessert werden kann.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Durchmischen einer Flüssigkeit mittels eines mikrofluidischen Testelements (2) mit einem Substrat und einer mikrofluidischen Kanalstruktur (10) zur Aufnahme der Flüssigkeit, wobei das Testelement (2) mit einer Winkelgeschwindigkeit ω um eine Rotationsachse (4) rotiert, umfassend die folgenden Schritte:

- Rotieren des Testelements (2) mit der Flüssigkeit gemäß eines Rotationsprofils, das wenigstens zwei Zyklen umfasst und bei dem sich die Winkelgeschwindigkeit innerhalb eines Zyklus ändert,

wobei in einem Zyklus die folgenden Schritte ausgeführt werden:

- Beschleunigen der Rotation des Testelements (2) mit wenigstens einer Beschleunigung a_1 bis zum Erreichen einer ersten End-Winkelgeschwindigkeit ω_1 ,
- nach Erreichen der ersten End-Winkelgeschwindigkeit ω_1 , Beschleunigen der Rotation des Testelements (2) mit wenigstens einer Beschleunigung a_2 bis zum Erreichen einer zweiten End-Winkelgeschwindigkeit ω_2 ,

wobei die Beschleunigung a_1 und die Beschleunigung a_2 entgegengerichtet sind,

dadurch gekennzeichnet, dass

sich wenigstens eine der Beschleunigungen a_1 , a_2 und/oder wenigstens eine der End-Winkelgeschwindigkeiten ω_1 , ω_2 von einem Zyklus zum nächsten Zyklus ändert.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Beträge der Beschleunigungen a_1 , a_2 in einem Zyklus verschieden sind.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet, dass** wenigstens eine der Beschleunigungen a_1 , a_2 während eines Zyklus konstant ist.

4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet, dass** wenigstens eine der Beschleunigungen a_1 , a_2 sich während eines Zyklus ändert.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** ein Zyklus aus einem ersten Teilzyklus bis zum Erreichen der ersten End-Winkelgeschwindigkeit ω_1 und aus ei-

