



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 697 27 932 T2 2005.03.10

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 906 449 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 697 27 932.4

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US97/09856

(96) Europäisches Aktenzeichen: 97 929 833.8

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 97/46712

(86) PCT-Anmeldetag: 04.06.1997

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 11.12.1997

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 07.04.1999

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 03.03.2004

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 10.03.2005

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: C12Q 1/68

B01L 7/00, G01N 21/76, G01N 21/07

(30) Unionspriorität:

658993 04.06.1996 US

(73) Patentinhaber:

University of Utah Research Foundation, Salt Lake City, Utah, US

(74) Vertreter:

WINTER, BRANDL, FÜRNISS, HÜBNER, RÖSS, KAISER, POLTE, Partnerschaft, 85354 Freising

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(72) Erfinder:

WITTWER, T., Carl, Salt Lake City, US; RIRIE, M., Kirk, Salt Lake City UT 84108, US; RASMUSSEN, P., Randy, Salt Lake City, US; HILLYARD, R., David, Salt Lake City, US

(54) Bezeichnung: VORRICHTUNG UND VERFAHREN ZUR DURCHFÜHRUNG UND ÜBERWACHUNG VON POLYMERASE KETTENREAKTIONEN

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

## 1. Erfindungsumfeld

**[0001]** Die vorliegende Erfindung bezieht sich im allgemeinen auf eine Vorrichtung zum Durchführen der Polymerasekettenreaktion (PCR). Genauer gesagt, betrifft die vorliegende Erfindung eine Vorrichtung und ein Verfahren, die einen Temperaturwechsel und die Überwachung der Polymerasekettenreaktion ausführen.

## 2. Technischer Hintergrund

**[0002]** In zahlreichen Bereichen von Industrie, Technologie und Forschung besteht das Bedürfnis zuverlässig und nachvollziehbar Proben einem zyklischen Temperaturwechselprozess zu unterziehen. Die Notwendigkeit einer Probe einem wiederholten zyklischen Temperaturwechselprozess zu unterziehen, ist insbesondere bei biotechnologischen Anwendungen akut. Im biotechnologischen Umfeld ist es oft erstrebenswert, kleine Materialproben während einer kurzen Zeitspanne wiederholt zu erwärmen und zu kühlen. Einer dieser biologischen Prozesse, der regelmäßig ausgeführt wird, ist die zyklische DNS Vervielfältigung.

**[0003]** Die zyklische DNS Vervielfältigung, bei der eine temperaturstabile DNS Polymerase benutzt wird, ermöglicht die automatische Vervielfältigung von Primer-spezifischer DNS, die im allgemeinen als "Polymerasekettenreaktion" oder "PCR" bekannt ist. Die Automation dieses Prozesses erfordert einen kontrollierten und präzisen zyklischen Temperaturwechsel der Reaktionsmischungen, die gewöhnlich in mehreren Behältern enthalten sind. In der Vergangenheit war der bevorzugte Behälter ein Standard-Mikrozentrifugenrörchen aus Plastik.

**[0004]** Kommerziell programmierbare metallische Heizblöcke wurden in der Vergangenheit dazu verwendet, den Temperaturwechsel der Proben in den Mikrozentrifugenrörchen entsprechend dem Temperatur-gegen-Zeit Sollprofil durchzuführen. Jedoch stellte sich das Unvermögen, die Temperatur der Heizblöcke über einen großen Temperaturbereich innerhalb einer kurzen Zeitspanne schnell und genau anzupassen, für die Verwendung der heizblockartigen Gerätetypen für ein Wärmesteuersystem als nicht erwünscht heraus, wenn Abläufe wie die Polymerasekettenreaktion ausgeführt werden.

**[0005]** Darüber hinaus haben auch die im allgemeinen verwendeten Mikrozentrifugenrörchen Nachteile. Das Material der Mikrozentrifugenrörchen, ihre Wandstärke, und die Geometrie der Mikrozentrifugenrörchen stellen ein Hindernis beim schnellen Erwärmen und Kühlen der darin enthaltenen Probe dar. Das Plastikmaterial und die Wandstärke der Mikrozentrifugenrörchen wirken wie eine Isolierung zwischen der darin enthaltenen Probe und dem umgebenden Medium, wodurch ein Transfer der Wärmeenergie behindert wird. Außerdem bietet die Geometrie des Mikrozentrifugenrörchens dem beliebigen zum Wärmeenergieübertrag benutzten Medium nur einer kleinen Oberfläche. Die kontinuierliche Verwendung der Mikrozentrifugenrörchen mit ihrer suboptimalen Geometrie im Stand der Technik zeigt, dass die Vorteile einer verbesserten Wärmeenergieübertragung (die sich durch eine vergrößerte Oberfläche des Probenbehälters für eine Probe konstanten Volumens einstellt) bis jetzt noch nicht erkannt worden sind.

**[0006]** Weiterhin wurden Vorrichtungen, die Wasserbäder mit Fluidaustausch (oder mechanischem Transfer) als zyklische Temperaturwechsler für die Polymerasekettenreaktion verwendet. Auch wenn Wasserbäder für das zyklische Durchlaufen einer Polymerasekettenreaktionsmischung entlang einem Temperatur-gegen-Zeit Sollprofil, das für das Stattfinden der Reaktion nötig ist, verwendet wurden, wirkt die hohe thermisch wirksame Masse des Wassers (und die niedrige Wärmeleitfähigkeit der Plastikmikrozentrifugenrörchen) signifikant einschränkend, soweit das Betriebsverhalten des Geräts und die Spezifität der Reaktion betroffen ist.

**[0007]** Geräte mit Wasserbädern sind in ihrem Betriebsverhalten eingeschränkt. Der Grund liegt darin, dass die thermisch wirksame Masse des Wassers den maximalen Temperatur-gegen-Zeit Gradienten, der damit erreicht werden kann, signifikant einschränkt. Außerdem zeigt sich, dass das Wasserbadgerät aufgrund seiner Größe, der Zahl der Wasser führenden Schläuche, und der externen Temperatursteuervorrichtung für das Wasser sehr schwertällig ist. Darüber hinaus ist das Erfordernis der strengen periodischen Wartung und Inspektion der Wasseranschlüsse, um Lecks in dem Wasserbadgerät zu detektieren, mühsam und zeitaufwändig. Zu guter Letzt ist es schwierig, mit dem Wasserbadgerät die Temperatur der Probenrörchen mit der erforderlichen Genauigkeit zu steuern.

**[0008]** Das US Patent Nr. 3,616,264 von Ray zeigt ein thermisches Gebläseluftgerät für die Luftzirkulation, um biologische Proben auf eine konstante Temperatur zu erwärmen oder zu kühlen. Auch wenn Rays Gerät

durchaus effektiv ist, eine konstante Temperatur innerhalb einer Luftkammer zu halten, wird das Erfordernis eines schnellen Anpassens der Temperatur in zyklischer Art entsprechend einem Temperatur-gegen-Zeit Profil, wie für biologische Anwendungen wie der Polymerasekettenreaktion nötig sind, nicht angesprochen.

**[0009]** Das US Patent Nr. 4,420,679 von Howe und das US Pat. Nr. 4,286,456 von Sisti et al. offenbaren jeweils Gaschromatographieöfen. Die in den Patenten von Howe und Sisti et al. offenbarten Vorrichtungen sind dafür geeignet, einen Gaschromatografieprozess auszuführen, sind aber nicht dafür geeignet, einen zyklischen Temperaturwechsel durchzuführen, der wesentlich schneller ausgeführt werden soll, als mit einem der vorher beschriebenen Geräte. Ein schneller zyklischer Temperaturwechsel ist für die Ausführungen vieler Prozesse nützlich. Geräte, wie in den Patenten von Howe und Sisti et al. beschrieben werden, sind nicht geeignet, solche Reaktionen effizient und schnell auszuführen.

**[0010]** Insbesondere die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine für die moderne Molekularbiologie essenzielle grundlegende Vervielfältigungstechnik. Trotz ihrer Nützlichkeit und Popularität ist das bisherige Verständnis der PCR nicht weit fortgeschritten. Die Vervielfältigungsmethoden müssen durch "trial and error" optimiert werden, und Protokolle werden oft blindlings befolgt. Das begrenzte Verständnis der PCR, wie es im Stand der Technik zu finden ist, ist ein gutes Beispiel dafür, dass Fachleute sich damit zufrieden geben, eine leistungsfähige Technik ohne Reflexion und Verstand zu verwenden.

**[0011]** Biologische Prozesse wie die PCR benötigen einen zyklischen Temperaturwechsel der Proben. Im Stand der Technik wird ein solcher Temperaturwechsel, wie oben beschrieben, nur langsam ausführt. Der Stand der Technik ignoriert außerdem die zu Grunde liegenden Prinzipien, die es der PCR ermöglichen, zu funktionieren, und die dazu verwendet werden könnten, die PCR noch nützlicher zu gestalten. Es wäre deshalb ein großer Fortschritt in der Technik, Verfahren und eine Vorrichtung bereitzustellen, die insbesondere dafür ausgelegt sind, eine PCR schnell auszuführen und die währenddessen stattfindende Reaktion zu analysieren, insbesondere wenn eine solche Reaktion während ihres Stattfinden – also in Echtzeit – analysiert wird.

**[0012]** EP 0636413 A offenbart eine Vorrichtung und ein Verfahren zum Ausführen einer PCR in Kapillarröhrchen. EP 0580362 offenbart ein Gerät und ein Verfahren zum Ausführen einer PCR, wobei feststehende Röhrchen, als Behälter, und optische Fasern zwischen den Röhrchen und einer Lichtquelle, und einer Detektivvorrichtung verwendet werden. EP 0640828 A zeigt ein System zum simultanen Überwachen aller PCR Proben in dem System, beispielsweise mittels einer CCD Kamera. Wittwer, C. T. et al. (Nucl. Acids Res., 1989, Vol. 17 III, pages 4353–4357) zeigen einen Gebläseheizgerät für PCR.

#### Kurze Zusammenfassung und Aufgaben der Erfindung

**[0013]** Im Hinblick auf den oben beschriebenen Stand der Technik soll vorliegende Erfindung die folgenden Aufgaben und Vorteile realisieren.

**[0014]** Es ist eine Aufgabe vorliegender Erfindung ein Gerät bereitzustellen, das die Temperatur von biologischen Proben genau steuert.

**[0015]** Es ist eine weitere Aufgabe vorliegender Erfindung ein zyklisches Temperaturwechselgerät bereitzustellen, um die Temperatur von biologischen Proben entsprechend einem vorgegebenen Temperatur-gegen-Zeit Profil schnell und genau zu variieren.

**[0016]** Eine weitere Aufgabe vorliegender Erfindung ist es, ein Gerät bereitzustellen, das dazu geeignet ist, mehrere unterschiedliche biologische Proben einem schnellen zyklischen Temperaturwechsel zu unterziehen.

**[0017]** Es wird außerdem beschrieben, wie ein zyklisches Temperaturwechselgerät mit einem Wärme übertragenden Medium mit niedriger thermisch wirksamer Masse bereitgestellt werden kann, das Proben einem großen Temperaturgradienten innerhalb sehr kurze Zeit effektiv unterziehen kann.

**[0018]** Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Gerät bereitzustellen, das eine biologische Probe einem schnellen Temperaturwechsel unterziehen kann, wobei die Luft als Wärme übertragendes Medium verwendet wird.

**[0019]** Es ist eine Aufgabe vorliegender Erfindung, ein System und ein Verfahren bereitzustellen, um eine PCR schnell durchzuführen, und um simultan die Reaktion zu überwachen.

**[0020]** Es ist eine weitere Aufgabe vorliegender Erfindung, ein System und ein Verfahren bereitzustellen, um eine PCR schnell durchzuführen und zudem die Reaktion während ihres Ablaufs kontinuierlich zu überwachen.

**[0021]** Es wird außerdem beschrieben, wie die Nukleinsäureproben durch synthetische Nukleinsäureanaloga oder -derivate, beispielsweise durch Peptid-Nukleinsäure (PNA), ersetzt werden können, vorausgesetzt, dass diese auch mit fluoreszierenden Verbindungen markiert werden können.

**[0022]** Diese und andere Aufgaben und Vorteile der Erfindung werden aus der Beschreibung und den folgenden Ansprüchen noch klarer werden oder können durch die Anwendung der Erfindung gelernt werden.

**[0023]** Ein Gerät ist vorgesehen, das insbesondere dafür geeignet ist, biologische Proben einem schnellen Temperaturwechselprozess zu unterziehen, um einen oder mehrere einer Vielzahl von Abläufen oder Prozessen auszuführen. Die Erfindung ist durch die Ansprüche definiert. Die die biologische Probe enthaltende Konstruktion, auch Probenkammer genannt, kann mit einer Isolierzvorrichtung zum Speichern der Wärmeenergie und auch mit einer Vorrichtung zum Wärmen des Inneren der Probenkammer ausgestattet sein. In weiteren Ausführungsbeispielen wird kühle Luft in und aus einer die biologische Probe enthaltenden Kammer geleitet.

**[0024]** Um die Probenkammer schnell zu kühlen, beinhaltet das vorteilhafte Gerät eine Vorrichtung, um Luft in die Probenkammer zu blasen, und eine Vorrichtung, um die in die Probenkammer geblasene Luft zu verteilen. Die in mehreren Ausführungsbeispielen beinhalteten vorteilhaften Konstruktionen sind ein Hochgeschwindigkeitsventilator, der dazu ausgelegt ist, Luft in die Probenkammer zu blasen, und ein sich drehender Luftflügel, der dazu ausgelegt ist, die Luft in der Kammer zu verteilen. In einigen Ausführungsbeispielen ermöglicht eine Belüftungsvorrichtung, dass die Luft aus der Probenkammer entweicht, wobei sie die ungewollte Hitze mit sich nimmt. Die vorliegende Erfindung ermöglicht es, dass sowohl das Erwärmen als auch das Kühlen der Probe schnell und gleichmäßig erfolgt.

**[0025]** Gemäß dem Verfahren und der Vorrichtung der vorliegenden Erfindung stellt eine Steuerstruktur eine Vorrichtung zum Betreiben des zyklischen Temperaturwechselgeräts bereit.

**[0026]** Die Steuervorrichtung ermöglicht, dass die biologischen Proben einen vorgegebenen Temperaturzyklus durchlaufen, der dem Denaturierungs-, dem Anlagerungs- und dem Verlängerungsschritt der Polymerasekettenreaktion entspricht. Im Gebrauch ermöglicht das Gerät den Denaturierungs-, Anlagerungs- und Verlängerungsschritt, bezüglich der Zeit und Temperatur, schnell zu optimieren und die Zeitspannen ("ramp times") zwischen den Temperaturen jedes Schritts zu verkürzen.

**[0027]** Insbesondere verkürzt die vorliegende Erfindung die Gesamtzeit, die für die Vollendung der mit einer zyklischen Temperaturwechselvorrichtung aus dem Stand der Technik ablaufenden Polymerasekettenreaktion nötig wäre, wobei gleichzeitig die Spezifität und die Ausbeute signifikant erhöht werden.

**[0028]** Vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren und ein Gerät für eine kontinuierliche Fluoreszenz Überwachung des Polymerasekettenreaktionsablaufs bereit. In vorliegender Erfindung werden optische Komponenten mit Elementen, die einen schnellen Temperaturwechsel ermöglichen, kombiniert, um kontinuierlich die DNS Vervielfältigung mit mehreren unterschiedlichen Fluoreszenztechniken zu überwachen. Glaskapillarprobenbehälter oder aus Plastik/Glas zusammengesetzte Probenbehälter erlauben einen schnellen Wärmetransfer von einem bevorzugten Wärme übertragenden Medium (es sind 30 Vervielfältigungszyklen in weniger als 15 Minuten möglich, wenn ein Gas, wie beispielsweise Luft, als Wärme übertragendes Medium benutzt wird) und das simultane Überwachen der Reaktion.

**[0029]** Erfindungsgemäß werden optische Techniken dazu benutzt, den Fortgang der Reaktion während ihres Ablaufs zu überwachen. In einigen bevorzugten Ausführungsbeispielen der Erfindung, werden Fluoreszenzsonden dem Redaktionsgemisch zugegeben. Die vorliegende Erfindung überwacht dann die Fluoreszenz mindestens einmal während eines Temperaturübergangs, und vorteilhafterweise wird die Fluoreszenz entweder von einer einzigen Probe oder von mehreren Proben zwei oder mehrmals während eines Temperaturübergangs aufgenommen. Ein sich drehendes Karussell ist vorhanden, um die Proben sequenziell eine nach der anderen an eine Überwachungsposition zu bewegen, wobei alle Proben simultan einem schnellen zyklischen Temperaturwechsel unterzogen werden. Wünschenswerterweise stellen die erfindungsgemäßen Ausführungsbeispiele Vorrichtungen zum Überwachen der Fluoreszenz einmal pro Vervielfältigungszyklus, oder zum kontinuierlichen Überwachen von Temperatur, Zeit und Fluoreszenz während jedes Vervielfältigungszyklus bereit.

