



EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT

(45) Veröffentlichungstag und Bekanntmachung des Hinweises auf die Patenterteilung:
12.09.2018 Patentblatt 2018/37

(51) Int Cl.:
B01L 3/00 ^(2006.01) **B01L 7/00** ^(2006.01)

(21) Anmeldenummer: **12704033.5**

(86) Internationale Anmeldenummer:
PCT/EP2012/052072

(22) Anmeldetag: **08.02.2012**

(87) Internationale Veröffentlichungsnummer:
WO 2012/136400 (11.10.2012 Gazette 2012/41)

(54) **VERFAHREN ZUR LYSE VON ZELLEN UND PCR-AMPLIFIKATION**

METHOD FOR THE LYSIS OF CELLS AND PCR AMPLIFICATION

PROCÉDÉ POUR LA LYSE DE CELLULES ET L'AMPLIFICATION ACP

(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: **08.04.2011 DE 102011007035**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
12.02.2014 Patentblatt 2014/07

(73) Patentinhaber: **Robert Bosch GmbH**
70442 Stuttgart (DE)

(72) Erfinder: **ROTHACHER, Peter**
76646 Bruchsal (DE)

(56) Entgegenhaltungen:
EP-A1- 1 797 956 US-A1- 2003 096 429
US-A1- 2008 171 366

- **DHAWAN M D ET AL:** "Development of a laser-induced cell lysis system", **ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY**, SPRINGER, BERLIN, DE, Bd. 374, Nr. 3, 1. Oktober 2002 (2002-10-01), Seiten 421-426, XP002427260, ISSN: 1618-2650, DOI: 10.1007/S00216-002-1489-2
- **RAU KAUSTUBH R ET AL:** "Pulsed laser microbeam-induced cell lysis: Time-resolved imaging and analysis of hydrodynamic effects", **BIOPHYSICAL JOURNAL**, BIOPHYSICAL SOCIETY, US, Bd. 91, Nr. 1, 1. Juli 2006 (2006-07-01), Seiten 317-329, XP002480409, ISSN: 0006-3495, DOI: 10.1529/BIOPHYSJ.105.079921

- **T. BAIER ET AL:** "Hands-free sample preparation platform for nucleic acid analysis", **LAB ON A CHIP**, Bd. 9, Nr. 23, 1. Januar 2009 (2009-01-01), Seite 3399, XP55024357, ISSN: 1473-0197, DOI: 10.1039/b910421f
- **CHEONG KWANG HO ET AL:** "Gold nanoparticles for one step DNA extraction and real-time PCR of pathogens in a single chamber", **LAB ON A CHIP**, ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, CAMBRIDGE, GB, Bd. 8, Nr. 5, 1. Januar 2008 (2008-01-01), Seiten 810-813, XP002521088, ISSN: 1473-0197, DOI: 10.1039/B717382B
- **SEUNG-KI BAEK ET AL:** "Wireless induction heating in a microfluidic device for cell lysis", **LAB ON A CHIP**, ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, CAMBRIDGE, GB, Bd. 10, 1. Januar 2010 (2010-01-01), Seiten 909-917, XP007912323, ISSN: 1473-0197, DOI: 10.1039/B921112H
- **BAO NING ET AL:** "Microfluidics-Based Lysis of Bacteria and Spores for Detection and Analysis", **PRINCIPLES OF BACTERIAL DETECTION: BIOSENSORS, RECOGNITION RECEPTORS AND MICROSYSTEMS**, SPRINGER, 1. Januar 2008 (2008-01-01), Seiten 817-831, XP009158348, DOI: 10.1007/978-0-387-75113-9_30 ISBN: 978-0-387-75112-2
- **PRATES ET AL:** "Bactericidal effect of malachite green and red laser on *Actinobacillus actinomycetemcomitans*", **JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY B: BIOLOGY**, ELSEVIER SCIENCE S.A., BASEL, CH, Bd. 86, Nr. 1, 6. Dezember 2006 (2006-12-06), Seiten 70-76, XP005794974, ISSN: 1011-1344, DOI: 10.1016/J.JPHOTOBIO.2006.07.010

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).

- **M. WILSON: "Photolysis of oral bacteria and its potential use in the treatment of caries and periodontal disease", JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, Bd. 75, Nr. 4, 1. Oktober 1993 (1993-10-01), Seiten 299-306, XP55024262, ISSN: 1364-5072, DOI: 10.1111/j.1365-2672.1993.tb02780.x**

Beschreibung

Stand der Technik

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Lyse von Zellen und PCR-Amplifikation der DNA der Zellen.

[0002] In der Diagnostik von Infektionskrankheiten gewinnt der Nachweis von Antibiotika-Resistenzen aufgrund zunehmender Verbreitung dieser Resistenzen eine immer größere Bedeutung. Methicillin-resistent *Staphylococcus aureus* (MRSA), Lungenentzündung (Pneumonie), Sepsis, Tuberkulose, und Fluorchinolon-resistenz bei *Escherichia coli* seien als einige Beispiele genannt. In der herkömmlichen Diagnostik werden diese Resistenzen meist zellkulturbasiert ermittelt. Die zellkulturbasierte Resistenzbestimmung ist jedoch ein relativ langwieriges Verfahren, da für die Kultur und Auswertung 2-3 Tage angesetzt werden müssen. Mittels DNA-Analyse der Bakterien-DNA lassen sich Resistenzen deutlich schneller bestimmen. Dabei muss jedoch die DNA der Zellen amplifiziert, d.h. vermehrt werden.

[0003] Die Polymerase-Chain-Reaction (PCR, Polymerase-Kettenreaktion) wurde Mitte der 80-er Jahre entdeckt und wird für die DNA-Amplifizierung heute flächendeckend in Diagnostik, Forschung und Forensik eingesetzt. Dabei wird eine temperaturstabile DNA-Polymerase zu der zu amplifizierenden DNA zugegeben und ein Temperaturzyklus bestehend aus

- Denaturierung, d.h. Aufspaltung DNA in Einzelstränge, bei ca. 95 °C;
- Primeranlagerung bei ca. 55 °C; und
- Elongation, d.h. Synthese der neuen DNA, bei ca. 72 °C;

mehrfach - bis zu 40 x - wiederholt, wobei sich bei jedem Zyklus die DNA-Menge verdoppelt. Für die Verzehnfachung der DNA-Menge sind also im Schnitt 3,3 Zyklen notwendig. Generell wird dazu das DNA-haltige Material vor der PCR aufgereinigt, wobei nach einem Assay-Ablauf-Protokoll vorgegangen wird.