- nem sich daran anschließenden zweiten Teilzyklus bis zum Erreichen der zweiten End-Winkelgeschwindigkeit ω_2 besteht und die Rotation des Testelements in wenigstens einem der beiden Teilzyklen mit wenigstens zwei Beschleunigungen a_a , a_b erfolgt, wobei die Beschleunigungen a_a , a_b voneinander verschieden sind. 5
6. Verfahren nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet, dass** wenigstens eine der Beschleunigungen a_a , a_b in wenigstens einem der Teilzyklen gleich Null ist. 10
7. Verfahren nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet, dass** wenigstens eine der Beschleunigungen a_a , a_b beim Erreichen einer der End-Winkelgeschwindigkeiten ω_1 , ω_2 gleich Null ist, so dass das Testelement für eine vorgegebene Zeitdauer T_p konstant mit der End-Winkelgeschwindigkeit ω_1 , ω_2 rotiert. 15 20
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Drehrichtung des Testelements (2) beim Erreichen der ersten End-Winkelgeschwindigkeit ω_1 der Drehrichtung beim Erreichen der zweiten End-Winkelgeschwindigkeit ω_2 entgegengesetzt ist. 25
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Rotationsprofil eine Mehrzahl von Zyklen umfasst und die Beschleunigung a_1 , a_2 und/oder End-Winkelgeschwindigkeit ω_1 , ω_2 des Rotationsprofils mit einer Zufallszahl derart kodiert sind, dass wenigstens eine der Beschleunigungen a_1 , a_2 und/oder End-Winkelgeschwindigkeiten ω_1 , ω_2 aus der Zufallszahl gebildet wird. 30 35
10. Verfahren nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Zufallszahl eine echte Zufallszahl ist und die Werte der Beschleunigungen a_1 , a_2 aus aufeinander folgenden Ziffern der Zufallszahl gebildet werden. 40
11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Zufallszahl eine echte Zufallszahl ist und die End-Winkelgeschwindigkeiten ω_1 , ω_2 aus aufeinander folgenden Ziffern der Zufallszahl gebildet werden. 45 50
12. Vorrichtung zum Durchmischen einer Flüssigkeit mit einem mikrofluidischen Testelement (2), das eine mikrofluidische Kanalstruktur (10) mit einer Flüssigkeitskammer (13) aufweist, umfassend ein Analysegerät 55
- mit einer Halterung (3) zur Aufnahme und Rotation des Testelements (2),
 - mit einem Antrieb (5) zum Rotieren der Halterung (3) um eine Rotationsachse (4) mit einer Winkelgeschwindigkeit ω
 - mit einer Steuerungseinheit (6) zum Steuern des Antriebs (5) derart, dass das Testelement (2) gemäß eines mehrere Zyklen umfassenden Rotationsprofils rotiert wird, wobei
 - sich die Winkelgeschwindigkeit innerhalb eines Zyklus ändert,
 - innerhalb eines Zyklus die Rotation mit wenigstens einer ersten Beschleunigung a_1 bis zu einer ersten End-Winkelgeschwindigkeit ω_1 beschleunigt und anschließend mit wenigstens einer entgegengerichteten zweiten Beschleunigung a_2 bis zu einer zweiten End-Winkelgeschwindigkeit ω_2 beschleunigt wird,
 - und wenigstens eine der Beschleunigungen a_1 , a_2 und/oder wenigstens eine der End-Winkelgeschwindigkeiten ω_1 , ω_2 innerhalb des Rotationsprofils von einem Zyklus zum nächsten Zyklus geändert wird.
13. Testelement zum Durchmischen einer Flüssigkeit umfassend eine Öffnung (12) zur Aufnahme von Flüssigkeit und eine mit der Öffnung (12) in Fluidverbindung stehende Flüssigkeitskammer (13), insbesondere geeignet zur Durchführung eines Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11 oder insbesondere geeignet zum Einsatz in einer Vorrichtung gemäß Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Flüssigkeitskammer (13) die Form einer runden Zylinderscheibe aufweist und sich das Testelement (2) um eine Rotationsachse (4) dreht, die von der Flüssigkeitskammer (13) beabstandet ist.
14. Testelement nach Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Flüssigkeitskammer (13) einen kreisrunden Grundriss hat.
15. Testelement nach Anspruch 13 oder 14, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Flüssigkeitskammer (13) derart ausgebildet ist, dass der Quotient aus Oberfläche der Flüssigkeitskammer (13) zu dem Volumen der Flüssigkeitskammer (13) zwischen 1 und 3,5 ist, bevorzugt nahe 1 ist.