**[0030]** Mit Hilfe der vorliegenden Erfindung kann eine dreidimensionale Darstellung der Temperatur, Zeit und Fluoreszenz erreicht werden. Fluoreszenz-gegen-Temperatur Diagramme der Hybridisierungssonden unterscheiden zwischen dem kumulativen, irreversiblen Signal der exonukleasen Spaltung, und der temperaturabhängigen, reversiblen Hybridisierung angelagerter Komponenten. Hybridisierungssonden sind nützlicher als Hydrolysesonden, da ihre Temperaturabhängigkeit von der Fluoreszenz überwacht werden kann, und dazu benutzt werden kann, Veränderungen in der Produktsequenz, d. h. Polymorphismen und Mutationen, zu detektieren. Durch die Verwendung von Farbstoffen, die in der Gegenwart der Doppelstrang-DNS fluoreszieren, kann die Produktdenaturierung, die Wiederanlagerung, und die Verlängerung innerhalb jedes Zyklus überwacht werden. Vorliegende Erfindung stellt ein Gerät und ein Verfahren zum schnellen Durchführen von PCR Vervielfältigungsreaktionen bereit, die Vervielfältigung und Analyse der Reaktionen in 15 Minuten, vorteilhaftweise in unter 15 Minuten, und am vorteilhaftesten in unter zehn Minuten, aneinanderreihen.

#### Kurze Figurenbeschreibung

**[0031]** Um besser würdigen zu können, wie die oben beschriebenen und andere Vorteile und Aufgaben der Erfindung erreicht werden, wird im Folgenden eine genaue Beschreibung der oben kurz beschriebenen Erfindung gegeben, indem auf die beigefügten Zeichnungen Bezug genommen wird. Die Zeichnungen sollen aber nicht den Schutzbereich beschränken, sondern die Erfindung soll nur durch zusätzliche Spezifikationen und Details mit Hilfe der zugehörigen Zeichnungen beschrieben werden, die jedoch nicht alle von den Ansprüchen umfasste Ausführungsbeispiele zeigen.

**[0032]** **Fig. 1** zeigt eine perspektivische Ansicht des zyklischen Temperaturwechselgeräts, das dazu auslegt ist eine biologische Probe einem Temperaturzyklus zu unterziehen und speziell für den Gebrauch bei einer zyklischen DNS Vervielfältigung ausgebildet ist.

**[0033]** **Fig. 2** ist eine seitliche Aufrissansicht des Fluidkammerteils des Geräts von **Fig. 1**.

**[0034]** **Fig. 3** ist eine innere Grundrissansicht des Fluidkammerteils des in **Fig. 1** dargestellten Geräts.

**[0035]** **Fig. 4** ist eine innere Grundrissansicht einer anderen Fluidkammer eines anderen Ausführungsbeispiels vorliegender Erfindung

**[0036]** **Fig. 5** zeigt ein optimiertes Temperatur-gegen-Zeit Profil für die Polymerasekettenreaktion, die einen zyklischen Temperaturwechsler verwendet.

**[0037]** **Fig. 6** zeigt graphisch den Effekt der Denaturierungszeit auf die Ergiebigkeit der Polymerasekettenreaktion.

**[0038]** **Fig. 7** zeigt graphisch den Effekt der Anlagerungszeit auf die Spezifität und die Ergiebigkeit der Polymerasekettenreaktion.

**[0039]** **Fig. 8A–B** zeigen die perspektivische bzw. Aufriss-Ansicht eines Querschnitts eines anderen bevorzugten Ausführungsbeispiels eines Vergleichsbeispiels.

**[0040]** **Fig. 8C** ist die Diagrammdarstellung der Beziehung zwischen Wärme produzierendem Element und den Kapillarröhrchen, die die biologische Probe in dem Vergleichsbeispiel, das in den **Fig. 8A–B** dargestellt ist

**[0041]** **Fig. 9A** ist ein Vergleichsbeispiel und zeigt das Ergebnis von vier verschiedenen Temperatur-Zeit-Profilen und deren resultierendes Vervielfältigungsprodukt nach 30 Zyklen (A–D).

**[0042]** **Fig. 9B** ist ein Vergleichsbeispiel und zeigt einen Zyklus eines weiteren bevorzugten Temperatur-Zeit-Profilen.

**[0043]** **Fig. 9C–G** zeigen beispielhafte Zyklen anderer bevorzugter Temperatur-Zeit-Profile.

**[0044]** **Fig. 10** stellt einen Schaltplan eines Temperaturgefälle-Steuerschaltkreises des Vergleichsbeispiels dar.

**[0045]** **Fig. 10A** ist die graphische Darstellung des Effekts der Temperaturübergangsgeschwindigkeit von der Produktdenaturierungstemperatur zu der Primeranlagerungstemperatur auf die Spezifität des Reaktionspro-

dukts.

**[0046]** **Fig.** 11 ist die schematische Ansicht eines bevorzugten schnellen zyklischen Temperaturwechslers mit Fluoreszenzdetektion gemäß vorliegender Erfindung.

**[0047]** **Fig.** 11A ist eine Temperatur-gegen-Zeit Diagramm, das eine bevorzugte Funktionsweise des Geräts von **Fig.** 11 zeigt.

**[0048]** **Fig.** 12 ist eine Darstellung eines 3D Diagramms von Temperatur, Zeit und Fluoreszenz während der Vervielfältigung eines Hepatitis B DNS Fragments in Gegenwart von SYBR® Green I.

**[0049]** **Fig.** 12A–C sind Darstellungen von 2D Diagrammen von Temperatur-gegen-Zeit, Fluoreszenz-gegen-Zeit und Fluoreszenz-gegen-Temperatur, die in zusammen in dem 3D Plot von **Fig.** 12 gezeigt sind.

**[0050]** **Fig.** 13 ist ein Diagramm von Fluoreszenz-gegen-Temperatur während der Vervielfältigung eines 536 Basenpaarfragments des menschlichen  $\beta$ -Globin Gens in der Gegenwart von SYBR® Green I.

**[0051]** **Fig.** 14 ist das Diagramm von Fluoreszenz-gegen-Zyklusanzahl, das gemäß einem erfindungsgemäßen Aspekt erzeugt wird.

**[0052]** **Fig.** 14A ist die Legende zu **Fig.** 14 und zu den nachfolgenden Figuren, die verschiedene Anfangszahlen für die Vorlagenkopien anzeigt.

**[0053]** **Fig.** 15 ist ein Diagramm von Fluoreszenz-gegen-Zykluszahl, das gemäß einem Aspekt der vorliegenden Erfindung gewonnen wird.

**[0054]** **Fig.** 16 ist ein Fluoreszenzverhältnis-gegen-Temperatur Diagramm, das gemäß einem Aspekt der vorliegenden Erfindung gewonnen wird.

**[0055]** **Fig.** 17 ist ein Fluoreszenzverhältnis-gegen-Temperatur Diagramm, das gemäß einem Aspekt der vorliegenden Erfindung gewonnen wird.

**[0056]** **Fig.** 18A ist ein Diagramm, das ein gleichgewichtiges PCR Paradigma darstellt.

**[0057]** **Fig.** 18B ist ein Diagramm, das ein kinetisches PCR Paradigma darstellt.

**[0058]** **Fig.** 18C ist ein Diagramm, das unterschiedliche Zeit-Temperatur Profile im Bereich der Anlagerungs-temperatur darstellt.

**[0059]** **Fig.** 19 stellt ein Vergleichsbeispiel dar, das dazu ausgebildet ist, die Probe kontinuierlich zu überwachen.

**[0060]** **Fig.** 19A–19D sind Darstellungen verschiedener Probenbehälterausbildungen.

**[0061]** **Fig.** 19E ist eine Graphik, die den Effekt der unterschiedlichen Probenbehälterausbildungen aus den **Fig.** 19A–D auf das Temperaturverhalten der Probe selbst darstellt.

**[0062]** **Fig.** 19F und 19G ist eine Seiten bzw. Bodenansicht eines bevorzugten Probenbehälters.

**[0063]** **Fig.** 19H und 19I zeigen entsprechend zwei mögliche Ausrichtungen eines rechteckigen Kapillarröhrchens beim Detektieren der Fluoreszenz der Probe.

**[0064]** **Fig.** 20 zeigt den optischen Aufbau, um ein kontinuierliches Überwachen der Probe, die einer DNS Vervielfältigung unterzogen wird bereitzustellen.

**[0065]** **Fig.** 21 ist die schematische Darstellung eines schnellen zyklischen Temperaturwechslers mit Fluoreszenzdetektion an der Spitze des Probenbehälters.

**[0066]** **Fig.** 21A–D zeigen aus Plastik/Glas zusammengesetzte Behälter, in welche biologische Proben eingefüllt werden.

**[0067]** **Fig.** 22 zeigt nützliche Temperatur-gegen-Zeit Abschnitte für die Fluoreszenz Hybridisierungsüberwachung.

**[0068]** **Fig.** 22A zeigt graphisch die Effektivität der Lichtführung, wenn eher die Spitze als die Seite der Kapillarprobenbehälter beobachtet wird.

**[0069]** **Fig.** 22B zeigt graphisch die Effektivität der Lichtführung anhand zweier unterschiedlicher Größen von Kapillarprobenröhren.

**[0070]** **Fig.** 22C ist ein Blockdiagramm mit hohem Niveau, das die Aufgaben zeigt, die von einem erfindungsgemäß bevorzugten Ausbildungsbeispiel durchgeführt werden, wobei die Erfindung einen schnellen zyklischen Temperaturwechsler mit Epifluoreszenzdetektion umfasst.

**[0071]** **Fig.** 22D ist ein Diagramm der Temperatur-gegen-Zeit für eine PCR Reaktion, wobei ein Fluoreszenzfeedback benutzt wurde, um die Reaktionsparameter zu steuern.

**[0072]** **Fig.** 22E ist ein Diagramm von Fluoreszenz-gegen-Zeit für eine PCR Reaktion, bei welcher ein Fluoreszenzfeedback benutzt wurde, um die Reaktionsparameter zu steuern.

**[0073]** **Fig.** 23 ist ein Diagramm von Fluoreszenz-gegen-Zeit, das die inverse Beziehung zwischen Temperatur und Fluoreszenz darstellt.

**[0074]** **Fig.** 24 ist ein Diagramm von Temperatur-gegen-Zeit, das die inverse Beziehung zwischen Temperatur und Fluoreszenz darstellt.

**[0075]** **Fig.** 25 ist ein Diagramm von Fluoreszenz-gegen-Temperatur für drei verschiedene PCR Produkte in Gegenwart von SYBR® Green I, das bei einem 0,2 Grad pro Sekunde Temperaturübergang durch die Produktschmelztemperatur erzeugt wurde.

**[0076]** **Fig.** 26 ist ein Diagramm von Fluoreszenz-gegen-Zeit, das die Produktanlagerung für verschiedene Konzentrationen von PCR Produkten in Gegenwart von SYBR® Green I zeigt.

**[0077]** **Fig.** 27A und 27B sind die schematische Querschnittsansichten des in **Fig.** 28 dargestellten Ausführungsbeispiels in einem Ablaufzustand bzw. einem Bestückungszustand.

**[0078]** **Fig.** 28 ist eine schematische Darstellung eines schnellen zyklischen Temperaturwechsels mit Fluoreszenzdetektion an der Spitze des Probenbehälters, der Positionen für die Fluoreszenzdetektion in zwei Dimensionen aufweist, um die Detektion zu optimieren.

**[0079]** **Fig.** 29 ist eine perspektivische Ansicht des Äußeren des in **Fig.** 28 schematisch dargestellten Ausführungsbeispiels.

**[0080]** **Fig.** 30A–30V sind detaillierte schematische Diagramme der elektrischen Komponenten.

**[0081]** **Fig.** 31A und 31B sind die perspektivische bzw. die Querschnitts- Ansicht des Probenhandhabungssystems.

**[0082]** **Fig.** 32 ist eine schematische Darstellung eines anderen Ausführungsbeispiels, das mehrere Probenhandhabungsscheiben beinhaltet.

#### Detaillierte Beschreibung der vorteilhaften Ausführungsbeispiele

**[0083]** Vorliegende Erfindung betrifft ein in den Ansprüchen definiertes Gerät und ein in den Ansprüchen definiertes Verfahren zum Ausführen eines zyklischen Temperaturwechsels und zum Überwachen von biologischen Reaktionen.

**[0084]** Gemäß einem Ausführungsbeispiel umfasst der Schritt des Anordnens einer ersten Probe den Schritt des Anordnens eines Volumens einer PCR Probe in jeden Behälter, wobei das Volumen der PCR Proben nicht größer als 10.000 µl ist und die Behälter zumindest teilweise aus Glas sind.

**[0085]** Das System kann weiterhin eine Vorrichtung zum Anpassen der Steuervorrichtung an die Reaktionsparameter umfassen. In einem Ausführungsbeispiel umfasst die Vorrichtung zum Bestimmen mindestens eines Reaktionsparameters gemäß der detektierten Fluoreszenz eine Berechnungsvorrichtung zum Bestimmen eines Reaktionsparameters, der aus der Gruppe bestehend aus Produktschmelztemperatur und -zeit, Produktwiederanlagerungstemperatur und -zeit, Sondenschmelztemperatur und -zeit und Primeranlagerungs-/Verlängerungstemperatur und -zeit ausgewählt ist.

**[0086]** Ein Karussell kann umfassen:

**[0087]** Eine Scheibe mit einer oberen Fläche, einer unteren Fläche, einem äußeren dazwischen verlaufenden Rand, einer Probenaufnahmeöffnung an der oberen Fläche, einer Probenbehälteröffnung an dem äußeren Rand und einen Probendurchgang, der die Probenaufnahmeöffnung und die Probenbehälteröffnung verbindet, wobei die Probenbehälteröffnung und der Probendurchgang dazu ausgebildet sind, einen Probenbehälter in der Scheibe aufzunehmen und zu befestigen.

**[0088]** Das Karussell kann weiterhin einen Verschluss für die Probenaufnahmeöffnung aufweisen. Zusätzlich kann der Durchgang durch das Karussell eine Barriere beinhalten, die verhindert, dass eine flüssige an der Probenaufnahmeöffnung abgegebene Probe zu der Probenbehälteröffnung fließt, wenn keine beeinflussende Kraft auf die flüssige Probe wirkt.

**[0089]** In einem Ausführungsbeispiel weist der Probenbehälter ein Kapillarröhrchen mit einem Volumen-zu-Oberfläche, der größer als 1 mm ist, auf.

**[0090]** In einem Ausführungsbeispiel ist der Probendurchgang durch das Karussell mit der Probenbehälteröffnung, der Probenaufnahmeöffnung und mindestens einer weiteren in der Oberfläche ausgebildeten Öffnung verbunden. Gemäß einem Ausführungsbeispiel umfasst das Karussell weiterhin eine vorgegebene Reagenzmischung in dem Probendurchgang zwischen der Probenaufnahmeöffnung und der Probenbehälteröffnung.

**[0091]** Im Folgenden werden die Figuren beschrieben, wobei die gleichen Strukturen die gleichen Bezugszeichen tragen.

**[0092]** Wie in **Fig. 1** dargestellt, umfasst das vorteilhafte Ausführungsbeispiel der zyklischen Temperaturwechselvorrichtung **10** eine Kammer mit einem geschlossenen Fluidkreislauf (am vorteilhaftesten ist Luft), die im allgemeinen mit **11** bezeichnet wird, und dazu ausgelegt ist, Proben, die dem Zyklus unterzogen werden sollen, durch die Lüftungsklappe **14** zu empfangen. Die Kammer **11** mit dem geschlossenen Fluidkreislauf beinhaltet mehrere Unterteilungen, die jeweils kurz beschrieben werden. Die Vorrichtung **10** weist außerdem eine Steuervorrichtung **12** auf, die mittels Eingabetasten **25** und einem Display **26** programmiert werden kann, um eine Abfolge von Temperaturen über eine vorgegebene Zeit zyklisch zu durchlaufen. Der zyklische Temperaturwechsel der Kammer **11** kann dazu verwendet werden, mehrere Abläufe auszuführen und ist insbesondere, wie weiter unten erklärt werden wird, für die Vervielfältigung von Primer-spezifischen DNS-Proben, die ein Reaktionsgemisch enthalten, geeignet.