[0004] Bei Gram-negativen Zellen funktioniert die PCR auch wenn nach einem verlängerten ersten Hochtemperaturschritt direkt ohne Reinigung Zellmaterial eingesetzt wird, da bei Temperaturen nahe dem Siedepunkt die Zellen zerstört werden und DNA freigesetzt wird. Dies funktioniert jedoch nicht bei Gram-positiven Zellen, die eine besonders widerstandsfähige Zellmembran besitzen. Gram-positive Bakterien sterben zwar bei dieser Erhitzung ab, die in ihnen enthaltene DNA kann jedoch die Bakterienhülle nicht verlassen und entsprechend nicht vervielfältigt werden.

[0005] Für die Lyse Gram-positiver Zellen werden derzeit verschiedene Verfahren eingesetzt, darunter Enzymatische Lyse, Ultraschall-Lyse und Elektroporation. Eine Photolyse mit einem Laser beschreibt die EP 4342914 A1. Dort wird zunächst eine Zellen enthaltende Lösung auf einen Metalloxid-Träger gegeben, wobei das Metall-

oxid Zellen bindet. Anschließend wird das Metalloxid mit dem Laser bestrahlt, wobei die Zellwände zerstört und DNA frei gesetzt werden. Anschließend werden in einem Aufreinigungsschritt nicht gebundene Zellbestandteile ausgewaschen. Diese Verfahren erfordern einen hohen Aufwand und eine schwierige Handhabung bevor die PCR beginnen kann.

[0006] EP 1797956 A1 zeigt eine Mikrofluidik-Vorrichtung für die Konzentration und die Lyse von Zellen oder Viren und ein zugehöriges Verfahren, wobei die Mikrofluidik-Vorrichtung umfasst: eine Reaktionskammer, in welcher magnetische Kügelchen aufgenommen werden können, aufweisend eine Vielzahl von Elektroden 20, 20' zum Erzeugen eines nicht-gleichförmigen elektrischen Feldes, ein schwingendes Teil zum Bewegen der magnetischen Kügelchen in der Kammer, und eine Laserquelle zum Aussenden eines Laserstrahls auf die magnetischen Kügelchen in der Reaktionskammer.

[0007] Dhawan M. D. et Al. "Development of a laser-induced cell lysis system", Analytical and Bioanalytical Chemistry, Bd. 374, Nr. 3, Seiten 421-426 offenbart eine Zelllyse, welche auf einer laserinduzierten Zerstörung von Bakterien- und Hefe-Zellen basiert. Das Aufbrechen der Zellen erfolgt hierbei durch das gezielte Erwärmen des Wassers in der Zelle durch den Einsatz eines 100 mW Lasers. Die eingesetzten Wellenlängen reichten von 500 nm bis 1550 nm, mit optimaler Wellenlängen zwischen 1250 nm und 1550 nm.

[0008] US 2003/096429 A1 zeigt ein Verfahren zur Bestimmung von Laserparametern zur Zelllyse, mit dem Aussetzen der Zellen aus einer Teilprobe von einer Probe dem Laserlicht. Mindestens ein Parameter des Lasers wird variiert und eine Beschädigung intrazellulärer Moleküle der Teilproben der Probe bei den derart unterschiedlichen Parametern wird gemessen. Mindestens einer der Parameter wird auf der Basis der gemessenen Schäden bestimmt.

[0009] Rau Kaustubh et. Al. "Pulsed laser microbeam-induced cell lysis: Time resolved imaging and analysis of hydrodynamic effects", BIOPHYSICAL JOURNAL, BIOPHYSICAL SOCIETY, US, Bd. 91, Nr. 1, 1. Juli 2006 (2006-07-01), Seiten 317-329, offenbart die Lyse von Zellen, mit dem Aufbrechen der Zellwand durch eine Bestrahlung der Zellen mittels Laser zum Erzeugen von Kavitationsblasen.

[0010] T. Baier et al. "Hands-free sample preparation platform for nucleic acid analysis", LAB ON A CHIP, Bd. 9, Nr. 23, 1. Januar 2009 (2009-01-01), Seite 3399, zeigt ein Lab-On-Chip System für eine automatische Extraktion einer Nukleinsäure aus menschlichen Zellproben in einer Methanol-basierten Lösung.

[0011] US 2008/171366 A1 offenbart ein Verfahren und Vorrichtung zum Aufbrechen von Zellen und Amplifizieren von Nukleinsäuren unter Verwendung von Nanostäbchen aus Gold, welche mit einem Laser bestrahlt werden, um die Zellen aufzubrechen.

Offenbarung der Erfindung

Vorteile der Erfindung

[0012] Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren lassen sich im Vergleich zum Stand der Technik geringem Aufwand Zellen, insbesondere Bakterien, Pilze, Viren, Blutzellen und Zellverbände in einem Filter ohne Enzyme lysieren. Dies ist gegebenenfalls auch unter Vermeidung einer Aufreinigung nach der Lyse möglich.

[0013] Die Erfindung lässt sich einfach auf den aktuellen biochemischen Assay übertragen.

[0014] Die Erfindung ermöglicht es, auch Gram-positive Keime oder andere schwer lysierbare Zellen wie Pilze oder Sporen zu amplifizieren, was erst eine Plattform mit Applikationen für Harnwegsinfekte, MRSA, Pneumonie, Sepsis, Mycosen, usw. ermöglicht.

[0015] Ein Laser-Scanner zum Abscannen einer Probe kann günstig mit einem Mikroskop in sehr kleiner Bauweise realisiert werden und ermöglicht ein kompaktes Analysegerät. Die Laserlyse lässt sich mit standardisierten Bauelementen für Optik, Scanner und Laser kompakt realisieren mit einem wesentlich geringeren Aufwand als Lyseeinrichtungen nach dem Stand der Technik.

[0016] Gegenüber enzymatischen / chemischen Lyse ist die deutliche Vereinfachung des Assays ausschlaggebend.

[0017] Gegenüber Ultraschalllyse ist neben dem Aufwand für den Generator die einfachere Auslegung und Abstimmung des Chips entscheidend.

[0018] Die Erfindung ermöglicht ein Lab-on-a-Chip (kurz LOC) als μ TAS (Micro Total Analysis System), da der Ablauf der Aufarbeitungs- und Amplifizierungsschritte vor der Detektion gegenüber dem Stand der Technik vereinfacht ist und eine in einen Biochip übertragbare, automatisierungsfähige Vereinfachung des Protokolls geschaffen worden ist.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0019]

Fig. 1 zeigt eine schematische Darstellung eines LOC in einer Analysevorrichtung zur Lyse von Zellen und PCR-Amplifikation.