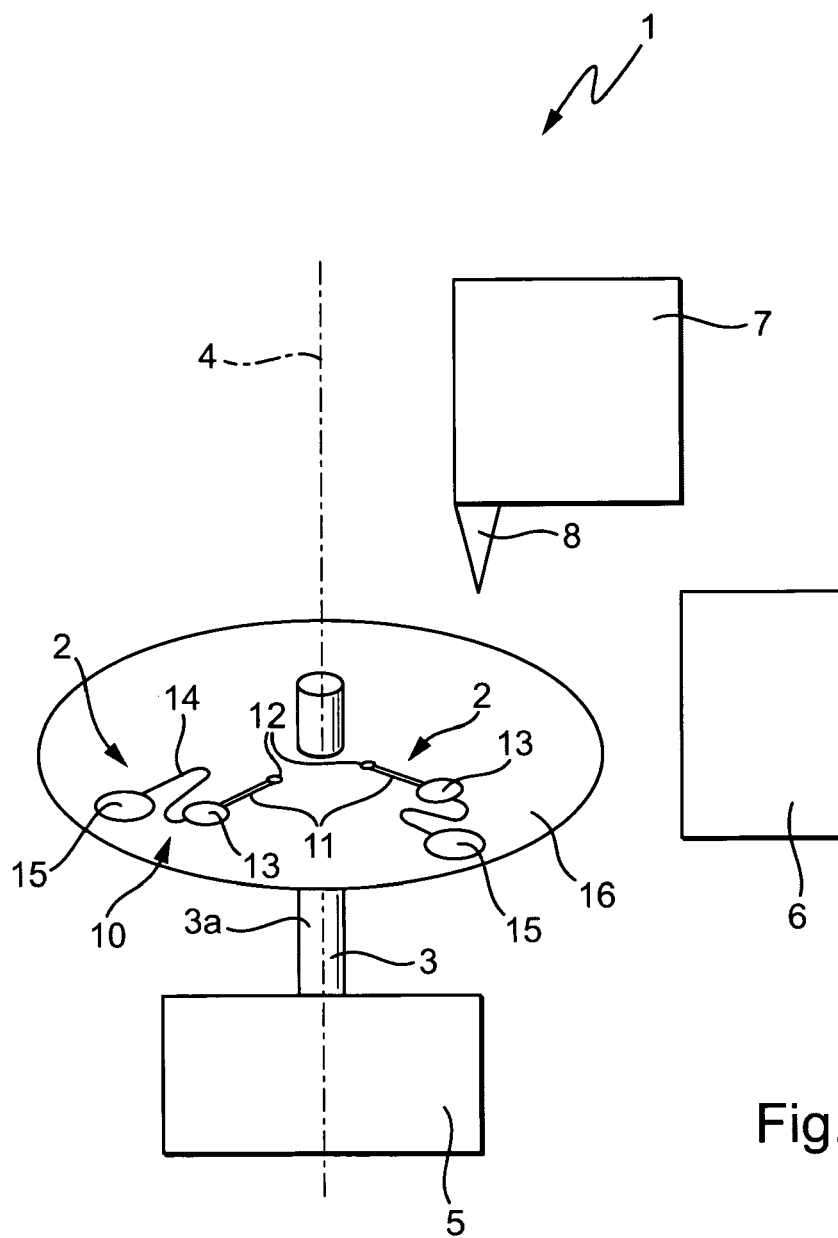


Fig. 1

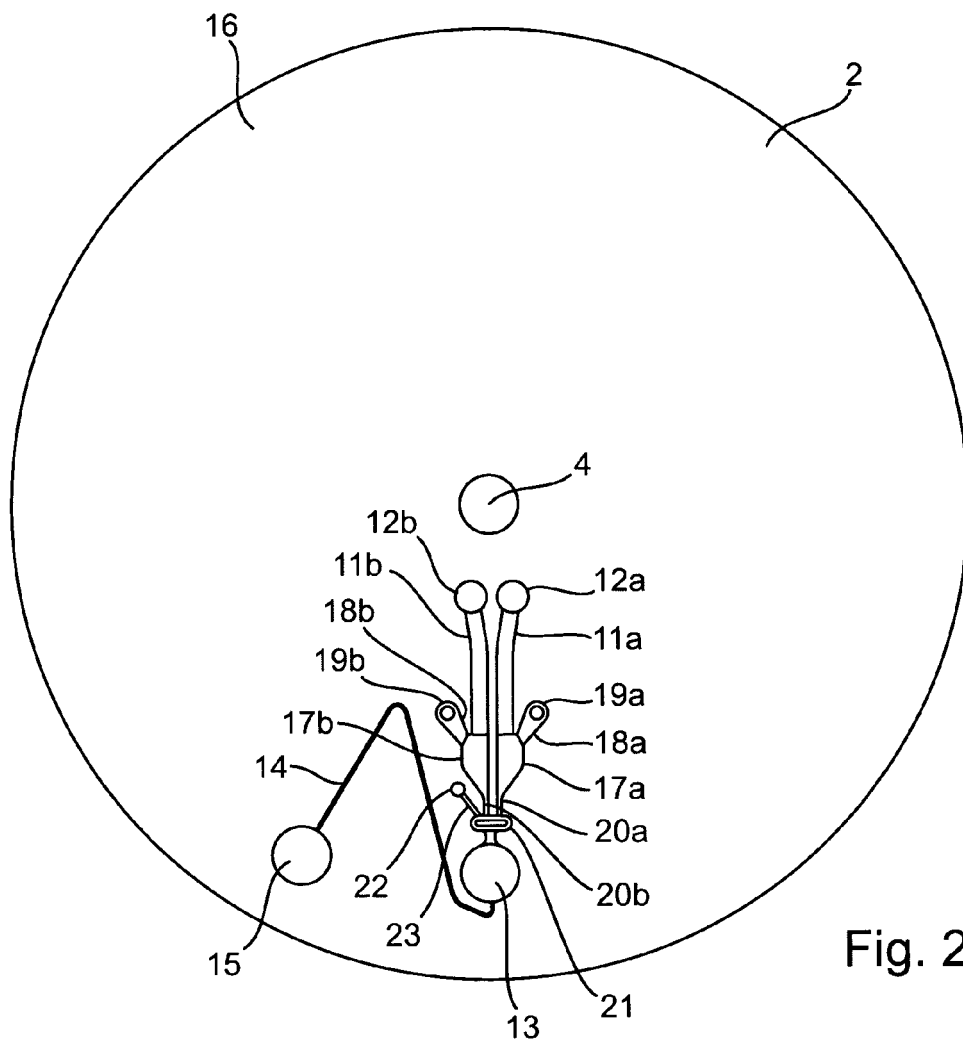


Fig. 2