**[0093]** Die Kammer **11** mit dem geschlossenen Fluidkreislauf ist im allgemeinen in einem schachtelförmigen Gehäuse **13** aufgenommen. Gebläsebefestigungsplatten **16** können, falls gewünscht, derart angeordnet sein, dass sie einen kleineren rechteckigen Bereich der Kammer **11** abtrennen und dazu dienen ein im allgemeinen zylinderförmiges unteres Gehäuse **15** zu tragen und daran zu befestigen. Alternativ kann der Ventilator des Gebläses **28** integral in dem Kammergehäuse **13** angeordnet sein. Das Innere des Gebläsegehäuses **15** umfasst die Flügel und die Antriebswelle des Gebläses. Der Gebläsemotor (nicht dargestellt) ist außerhalb des Gebläsegehäuses **15** angeordnet, und deshalb auch außerhalb der umschlossenen Kammer **11**. In dieser Konfiguration sind die Flügel und die Antriebswelle die einzigen Teile des Gebläses, die dem zirkulierenden heißen Fluid in der Kammer **11** ausgesetzt werden. Es wäre unvorteilhaft den Motor innerhalb der Kammer zu befestigen, der dann den Temperaturänderungen ausgesetzt werden würde und zudem die thermisch wirksame Masse des Motors derjenigen hinzufügt, die dem Erwärmen und Kühlen ausgesetzt werden soll. Die Verringerung der thermisch wirksamen Masse, die dem Fluid in der Kammer **11** ausgesetzt wird, ist wünschenswert für das gesamte Betriebsverhalten der Vorrichtung **10** in seiner Funktion, bei der die Proben in der Vorrichtung platziert und einem Temperatur-gegen-Zeit Sollprofil unterzogen werden, wobei entweder ein vorgegebenes Profil verwendet wird, oder, wie weiter unten detailliert beschrieben werden wird, eine oder mehrere Reaktionsparameter während des Reaktionsablaufs verändert werden.

**[0094]** Das Gebläse **28** ist ein wohlbekannter Gebläsetyp, der gewöhnlich als "in line" Gebläsetyp identifiziert

wird, der vorzugsweise einen Propellerartigen Ventilator, bedingt durch seine im allgemeinen niedrige thermisch wirksame Masse, oder, falls gewünscht, einen Käfigläuferartigen Ventilator aufweist, wobei der Ventilator vorzugsweise eine Kapazität von 75 ft<sup>3</sup>/min aufweist.

**[0095]** Die Solenoidplatte **17** weist ein daran befestigtes Solenoid **18** auf. Der Solenoidanker **19** ist an dem oberen Ende **21** eines Stabs **20** befestigt, der wiederum fest mit der Lüftungsklappe **14** verbunden ist und drehbar an Punkten oberhalb und unterhalb der Lüftungsklappe **14** an dem Gehäuse **13** befestigt ist. Der Stab **20** ermöglicht es deshalb, dass sich die Lüftungsklappe **14** relativ zu dem Gehäuse **13** um die Längsachse des Stabs **20** frei drehen kann.

**[0096]** Eine Feder **22** ist an ihrem einen Ende an dem Gehäuse **13** durch einen Tragpfosten **23** befestigt. Das gegenüberliegende Ende der Feder **22** ist mit dem oberen Ende **21** des Stabs **20**, direkt neben der Verbindung mit dem Solenoidanker **19**, verbunden. Die Feder **22** ist zwischen den zwei Befestigungspunkten gespannt. Deshalb tendiert die Feder **22** dazu, das obere Ende **21** in Richtung des Tragpfostens **23** zu ziehen, wodurch die Lüftungsklappe dazu tendiert, sich in ihre geschlossene Position zu drehen. Wenn das Solenoid **18** betätigt wird, tendiert der Anker **19** dazu, das obere Ende **21** des Stabs **20** in Richtung des Solenoids **18** zu ziehen, was der Zugrichtung der Feder **22** entgegenwirkt, und die Lüftungsklappe **14** tendiert dazu, sich zu öffnen.

**[0097]** Die Steuervorrichtung, im allgemeinen mit **12** bezeichnet, ist elektrisch mit der Kammer **11** mittels eines Übertragungskabels **24** verbunden. Das Kabel **24** stellt außerdem Energie für den Gebläsemotor (nicht dargestellt) und die Heizwendel **31** bereit. Weiterhin ist die Steuervorrichtung auch mit einem Thermoelementsensor **35** zum Empfangen von den Temperaturdaten entsprechenden Signalen und dem Solenoid **18** zum Triggern des Solenoidankers verbunden.

**[0098]** Die Steuervorrichtung **12** kann ein wohlbekannter Typ von Temperatursteuereinheit sein, die dazu programmierbar ist, die Heizwendel **31**, die Lüftungsklappe **14** und das Gebläse derart anzusteuern, dass eine vorgegebene Temperatur als Funktion der Zeit in der Kammer **11** herrscht, und die dazu programmiert werden kann, einen Relaisausgang zum Ansteuern des Solenoids zu vorgegebenen Zeitperioden und Kammertemperaturniveaus zu aktivieren. Eine vorteilhafte Temperatursteuervorrichtung **12** für die Ausführungsbeispiele der **Fig. 1 bis 3** ist eine Partlow MIC-6000 Proportional Temperatursteuervorrichtung, die von Omega Engineering Inc., Stamford, Connecticut, unter der Modellnummer CN8600 process controller bezogen werden kann.

**[0099]** Wie in den **Fig. 2** und **3** dargestellt, ist das Innere der Kammer **11** in 4 Hauptabschnitte unterteilt. Der Gebläseabschnitt **28** wird durch das Gebläsegehäuse **15** und die Gebläsebefestigungsplatten **16** gebildet. Die Gesamtheit des Gebläseabschnitts **28** ist mit dem Ventilator und den Antriebswellenteilen des Gebläses, wie oben beschrieben ausgefüllt. Das Gebläse kann eines der mehreren wohlbekannten Designs, wie oben beschrieben, aufweisen, und ist deshalb in **Fig. 3** zum Zweck der Klarheit weggelassen worden. Es ist ausreichend, zu verstehen, dass der in dem Gebläseabschnitt **28** angeordnete Ventilator das Fluid durch die Einlassöffnung **36** in den Gebläseabschnitt **28** zieht und durch die Auslassöffnung **37** hinausdrückt.

**[0100]** Es ist vorteilhaft, dass das Fluid durch das Gebläse mit einer Geschwindigkeit von mindestens 75 ft<sup>3</sup>/min vorangetrieben wird. Es ist trotzdem wichtig zu realisieren, dass das in der Kammer **11** vorhandene Fluid nur den Ventilator und einen Teil der Antriebswelle des Gebläses kontaktiert, der Gebläsemotor selbst ist außerhalb des Gebläsegehäuses **15** angeordnet, so dass ein Kontakt mit dem Fluid in der Kammer **11** vermieden wird. Diese Überlegung trägt zu der Arbeitsgeschwindigkeit bei, um das Material, das das Fluid innerhalb der Kammer **11** kontaktiert, zu minimieren und dadurch die thermisch wirksame Masse des Materials, das während des Zyklusablaufs erwärmt bzw. abgekühlt werden muss, zu minimieren. Durch die Minimierung der thermisch wirksamen Masse, die durch das Fluid erwärmt oder abgekühlt werden muss, wird die Reaktionszeit, die nötig ist, um die Teile der Kammer **11** auf eine einheitliche Temperatur zu bringen, um ein Vielfaches verringert.

**[0101]** Das den Gebläseabschnitt **28** durch die Auslassöffnung **37** verlassende Fluid tritt in den Heizabschnitt **29** ein. Das den Heizabschnitt **29** durchströmende Fluid muss die Heizwendeln **31** passieren. Wenn die Heizwendeln **31** heißer werden als das in den Heizabschnitt **29** gelangende Fluid, wird das Fluid, während es durch den Heizabschnitt **29** geblasen wird, erwärmt. Die Heizwendel ist vorzugsweise eine 1000 Watt (125 VAC) Nichrome Draht-Wendel, die um einen Mikroträger gewickelt ist. Trotzdem kann jede andere Heizeinheit, die geeignet ist, die Art des in der Kammer vorhandenen Fluids zu erwärmen, verwendet werden. Die speziell in dem Ausführungsbeispiel der **Fig. 1 bis 3** verwendete Heizwendel ist von Johnstone Supply, Portland, Oregon, hergestellt.

**[0102]** Die Heizwendel **31** wird durch ein in der Steuervorrichtung **12** beinhaltetes Ausgangsrelais aktiviert.

Das bevorzugte Relais ist ein 25 A, 125 VAC Festkörperrelais, das von Omega Engineering Inc., Stanford, Connecticut, unter der Modell Nr. Omega SSR 240 D25 hergestellt wird.

**[0103]** Das den Heizabschnitt **29** passierende Fluid fällt auf die Einbauten **32** und **33**, bevor es in den Reaktionsabschnitt **30** gelangt. Die Einbauten **32** und **33** tendieren dazu, eine laminare Strömung zu unterbrechen und erzeugen eine Turbulenz, um das Fluid effektiv zu mischen, so dass es mit einer homogenen Temperatur in dem Reaktionsabschnitt **30** ankommt.

**[0104]** Der Thermoelementsensor **35** stellt ein elektrisches Eingangssignal an der Steuervorrichtung **12** bereit, das der Fluidtemperatur in dem Reaktionsabschnitt entspricht. Die Temperaturüberwachung während des Betriebs der zyklischen Temperaturwechselvorrichtung **10** wird vorteilhafterweise durch ein 30-Gauge-Eisen-Konstantan "J-type" Thermoelement erreicht. Die Steuervorrichtung verwendet die Information, um die Heizwendel **31** gemäß dem vorgegebenen darin gespeicherten Temperatur-gegen-Zeit Profil zu steuern, und das Solenoid **18** zu betätigen, wie in Kürze erklärt werden wird.

**[0105]** Das von dem Reaktionsabschnitt **30** in den Luftrückführabschnitt **34** strömende Fluid muss durch den Probenabschnitt **27** (dargestellt durch gestrichelte Linien) strömen. Der Probenabschnitt **27** wird ebenfalls in Kürze erläutert werden.

**[0106]** Das sich in dem Rückführabschnitt **34** befindende Fluid ist, bedingt durch die Wärmeübertragung an die in der Probenkammer angeordneten Proben, leicht gekühlt worden. Das Fluid in dem Rückführabschnitt **30** wird durch die Einlassöffnung **36** in den Gebläseabschnitt **28** gezogen, woraus es dann wieder, aufgrund des Ventilators, aus der Auslassöffnung in den Heizabschnitt **39** geblasen wird. Deshalb ist die Fluidkammer **11**, wenn sie mit geschlossener Lüftungsklappe **14** betrieben wird, eine Fluidkammer mit geschlossenem Fluidkreislauf, in der das Fluid entlang eines geschlossenen Schleifenwegs kontinuierlich durch jeden der Abschnitte zirkuliert, um die darin angeordneten Teile auf eine konstante Temperatur zu bringen. Die kontinuierliche Zirkulation der Luft in der Luftkammer **11** ermöglicht es, dass die Proben in dem Probenabschnitt **27** so schnell wie möglich auf eine vorgegebene Temperatur gebracht werden, und dann, wenn gewünscht, auf dieser Temperatur gehalten werden.

**[0107]** Wenn die Vorrichtung **10** nicht nur dafür verwendet werden soll, das in dem Reaktionsabschnitt **27** angeordnete Material zu erwärmen, sondern nachfolgend auch so schnell wie möglich auf eine Temperatur an oder oberhalb der Umgebungsfluid- (Luft-) Temperatur zu kühlen, kann die Steuervorrichtung **12** programmiert werden, das Solenoid **18** zu betätigen, um die Lüftungsklappe **14** zu öffnen und große Mengen Umgebungsfluid unverzüglich in die Kammer **11** strömen zu lassen, während das darin vorhandene erwärmte Fluid simultan entweicht.

**[0108]** Die Deaktivierung der Heizwendel **31**, während der kontinuierlichen Aktivierung des Gebläses bei geöffneter Lüftungsklappe **14**, zieht das Umgebungsfluid in den Rückführabschnitt **34** und von dort aus in den Gebläseabschnitt **28**. Das Gebläse drückt dann das Umgebungsfluid durch den Heizabschnitt **29**, von wo es direkt, ohne von der Heizwendel **31** erwärmt zu werden, in den Reaktionsabschnitt **30** gelangt. Das Umgebungsfluid passiert dann den Probenabschnitt **27** und entweicht aus der Kammer **11** durch die Lüftungsklappe **14**. Bedingt durch die minimale thermisch wirksame Masse des in der Kammer **11** angeordneten Materials, und der Wirkung des Gebläseventilators, werden große Mengen Umgebungsfluid an dem Probenabschnitt vorbei geblasen, und von dort aus aus der Kammer **11**. Dadurch wird ein schnelles Kühlen der Proben und des in dem Probenabschnitt **27** angeordneten Materials erreicht.

**[0109]** Der Probenabschnitt **27** ist so dimensioniert, dass mehrere Proben, wie beispielsweise hohle längliche eine Probe enthaltende Glasrörchen, leicht in voneinander räumlich getrennter Ausrichtung angeordnet werden können, so dass sich das Fluid gleichmäßig um jede Probe verteilen kann. Falls gewünscht, kann der Probenabschnitt **27** derart dimensioniert und ausgebildet sein, dass ein Einbringen eines Gestells, einer Gondel oder etwas Ähnlichem, das für die Aufnahme mehrerer räumlich getrennt angeordneter Proben geeignet ist, möglich ist, so dass ein einfaches Beladen der Proben in den Probenabschnitt **27** möglich ist.

**[0110]** Der Zugang zu dem Probenabschnitt **27** wird durch Drehung der Lüftungsklappe **14** in ihre geöffnete Position möglich. Ist die Lüftungsklappe **14** einmal um ca. 90° aus ihrer geschlossenen Position gedreht, ist der Probenabschnitt **27** dort hindurch leicht zugänglich. Demnach verursacht, wie aus den **Fig. 1** bis **3** leicht ersichtlich ist, eine Drehung der Lüftungsklappe **14** um ca. 90° aus ihrer geschlossenen Position, dass der Rückführabschnitt **34** im wesentlichen von dem Reaktionsabschnitt **30** abgeschlossen ist. Demnach wird, wenn die Vorrichtung **10** in einem "Kühlzustand" ist, Umgebungsfluid direkt in den Rückführabschnitt **34** geleitet.

tet und durch den Gebläseabschnitt **28**, den Heizabschnitt **29**, den Reaktionsabschnitt **30** und den Probenabschnitt **27** im wesentlichen entlang des gleichen Wegs, wie dem oben beschriebene geschlossenen Fluid-Kreislaufweg, geblasen. Das Fluid wird dann aus der Luftkammer **11** geblasen und an dem Rückeintritt in den Luftrückführabschnitt **34** durch die Positionierung der Lüftungsklappe **14** zwischen dem Probenabschnitt **27** und dem Rückführabschnitt **34** gehindert.

**[0111]** Demnach ermöglicht die Lüftungsklappe **14** nicht nur den Eintritt von Umgebungsluft in die Kammer **11**, sie kann auch das Fluid daran hindern, in schleifenförmiger Art durch die Kammer zu zirkulieren. Statt dessen wird das Fluid gezwungen, den Probenabschnitt **27** zu passieren und dann die Kammer **11** zu verlassen, um das schnelle Kühlen der Probeninhalte und der Kammer **11** zu unterstützen.

**[0112]** Wenn die Vorrichtung **10** für die zyklische DNS Vervielfältigung verwendet wird, ist ein wiederholter Zyklus über verschiedene Temperaturen erforderlich. Proben mit einer Reaktionsmischung für die Polymerasenkettreaktion müssen ungefähr 30 mal zyklisch die Temperaturwechsel durchlaufen, die den Denaturierungs-, Anlagerungs- und Verlängerungsphasen des Vervielfältigungsprozesses entsprechen.

**[0113]** Die Vorrichtung **10** ist, bedingt durch ihre neuartigen oben beschriebenen Eigenschaften, dazu fähig, Proben, in, im Vergleich mit dem Stand der Technik, signifikant kürzerer Zeit zyklisch zu behandeln. Beispielsweise kann die in den Figuren dargestellt DNS Vervielfältigungsanwendung einen Temperatur-gegen-Zeit Profil Zyklus in 30 bis 60 Sekunden (vgl. **Fig. 5**) durchlaufen. Der gleiche Zyklus würde mit einer aus dem Stand der Technik bekannten Vorrichtung 5 bis 10 mal so lange dauern. Diese geringe Zykluszeit vergrößert nachweislich die Ausbeute und die Spezifität der Polymerasenkettreaktion gegenüber dem dem Stand der Technik entsprechenden Zyklus.

#### Beispiel 1

**[0114]** Die Polymerasenkettreaktion wurde in einem 10  $\mu$ l Volumen mit 50 ng Vorlage-DNS aus dem menschlichen Genom, 0,5 mM von jedem Deoxynukleotid, 500 ng von jeweils zwei oligonukleotiden Primern GGTTGGCCAATCTACTCCCAGG (SEQ ID Nr. 5) und GCTCACTCAGTGTGGCAAAG (SEQ ID Nr. 6) in einem Reaktionspuffer bestehend aus 50 mM Tris-HCl (pH 8,5 bei 25°C), 3,0 mM Magnesiumchlorid, 20 mM KCl, und 500  $\mu$ g/ml Serumalbumin vom Rind laufen gelassen. Die *Thermus aquatis* DNS Polymerase (0,4  $\mu$ l) wurde zugegeben, die Proben in ein 8 cm langes, dünnwandiges Kapillarröhrchen (hergestellt von Kimble, Kimax 46485-1) gegeben, und die Enden mit einem Laborgasbrenner verschweißt, so dass eine Luftblase an beiden Enden jedes Röhrchens vorhanden war.