Fig. 2 zeigt eine schematische Darstellung eines LOC in einer Analysevorrichtung zur Lyse von Zellen und PCR-Amplifikation.

Fig. 3 zeigt ein Flussdiagramm des Verfahrens zur Lyse von Zellen und PCR-Amplifikation gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ohne Reinigungsschritt.

Fig. 4 zeigt ein Flussdiagramm des Verfahrens zur Lyse von Zellen und PCR-Amplifikation gemäß einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung mit Reinigungsschritt.

Ausführungsformen der Erfindung

[0020] Fig. 1 zeigt ein LOC 10 in einer Analysevorrichtung 30 zur Lyse von Zellen und PCR-Amplifikation, bei der jeweils zur DNA-Auswertung mit einem Array 18. Das LOC 10 weist ein steifes, flaches Substrat 11 mit einem fluidischen Netzwerk 12 in dem Substrat 11 auf. Zum fluidischen Netzwerk 12

gehören beispielhaft gezeigte Mikrokanäle 13, Ventile 14 und Kammer 15, sowie eine Multifunktionskammer 19 mit einem Filter 16, in der unter anderem eine PCR stattfindet, und eine Array-Kammer 17 mit dem Array 18. Der Filter 16 enthält hier als Filtermedium ein Silica-Pad und ist über ein erstes externes Temperierelement 43 unter dem Substrat 11 temperierbar. Der Filter 16 füllt einen durchströmten Querschnitt der Multifunktionskammer 19 voll aus. Die Array-Kammer 17 ist über ein zweites Temperierelement 44 unter dem Substrat 11 temperierbar. Elemente des fluidischen Netzwerks 12 können auch im Inneren des LOC 10 verlaufen und sind an der Oberseite mit einer nicht gezeigten Membran bzw. Folie flüssigkeitsdicht abgeschlossen. Die Betätigungselemente für den Betrieb des fluidischen Netzwerks 12 und eine fluidische Schnittstelle zur Analysevorrichtung 30 sind nicht dargestellt.

[0021] Die Analysevorrichtung 30 weist eine Photolyse-Lichtquelle 31 zur Bestrahlung des Filters 16 und eine Steuerung 32 zur Durchführung der Lyse mittels Bestrahlung des Filters auf. Die Photolyse-Lichtquelle 31 weist in dieser Ausführungsform einen Laser 33, einen Strahlaufweiter 34, einen Mikroskopspiegel 35 und eine Linse 36 auf. Ein von dem Laser 33 verlassender Lichtstrahl 37 verläuft über den Strahlaufweiter 34 zum Mikroskopspiegel 35 und wird dort umgelenkt und verläuft weiter über die Linse 36 zum Filter 16. In dieser Ausführungsform ist der Mikroskopspiegel 35 ein steuerbarer Mikroskopspiegel, mit dem der Laser-Lichtstrahl 37 den Filter 16 fokussiert und entsprechend dem Strahldurchmesser rasterförmig überstreichen kann. Die Analysevorrichtung 30 weist weiterhin eine Kamera 39 und eine Array-Beleuchtungs-Lichtwelle 40 auf, die jeweils auf das Array 18 gerichtet sind.

[0022] Die Steuerung 32 ist über elektrische Steuerleitungen 38 mit dem Laser 33, dem Mikroskopspiegel 35, der Kamera 39, der Array-Beleuchtungs-Lichtwelle 40, dem Mikroskopspiegel 35 und den Temperierelementen 43 und 44 verbunden.

[0023] Die Analysevorrichtung 30 weist weiterhin eine nicht gezeigte mechanische Schnittstelle mit dem LOC 10 auf, mit der das LOC 10 in der Analysevorrichtung 30 definiert positioniert wird. Aufgrund der definierten Positionierung des Filters 16 und des Arrays 18 im LOC sind LOCs austauschbar in der Analysevorrichtung 30 ohne eine erneute optische Justierung einsetzbar. Die Photolyse-Lichtquelle 31 ist bei eingelegtem LOC 10 auf die Position des Filters 16 gerichtet und die Kamera 39 ist auf die Position des Arrays 18, hier in der Array-Kammer 17 angeordnet, gerichtet. Bei eingelegtem LOC 10 ist der Filter 16 über dem ersten externen Temperierelement 43

angeordnet, und die Array-Kammer 17 ist über dem zweiten Temperierelement 44 angeordnet. Als Temperierelemente können Peltierelemente, Micro-Hotplates oder konvektive Heiz-/Kühl-Elemente, gegebenenfalls elektrische Widerstände, auch in Kombination verwendet werden. Die mechanische Schnittstelle ermöglicht einen geeigneten Wärmeübergang.

[0024] Im Betrieb steuert die Steuerung 32 den Ablauf des Assay-Protokolls auf dem LOC 10. Das fluidische Netzwerk 12 wird über die fluidische Schnittstelle gesteuert. Temperaturen und Temperaturänderungen werden über die Temperierelemente 43 und 44 gesteuert. Die Detektion erfolgt mit einem Array- / Biochip und wird mittels der eine Fluoreszenz anregenden eine Array-Bleuchtungs-Lichtwelle 40 und der ein Fluoreszenzlicht beobachtenden Kamera 39, alternativ einem weiteren (nicht gezeigten) Photometer überprüft. Die Auswertung einer DNA-Analyse erfolgt durch die Beobachtung, an welchen Positionen auf einem Array 18 eine Fluoreszenz statt findet, mit der Kamera 39.

[0025] Das LOC 10 zur Lyse von Zellen und PCR-Amplifikation hat eine gemeinsame, einen Filter 16 aufweisende, Multifunktionskammer 19 für Akkumulation von Zellen, Färbung der Zellen, Zellen-Lyse und PCR.

[0026] Fig. 2 zeigt ein LOC 46 in einer Analysevorrichtung 47 zur Lyse von Zellen und PCR-Amplifikation, beide jeweils zur DNA-Auswertung. Die aus Fig. 1 bekannten Elemente haben wieder dieselben Bezugswerte. In dieser Ausführungsform erfolgt die Detektion mittels Real-Time-PCR in derselben Kammer wie die Lyse, in der Multifunktionskammer 19. Dazu werden die in der Real-Time-PCR eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe mittels einer Lichtquelle 41 angeregt und mit einem Detektor 42 wird die resultierende Fluoreszenzstrahlung, ggf. bei verschiedenen Wellenlängen, beobachtet. In dieser Ausführungsform ist eine Arraykammer nicht erforderlich.