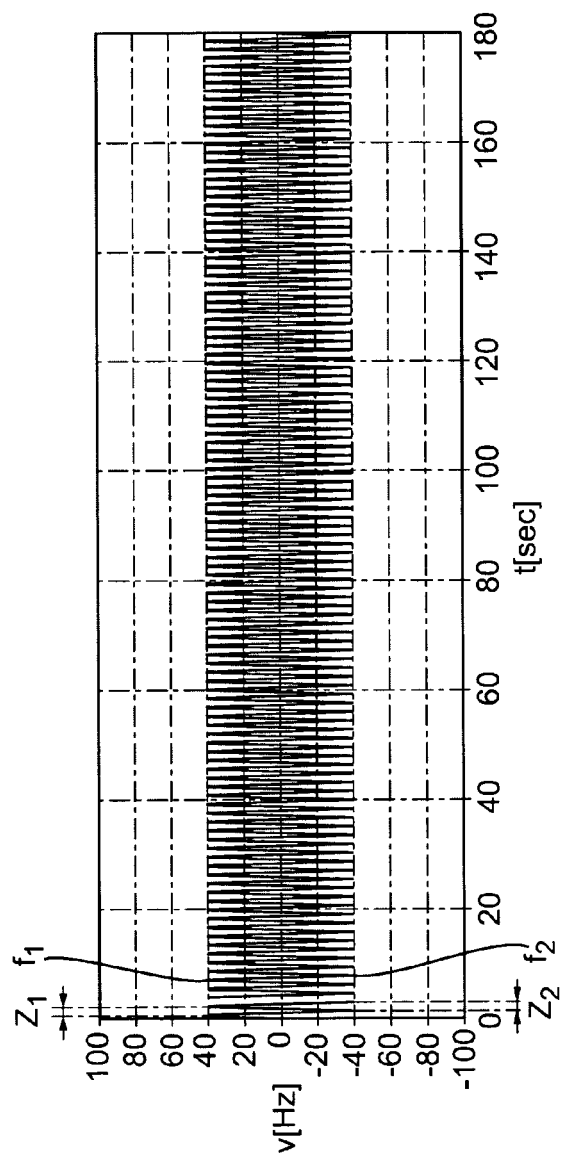


Fig. 3

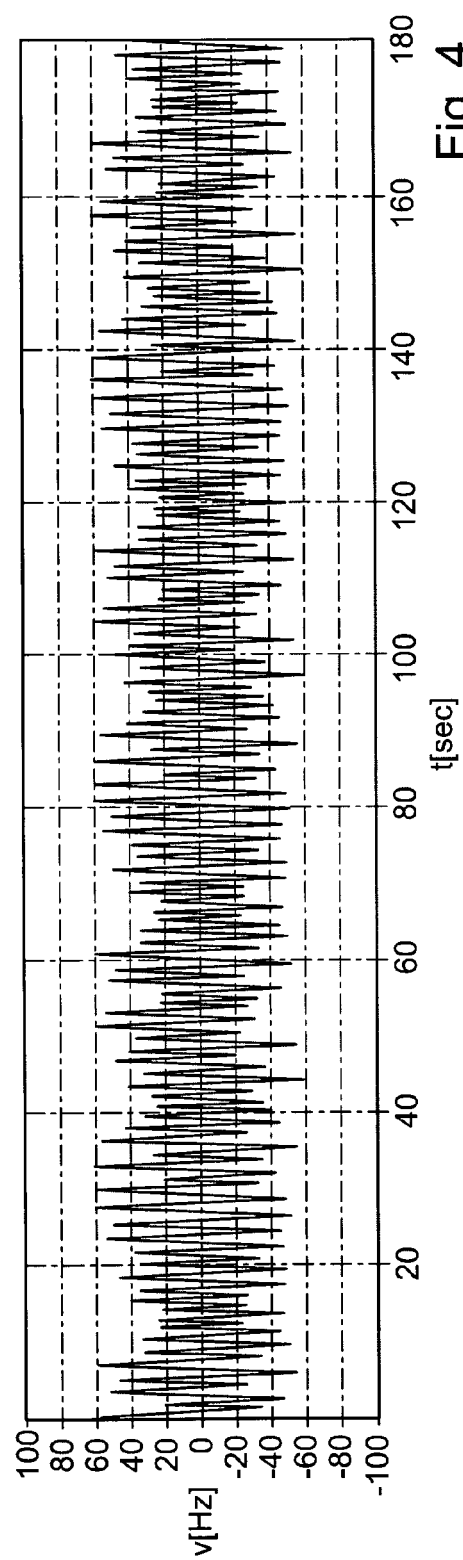