**[0115]** Die Kapillarröhrchen wurden dann vertikal in einen Halter aus 1 mm dickem "prepunched perfboard" (hergestellt von Radio Shack) gestellt. Die Mischung durchlief den Zyklus aus Denaturierung (90–92°C), Anlagerung (50–55°C), und Verlängerung (72–75°C) 30 mal, um das in **Fig. 5** dargestellte Temperatur-gegen-Zeit Profil zu ergeben. Die Temperaturüberwachung der Kapillarröhrchen wurde mittels eines Miniaturthermoelements (IT-23, Sensortek, Clifton, NJ) durchgeführt, das in 10  $\mu$ l destilliertem Wasser angeordnet und mit einem Thermoelementmonitor (BAT-12, Sensortek) verbunden war. Die Vervielfältigungsprodukte wurden durch Elektrophorese auf einem 1,5%-igen Agarosegel aufgetrennt. Die spezifischen Vervielfältigungsprodukte wurden mit guter Ausbeute erhalten.

**[0116]** Bedingt durch die Tatsache, dass die Vorrichtung **10** Luft statt Wasser als Wärme übertragendes Medium verwendet, besteht der Vorteil, dass der Wärmeübertrag über ein Medium (Luft) mit niedriger Wärmekapazität, das sehr schnell erwärmt werden kann, erfolgt.

**[0117]** Die Reaktionszeit für das Probenkühlen ist sehr kurz, da dünnwandige Glaskapillarröhrchen zum Enthalten der Proben, statt Mikrozentrifugenröhrchen aus Plastik, die bei aus dem Stand der Technik bekannten Abläufen benutzt werden, verwendet werden, und da die thermisch wirksame Masse des in der Kammer **11** (siehe **Fig. 5**) angeordneten Materials minimiert wurde. Diese Reaktionszeiten können eine Optimierung der Zeit- und Temperaturanforderungen für die Denaturierungs-, Anlagerungs-, und Verlängerungsschritte der Polymerasenkettreaktion ermöglichen.

**[0118]** Darüber hinaus werden kürzere "ramp times" erzielt, d. h. die Zeit, die erforderlich ist, um die Proben-temperatur von einem Temperaturlevel auf das nächste, den Phasen im Vervielfältigungsprozess entsprechende Temperaturlevel zu bringen, wird verkürzt. Dies verkürzt die Zeit, die für eine komplett Vervielfältigung nötig ist, und ermöglicht spezifische Studien der Anlagerungs-, Denaturierungs-, und Verlängerungskinematik in einem Polymerasenkettreaktionsprotokoll.

**[0119]** Die Einbauten **32** und **33** (wie in **Fig. 3** gezeigt) können, wenn gewünscht, dazu verwendet werden, eine bessere Temperaturhomogenität in dem Probenabschnitt **27** zu erhalten. Wie gezeigt, verringern die Einbauten **32** und **33** die Temperaturunterschiede in dem Reaktionsabschnitt **30** von ungefähr 10°C auf ungefähr 2°C. Falls gewünscht, können weitere (oder komplexere) Einbauten verwendet werden, um die Temperaturunterschiede in dem Reaktionsabschnitt **30** weiter zu verringern. Alternativ kann ein Ventilator, wie in **Fig. 4** gezeigt, stromabwärts von der Heizwendel **31** aus, aber vor dem Probenabschnitt **27** angeordnet sein, um eine gleichmäßige Mischung zu erhalten.

**[0120]** Die Vervielfältigungsprodukte, die durch die Verwendung der Vorrichtung **10** erhalten werden, sind quantitativ und qualitativ mindestens genauso erstrebenswert wie die, die durch das manuelle Wasserbad Zyklosverfahren gewonnen werden. Trotzdem sind mit der schnellen Wärmesteuerung der Reaktionsmischung Vorzüge in der Spezifität und der Ausbeute möglich.

**[0121]** **Fig. 6** zeigt die Auswirkung des in **Fig. 5** dargestellten Temperatur-gegen-Zeit Profils auf die Spezifität (d. h. die eine spezifische Produktausbeute im Gegensatz zu mehreren ähnlichen oder sog. "shadow"-Produkten), wenn das Temperaturwechselgerät **10** verwendet wird. Wie zu sehen ist, ist die Produkt-spezifität umso größer, je kürzer die die "ramp" und die Anlagerungszeiten sind. Die schnelle Temperaturreaktion des Geräts **10** ermöglicht eine verbesserte Spezifität und Ausbeute, die mit Systemen aus dem Stand der Technik nicht möglich sind.

**[0122]** **Fig. 7** zeigt die Auswirkung des Variierens der Denaturierungszeit des in **Fig. 5** dargestellten Temperatur-gegen-Zeit Profils auf die DNS Vervielfältigungsausbeute, wenn das erfindungsgemäße Temperaturwechselgerät verwendet wird. Die helleren vertikalen Linien entsprechen jeweils einer bestimmten Zeit bei einer Denaturierungstemperatur. Wie zu sehen ist, ist die Ausbeute bei den kürzest möglichen Denaturierungszeiten am größten. Solch ein Resultat wäre mit den Systemen aus dem Stand der Technik nicht möglich.

**[0123]** Wie gezeigt wurde, kann durch die Verringerung der Wärmekapazität (thermisch wirksame Masse) des Geräts **10** die Gesamtzeit, die für das Durchlaufen der Polymerasekettenreaktion nötig ist, bemerkenswert verringert werden. Außerdem verkürzt die Verwendung von kleinen Probenvolumina die Zeit, die für die Reaktion nötig ist, weiter und reduziert zudem die Menge von teuren Reagenzien, die verwendet werden müssen, um bis zu 90%, wodurch die Kosten zum Durchführen des Verfahrens weiter reduziert werden. Beispielsweise können, wenn gewünscht, in dem in den **Fig. 1** bis **3** dargestellten Vergleichsbeispiel Kapillarröhrchen verwendet werden, die einen inneren Durchmesser im Bereich von ungefähr 0,25 mm bis ungefähr 1,0 mm aufweisen. In einigen Anwendungen können erstrebenswerterweise auch Kapillarröhrchen verwendet werden, die einen inneren Durchmesser im Bereich von ungefähr 0,02 mm bis ungefähr 0,1 mm aufweisen.

**[0124]** Das Gerät **10** ist für die DNS Vervielfältigung aus beliebigen Quellen einsetzbar. Auch wenn spezielle Konfigurationen und Anordnungen in Verbindung mit dem zyklischen Temperaturwechselgerät **10** diskutiert wurden, können auch andere Anordnungen und Konfigurationen verwendet werden. Beispielsweise können alternativ andere Fluida als Luft, mit im allgemeinen geringer thermisch wirksamer Masse, Verwendung finden.

**[0125]** Ein weiteres Vergleichsbeispiel ist in den **Fig. 8A–C** dargestellt. **Fig. 8A** ist eine perspektivische Ansicht und **Fig. 8B** ist eine Querschnitts-Aufrissansicht eines zusätzlichen Ausführungsbeispiels. Es ist selbstverständlich, dass viele der im Vorhergehenden erläuterten Komponenten und Lehren ihre Anwendung auch in dem in den **Fig. 8A–C** dargestellten Beispiel finden. Demnach werden nur die relevanten zusätzlichen Informationen bezüglich des Beispiels im Folgenden dargestellt. Wichtig ist, dass in dem in den **Fig. 8A–C** dargestellten Beispiel das Wärme produzierende Element neben den biologischen Probenbehältern angeordnet ist, wodurch, wie weiter unten erläutert werden wird, ein schnelleres Erwärmen und Kühlen der biologischen Proben ermöglicht wird.

**[0126]** Wie in Kürze klar werden wird, stellt das in den **Fig. 8A–C** dargestellte Gerät eine noch größere Verbesserung gegenüber dem Stand der Technik im Hinblick auf die Schnelligkeit mit der der Temperaturwechsel vollzogen werden kann dar, beispielsweise dauern 15 oder 30 Zyklen der DNS Vervielfältigung nur noch 30, 15, 10 oder noch weniger Minuten. Darüber hinaus stellt das Gerät **100** eine bessere, als vorher mögliche, Wärmehomogenität überall in den Proben bereit.

**[0127]** In **Fig. 8A** ist die allgemeine Konfiguration des Gehäuses **102** des Beispiels gezeigt. Das Gehäuse **102** ruht auf Füßen **104** (am besten in **Fig. 8B** zu sehen) und dient dazu, die anderen beschriebenen Strukturelemente an ihrem Platz zu halten und die Strukturelemente, die heiß werden, von ihrer umgebenden Umgebung zu isolieren. In der in **Fig. 8A** gezeigten Ausgestaltung **100** sind Eingabetasten **25** und ein Monitor **26**, wie vor-

her bei dem Gerät **10** beschrieben, enthalten. Die vorher beschriebenen Steuerstrukturelemente können ohne weiteres modifiziert werden, oder als Muster für eine Steuervorrichtung, die in dem in den **Fig. 8A–C** dargestellten Beispiel benutzt werden kann, verwendet werden.

**[0128]** Wie am besten in der Querschnittsansicht von **Fig. 8B** dargestellt, ist die Probenkammer durch eine Klammer **106** bezeichnet. Ein Deckel **138**, der durch ein Scharnier **131** mit dem Gehäuse **102** verbunden ist, kann geöffnet werden, um den Zugang zu der Probenkammer **106** zu ermöglichen. Die Probenkammer **106** weist vorzugsweise eine zylindrische Form auf, kann aber jede andere Form oder Größe, die von der speziellen Anwendung gefordert wird, aufweisen.

**[0129]** Die Probenkammer **106** ist vorzugsweise mit einem schwarzen Schaummaterial **110** ausgekleidet, dessen Oberfläche lichtabsorbierende Eigenschaften aufweist, wobei aber der Großteil der Schaumdicke isolierende Eigenschaften aufweist. Das schwarze Schaummaterial kann eines sein, das bereits im Stand der Technik vorhanden ist, oder es ist eines, das aus einem Plastikmaterial hergestellt ist. Der Schaum ist vorzugsweise ein Material, das bereits durch die darüber streichende Luft gekühlt wird, d. h. das Material weist eine niedrige Wärmeleitfähigkeit und eine poröse Fläche auf.

**[0130]** Die dunkle oder schwarze poröse Fläche des Materials konvertiert die auf die Oberfläche treffende Strahlung kürzerer Wellenlänge in langwellige Strahlung d. h. Wärme, die in die Probenkammer abgestrahlt wird.

**[0131]** Der Schaum **110** dient dazu, die Probenkammer thermisch gegenüber dem umgebenden Luftraum in dem Gehäuse zu isolieren, und auch dazu, das von der Lampe **112** emittierte Licht in Wärmeenergie umzuwandeln. Der Schaum **110** kann auch an anderen Strukturelementen angeordnet sein. Beispielsweise kann ein Material mit einer schwarzen, dunklen oder sonstigen nichtreflektierenden Oberfläche, wie beispielsweise einer dünnen Folie Polycarbonat mit einer schwarz gestrichenen Oberfläche, an der Rückseite eines Isoliermaterials, wie beispielsweise Fiberglas oder ein Schaumstoffmaterial, angebracht sein. Die schwarze oder dunkle Oberfläche, die auf mehrere verschiedene Substanzen gestrichen sein kann, konvertiert kurzwellige auftreffende Strahlung in Wärmestrahlung, während das Isoliermaterial die Probenkammer von der Umgebung thermisch isoliert. Demnach können, entsprechend der bereitgestellten Lehre, Fachleute viele verschiedene Materialien und Strukturen zum Auskleiden der Probenkammer verwendet.

**[0132]** Die Lampe **112** ist vorzugsweise eine 500 W Halogenlampe. Falls angemessene Steuervorrichtungen verwendet werden, ist es auch möglich, Lampen mit einer höheren Leistung oder mehrere Lampen, wie beispielsweise vier 500 W Halogenlampen, zu verwenden. Eine Lampenfassung **112A** ist an dem Gehäuse **102** mittels einer Tragvorrichtung **112B** angebracht. Die Lampe **112** ist dazu fähig, die Probenkammer **106** schnell und gleichmäßig auf die Solltemperatur zu erwärmen. Andere Wärmequellen, d. h. Infrarotstrahlung, wie beispielsweise durch das vorher beschrieben Nichrome Drahtelement, können genauso verwendet werden.

**[0133]** In **Fig. 8B** sind zwei dünnwandige, wie vorher beschriebene, Kapillarröhrchen, dargestellt. Auch wenn nur zwei dünnwandige Kapillarröhrchen dargestellt sind, kann die Probenkammer **106** viele solcher Röhrchen aufnehmen. Die dünnwandigen Kapillarröhrchen haben einige wichtige Vorteile gegenüber den vorher beschriebenen Vorrichtungen, und dienen, zusammen mit der Probenkammer **106**, als das gegenwärtig bevorzugte Beispiel für eine Vorrichtung zum Aufnehmen von biologischen Proben.

**[0134]** Es ist klar, dass viele andere Strukturen, die äquivalente oder ähnliche Funktionen haben, ebenfalls verwendet werden können. Die dünnwandigen Kapillarröhrchen **108** werden vorzugsweise so hinterlassen, dass sie aus der Probenkammer durch Öffnungen **140** hinaus ragen, um einen leichten Zugang zu ihnen zu gewährleisten, aber sie können auch vollständig in der Probenkammer **106** beinhaltet sein, wie es zahlreiche Fluid enthaltende Strukturen sind, die für bestimmte Anwendungen geeignet sind. Die vorteilhaften dünnwandigen Kapillarröhrchen haben eine Aufnahmefähigkeit von ungefähr 10 µl. Es ist selbstverständlich, dass das Volumen der Probe klein gehalten werden sollte, und die Oberfläche der die Probe enthaltenden Struktur relativ groß sein sollte, und dass sie zusammen eine relativ kleine thermisch wirksame Masse aufweisen. Es ist auch vorteilhaft, dass die die Probe enthaltenden Strukturen Volumina irgendwo zwischen 1 pl bis 10.000 µl beinhalten können, aber den Fachleute ist klar, dass auch andere Probenvolumina benutzt werden können, sofern die unterschiedliche thermisch wirksame Masse der Struktur berücksichtigt wird.

**[0135]** Die Lampe **112** und der Isolierschaum **110** stellen zusammen eine schnelle und gleichmäßige Erwärmung der in den dünnwandigen Kapillarröhrchen **108** enthaltenen Probe und der in der Probenkammer **106** beinhalteten Luft bereit. Ein Thermoelement **134** ist in der Probenkammer **106** angeordnet, um die Temperatur

in der Kammer zu messen und wird dazu verwendet, die Solltemperatur in der Kammer, wie vorher beschrieben, aufrecht zu erhalten.

**[0136]** Das Thermoelement ist vorzugsweise eines das im Stand der Technik erhältlich ist, dessen Thermalreaktion im wesentlichen der Thermalreaktion der biologischen Probe und dem diese enthaltenden Behälter entspricht. Solche Thermoelemente können kommerziell von Bezugsquellen, wie beispielsweise den Idaho Labs, die eine Reihe von Thermoelementen, die als Metallummantelte J-Typ-Thermoelemente bezeichnet werden, herstellen, bezogen werden. Das Anpassen der Thermalreaktion des Thermoelements an die Thermalreaktion der biologischen Probe und des Behälters kann vorzugsweise dadurch durchgeführt werden, dass ein Mikrothermoelement, wie beispielsweise das im Stand der Technik bekannte von Physi-Temp beziehbare Thermoelement Model IT-23, in eine typische biologische Probe, die in dem gewählten Behälter enthalten ist, eingebracht wird, und die Probe und das Thermoelement einem Test mit den gleichen Temperaturänderungen unterzogen werden. Das getestete Thermoelement, oder einige Außenkriterien, können geändert werden, bis die Thermalreaktion des Thermoelements an die Thermalreaktion der Probe und ihres Behälters angemessen angepasst ist.

**[0137]** Die in der **Fig. 8B** dargestellte Anordnung stellt eine gleichmäßige Erwärmung und Kühlung der Probe als die früher zur Verfügung stehenden Vorrichtungen bereit. In den früher zur Verfügung stehenden Vorrichtungen wurde der Wärmetransfer über die gesamte Probe selbst durch Konvektion in der Probe durchgeführt. Die durch die Konvektion induzierte Bewegung innerhalb der Probe in egal welcher die Probe enthaltenen Struktur wird durch die Temperaturgradienten oder -unterschiede in den im allgemeinen kleinen biologischen Proben (d. h. 10–100 µl) verursacht.