[0027] Fig. 3 zeigt ein Flussdiagramm 50 des Verfahrens zur Lyse von Zellen und PCR-Amplifikation der DNA der Zellen gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung. Das Verfahren weist die Verfahrensschritte auf:

- a) Positionierung der Zellen auf einem Filter;
- b) Färbung der Zellen;
- c) Zugabe einer PCR-Behandlungs-Lösung;
- d) Photolyse der Zellen; und
- e) Amplifikation von DNA der Zellen mittels PCR.

[0028] Damit liegt die DNA der Zellen in hinreichender Menge für DNA-Untersuchungen vor. Das Verfahren ist für Gram-negative und Gram-positive Zellen geeignet.

Vorteilhaft folgt der weitere Verfahrensschritt

[0029]

- f) Mischung der amplifizierten DNA mit einem Hybridisation Buffer. Dies dient der Vorbereitung für den

weiteren Verfahrensschritt

g) Analyse der amplifizierten DNA. Dies betrifft die Analyse mittels einem Array, entsprechend einer Vorrichtung wie zum Beispiel in Fig. 1 gezeigt.

[0030] In einer alternativen Ausführungsform ohne Array, entsprechend einer Vorrichtung wie zum Beispiel in Fig. 2 gezeigt, entfallen Verfahrensschritte f) und g) und Verfahrensschritt e), in diesem Fall Real-Time-PCR, findet direkt in der Multifunktionskammer 19 in Fig. 2 statt.

[0031] Zu den einzelnen Verfahrensschritten folgen weitere Erläuterungen, gegebenenfalls unter beispielhafter Bezugnahme auf die Analysevorrichtung 30 und das LOC 10 aus Fig. 1 oder 2. In Verfahrensschritt a) wird zur Positionierung der Zellen auf dem Filter eine zellhaltige Flüssigkeit, meist Körperflüssigkeit wie Urin, Sputum, Serum, Plasma, Abstriche, BAL (Bronchoalveoläre Lavage), etc. über ein Filtermedium, in Fig. 1 und 2 über das Silica-Faserpad des Filters 16, gepumpt. Dabei werden die Zellen abgeschieden und mit wenigen 100 µl Puffer gewaschen. Das Silica-Faserpad enthält Glasfasern mit Durchmesser $d = 0,5 \mu\text{m}$ - $10 \mu\text{m}$.

[0032] Bezüglich der Reihenfolge der Verfahrensschritte a) und b) sind zwei alternative Ausführungsformen möglich, nämlich die Zellen vor oder nach dem Aufbringen auf dem Filter 16 zu färben.

[0033] Zur Färbung der Zellen in Verfahrensschritt b) wird eine Farbstofflösung, ca. 50 µl, auf den Filter gegeben und ca. 30 s inkubiert. Anschließend wird gewaschen, z.B. zuerst mit 200 µl Ethanol und danach mit 200 µl Wasser. Als Färbereagentien können verwendet werden:

- 1) Gram-Färbung - Kristallviolett-Lösung, waschen mit 200 µl Wasser, 2 min fixieren mit 50 µl Lugol'scher Lösung (Lugol's solution, KI_3 -Lösung);
- 2) Methylenblau-Lösung;
- 3) weitere Farbstoffe wie Malachitgrün, Safranin, Fuchsin (mit PAS-Reaktion, Periodic acid-Schiff reaction), Fuchsin-schwefelige Säure für Pilze, Brillant-Grün, Methylgrün, Ethyl-Grün, Brillant-blau, Coomassie violett, etc.. Diese Farbstoffe weisen eine Ammoniumgruppe auf, typischerweise in einem Chinoiden System mit weiteren Alkyl-/Aryl-aminogruppen. Viele gehören zur Klasse der Triphenylmethanfarbstoffe. Die Farbstoffe können auch als Feststoffe in Depots auf dem LOC 10, z.B. lyophilisiert, gelagert werden und mit Wasser in den Filter 16 geschwemmt werden. Die gefärbten Bakterien lassen sich mit Licht mit vergleichsweise geringen Intensitäten lysieren.

[0034] In Verfahrensschritt c) wird der Filter mit der PCR-Behandlungs-Lösung, dem so genannten Mastermix, befüllt. Diese PCR-Behandlungs-Lösung besteht aus einer Mischung aus dNTPs (deoxynucleotide triphosphate), Primern, Polymerase und Puffer. Ferner ist in der Mischung noch eine Substanz zur Blockierung der

Filteroberfläche enthalten, z.B. BSA (Bovine serum albumin), PEG (Polyethylene glycol), PPG (Polypropylene glycol). Es ist auch möglich, die erst in Verfahrensschritt e) benötigten Substanzen erst nach Verfahrensschritt d) zuzugeben.

[0035] Die Photolyse der Zellen in Verfahrensschritt d) erfolgt bevorzugt mittels Laserlyse. Bei der Photolyse wird die DNA der Zellen freigesetzt. Der Filter, auf dem sich die angefärbten Zellen befinden, wird mit einem handelsüblichen Laser bestrahlt. Dabei wird vorzugsweise der Laserstrahl fokussiert und mit einem Mikroskopspiegel über den Filter geführt, wobei möglichst die gesamte Filterfläche lückenlos mit dem Laserstrahl überstrichen wird. Alternativ kann der Filter auch mit Hochenergie-LEDs, Blitzlampen oder fokussierten Lichtquellen mit hoher Energiedichte bestrahlt werden. Entscheidend ist dabei, dass die Bakterien möglichst viel Licht absorbieren, wohingegen die Matrix und die umgebende Flüssigkeit möglichst wenig Energie aufnehmen sollen. Dies wird erreicht, indem das zur Photolyse benutzte Licht im Wesentlichen in einem Wellenlängenbereich liegt, der von den gefärbten Zellen stark absorbiert wird, jedoch von Wasser schwach absorbiert wird. Die Farbe der gefärbten Zellen wird vom Farbstoff bestimmt, kann aber von der Farbe des Farbstoffs verschieden sein. Die Wellenlänge oder Wellenlängen des Photolyse-Lichts sind auf die Farbe der gefärbten Zellen abgestimmt, so dass der Absorptionskoeffizient der gefärbten Zelle ein Vielfaches des Absorptionskoeffizienten eines Fluids oder einer stationären Phase eines um die Zellen vorhandenen Puffermediums, meist Wasser, beträgt. Ein Vielfaches kann beispielsweise mindestens der Faktor 2,5, zum Beispiel 10 sein. Eine hohe Energieaufnahme des Fluids oder der stationären Phase hätte eine starke schlecht kontrollierbare Temperaturerhöhung zur Folge, die zur Inaktivierung der Polymerase, zum Verdampfen des flüssigen Mediums und zum Platzen der LOCs führen kann. Die Photolyse-Lichtquelle weist vorteilhafterweise eine Wellenlänge im sichtbaren Bereich, die komplementär zur Farbe der angefärbten Zellen ist auf, z.B. 532 nm bei Rotfärbung der Zellen mit Methylenblau, so dass die Absorption durch die gefärbten Bakterien möglichst hoch ist.