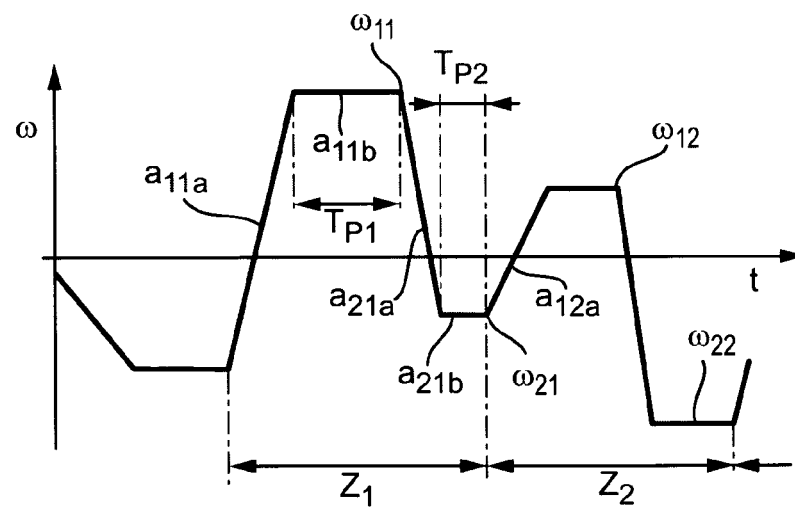
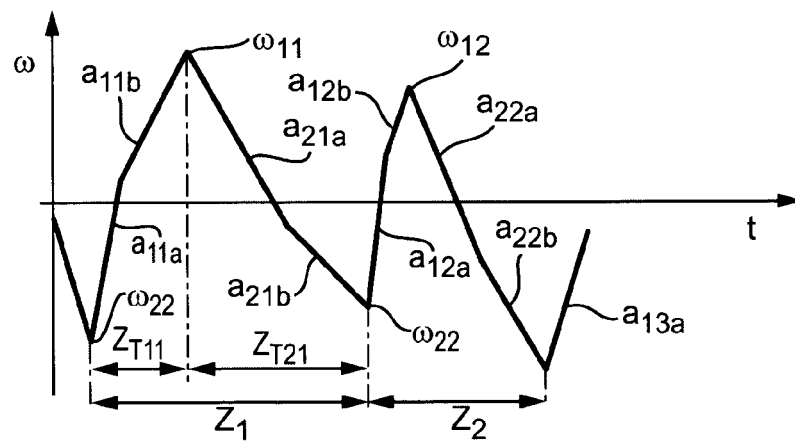
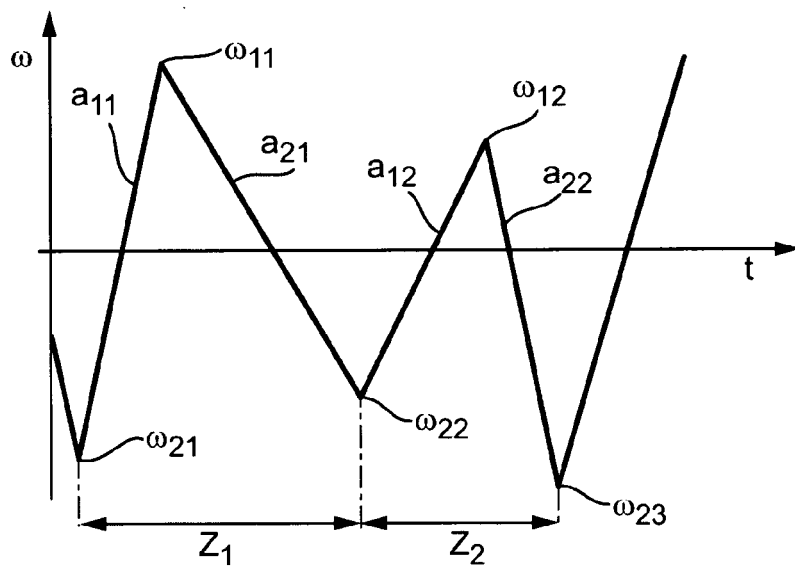