**[0138]** Die Auswirkung der Temperaturgradienten in der Probe macht sich stärker bemerkbar und ist schwieriger zu kontrollieren, wenn sich die Zykluszeit für eine Probe verringert. Das Vorhandensein von ungleichen Temperaturen innerhalb einer Probe, und speziell das sich Verlassen auf das Mischen durch Konvektion in der Probe, auf das sich die Vorrichtungen aus dem Stand der Technik verlassen haben, verlängert im Allgemeinen die Zykluszeit für eine Probe und hat gerne schädliche Auswirkungen auf die biologische Probe. Das Gerät **100** ist dazu fähig, für ein derartiges Erwärmen und Kühlen zu sorgen, dass die Temperaturunterschiede in einer 10 µl Probe in einem Bereich nicht größer als ±1°C ist, während der gesamten Zeit der 30 Zyklen gehalten werden können.

**[0139]** Um für ein gleichmäßiges Erwärmen und Kühlen zu sorgen, ist es vorteilhaft, dass die dünnwandigen Kapillarröhrchen **108**, zumindest irgendwie, gleichweit von der Wärmequelle, beispielsweise der Lampe **112** in Gerät **110**, entfernt sind. **Fig. 8C** stellt schematisch eine Ansicht auf die Lampe **112** und die mehreren dünnwandigen Kapillarröhrchen **108**, wie sie in dem in den **Fig. 8A–B** dargestellten Gerät **100** angeordnet sind, dar.

**[0140]** In der in **Fig. 8C** dargestellten Anordnung, sind die dünnwandigen Kapillarröhrchen **108**, die am weitesten von der Lampe **112** entfernt sind (wie durch die Linie F angezeigt), vorteilhafterweise nicht mehr als im wesentlichen 40%, und noch vorteilhafterweise nicht mehr als im wesentlichen 25%, weiter von der Lampe **112** entfernt sind als den Abstand zwischen der Lampe **112** und den dünnwandigen Kapillarröhrchen **108**, die der Lampe **112** (angezeigt durch die Linie N) am nächsten sind. Beispielsweise kann der durch die Linie N angezeigte Abstand ungefähr 7,3 cm betragen, während der durch die Linie F angezeigte Abstand ungefähr 8,5 cm beträgt.

**[0141]** Es sollte klar sein, dass die Anordnung der dünnwandigen Kapillarröhrchen **108** anders sein kann, als in den Figuren dargestellt, beispielsweise kreis- oder halbkreisförmig. Außerdem ist klar, dass sich der Punkt, von dem der Abstand zwischen Wärme produzierendem Element und Probenbehältern gemessen wird, ändern kann, wenn sich die Art oder die Größe des Wärme produzierenden Elements ändert. Zum Beispiel kann das Wärme produzierende Element mehrere Lampen oder mehrere elektrische Widerstandselemente umfassen, die sich in Form und Größe unterscheiden. In einigen Ausführungsbeispielen kann es auch wichtig werden, den Abstand von der Kammerwand, an der die Probenbehälter angeordnet sind zu berücksichtigen. In dem dargestellten Beispiel dienen die Öffnungen **104** (vgl. **Fig. 8A**) als Vorrichtung zum Halten der Probenbehälter, es kann aber jeder andere Aufbau, der äquivalente Funktionen erfüllt, gemäß vorliegender Erfindung verwendet werden.

**[0142]** Das Gerät **100** kühlt zudem die in den Kapillarröhrchen **108** enthaltenen Proben sehr schnell und gleichmäßig. Um die Probenkammer **106** zu kühlen, wird Luft von außerhalb des Gehäuses durch ein unteres Gehäuseportal **114** mittels eines Ventilators **116** gezogen, wobei der Ventilator **114** mit einer von einem Motor **128** angetriebenen Motorwelle **122** verbunden ist. Da ein schnelles Kühlen der Probenkammer erstrebenswert

ist, ist es vorteilhaft, dass, wie in Kürze erläutert werden wird, die Kombination aus Motor **128** und Ventilator **116** ein ausreichendes Luftvolumen in die Probenkammer **106** blasen und dann die Luft innerhalb der Probenkammer **106** verteilen kann.

**[0143]** Die Verwendung von Luft als Wärme übertragendes Medium hat, im Gegensatz zu anderen Gasen oder Flüssigkeiten, den Vorteil, dass sie günstig, relativ leicht zu beschaffen, und einfach mischbar ist und keine Verunreinigung verursacht. Im Fall der beschriebenen Ausführungsbeispiele sorgt die große Oberfläche-zu-Volumen Verhältnis der die Probe enthaltenden Kapillarröhrchen für einen schnellen Wärmeübertrag, wobei Luft als Wärme übertragendes Medium verwendet wird.

**[0144]** Während des Kühlabschnitts des Temperaturzyklus, zieht die Betätigung des Ventilators **116** Luft mit Raumtemperatur in das Gehäuse **102**. Eine Lüftungsklappe **128**, die durch ein Scharnier **129** befestigt ist, ist vorgesehen. Die Lüftungsklappe **128** wird automatisch mit Hilfe eines Solenoids **132** geöffnet, so dass das Innere des Gehäuses **102** von dem oberen Gehäuseportal **130** abgeriegelt ist. In einigen Ausführungsbeispielen ist vorteilhafterweise das Solenoid **132** durch einen wohlbekannten Schrittmotor ersetzt. Die Verwendung eines Schrittmotors ermöglicht es, die Lüftungsklappe **128** genau und inkremental entsprechend den Anforderungen an das Wärmen oder Kühlen der Proben, zu öffnen und zu schließen. Die Fachleute sind fähig einen entsprechenden Steuermechanismus für den Gebrauch eines Schrittmotors abzuleiten, wie beispielsweise eine wohlbekannte SC-149 Schrittmotorsteuervorrichtung (erhältlich bei Alpha Products), wobei die hier dargelegten Informationen verwendet werden.

**[0145]** Bedingt durch die Anordnung des unteren Probenkammerportals **120**, des größeren Querschnittsbereichs und der Position des oberen Probenkammerportals **126**, wird die Luft mit Umgebungstemperatur in der Probenkammer **106** bewegt, darin verteilt und innerhalb der Kammer mit einem Flügel **124**, der mit der Motorwelle **122** verbunden ist, gemischt. Der Flügel **124** sollte sich mit einer relativ hohen Geschwindigkeit drehen, beispielsweise schnell genug, um Luftgeschwindigkeiten von vorzugsweise ungefähr 250 m/min, besser von ungefähr 500 m/min, und am besten von ungefähr 1000 m/min in der Probenkammer **106** zu erzeugen. Mit dem sich sehr schnell drehenden Flügel **124**, der ein Einzel- oder Mehrblattflügel sein kann, wird die Luft in die Probenkammer **106** bewegt, oder gezogen, und entlang des durch die gestrichelte Linie **136** gezeigten Wegs aus der Probenkammer **106** geblasen. Die Drehung des Flügels unterstützt außerdem die Vermischung der in die Probenkammer **106** geleiteten Luft und stellt den effizientesten Wärmeenergietransfer von der Fläche der dünnwandigen Kapillarröhrchen **108** an die durch die Probenkammer **106** geleitete Luft sicher. Es ist klar, dass auch andere Aufbauten, als die hier dargestellten, die äquivalenten Funktionen ausführen können.

**[0146]** Da das Solenoid **132** betätigt werden kann, um die Lüftungsklappe **128** zu öffnen, wird die gesamte in die Probenkammer **106** geleitete Luft mit Umgebungstemperatur durch das obere Probenkammerportal **126** und dann durch das obere Gehäuseportal **130** ausgestoßen, wobei sie die Wärme der Probenkammer **106** in die umgebende Atmosphäre trägt. Das schnelle Mischen der Luft, die durch die Probenkammer **106** durchströmt und sich in ihr verteilt, resultiert in einem schnellen und gleichmäßigen Kühlen der Proben.

## Beispiel 2

**[0147]** **Fig. 9A** zeigt die Ergebnisse von vier verschiedenen Temperatur-Zeit Profilen (A–D) und deren resultierende Vervielfältigungsprodukte nach 30 Zyklen (A–D). Die Profile A und B in **Fig. 9A** wurden durch die Verwendung einer heizblockartigen Vorrichtung gemäß dem Stand der Technik gewonnen, wobei die Mikrozentrifugenröhrchen aus dem Stand der Technik benutzt wurden. Wie in **Fig. 9A** zu sehen ist, sind die Übergänge zwischen den Temperaturen langsam, und viele nichtspezifische Bände sind in den Profilen A und B gegenwärtig. Profil B zeigt eine Verbesserung, da (im Gegensatz zu Profil A) einige nichtspezifische Banden dadurch eliminiert wurden, dass die Zeit, die jede Probe auf jeder Temperatur bleibt, limitiert wurde, wodurch wieder gezeigt wurde, dass kürzere Zeiten erstrebenswertere Resultate liefern.

**[0148]** Die Profile C und D wurden mittels des in den **Fig. 8A–B** gezeigten Geräts erzeugt. Wie in **Fig. 9A** zu sehen ist, ist die Vervielfältigung spezifisch und auch wenn die Ausbeute in Profil C (60 Sekunden Verlängerungszeit) maximal ist, ist sie auch noch, insgesamt betrachtete, annehmbar in Profil D (10 Sekunden Verlängerungszeit).

**[0149]** Die optimalen Zeiten und Temperaturen für ein 536 bp Fragment von  $\beta$ -Globin der menschlichen Genom – DNS wurden ebenfalls bestimmt. Die Vervielfältigungsausbeute und die Produktspezifität waren optimal, wenn die Denaturierung (93°C) und die Anlagerung (55°C) weniger als 1 Sekunde gedauert haben. Längere Denaturierungs- oder Anlagerungszeiten ergeben keine Vorteile. Die Ausbeute steigt mit längeren Ver-

längerungszeiten (77°C), aber es gibt wenig Veränderung bei längeren Verlängerungszeiten als 10 bis 20 Sekunden. Diese unerwarteten Ergebnisse zeigen, dass die bis jetzt zur Verfügung stehenden Vorrichtungen für die DNS Vervielfältigung die Bedingungen, die für eine Optimierung der physikalischen und enzymatischen Erfordernisse der Reaktion nötig sind, nicht maximiert wurden.

**[0150]** Weitere Information können erhalten werden aus: Wittwer, Carl T., Marshall, Bruce C., Reed, Gudrun B. und Cherry, Joshua L., "Rapid Cycle Allele-Specific Amplification with Cystic Fibrosis  $\Delta F_{50B}$  Locus", 39 Clinical Chemistry 804 (1993), und Wittwer, Carl T., Reed, Gudrun H., and Rire, Kirk M., "Rapid DNS Amplification", The Polymerase Chain Reaktion 174 (1994).

**[0151]** Aus der in **Fig. 9A** bereitgestellten Information kann gesehen werden, dass die darin angeordneten Proben einem schnellen zyklischen Temperaturwechsel unterzogen werden, wobei die Temperatur der Probe mit einer Geschwindigkeit, die vorzugsweise mindestens 0,5°C/sec groß ist, erhöht oder erniedrigt wird. Im Fall der vorliegenden Erfindung, die eine Polymerasekettenreaktion ausführt, wird die Temperaturänderung vorzugsweise in einem ungefähren Bereich von 30°C bis 50°C ausgeführt. Es ist vorteilhaft, dass der zyklische Temperaturwechsel schnell genug ausgeführt wird, um zumindest 30 Zyklen in 40 Minuten, oder noch vorteilhafter 30 Zyklen in 20 Minuten, oder am vorteilhaftesten 30 Zyklen in 10 Minuten zu komplettieren.

**[0152]** Das Gerät **100** erhöht oder erniedrigt vorteilhafterweise die Temperatur der Probe mit einer Geschwindigkeit von mindestens 1,0°C/sec, noch vorteilhafter mit einer Geschwindigkeit von mindestens 4,0°C/sec, und am vorteilhaftesten mit einer Geschwindigkeit von 10,0°C/sec. Problematischerweise muss die biologische Probe, und nicht nur das Umgebungsmedium und/oder der Probenbehälter, die spezifische Temperaturänderung ausführen. Die früher zur Verfügung stehenden Vorrichtungen, die zudem den Nachteil haben, dass sie nicht fähig sind, die Temperaturwechsel schnell durchzuführen, erkannten das Problem des schnellen und gleichmäßigen zyklischen Temperaturwechsels der Probe, und nicht nur des Temperaturwechsels des umgebenden Mediums und Behälters, nicht.

**[0153]** Unter Bezugnahme auf das Diagramm von **Fig. 9B** kann das Verfahren erstrebenswerterweise einen Temperaturzyklus mit einer Geschwindigkeit von mindestens 10°C/sec erreichen, noch vorteilhafter mit einer Geschwindigkeit von 20°C/sec, über einen Temperaturbereich von ungefähr 20°C, noch vorteilhafterweise über einen Temperaturbereich von ungefähr 30°C, und am vorteilhaftesten über einen Temperaturbereich von ungefähr 40°C. **Fig. 9B** zeigt die Temperatur der biologischen Probe in °C, nicht nur der Umgebungstemperatur oder des Behälters, während die biologische Probe dem Temperaturzyklus unterzogen wird. **Fig. 9B** zeigt eine PCR Probe, die bei 74°C beginnt und für 2 Sekunden auf die Denaturierungstemperatur, angezeigt durch D, von ungefähr 92°C erwärmt wird. Die Probe wird dann für 2 Sekunden auf eine Anlagerungstemperatur, angezeigt durch A, von ungefähr 55°C abgekühlt. Der Übergang zwischen der Denaturierungstemperatur und der Anlagerungstemperatur umfasst einen Bereich von 37°C in unter 4 Sekunden, was eine Geschwindigkeit von 10°C/sec darstellt. Die Probe wird dann für 5 Sekunden auf eine Verlängerungstemperatur von 74°C erwärmt, wie durch E in der **Fig. 9B** angezeigt ist. Das zyklische Durchlaufen der Proben von Denaturierungs-, Anlagerungs-, und Verlängerungstemperatur wird 30 mal oder so oft wie gewünscht wiederholt.

**[0154]** Die **Fig. 9C–G** zeigen Beispieldzyklen anderer bevorzugter Temperatur-Zeit Profile. Es ist für die Fachleute klar, dass die dargestellten Temperatur-Zeit Profile verändert werden können, um spezielle Prozesse auszuführen. Die Fachleute verstehen außerdem, dass die früher zur Verfügung stehenden Vorrichtungen und Verfahren, wie die Vorrichtung, die über einen Festkörper oder eine Flüssigkeit Wärme zu oder von der Probe leitet, die hier dargestellten resultierenden Temperatur-Zeit Profile nicht bereitstellen können. Darüber hinaus werden von den früher zur Verfügung stehenden Vorrichtungen und Verfahren die hier vorgestellten Temperatur-Zeit Profile weder vorgeschlagen noch gelehrt. Des weiteren ist verständlich, dass die früher zur Verfügung stehenden Vorrichtungen und Verfahren, die die Luft als Transfermedium verwenden, beispielsweise die früher zur Verfügung stehenden Chromatographieöfen, die hier beschriebenen Temperatur-Zeit Profile weder bereitstellen können, noch diese vorschlagen oder lehren.

**[0155]** Um die kürzeste Temperaturzykluszeit bereitzustellen, ist es vorteilhaft, dass die Lampe (mit **112** in den **Fig. 8A** und **8B** bezeichnet) eine Leistung von 2000 Watt aufweist, oder mehrere Lampen vorgesehen sind, die eine ähnliche Ausgangsleistung bereitstellen. Es ist außerdem bevorzugt, einen Temperaturgefälle-Steuerungsschaltkreis vorzusehen, der in **Fig. 10** in Verbindung mit einem A-Bus-Steuerungs-/Aufnahmesystem dargestellt ist, wobei ein 8052 micro controller board mit einer Uhr und einem Hochsprachen-Programm-Interpreter, erhältlich von Alpha Products (Modell Nr. SP-127), Darian, Connecticut, verwendet wird. Ein beispielhafter Programmcode, der in Verbindung mit dem beschriebenen Microcontroller verwendet wird, ist im Programmcode- anhang A beinhaltet. Der in Anhang A vorgestellte Programmcode ist eine BASIC52 Datei zum seriellen Her-

unterladen in einen Microcontroller und stellt eine beispielhafte Temperaturverlaufsteuerung während des Temperaturzyklus bereit. Die Verwendung einer 2000 Watt Wärme produzierenden Vorrichtung und die beschriebenen Steueraufbauten ermöglichen Temperaturzyklusgeschwindigkeiten von 20°C/sec, was erstrebenswerterweise erreicht wird.

**[0156]** Die bevorzugte Anordnung für den in der **Fig. 10** dargestellten Temperaturgefälle-Steuerschaltkreis wird erläutert werden, wobei klar ist, dass die nicht explizit in **Fig. 10** dargestellten zusätzlich nötigen Komponenten ohne Weiteres von den Fachleuten bereitgestellt werden können.