[0036] Zwischen den Verfahrensschritten d) und e) findet in dieser Ausführungsform keine Aufreinigung statt. Die Verfahrensschritte a) bis d) finden alle im Filter 16 statt. Anschließend wird der Inhalt des Filters 16 in die Array-Kammer 17 gepumpt, in der anschließend die Hybridisierung und Detektion stattfindet.

[0037] Bei der PCR-Amplifikation der DNA in Verfahrensschritt e) wird der Filter den für die PCR üblichen thermischen Zyklen unterworfen. Bei diesen Temperaturzyklen wird die DNA wie bereits oben beschrieben vervielfältigt. Nun liegt die DNA der Zellen in hinreichender Menge für DNA-Untersuchungen vor. Das Verfahren ist für Gram-negative und Gram-positive Zellen geeignet. Anschließend kann die DNA von dem Filterelement eluiert werden. So werden z.B. aus 10 ml Urin mit 10^5 Zellen

nach 20 Zyklen 10^{11} DNA Moleküle in 50 μ l isoliert. Alternativ kommen andere Amplifikationen, auch isotherme, ebenso in Frage, z.B. NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification).

[0038] Nach dem Zufügen eines so genannten Hybridisation Buffer in Verfahrensschritt f) und Aufbringen auf das DNA-Array 18 mittels des fluidischen Netzwerks 12 ist die DNA für die Detektion bzw. Analyse der amplifizierten DNA in Verfahrensschritt g), mittels DNA-Array, beispielsweise Array 18 in Fig. 1, vorbereitet. Der Hybridisation Buffer kann ein Puffersystem und ein Salz zur Erhöhung einer Salzkonzentration umfassen.

[0039] Das erfindungsgemäße Verfahren lässt sich einfach sowohl auf die Filter-PCR als auch auf einen voll integrierten LOC übertragen.

[0040] Fig. 4 zeigt ein Flussdiagramm 60 des Verfahrens zur Lyse von Zellen und PCR-Amplifikation der DNA der Zellen gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung mit einem Reinigungsschritt. Das Verfahren weist die Verfahrensschritte auf:

- a) Positionierung der Zellen auf einem Filter;
- b) Färbung der Zellen;
- d) Photolyse der Zellen;
- d1) Reinigung von DNA der Zellen;
- c) Zugabe einer PCR-Behandlungs-Lösung; und
- e) Amplifikation der DNA der Zellen mittels PCR.

[0041] Damit liegt die DNA der Zellen in hinreichender Menge für DNA-Untersuchungen vor. Das Verfahren ist für Gram-negative und Gram-positive Zellen geeignet.

[0042] Vorteilhaft folgt der weitere Verfahrensschritt

- f) Mischung der amplifizierten DNA mit einem Hybridisation Buffer. Dies dient der Vorbereitung für den weiteren Verfahrensschritt
- g) Analyse der amplifizierten DNA. Die Analyse umfasst die Hybridisierung und die Detektion.

[0043] In dieser Ausführungsform der vorliegenden Erfindung entsprechen die gleichnamigen Verfahrensschritte den aus der Beschreibung von Fig. 3 bekannten Verfahrensschritten, unter Berücksichtigung der folgenden Unterschiede. Nach der Photolyse der Zellen in Verfahrensschritt d) erfolgt nun eine Reinigung von DNA der Zellen in Verfahrensschritt d1). Diese Reinigung kann durch einen oder mehrere Waschschriffe erfolgen, in denen Zellbestandteile außer DNA entfernt werden. Wegen des mit der Reinigung einher gehenden Flüssigkeitsaustauschs wird die PCR-Behandlungs-Lösung erst nach der Reinigung zugegeben - Verfahrensschritt c) erfolgt also nach Verfahrensschritt d1).

55 Patentansprüche

1. Verfahren der Lyse von Zellen und PCR-Amplifikation mit den Verfahrensschritten

- a) Positionierung der Zellen in einer Kammer (19);
- b) Färbung der Zellen;
- c) Zugabe einer PCR-Behandlungs-Lösung;
- d) Photolyse der Zellen; und
- e) Amplifikation von DNA der Zellen mittels PCR;

wobei Verfahrensschritte a) und b) sowie c) und d) jeweils in beliebiger Reihenfolge erfolgen können und das zur Photolyse benutzte Licht im Wesentlichen in einem Wellenlängenbereich liegt, der von den gefärbten Zellen stark absorbiert wird, jedoch von Wasser schwach absorbiert wird, **dadurch gekennzeichnet, dass** in Verfahrensschritt b) die Färbung der Zellen mit mindestens einem Farbstoff aus der Menge umfassend Kristallviolett-Lösung und Methylenblau-Lösung erfolgt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet durch** den weiteren Verfahrensschritt

d1) Reinigung der DNA der Zellen nach Verfahrensschritt d).

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **gekennzeichnet durch** den weiteren Verfahrensschritt

f) Zuführung eines Hybridisation Buffer zu der amplifizierten DNA.

4. Verfahren nach Anspruch 3, **gekennzeichnet durch** den weiteren Verfahrensschritt

g) Analyse der amplifizierten DNA.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Verfahrensschritte a) bis d) in demselben Volumenelement eines Analysechips statt finden.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet, dass** Zellen, Bakterien, insbesondere Gram-positive Bakterien, Pilze, Sporen oder Viren verwendet werden.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet, dass** in Verfahrensschritt c) die Behandlungs-Lösung eine Mischung aus dNTPs (deoxynucleotide triphosphate), Primern, Polymerase und Puffer, sowie eine Substanz zur Blockierung der Filteroberfläche aufweist.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet, dass** in Verfahrensschritt d) die Photolyse der Zellen mittels Laserstrahl, Hochenergie-LEDs, Blitzlampen oder Lichtquellen mit hoher Energiedichte erfolgt.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet, dass** ein Wellenlängenbereich eines zur Photolyse benutzten Lichts auf die Färbung der Zellen so abgestimmt ist, dass ein Absorptionskoeffizient der gefärbten Zellen ein Vielfaches größer als ein Absorptionskoeffizient eines um die Zellen vorhandenen Puffermediums ist.