Fig. 4



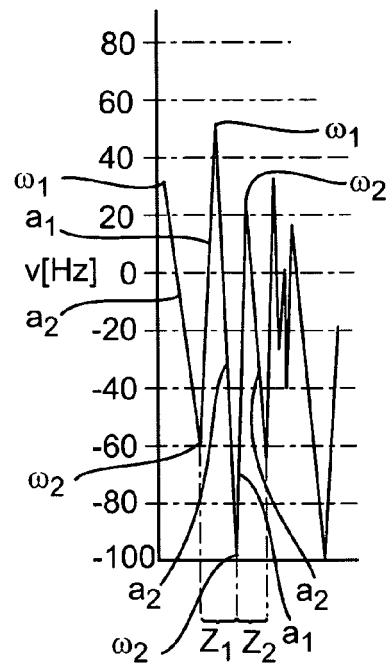
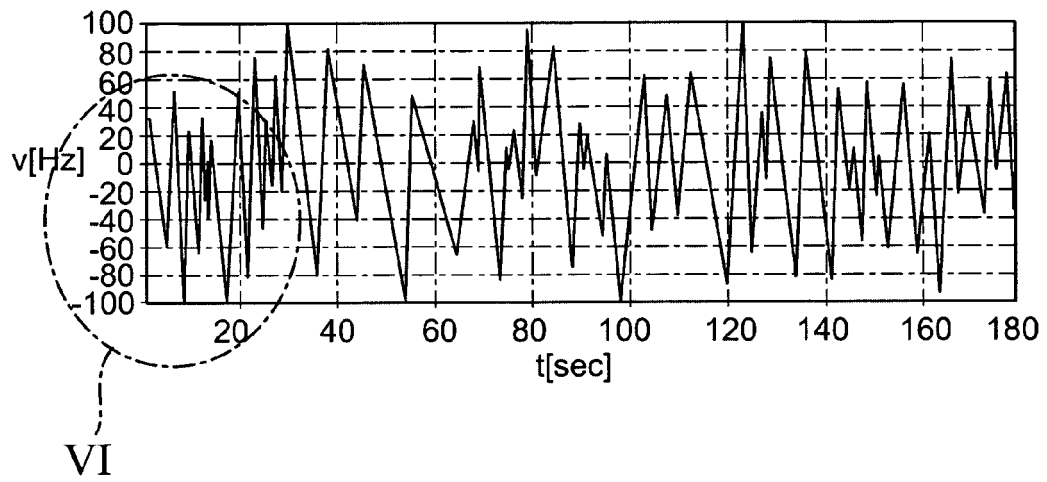