**[0157]** Der in **Fig. 10** dargestellte Temperaturgefälle-Steuerschaltkreis beinhaltet ein Thermoelement **200**, das, wie vorher beschrieben, an die Probentemperaturreaktion angepasst wurde. Das Thermoelement **200** ist mit einem integrierten Schaltkreis **206** verbunden, der vorteilhafterweise einer der bekannten aus dem Stand der Technik, wie beispielsweise ein AD595, ist, dessen Ausgang zu einem Tiefpassfilter vierten Ordnung **208** mit einer Grenzfrequenz von 100 Hz und zu einem 12 bit Analog/Digital Konverter **210**, dessen Ausgang dazu benutzt wird, eine digitale Darstellung der Temperatur bereitzustellen, führt.

**[0158]** Der Ausgang des Schaltkreises **206** ist außerdem zu einem Gefälle-Messschaltkreis geleitet. Der Gefälle-Messschaltkreis **212** beinhaltet vorzugsweise einen 353-Operationsverstärker **218**, ein 100 kΩ Potentiometer **214**, ein 1 MΩ Potentiometer **230** und einen 22 µF Kondensator. Der Gefälle-Messschaltkreis **212** gibt ein Signal an den invertierenden Eingang eines 353-Operationsverstärkers **246** aus.

**[0159]** Ein Gefälle-Festlegeschaltkreis **222** beinhaltet einen Digital/Analog Konverter **226** zum Festlegen eines positiven Gefälles und einen Digital/Analog Konverter **224** zum Festlegen eines negativen Gefälles. Die Digital/Analog Konverter **224** und **226** sind vorzugsweise 8-bit Digital/Analog Konverter, die im Stand der Technik mit DA147 bezeichnet werden. Der Gefälle-Festlegeschaltkreis kann vorzugsweise Anweisungen von anderen digitalen Vorrichtungen (nicht in **Fig. 19** dargestellt), wie beispielsweise einem PC empfangen. Die Ausgabe des Gefälle-Festlegeschaltkreises **228** ist mit einem Summier-Schaltkreis **240** verbunden.

**[0160]** Der Summier-Schaltkreis **240** beinhaltet vorzugsweise 100 kΩ Widerstände **236**, **238** und **244** und einen 353-Operationsverstärker **242**. Die Ausgabe des Summier-Schaltkreises **240** wird in den nicht-invertierenden Eingang des Operationsverstärkers **246** geleitet und stellt das Sollgefälle für die Temperaturänderung dar. Die Ausgabe des Operationsverstärkers **246** wird an einem Transistor **248** bereitgestellt, der einen Energie-An/Ausschalt-Schaltkreis **262** umfasst.

**[0161]** Der Energie-An/Ausschalt-Schaltkreis **262** beinhaltet ein 5 VDC Netzteil, das einen Strom an dem Transistor **248** bereitstellt. Der Transistor **248** weist einen mit einem 3010-Schaltkreis **254** mit Hilfe eines Widerstands **252**, vorzugsweise einem 300 Ω Widerstand, verbundenen Emitter auf. Der 3010-Schaltkreis **254** beinhaltet einen Ausgang, der in Reihe mit einem Widerstand **256**, der vorzugsweise ein 180 Ω Widerstand ist, verbunden ist. Ein Zweiwegethyristor **258** wird vorzugsweise dazu benutzt, den der Lampe **262**, oder einer anderen Wärme produzierenden Vorrichtung, von einer Gleichstromquelle **260** gelieferten Strom zu steuern.

**[0162]** Der in **Fig. 10** dargestellte Temperaturgefälle-Steuerschaltkreis, gemeinsam mit den anderen beschriebenen Systemkomponenten, stellt einen zyklischen Temperaturwechsel von biologische Proben von 20°C/sec über einen Temperaturbereich von 30°C, und noch vorteilhafter über einen Bereich von 40°C, bereit, wobei die Homogenität über die gesamte biologische Probe aufrechterhalten wird.

**[0163]** Wie vorher gezeigt, und im Gegensatz zu den Lehren des Stands der Technik, kann die Polymerasekettenreaktion schnell durchgeführt werden. Mit Hilfe der hierin beschriebenen Verfahren und Geräten kann die nötige Anzahl der Temperaturzyklen in weniger Zeit durchgeführt werden, beispielsweise in 15 Minuten, als mit den Vorrichtungen aus dem Stand der Technik möglich ist. Durch Minimierung der Denaturierungs- und Anlagerungszeiten werden zudem die Spezifität und Ausbeute der schnell zyklisch durchlaufenden Vervielfältigung in einem bisher nicht möglichen Maß verbessert. Darüber hinaus, zusätzlich zu der vereinfachten schnellen Wärmeübertragung, ermöglicht, gemäß der vorliegenden Erfindung, die Verwendung von optisch klaren Probenbehältern, wie beispielsweise klaren Kapillarröhrchen, eine kontinuierliche Fluoreszenzüberwachung der DNS Vervielfältigung.

**[0164]** **Fig. 10A** zeigt graphisch die Auswirkung der Temperaturübergangsgeschwindigkeiten auf die PCR Spezifität und die Ausbeute, wobei ein Vergleichsgerät verwendet wurde. Die Ergebnis aus **Fig. 10A** wurden mit Hilfe eines 536 bp Fragments des β-Globin Gens erhalten, das aus 50 ng der menschlichen Genom-DNS mit 50 mM Tris, pH 8,3, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 µg/ml Serumalbumin vom Rind, 0,5 µM von jedem Primer, 0,2 mM von

jeder dNTP, und 0,4 U native Taq DNS Polymerase in einer 10  $\mu$ l Reaktionsflüssigkeit. Die menschlichen  $\beta$ -Globin Primer RS42 und KM 29 (536 Basenpaare) werden beschrieben in: C T. Wittwer, G. C. Fillmore and D. R. Hillyard "Automated Polymerase Chain Reaktion in Capillar Tubes with Hot Air" Nucl. Acid Res. 17: 4353–4357. Die Temperaturzyklusparameter waren 94°C für 0 Sekunden, 55°C für 0 Sekunden, und 72°C für 10 Sekunden. 35 Vervielfältigungszyklen wurden mit den angegebenen Geschwindigkeiten zwischen allen Temperaturen durchgeführt. Die Proben wurden danach einer Elektrophorese auf einem 1,5%-igen Agarosegel unterzogen und mit 0,5  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid eingefärbt. Spezifität und Ausbeute verringerten sich, wenn sich die Temperaturübergangsgeschwindigkeiten verringerten.

**[0165]** Fluoreszenzsonden können verwendet werden, um die DNS Vervielfältigung zu detektieren und zu überwachen. Wie den Fachleuten bekannt ist, beinhalten nützliche Sonden Doppelstrang-DNS-spezifische Farbstoffe und Sequenz-spezifische Sonden. Mit dem interkalierten Ethidiumbromid steigt die UV-angeregte rote Fluoreszenz nach der Vervielfältigung an. Während Mikrozentrifugenröhrchen als Probenbehälter für die DNS Vervielfältigung verwendet wurden, wurden in den hier beschriebenen Verfahren und Geräten vorteilhaftweise Probenbehälter mit vielen Struktureigenschaften benutzt, die hier als Kapillarröhrchen bezeichnet werden.

**[0166]** Die Verwendung der hier beschriebenen Probenbehälter ermöglicht die Fluoreszenzdetektion während die Probe in dem Behälter enthalten ist, wie in Kürze vollständiger erklärt werden wird. Für die Fachleute ist klar, dass mehrere unterschiedliche Arten der Fluoreszenzdetektion der DNS Vervielfältigung, die zum jetzigen Zeitpunkt zur Verfügung stehen, verwendbar sind. Beispielsweise ist ohne weiteres eine Sequenz-spezifische Fluoreszenzdetektion möglich, wobei die vorliegende Erfindung und oligonukleotide Hybridisierungs-sonden verwendet werden. Als weiteres Beispiel können die dual-markierte Fluorescein/Rhodamin Sonden während der Polymeraseverlängerung durch die 5'-exonuklease Aktivität geschnitten werden, wobei die Fluorophore separiert werden und die Fluorescein/Rhodamin Fluoreszenzrate ansteigt.

**[0167]** Beim Verwenden der im Folgenden beschriebenen Ausführungsbeispielen der vorliegenden Erfindung kann die Fluoreszenz nachdem der Temperaturzyklus komplettiert ist, einmal pro Zyklus als eine Überwachung der Produktakkumulation, zwei- oder mehrmals während eines Temperaturübergangs, oder kontinuierlich in jedem Zyklus gemessen werden. Im Gegensatz zu der vorliegenden Erfindung durchlaufen die früher zur Verfügung stehenden Verfahren den Zyklus relativ langsam und lehrten weder die Aufnahme noch die Analyse von Fluoreszenz während der Temperaturänderungen.

**[0168]** Die vorliegende Erfindung erlaubt eine Zyklus-für-Zyklus Überwachung der Vervielfältigung der Kopienzahl der Anfangsvorlage. Um eine solche Zyklus-für-Zyklus Überwachung auszuführen, wird die Fluoreszenz während der Verlängerungs- oder der kombinierten Verlängerungs-/Anlagerungsphase in jedem Zyklus aufgenommen und mit der Produktkonzentration in Relation gesetzt. Beispielsweise ist eine quantitative Reihenuntersuchung der Hepatitis C RNA unter Verwendung des interkalierenden YO-PRO-1<sup>TM</sup> im Stand der Technik bekannt und kann in Verbindung mit vorliegender Erfindung verwendet werden. Für weitere Information vgl.: Ishiguro, T., J. Saitch, H. Yawata, H. Yamagishi, S. Iwasaki, and Y. Mitoma, 1995, "Homogenous quantitative assay of hepatitis C virus RNA by polymerase chain reaction in the presence of a fluorescent intercalator", Anal. Biochem. 229: 207–213. Vor der vorliegenden Erfindung wurde eine kontinuierliche Fluoreszenzüberwachung in jedem Zyklus während den Temperaturübergängen nicht versucht.

**[0169]** Ein schneller zyklischer Temperaturwechsler mit integrierter 2-Farben-Fluoreszenzoptik kann verwendet werden, um eine kontinuierliche Fluoreszenzüberwachung bereitzustellen. Wie im Folgenden vollständiger diskutiert werden wird, werden unterschiedliche vorteilhafte Fluoreszenztechniken zum Überwachen der DNS Vervielfältigung hier als spezielle Beispiele zum Ausführen dieses erfindungsgemäßen Aspekts bereitgestellt. Die Fachleute sind mit der Verwendung von Ethidiumbromid in den Fluoreszenztechniken vertraut. In einem weiter unten beschriebenen Beispiel, wird bevorzugt SYBR<sup>®</sup> Green I, das im Stand der Technik wohlbekannt ist und von Molecular Probes, Eugene, Oregon, bezogen werden kann, als Doppelstrang – spezifischer Farbstoff verwendet.

**[0170]** In einem Beispiel werden Zeit, Temperatur, und Fluoreszenz alle 200 ms während der Vervielfältigungsreaktion aufgenommen. Beim regelmäßigen Aufnehmen der Daten während der Reaktion, deckt die Datenaufnahme feine Details der Produktdenaturierung, -wiederanlagerung, und -verlängerung auf, die mit früher zur Verfügung stehenden Geräten und Verfahren nicht zugänglich waren.

**[0171]** Wie von den Fachleuten verstanden werden wird, ist die einmal-pro-Zyklus Überwachung von mehreren Proben, die einer DNS Vervielfältigung unterzogen werden, ein leistungsfähiges quantitatives Werkzeug.

Wichtigerweise kann, wie sich durch das Verständnis dieser Offenlegung zeigt, die kontinuierliche Überwachung in einem Zyklus die Natur der Sondenfluoreszenz identifizieren, wodurch Einblicke in die DNS Vervielfältigungsmechanik, die früher im Stand der Technik nicht zur Verfügung standen, Zugang zu PCR Produkten, und Sondenschmelzkurven bereitgestellt werden, um die Vervielfältigungsprodukte und Mutationen zu identifizieren.

**[0172]** Unter Bezugnahme auf die **Fig. 11** ist eine schematische Ansicht eines vorteilhaften Temperaturwechsels mit Fluoreszenzdetektion, der im allgemeinen mit dem Bezugszeichen **300** versehen ist, bereitgestellt. Eine Heißluftgebläsequelle **302** ist vorzugsweise vorgesehen. Die Heißluftgebläsequelle **302** ist vorzugsweise eine kommerziell erhältliche Vorrichtung mit einer 1600 W Heizwendel und einem Ventilator. Eine Kaltluftgebläsequelle **304** ist ebenfalls vorteilhafterweise vorgesehen. Die Kaltluftgebläsequelle **304** ist vorzugsweise ein Spaltpolgebläse mit 2200 Umdrehungen/min, das von Dayton, Niles, Illinois, Modell Nr. 40006B, bezogen werden kann. Es ist vorteilhaft, dass die Kaltluftgebläsequelle **304** Luft mit Raumtemperatur bereitstellt, aber es liegt auch im Schutzbereich der Erfindung, dass eine Vorrichtung verwendet wird, die ein Fluid bereitstellt, das eine niedrigere Temperatur als die Raumlufttemperatur aufweist.

**[0173]** In dem Ausführungsbeispiel von **Fig. 11** verbinden Kanäle **306** und **308** die Heißluftgebläsequelle **302** bzw. die Kaltluftgebläsequelle **304** mit der Probenkammer **310**. Die Kanäle **306** und **308** sind vorzugsweise gefirbelte schwarze Nylonröhren mit einem Durchmesser von 2,5 cm. Der Kanal **306** ist über den Anschluss **306A** mit der Probenkammer **310** verbunden und der Kanal **308** ist über den Anschluss **308A** mit der Probenkammer **310** verbunden. Ein Belüftungs- (**312**) und ein Ausstoß- (**314**) Ventilator dienen dazu, Luft aus der Probenkammer **310** zu bewegen. Darüber hinaus ist eine Vorrichtung zum Abschotten des Inneren der Probenkammer **310** vom Umgebungslicht integral mit der Probenkammer **310** vorgesehen.

**[0174]** Die Temperatur der Proben in der Probenkammer **310** wird vorzugsweise von einem röhrenförmigen, Metall ummantelten Thermoelement, das von Idaho Technology, Idaho Falls, Idaho, Modell Nr. 1844, bezogen werden kann, überwacht, das an die Temperaturreaktion der in den vorteilhaften Probenbehältern, beispielsweise den Kapillarröhrchen, enthaltenen Proben angepasst ist. Wichtig ist, dass die Temperaturhomogenität in der Probenkammer **310** durch das Vermischen der Luft in der Probenkammer **310** erreicht wird. Es ist vorteilhaft, dass ein solches Mischen der Luft in der Probenkammer **310** durch einen zentralen Probenkammer-ventilator **318** durchgeführt wird. Der Probenkammerventilator **318** beinhaltet vorzugsweise einen 1,7 × 11 cm großen Ventilatorflügel, der bei Idaho Technology, Modell Nr. 1862, erhältlich ist, und einen Motor, der auch bei Idaho Technology, Modell Nr. 1861, erhältlich ist, und erzeugt eine Luftgeschwindigkeit von mindestens 800 bis 1000 m/min in der Probenkammer **310**. Solche schnellen Luftgeschwindigkeiten müssen nicht in allen Anwendungsbereichen der vorliegenden Erfindung nötig sein, aber schnelle Luftgeschwindigkeiten fördern ein intensives Mischen und die Temperaturhomogenität in der Probenkammer **310**.

**[0175]** In der Probenkammer **310** sind mehrere Proben in Kapillarröhrchen enthalten, von denen einige mit **320** bezeichnet sind, und in vertikaler Ausrichtung in einem drehbaren Karussell **322** platziert sind. Das Karussell **322** hat vorzugsweise 14 cm im Durchmesser und wird durch einen Schrittmotor, der durch ein Mikroschritt-antriebsmodul **326** gesteuert wird, mit 400 Schritt pro Umdrehung gedreht. Der Schrittmotor **324** ist vorzugsweise einer, der von New England Affiliated Technologies, Lawrence, Massachusetts, unter der Modell Nr. 2198364 bezogen werden kann, und das Mikroschrittantriebsmodul **326** ist vorzugsweise eines, das ebenfalls von New England Affiliated Technologies, Lawrence, Massachusetts, unter der Modell Nr. MDM7 micro stepping drive module bezogen werden kann, das 12.800 Schritte pro Rotation des Karussells **322** bereitstellt.