10 Claims

1. Method for the lysis of cells and PCR amplification, having the following method steps

- a) positioning the cells in a chamber (19);
- b) staining the cells;
- c) adding a PCR treatment solution;
- d) photolysis of the cells; and
- e) amplification of DNA from the cells by means of PCR;

wherein method steps a) and b) and also c) and d) can in each case take place in any desired order and the light used for the photolysis is substantially in a wavelength range which is strongly absorbed by the stained cells, but is poorly absorbed by water, **characterized in that** in method step b) the cells are stained with at least one stain from the group consisting of crystal violet solution and methylene blue solution.

2. Method according to Claim 1, **characterized by** the further method step d1) purifying the DNA from the cells after method step d).

3. Method according to Claim 1 or 2, **characterized by** the further method step

- f) supplying a hybridization buffer to the amplified DNA.

4. Method according to Claim 3, **characterized by** the further method step

- g) analysing the amplified DNA.

5. Method according to one of Claims 1 to 4, **characterized in that** the method steps a) to d) take place in the same volume element of an analysis chip.

6. Method according to one of Claims 1 to 5, **characterized in that** cells, bacteria, especially Gram-positive bacteria, fungi, spores or viruses are used.

7. Method according to one of Claims 1 to 6, **characterized in that** in method step c) the treatment solution has a mixture of dNTPs (deoxynucleotide triphosphates), primers, polymerases and buffer, and

also a substance for blocking the filter surface.

8. Method according to one of Claims 1 to 7, **characterized in that** in method step d) the photolysis of the cells is carried out by means of laser beam, high-energy LEDs, flash lamps or light sources with a high energy density.
9. Method according to one of Claims 1 to 8, **characterized in that** a wavelength range of a light used for the photolysis is adapted to the staining of the cells such that an absorption coefficient of the stained cells is greater by a multiple than an absorption coefficient of a buffer medium present around the cells.

Revendications

1. Procédé de lyse de cellules et d'amplification PCR, présentant les étapes de procédé
 - a) positionnement des cellules dans une chambre (19) ;
 - b) coloration des cellules ;
 - c) addition d'une solution de traitement par PCR ;
 - d) photolyse des cellules ; et
 - e) amplification de l'ADN des cellules par PCR ;

les étapes de procédé a) et b) ainsi que c) et d) pouvant à chaque fois avoir lieu dans un ordre quelconque et la lumière utilisée pour la photolyse se situant essentiellement dans une plage de longueurs d'onde qui est fortement absorbée par les cellules colorées mais faiblement absorbée par l'eau, **caractérisé en ce que**, dans l'étape de procédé b), la coloration des cellules est réalisée avec au moins un colorant du groupe comprenant une solution de cristal violet et une solution de bleu de méthylène.
2. Procédé selon la revendication 1, **caractérisé par** l'étape de procédé supplémentaire
 - d1) purification de l'ADN des cellules après l'étape de procédé d).
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, **caractérisé par** l'étape de procédé supplémentaire
 - f) addition d'un tampon d'hybridation à l'ADN amplifié.
4. Procédé selon la revendication 3, **caractérisé par** l'étape de procédé supplémentaire
 - g) analyse de l'ADN amplifié.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, **caractérisé en ce que** les étapes de procédé a) à d) ont lieu dans le même élément volumique d'une puce d'analyse.
6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, **caractérisé en ce qu'on** utilise des cellules, des bactéries, en particulier des bactéries à Gram positif, des champignons, des spores ou des virus.
7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, **caractérisé en ce que**, dans l'étape de procédé c), la solution de traitement présente un mélange de DNTP (désoxynucléotide triphosphate), d'amorces, de polymérase et de tampon, ainsi qu'une substance pour le blocage de la surface du filtre.
8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, **caractérisé en ce que**, dans l'étape de procédé d), la photolyse des cellules a lieu au moyen d'un rayon laser, de DEL à haute énergie, de lampes stroboscopiques ou de sources lumineuses présentant une densité énergétique élevée.
9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, **caractérisé en ce qu'une** plage de longueurs d'onde d'une lumière utilisée pour la photolyse est adaptée à la coloration des cellules de manière telle qu'un coefficient d'absorption des cellules colorées est un multiple de fois supérieur à un coefficient d'absorption d'un milieu tampon présent autour des cellules.