Fig. 6

Rot-Profil	Analyt pg/ml		counts /10sec
1.			
Standard	23269	MW	7822
		VK	27%
chaotic	23269	MW	8360
		VK	21%
2.			
Standard	1060	MW	1243
		VK	26%
chaotic	1060	MW	1385
		VK	17%

Fig. 7

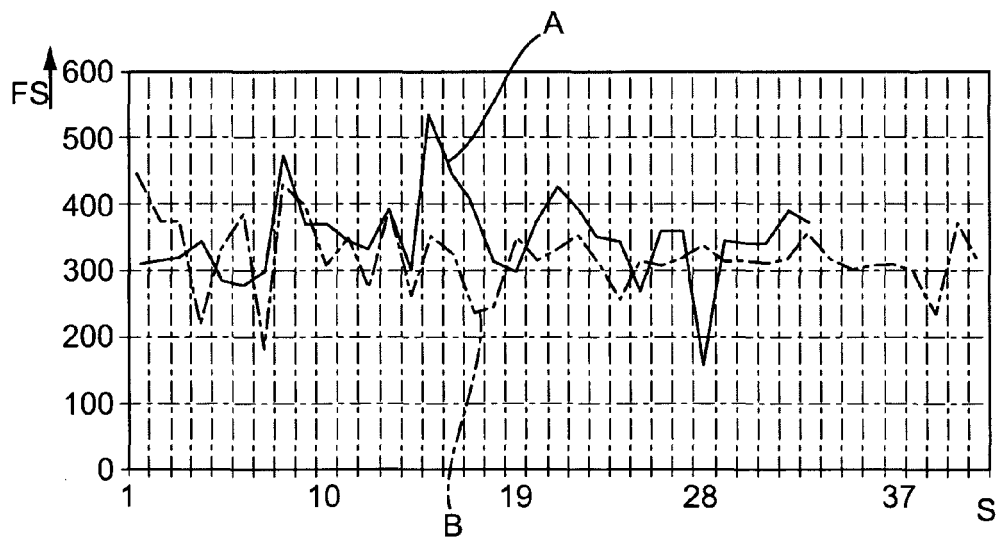


Fig. 8

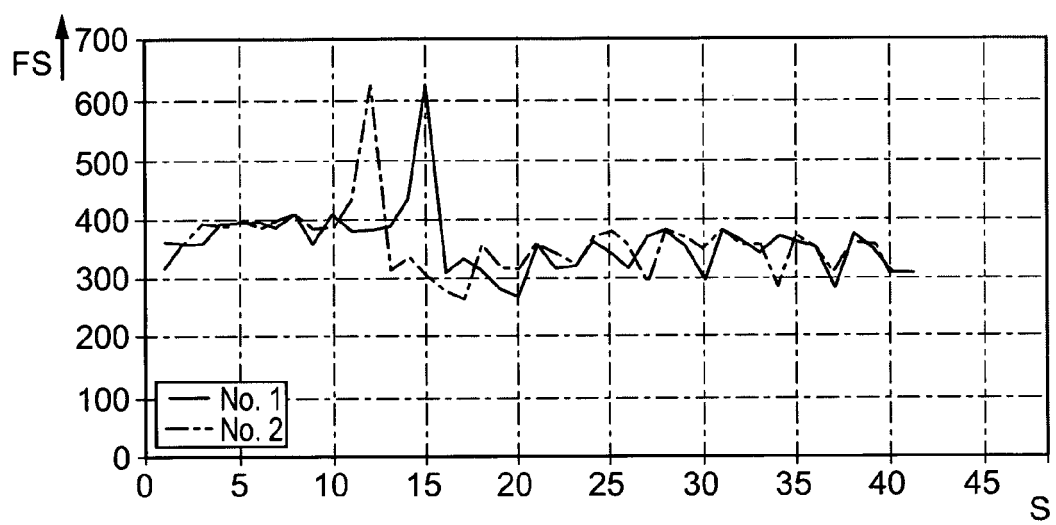


Fig. 9



EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

 Nummer der Anmeldung
EP 10 00 5124

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (IPC)
X	EP 1 894 617 A2 (SAMSUNG ELECTRONICS CO LTD [KR]) 5. März 2008 (2008-03-05) * Zusammenfassung * * Abbildungen 1-8 * * Absätze [0019] - [0022], [0029], [0031], [0036], [0037] * -----	1-5,7-9, 12,13	INV. B01F11/00 B01F13/00 B01F15/02 B01L3/00
X,D	GRUMANN: "READOUT OF DIAGNOSTIC ASSAYS ON A CENTRIFUGAL MICROFLUIDIC PLATFORM" DISSERTATION, 31. Oktober 2005 (2005-10-31), XP002607011 Freiburg * Seite 82 - Seite 85 * * Seite 87 - Seite 90 * * Seite 128 * * Seite 162 * -----	1-9, 12-15	
X	DE 10 2005 048260 A1 (UNIV ALBERT LUDWIGS FREIBURG [DE]) 12. April 2007 (2007-04-12) * Abbildungen 1,2,8,9 * * Zusammenfassung * * Absätze [0073], [0074] * -----	1,3-9,12	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (IPC) B01F B01L
X	NOROOZI, KIDO, MICIC, PAN, BARTOLOME, PRINCEVAC, ZOVAL, MADOU: "Reciprocating flow-based centrifugal mixer" REVIEW OF SCIENTIFIC INSTRUMENTS, Bd. 80, 075102, 14. Juli 2009 (2009-07-14), XP002607012 * Abbildung 3 * * Absatz [II. G] * -----	1-6,9, 12,13	
A	DE 198 19 447 A1 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE]) 4. November 1999 (1999-11-04) * Abbildungen 1,2 * * Zusammenfassung * * Seite 4, Zeile 18 - Zeile 30 * -----	1-15	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort Den Haag		Abschlußdatum der Recherche 28. Oktober 2010	Prüfer Krasenbrink, B