**[0176]** Immer noch unter Bezugnahme auf die **Fig. 11**, wird eine Fluoreszenz-Anregungsquelle **328** bereitgestellt. Eine bevorzugte Anordnung für den Anregungsweg wird jetzt beschrieben werden, wobei eine bevorzugte Anordnung für den erfindungsgemäßen Auffangweg danach beschrieben werden wird. Die Fluoreszenz-Anregungsquelle **328** beinhaltet vorteilhafterweise eine 75 W Xenon Lichtbogenquelle **328A**, die mit einem elliptischen Reflektor **328B** fokussiert wird. Die Xenon Lichtbogenquelle **328** mit einem f/2,5 elliptischen Reflektor **328B** ist vorzugsweise bei Photon Technology International, South Brunswick, New Jersey, unter der Modell Nr. A1010 erhältlich. Das Energienetzteil und andere erforderliche Komponenten, um die Fluoreszenz-Anregungsquelle **328** zu betreiben, sind im Stand der Technik wohlbekannt. Alternativ kann eine lichtemittierende Diode als Fluoreszenz-Anregungsquelle verwendet werden. Die Fachleute werden verstehen, dass viele verschiedene Anregungsquellen im Rahmen des Schutzbereichs der vorliegenden Erfindung verwendet werden können.

**[0177]** Die Strahlung, die von der Fluoreszenz-Anregungsquelle **328** emittiert wird, wird mit einer justierbaren Iris **334**, wie beispielsweise in der Industrie bei Rolyn, Covina, Californien, Modell Nr. 75.0125 erhältlich ist, auf ungefähr 2 mm fokussiert. Das von der Fluoreszenz-Anregungsquelle **328** emittierte Licht fällt auf einen kalten

Spiegel **330**, der vorzugsweise bei Rolyn unter der Modell Nr. 60.440 erhältlich ist, und führt dann durch ein Wärme absorbierendes Glas **332**, das vorzugsweise auch eines von Rolyn unter der Modell Nr. 65.3130 erhältliches ist. Nach der Kollimation durch eine plankonvexe Linse **336**, die vorzugsweise bei Rolyn unter der Modell Nr. 10.0260 erhältlich ist, einen 450–490 nm Bandpass-Interferenzfilter **338**, der vorzugsweise bei Omega Optical, Brattleboro, Vermont unter der Modell Nr. 470RDF40 erhältlich ist, eine fokussierende plankonvexe Linse **340**, die vorzugsweise bei Rolyn unter der Modell Nr. 10.0260 erhältlich ist, und ein 1 mm Siliziumdioxidfenster **342**, um eine Kondensation auf den gerade beschriebenen optischen Komponenten während des Temperaturwechsels zu verhindern, wird ein 5–7 mm großer Bereich eines der Kapillarröhrchen **320A** illuminiert, wobei der beschriebenen Anregungsweg benutzt wird.

**[0178]** Unter weiterer Bezugnahme auf die **Fig. 11** wird als nächstes der Auffangweg zum Auffangen der von der Probe **320A** emittierten Fluoreszenz beschrieben. Die Optik des Auffangwegs beinhaltet ein 1 mm dickes Fenster aus Siliziumdioxid, das in dem optischen Weg angeordnet ist, um die Kondensation auf den anderen optischen Komponenten zu verhindern. Zwei einander gegenüberliegende asphärische Linsen **346A** und **B**, die vorzugsweise bei Rolyn unter der Modell Nr. 17.1175 erhältlich sind, dienen dazu, die emittierte Fluoreszenz auf einen 2 × 10 mm großen Spalt **348** zu fokussieren. Der Spalt **348** kann vorzugsweise durch das Schneiden eines ausgestellten Röntgenstrahlenfilms hergestellt werden und der Spalt **348** dient als räumlicher Filter. Nach dem Spalt **348** (der als räumlicher Filter wirkt) wird die emittierte Fluoreszenz auf eine elektronische 35 mm Blende **350** geführt, die mittels einer elektronischen Blendensteuervorrichtung **352** betätigt wird. Die elektronische 35 mm Blende ist vorzugsweise ein Uniblitz Blendenmodell Nr. VS35 und die elektronische Blendensteuervorrichtung **352** ist vorzugsweise ein Treiber mit der Modell Nr. D122, die beide von Vincent Associates, Rochester, New York, bezogen werden können, Darüber hinaus ist auch eine asphärische Sammellinse **354**, die vorzugsweise bei Rolyn unter der Modell Nr. 17.1175 erhältlich ist, vorgesehen.

**[0179]** Ein Filter **356** ist auch dann beinhaltet, wenn eine Detektion einer Emission von SYBR® Green I gewünscht ist. Der Filter **256** ist vorzugsweise ein 520–580 nm Bandpassfilter, der bei Omega unter der Modell Nr. 550RDF60 erhältlich ist, der vorzugsweise für eine Aufnahme einer einzelnen Wellenlänge verwendet wird. Für die Detektion anderer Emissionen, kann beispielsweise eine Kombination eines dichroitischen Filters **358** und der Wellenlängenfilter **358A** und **358B** verwendet werden. Zum Beispiel besteht der dichroitische Filter **358** für die Separation der Fluorescein- und Rhodamin-Emission aus einem 560 nm dichroitischen Filter, der vorzugsweise von Omega unter der Modell Nr. 560 DRLP erhältlich ist, einem 520–550 nm Bandpassfilter (**358A**) für die Detektion von Fluorescein, der von Omega unter der Modell Nr. 535DF30 erhältlich ist, und einem 580–620 nm Bandpassfilter (**358B**) für die Detektion von Rhodamin, der von Omega unter der Modell Nr. 600DF40 erhältlich ist. Für die Separation von Fluorescein- und Cy5™-Emissionen ist der dichroitische Filter **358** vorzugsweise ein 590 nm dichroitischer Filter, der von Omega unter der Modell Nr. 590 DRLP erhältlich ist, und die Filter **358A** und **B** bestehen vorzugsweise aus einem 520–550 nm Bandpassfilter (**358A**) für die Detektion von Fluorescein, der von Omega unter der Modell Nr. 535DF30 erhältlich ist, und einem 660–680 nm Bandpassfilter (**358B**) für die Detektion von Cy5™, der von Omega unter der Modell Nr. 670DF20 erhältlich ist. Den Fachleuten erschließt sich problemlos, dass die Verwendung anderer Komponenten einfach implementiert werden kann, wobei die hier dargelegten Informationen benutzt werden können, um andere Fluoreszenzwellenlängen aufzufangen.

**[0180]** Immer noch wird auf die **Fig. 11** Bezug genommen, wobei die emittierte Fluoreszenz, nachdem sie den Filtern **358A** und **358B** unterzogen wurde, durch zwei plankonvexe Linsen **360A** und **360B**, die vorzugsweise bei Edmund, Barrington, New Jersey, unter der Modell Nr. 32970 erhältlich sind, auf zwei Photomultiplierröhren **362A** bzw. **362B** fokussiert wird. Die Photomultiplierröhren ("PMT") **362A** und **362B** sind vorzugsweise bei Hamamatsu, Middlesex, New Jersey, unter der Modell Nr. R928 erhältlich, und sind jeweils von einem geeigneten Gehäuse mit einer entsprechenden Schaltkreistechnik mit analogen Aufnahmefähigkeiten umschlossen, das vorzugsweise von Photon Technology International unter der Modell Nr. 714 erhältlich ist. Ein PMT- und Daten-Aufnahmesteuermodul **364** ist außerdem vorteilhafterweise vorgesehen. Manuelle aus dem Stand der Technik bekannte PMT Blenden **366A** und **366B** sind zusätzlich vorgesehen.

**[0181]** Die im Vorhergehenden beschriebenen optischen Komponenten sind vorzugsweise 5 cm im Durchmesser und in einer fünf Zentimeter universellen Linsenbefestigung angebracht, wie der die unter der Modell Nr. 90.0190 von Rolyn erhältlich ist. Wie von den Fachleuten ausgeführt werden kann, können viele der nötigen Konstruktionskomponenten aus schwarzem Delrin™ mit den in der Industrie bekannten Techniken hergestellt werden.

**[0182]** Für die Fachleute ist klar, dass der schnelle zyklische Temperaturwechsler mit Fluoreszenzdetektion **300** vorteilhafterweise auch mit lichtemittierenden Dioden (LEDs) und Photodioden statt der in **Fig. 11** darge-

stellten ähnlich funktionierenden Komponenten aufgebaut werden kann. Demnach kann die Funktion der Fluoreszenz-Anregungsquelle **328** von einer lichtemittierenden Diode übernommen werden. Die Photomultiplierröhren **362A** und **362B** können durch Photodioden ersetzt werden. Zusätzliche Informationen bezüglich geeigneter lichtemittierender Dioden und Photodioden werden später hier bereitgestellt. Es ist klar, dass die Sensitivität der Technik durch die Hintergrundfluoreszenz begrenzt ist, wovon die meiste von den Sonden und nicht von dem Detektionssystem kommt. Kennzeichnenderweise ist die Stabilität aber im allgemeinen wichtiger als die absolute Sensitivität.

**[0183]** Den Fachleuten ist klar, dass der in **Fig. 11** dargestellte schnelle zyklische Temperaturwechsler mit Fluoreszenzdetektion **300** die zuträglichen Eigenschaften einer Fluorometervorrichtung mit schneller Temperaturwechselsteuerung beinhaltet, eine Kombination die nirgends im Stand der Technik vorgeschlagen oder gelehrt wird. Die PCR kann innerhalb der 10 bis 20 Minuten des Temperaturzyklus durchgeführt und analysiert werden. Die vorliegende erfindungsgemäße Kombination aus 1) Fluoreszenzüberwachung innerhalb jedes Temperaturzyklus und 2) Analyse der Temperatur- und Zeitabhängigkeit der Hybridisierung stellt Vorteile bereit, die anderweitig nicht erhältbar wären.

**[0184]** Vorliegende Erfindung ermöglicht außerdem Einzel-Farb-Fluoreszenz-Verfahren, um die Produktreinheit zu überwachen und die Vorlagen während der PCR mengenmäßig zu bestimmen. Farbstoffe, die den DNS-Strangzustand überwachen, werden zu den PCR Reaktionen für die Überwachung während des Temperaturwechsels dazu gegeben, wobei die erfindungsgemäßen Ausführungsbeispiele benutzt werden.

**[0185]** Um einige der Vorteile, die mit der vorliegenden Erfindung einhergehen, zu erläutern, werden nun bestimmte Beispiele, bei denen das in der **Fig. 11** dargestellte Gerät verwendet wurde, vorgestellt. Die DNS Vervielfältigung wurde, wenn nicht in den folgenden Beispielen anders angegeben, in 50 mM Tris, pH 8,3 (25°C), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 µg/ml Serumalbumin vom Rind, 0,5 µM von jedem Primer, 0,2 mM von jedem Deoxynukleotid Triphosphat und 0,2 U Taq Polymerase pro 5 µl Probe durchgeführt. Zudem wurde in den folgenden Beispielen als DNS Vorlage die menschliche Genom-DNS (denaturiert bei 1 min Kochen) oder ein gereinigtes Vervielfältigungsprodukt verwendet. Das gereinigte Vervielfältigungsprodukt wurde durch Phenol/Chloroform Extraktion und Ethanol Ausfällung (siehe D. M. Wallace 1987, Large- and small-scale Phenol extraction and precipitation of nucleic acids und beschrieben auf den Seiten 33–48 bei S. L. Berger und A. R. Kimmel (Hrsg.), Guide to Molecular Cloning Techniques (Methods in Enzymology, Vol. 152), Academic Press, Orlando), gefolgt von der Entfernung der Primer durch wiederholtes Auswaschen durch einen Centricon 30 Mikro Konzentrator (erhältlich bei Amicon, Danvers, Massachusetts) erhalten. Die Vorlagenkonzentration wurde durch die Absorption bei 260 nm bestimmt. Das A<sub>260</sub>/A<sub>290</sub> Verhältnis der Vorlagen war größer als 1,7.

**[0186]** In diesen Beispielen wurden die Primer durch die aus dem Stand der Technik bekannte Standard-Phosphoramidit-Chemie synthetisiert, wobei der Pharmacia Biotech Gene Assembler Plus (Piscataway, New Jersey) verwendet wurde. Das 180 Basenpaar Fragment des Hepatitis B Oberflächen Antigen Gens wurde mittels der Primer 5'-CGTGGTGGACTTCTCTCAAT-3' (Sequenz ID Nr. 1) und 5'-AGAAGATGAGGCATAG-CAGC-3' (Sequenz ID Nr. 2) (Genbank Sequenz HVHEPB) vervielfältigt. Der SYBR® Green I Farbstoff wurde von Molecular Probes (Eugene, Oregon) bezogen. Die β-Aktin Primer und die Fluorescein/Rhodamin Dualsonden wurden von Perkin Elmer (Foster City, Californien) (Nr. N808-0230) bezogen. Die menschlichen β-Globin Primer RS42/KM29 (536 Basenpaare) und PC03/PC04 (110 Basenpaare) sind beschrieben in: C. T. Wittwer, G. C. Fillmore, and D. R. Hillyard, "Automated Polymerase Chain Reaktion in Capillary Tubes with Hot Air", Nucl. Acids Res. 17: 4353–4357. Die einzel-markierten Sonden 5'-CAACAGACACCATGGTGCACCTGACTCCTGAGGA-Fluorescein-3' (Sequenz ID Nr. 3) und 5'-Cy5™-AAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAG-Phosphat-3' (Sequenz ID 4) wurden mittels eines Fluorescein-Phosphoramidit (erhältlich bei Glen Research, Sterling, Virginia, Nr. 10-1963), einem Cy5™-Phosphoramidit (erhältlich bei Pharmacia Nr. 27-1801-02), und einem chemischen Phosphorilierungsreagent (erhältlich bei Glen Research, Nr. 10-1900) synthetisiert. Die angrenzenden Sonden hybridisieren intern an dem PC03/PC04 β-Globin Primerpaar auf dem gleichen DNS Strang und sind durch ein Basenpaar getrennt. Die Sonden wurden durch umgekehrte C-18 Phase Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie gereinigt, und ihre Homogenität wurde durch Polyacrylamid-Elektrophorese und Absorption (A<sub>260</sub> und die Absorptionsmaxima der Fluorophore) überprüft. Die Hybridisierungssonden (β-Aktin und β-Globin) wurden jeweils mit 0,2 mM verwendet.

**[0187]** In den relevanten, hier beschriebenen Beispielen, werden Vervielfältigungsproben mit 5 µl in Kapillarröhrchen, von denen einige in der **Fig. 11** durch das Bezugszeichen **320** dargestellt sind, gefüllt. Die bevorzugten Kapillarröhrchen sind solche, die bei Idaho Technology, unter der Modell Nr. 1705 erhältlich sind, mit einer Abmessung von 1,02 mm im Außendurchmesser und 0,56 mm im Innendurchmesser. Einmal gefüllt werden

die Kapillarröhrchen durch eine Butanflamme versiegelt. Die Oberfläche des Kapillarröhrchens wurde mit optischem Qualitätsmethanol gereinigt, bevor es in das Karussell **322** des schnellen zyklischen Temperaturwechsler mit Fluoreszenzdetektion **300** geladen wurde.

**[0188]** Die Steuerung der in der **Fig. 11** dargestellten Komponenten wurde mit Hilfe einer graphischen Programmiersprache, die als LabView bekannt ist (erhältlich bei National Instruments, Austin, Texas), und einer 12-bit Multifunktions-Eingangs/Ausgangs-Karte **368A** (erhältlich bei National Instruments unter der Bezeichnung AT-MIO-E2) in einem PC kompatiblen Computer **368**, der einen Intel® 80486 Mikroprozessor mit einer Taktfrequenz von 120 MHz verwendet, ermöglicht. Die Analogausgangskanäle der Eingangs-/Ausgangs-Karte **368A** wurden dazu verwendet, die Sensitivität, d. h. die PMT Spannung, jeder Photomultiplieröhre **362A** bzw. **362B** zu steuern. Die analogen Eingangskanäle auf der Eingangs-/Ausgangs-Karte **368A** empfangen die Signale von der jeweiligen Photomultiplieröhre **362A** bzw. **362B**. Der PC kompatible Computer **368** steuert durch die Eingangs-/Ausgangs-Karte **368A** die Position, die Geschwindigkeit und die Richtung der Bewegung des Karussells **322**. Zum Beispiel positioniert das Karussell **322**, wenn viele Kapillarröhrchen aufgenommen sind, jedes Kapillarröhrchen schnell nacheinander für eine 10–100 ms dauernden Aufnahmezeitspanne an einer Überwachungsposition (die Position ist durch das Kapillarröhrchen **320A** gekennzeichnet). Für ein kontinuierliches Überwachen eines einzelnen Kapillarröhrchens, verbleibt das Kapillarröhrchen an der Überwachungsposition, während vorzugsweise alle 200 ms Daten aufgenommen werden, aus denen nach bekannten Verfahren der Durchschnitt gebildet wird. Die Zeit, die Temperatur und vorzugsweise zwei Fluoreszenzkanäle werden kontinuierlich als Fluoreszenz-gegen-Zykluszahl und Fluoreszenz-gegen-Temperatur Diagramme auf einem Monitor **368B** dargestellt, der mit dem Computer **368** verbunden ist.