Fig. 1

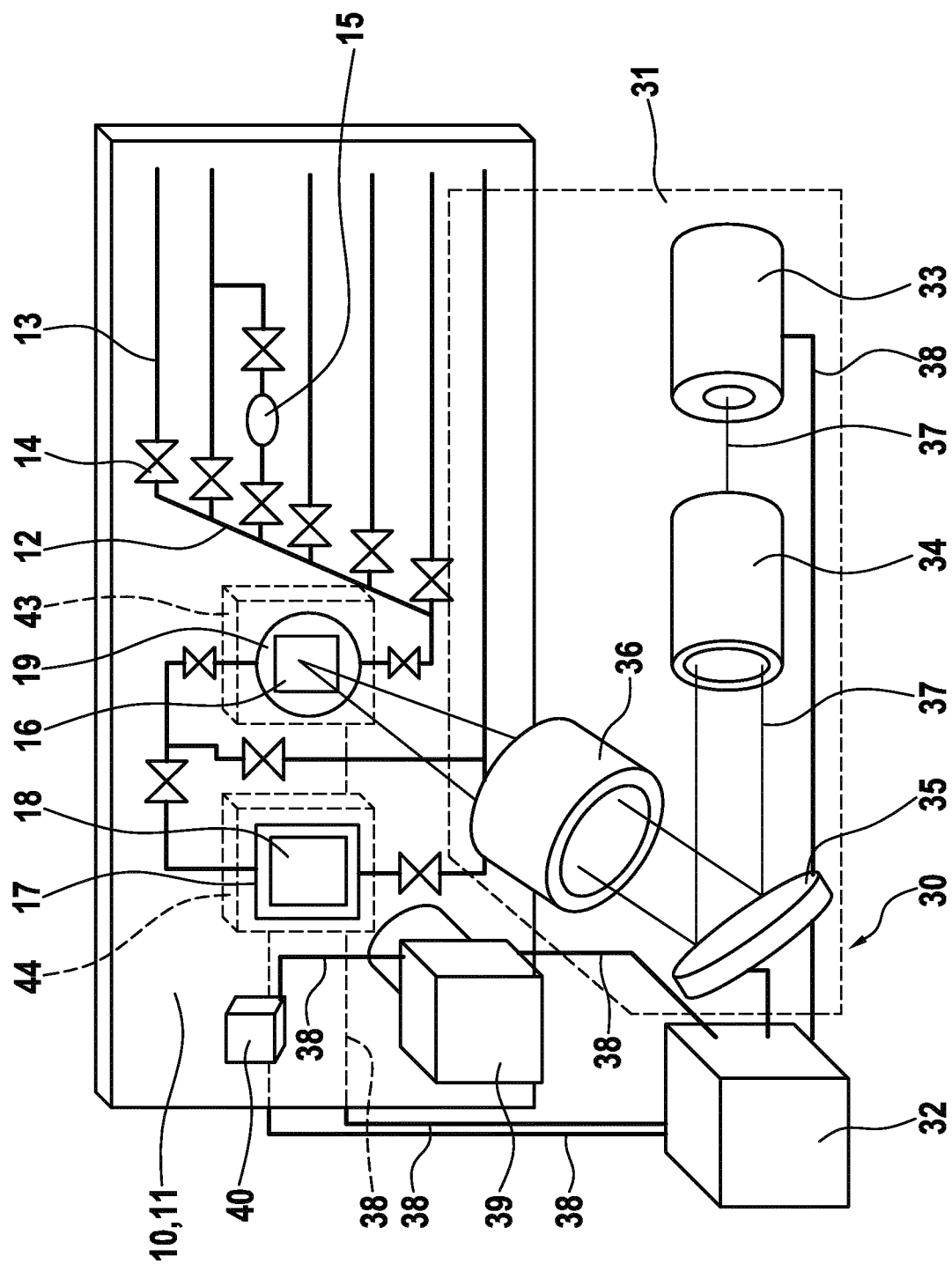


Fig. 2

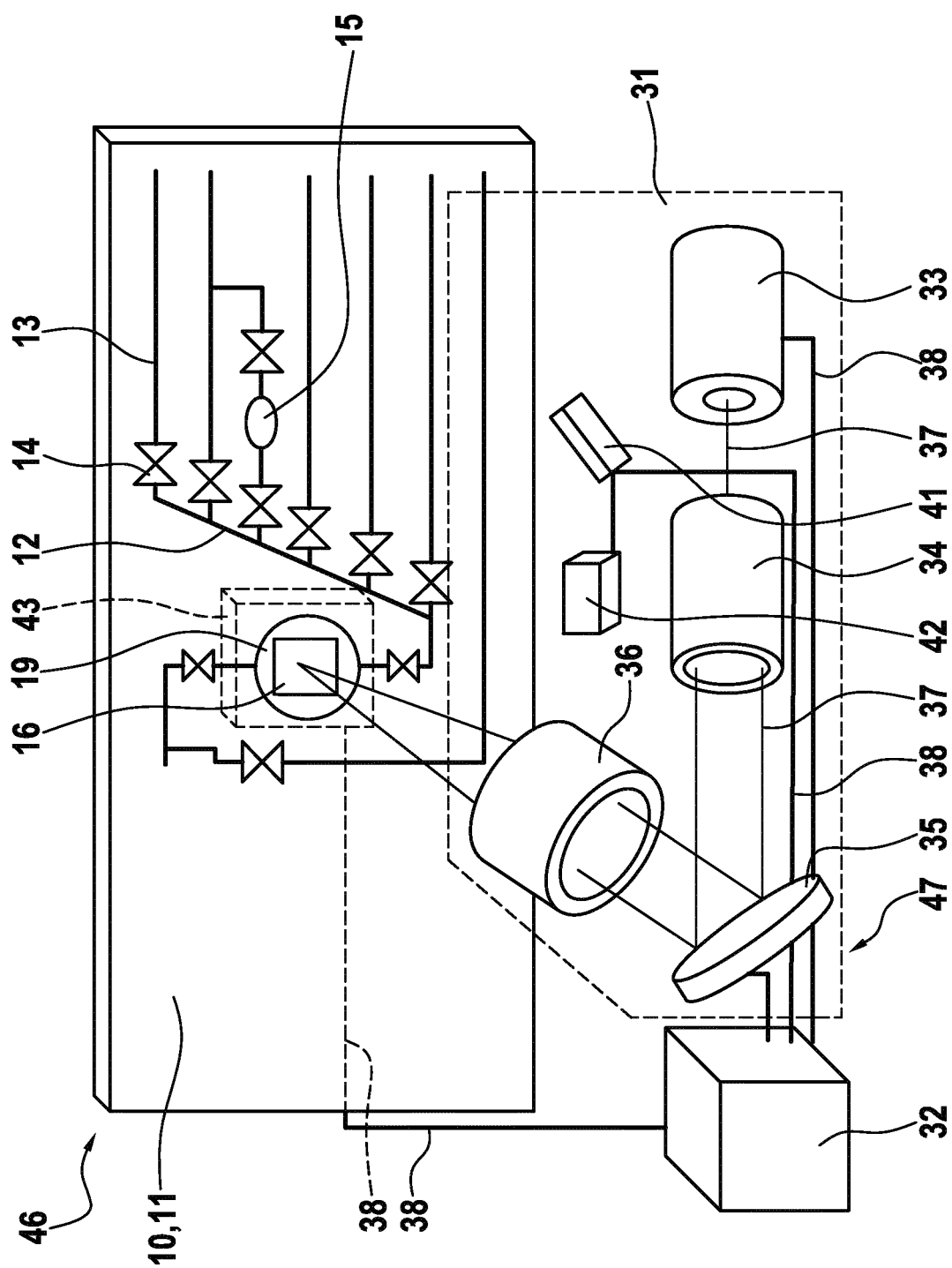


Fig. 3

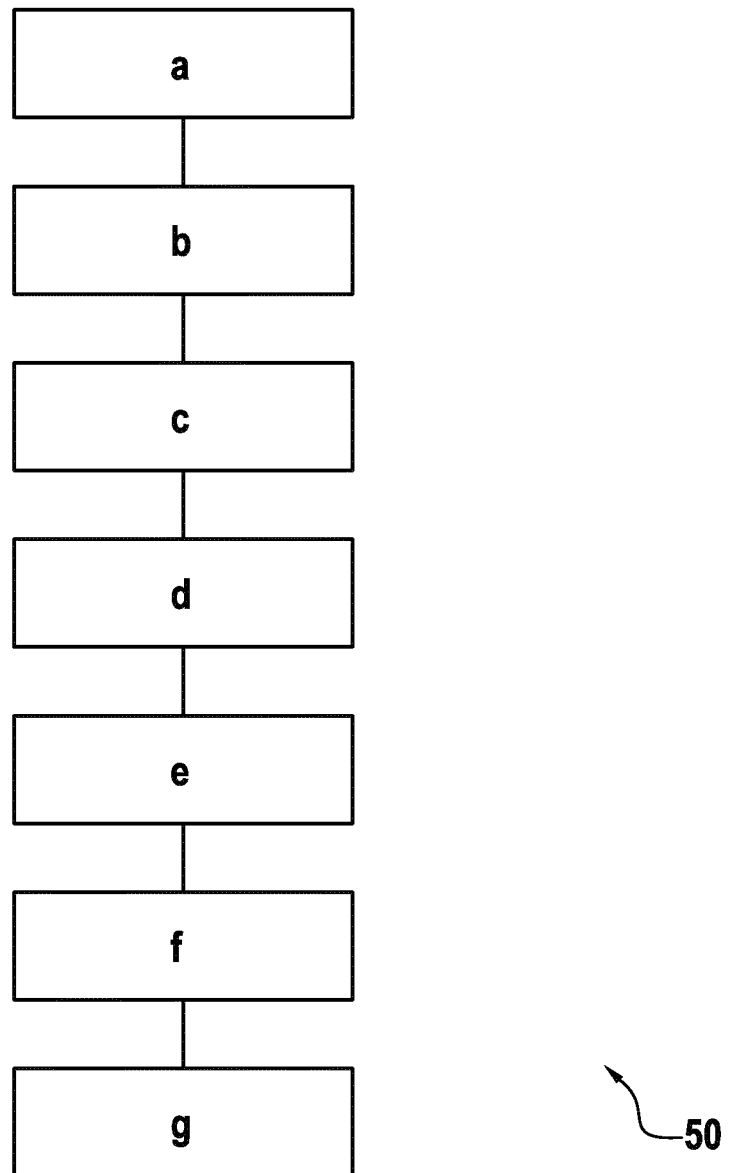
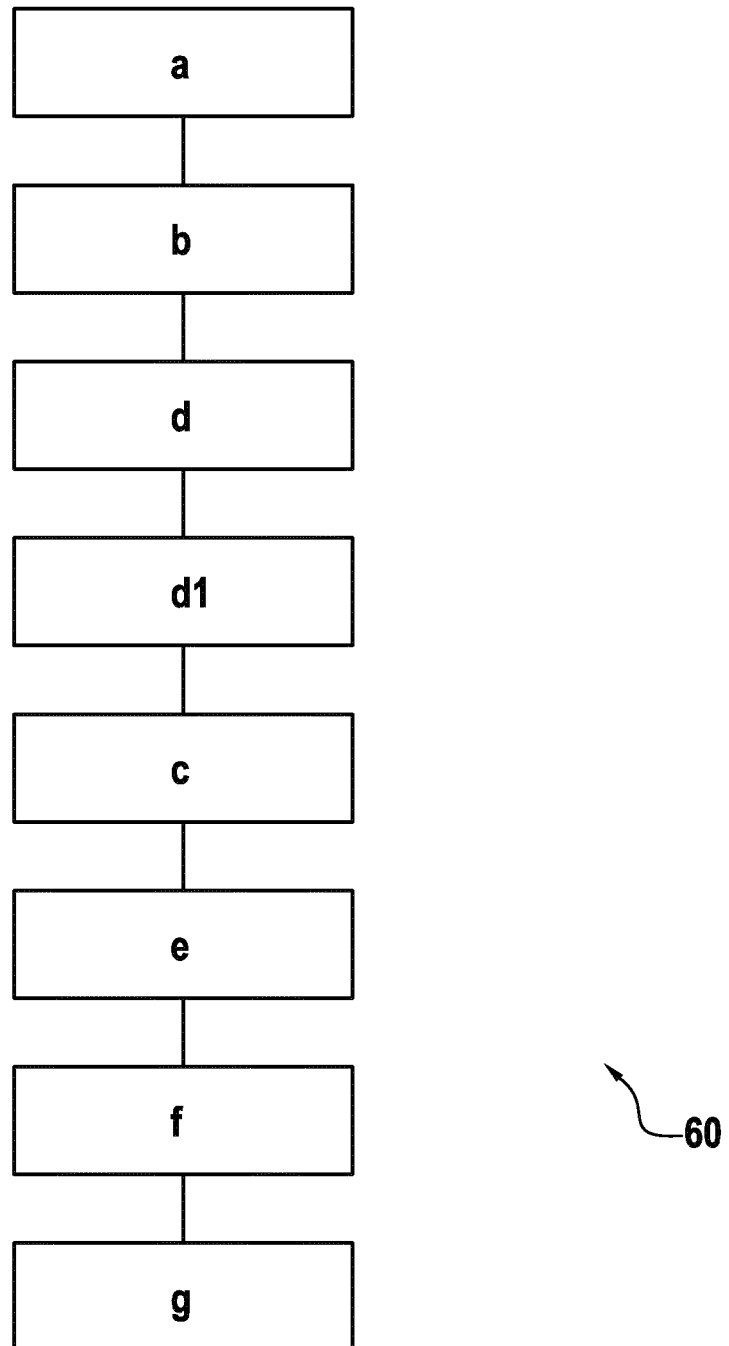


Fig. 4



IN DER BESCHREIBUNG AUFGEFÜHRTE DOKUMENTE

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

In der Beschreibung aufgeführte Patentdokumente

- EP 4342914 A1 [0005]
- EP 1797956 A1 [0006]
- US 2003096429 A1 [0008]
- US 2008171366 A1 [0011]

In der Beschreibung aufgeführte Nicht-Patentliteratur

- **DHAWAN M. D. et al.** Development of a laser-induced cell lysis system. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 374 (3), 421-426 [0007]
- Pulsed laser microbeam-induced cell lysis: Time resolved imaging and analysis of hydrodynamic effects. **RAU KAUSTUBH.** BIOPHYSICAL JOURNAL. BIOPHYSICAL SOCIETY, 01. Juli 2006, vol. 91, 317-329 [0009]
- **T. BAIER et al.** Hands-free sample preparation platform for nucleic acid analysis. *LAB ON A CHIP*, 01. Januar 2009, vol. 9 (23), 3399 [0010]