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE 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		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	

 1
EPO FORM 1503 03.92 (P04C03)

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

EP 10 00 5124

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

28-10-2010

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 1894617 A2	05-03-2008	JP 2008055405 A	13-03-2008
		US 2008056063 A1	06-03-2008

DE 102005048260 A1	12-04-2007	WO 2007042219 A1	19-04-2007

DE 19819447 A1	04-11-1999	WO 9956863 A1	11-11-1999
		EP 1075324 A1	14-02-2001
		ES 2203133 T3	01-04-2004
		JP 3732406 B2	05-01-2006
		JP 2002526232 T	20-08-2002
		US 6431745 B1	13-08-2002

EPO FORM P0461

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82

IN DER BESCHREIBUNG AUFGEFÜHRTE DOKUMENTE

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

In der Beschreibung aufgeführte Nicht-Patentliteratur

- **MARC MADOU et al.** Lab on CD. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2006, vol. 8, 601-628, online@<http://bioenc.annualreviews.org> [0010]
- **PEYTAVI et al.** Microfluidic Device for Rapid (< 15 Min.) Automated Microarray Hybridization. *Clinical Chemistry*, 2005, 1.138-1.844 [0011]
- **GUANGYAO ; JIA et al.** Dynamic Automated DNA Hybridization on a CD (Compact Disc) Fluid Platform. *Sensors and Actors B*, 2006, vol. 114, 173-181, www.sciencedirect.com [0011]
- **GRUMANN.** Readout of Diagnostic Assays on a Centrifugal Microfluidic Platform. *Dissertation an der Universität Freiburg*, Oktober 2005 [0011]
- **S. LUTZ et al.** Unidirectional Shake-Mode for Mixing Highly Wetting Fluids on Centrifugal Platforms. *12th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Live Science*, 12. Oktober 2008 [0011]