**[0189]** Das Karussell **322** sollte dort positioniert werden, wo die maximale Fluoreszenz und die Signale aufgenommen werden. Wenn ein einziges Kapillarröhrchen, wie beispielsweise das Kapillarröhrchen **320A** überwacht wird, werden die Signale alle 200 ms aufgenommen, wobei eine Integrationszeitkonstante an der Photomultiplieröhre **362A** oder **362B**, oder an beiden, auf 50 ms gesetzt wird. Für mehrere Probenröhrchen wird die Zeitkonstante auf 0,5 ms gesetzt und das Karussell wird einmal gedreht, um an der genauen Position angeordnet zu sein, wo jedes Kapillarröhrchen **320** an jedem der beiden Kanäle die maximale Fluoreszenz bereitstellt. Nachdem das Kapillarröhrchen **320A** an der Position mit der maximalen Fluoreszenz positioniert ist, wird die Sensitivität jeder Photomultiplieröhre **362A** und **362B** justiert und das Karussell wieder gedreht, um die Position aller Kapillarröhrchen **320** in dem Karussell **322** zu zählen und zu lokalisieren. Wenn nur eine Signalfloreszenzaufnahme einmal pro jedem Vervielfältigungszyklus während der Verlängerung gewünscht ist, wird jedes Kapillarröhrchen **320** auf dem Karussell nacheinander an der Überwachungsposition für 100 ms positioniert. Die kontinuierliche Aufnahme bei mehreren Röhrchen kann auch durch ein kontinuierliches Drehen des Karussells **322** erreicht werden. Die Temperatursteuerprogrammierung ist basiert auf und modifiziert von einem kommerziell erhältlichen schnellen zyklischen Temperaturwechsler, der von Idaho Technology unter dem Markennamen Rapidcycler™ bezogen werden kann, mit einem 8051 cross compiler, der von Sytronics, Salt lake City, Utah unter der Bezeichnung BCI151 erhältlich ist, und einem Dallas Development System (ebenfalls bei Sytronics unter der Bezeichnung DPB2 erhältlich).

**[0190]** In der Praxis ist die Temperaturreaktion des schnellen zyklischen Temperaturwechsler mit Fluoreszenzdetektion **300** ähnlich zu der Reaktion des in den **Fig. 8A** und **8B** dargestellten Geräts, wobei 20–30 Sekundenzyklen (30 Zyklen in 10–15 Minuten) ermöglicht werden, wie in dem Temperatur-gegen-Zeit Diagramm von **Fig. 11A** gezeigt ist (welches einige Zyklen eines bevorzugten Temperaturprofils zeigt). Wenn ein Doppelstrang-spezifischer Fluoreszenzfarbstoff während der Vervielfältigung vorhanden ist, erhöht sich die Fluoreszenz im allgemeinen, wenn mehr von dem Doppelstrang-Produkt hergestellt wird. Vgl. dazu R. Higuchi, G. Dollinger, P. S. Walsh, and R. Griffith, 1992, "Simultaneous Amplification and Detection of specific DNA Sequences", Bio/Technology 10: 413–417.

**[0191]** Darüber hinaus ist klar, dass Doppelstrang-spezifische Farbstoffe, wie Ethidium Bromid oder SYBR® Green I als generische Indikatoren der Vervielfältigung benutzt werden können. Der SYBR® Green I Farbstoff ist dem Ethidium Bromid in vielen Anwendungen vorzuziehen, da er ein Anregungsmaximum in der Nähe des Anregungsmaximums von Fluorescein aufweist und oft ein stärkeres Signal für die DNA bereitstellt, als bei der Anregung von Ethidium Bromid zu beobachten ist.

**[0192]** Die Fluoreszenz hängt zudem von der Temperatur ab, ein verwirrender Effekt während des Temperaturzyklus, der gewöhnlich dadurch eliminiert wird, dass die Fluoreszenz einmal pro Zyklus bei einer konstanten Verlängerungszeit betrachtet wird. Dennoch, wenn Temperatur, Zeit und Fluoreszenz alle 200 ms während der schnellen zyklischen Vervielfältigung aufgenommen werden, zeigt sich auf dem Monitor **368B** eine wie in **Fig. 12** dargestellte dreidimensionale Spirale. Das in **Fig. 11** dargestellte dreidimensionale Diagramm wurde

in **Fig. 12A** auf ein zweidimensionales Diagramm von Temperatur-gegen-Zeit, in **Fig. 12B** auf ein zweidimensionales Diagramm von Fluoreszenz-gegen-Zeit, und in **Fig. 12C** auf ein zweidimensionales Diagramm von Fluoreszenz-gegen-Temperatur projiziert. Die Temperatur-gegen-Zeit Projektion von **Fig. 12A** wiederholt jeden Zyklus und stellt im wesentlichen die gleiche Information, die in **Fig. 11A** dargestellt ist, bereit. Da sich die Fluoreszenz invers mit der Temperatur ändert, ist die in **Fig. 12B** dargestellte Fluoreszenz-gegen-Zeit Projektion bei frühen Zyklen ein skaliertes Spiegelbild des Temperatur-gegen-Zeit Diagramms. Wenn das Produkt anwächst, steigt die Fluoreszenz bei allen Temperaturen, bei denen das Doppelstrang-Produkt anwesend ist. Trotzdem kehrt die Fluoreszenz bei der Denaturierungstemperatur auf ihren Ausgangswert zurück, da dann nur eine Einzelstrang-DNS vorhanden ist.

**[0193]** Die in **Fig. 12C** gezeigte Fluoreszenz-gegen-Temperatur Projektion des Doppelstrang-Farbstoffs eliminiert die Zeitachse und zeigt die Temperaturabhängigkeit des Strangzustands während der Vervielfältigung. Die Fluoreszenz-gegen-Zeit Projektion aus **Fig. 12C** ist von dem 180 Basenpaar Fragment der Hepatitis B Virus DNS.

**[0194]** Eine andere Fluoreszenz-gegen-Zeit Projektion ist in **Fig. 13** gezeigt. Die in **Fig. 13** dargestellte Projektion ist von einem 536 Basenpaar Fragment der menschlichen  $\beta$ -Globin DNS. Frühe in **Fig. 13** dargestellte Zyklen erscheinen identisch mit einem nichtlinearen Anstieg der Fluoreszenz bei niedrigen Temperaturen. Wenn die Vervielfältigung forschreitet, erscheinen spätere Zyklen als sich zwischen den Anlagerungs- und Denaturierungstemperaturen erhebende Schleifen, die eine signifikante Hysterese zeigen. Das kommt daher, dass die beobachtete Fluoreszenz während der Erwärmung größer ist als während dem Kühlen. Wenn die Probe erwärmt wird, ist die Fluoreszenz solange hoch bis die Denaturierung einsetzt (sichtbar durch den scharfen Abfall in der Fluoreszenz). Wie aus **Fig. 13** ersichtlich ist, steigt die Fluoreszenz während der Verlängerung weiter, während die Temperatur konstant gehalten wird.

**[0195]** Doppelstrang-spezifische Farbstoffe können auch im Bezug auf verschiedene Aspekte vorliegender Erfindung verwendet werden. Der Strangzustand der PCR Produkte kann mit den Farbstoffen, die in Gegenwart von Doppelstrang-DNS fluoreszieren, nachvollzogen werden. Wenn SYBR® Green I während der Vervielfältigung anwesend ist, erhöht sich die Fluoreszenz, wenn mehr Doppelstrang-DNS hergestellt wird. Trotzdem führt der Temperaturzyklus einen verwirrenden Effekt ein, da die Fluoreszenz, wie in den **Fig. 26A** und **26B** gezeigt wird, invers proportional zur Temperatur ist. Wenn sich das Produkt vermehrt, steigt die Fluoreszenz an, außer bei der Denaturierungstemperatur, bei der die Fluoreszenz zu ihrem Ausgangswert, wie in **Fig. 12C** gezeigt ist, zurückkehrt.

**[0196]** Wenn mehrere Proben überwacht werden, wobei der schnelle zyklischen Temperaturwechsler mit Fluoreszenzdetektion **300** verwendet wird, kann, einmal pro Zyklus mit SYBR® Green I, ein  $10^7$ – $10^8$  Bereich der Anfangsvorlagen-Konzentration, wie in **Fig. 14** dargestellt, unterschieden werden. **Fig. 14A** stellt eine Legende für die Indizes der verschiedenen Graphen von **Fig. 14**, und für die Anfangsvorlagen-Kopienzahl in den nachfolgenden Figuren bereit. Wenn die Daten auf Prozent der maximalen Fluoreszenz jedes Kapillarröhrchens **320** normalisiert wurden, sind 100 Anfangskopien klar von 10 Kopien zu unterscheiden. Trotzdem ist der Unterschied zwischen 1 und 10 Kopien marginal, und es kann kein Unterschied zwischen 0 und 1 Durchschnitts-Kopien pro Kapillarröhrchen **320** beobachtet werden.

**[0197]** Doppelstrang-Farbstoffe hängen von den Vervielfältigungsprimern innewohnenden Spezifität ab. Wie den Fachleuten klar ist, kann die nichtspezifische Vervielfältigung bei hohen Zyklenzahlen die Detektions-sensitivität auf ungefähr 100 Anfangsvorlagen-Kopien (siehe **Fig. 14**) limitieren. Mit dem hier gelehrt schnellen Zyklus wird eine Verbesserung der Vervielfältigungsspezifität erreicht, wodurch wiederum die Gesamt-durchführung der DNS Vervielfältigung verbessert wird.

**[0198]** Der mengenmäßige Nachweis mit Sequenz-spezifischen Sonden weist einen ähnlich dynamischen Bereich wie der der Doppelstrang-DNS-Farbstoffe auf, aber scheint, wie in den **Fig. 15A** und **15B** gezeigt ist, auch eine einzelne Anfangsvorlagen-Kopie von negativen Kontrollen zu unterscheiden.

**[0199]** Wenn eine Detektion und ein mengenmäßiger Nachweis von wenigen Kopienzahlen nötig ist, wird eine zusätzliche Spezifität von Fluoreszenzsonden bereitgestellt, die für die Signalerzeugung eine Hybridisierung benötigen. Das Schneiden einer dual-markierten Exonuklease-Sonde ist eine Technik, die dazu fähig ist, eine einzelne Vorlagenkopie von einer Negativkontrolle, wie in **Fig. 15** gezeigt wird, zu unterscheiden. **Fig. 15** zeigt, entsprechend der Legende von **Fig. 14A**, ein Diagramm des Fluoreszenzverhältnisses gegen die Zykluszahl für verschiedene Zahlen von Anfangsvorlagen-Kopien.

**[0200]** Die Signalerzeugung mit 5'-Exonuklease-Sonden ist nicht nur von der DNS Synthese abhängig, sondern erfordert auch eine Hybridisierung und eine Hydrolyse zwischen den Fluorophoren der dual-markierten Sonde. Die Hydrolyse reduziert das sich gegenseitige Auslöschen und das Fluoreszenzverhältnis der Fluorescein- gegen Rhodamin- Emission steigt. Für weitere Informationen bezüglich dieser Technik vgl. L. G. Lee, C. R. Connell, and W. Bloch, 1993, "Allelic Discrimination by Nicktranslation PCR with Fluorogenic Probes", Nucl. Acids Res. 21: 3761–3766 und Livak, K. J., S. J. A. Flood, J. Marmaro, W. Giusti, and K. Deetz, 1995, "Oligonucleotides with Fluorescent Dyes at Opposite Ends Provide a Quenched Probe System Useful for Detecting PCR Products and Nucleic Acid Hybridization", PCR Meth. Appl. 4: 357–362.

**[0201]** **Fig.** 25 zeigt die Fluoreszenz-PCR-Ergebnisse von einer Sonde mit 5 zwischen den Fluorescein- und Rhodamin-Markern liegenden Basen. Die 45 Vervielfältigungszyklen waren in 20 Minuten vollendet, wobei der schnelle zyklische Temperaturwechsler mit Fluoreszenzdetektion **300** aus **Fig.** 11 verwendet wurde. Beim Überwachen des Fluoreszenzverhältnisses einmal pro Zyklus konnte ein  $10^9$ -facher Bereich der Anfangsvorlagen-Konzentration unterschieden werden. Die Vervielfältigungskurven sind ungefähr um 3–4 Zyklen für jede 10-fache Änderung der Anfangsvorlagen-Konzentration verschoben.

**[0202]** Auch wenn das Fluoreszenz-Endsignal verringert ist, wenn weniger Kopienzahlen vervielfältigt werden (vermutlich aufgrund der verringerten Vervielfältigungseffizienz), ist ein mengenmäßiger Nachweis von 1 bis 100 Kopien ohne Weiteres möglich. Das von den Exonuklease-Sonden erzeugte Signal ist kumulativ und steht nur indirekt mit der Produktkonzentration in Relation. Deshalb steigt das Fluoreszenzsignal, auch nachdem der Produktbetrag ein Plateau erreicht hat, weiter an. Unter Verwendung der hier bereitgestellten Informationen, können die Fachleute angemessene Standards für die Steuerung der Effizienz der Vervielfältigung und des Schneidens formulieren, um einen absoluten mengenmäßigen Nachweis durchzuführen.

**[0203]** Die Fluoreszenz-gegen-Temperatur Graphen der 5'-Exonuklease-Sonden bestätigen, dass die Sondenhydrolyse der Mechanismus der Signalerzeugung ist. In **Fig.** 16 ist ein Fluoreszenz-gegen-Temperatur Diagramm mit zwei Temperaturzyklen von der  $\beta$ -Aktin Exonuklease-Sonde gezeigt. In jedem Zyklus ändert sich das Fluoreszenzverhältnis linear mit der Temperatur und es gibt, wenn überhaupt, nur eine kleine Hysterese. Das Signal verstärkt sich in jedem Zyklus während der Anlagerungs-/Verlängerungsphase, wenn die Sondenhydrolyse auftaucht. Auch wenn sich die Fluoreszenz von beiden, dem Fluorescein und dem Rhodamin, mit der steigenden Temperatur verringert (diese Daten sind nicht in den Figuren gezeigt), ist die Änderungsrate für Rhodamin größer, was in einem ansteigenden Verhältnis bei ansteigender Temperatur resultiert. Bei der 5'-Exonuklease-Sonde können keine temperaturabhängigen Hybridisierungseffekte beobachtet werden.

**[0204]** Im Gegensatz dazu zeigen, wenn das Fluoreszenzsignal nur von der Hybridisierung abhängt, die Fluoreszenzverhältnis-gegen-Temperatur Graphen während des Zwei-Temperaturzyklus ein unterschiedliches Muster mit einer Hysterese, wie in **Fig.** 17 dargestellt ist. Die Graphen von **Fig.** 17 stellen die Ergebnisse dar, die erhalten werden, wenn zwei benachbarte Hybridisierungssonden benutzt werden, die im vorliegenden Beispiel eine mit Fluorescein markierte 3'-upstream-Sonde und eine mit Cy5™ markierte 5'-downstream-Sonde sind. Die Sonden sind durch einen 1 Basenpaar-Spalt separiert. Während der Anlagerungs-/Verlängerungsphase der Reaktion hybridisieren die Sonden, was in einer Vermehrung des Produkts resultiert und darin, dass das Cy5™-zu-Fluorescein Fluoreszenzverhältnis ansteigt. Während des Erwärmens des Produkts auf die De-naturierungstemperaturen, wobei die Sonden zwischen 65°C und 75°C dissoziieren, kehrt das Fluoreszenzverhältnis auf seinen Ausgangswert zurück. Die Änderung im Fluoreszenzverhältnis während der Hybridisierung ist zum großen Teil durch einen Anstieg der Cy5™-Fluoreszenz aufgrund des Resonanzenergietransfers bedingt. Die Temperaturabhängigkeit der Hybridisierung kann dazu verwendet werden, Mutationen durch eine Verschiebung in der Schmelzkurve zu entdecken. Benachbarte Hybridisierungssonden sind, wie in **Fig.** 15B gezeigt, außerdem für den mengenmäßigen Nachweis sehr nützlich.

**[0205]** Aus der vorhergehenden Diskussion ist klar, dass die Fluoreszenzüberwachung während der DNS Vervielfältigung eine außerordentlich leistungsfähige analytische Technik ist. Durch die Verwendung des schnellen zyklischen Temperaturwechslers mit Fluoreszenzdetektion **300** kann eine produktive und kosteneffiziente Echtzeit-Überwachung, eine sequenzspezifische Detektion und ein mengenmäßiger Nachweis, abhängig von der Anzahl der vorliegenden Anfangsvorlagenkopien, in 5 bis 20 Minuten erreicht werden.

**[0206]** Darüber hinaus sind das System und die in den **Fig.** 11 bis 17 dargestellten Ergebnisse insbesondere für eine kontinuierliche Überwachung einer biologischen Reaktion mit Fluoreszenz-Farbstoffen geeignet. Zum Beispiel kann, mit einer präzisen Temperatursteuerung und mit Doppelstrang-spezifischen Farbstoffen, die Produktreinheit aus den Schmelzkurven abgeschätzt werden. Mit der erfindungsgemäßen schnellen zyklischen Temperatursteuerung kann die absolute Produktkonzentration aus der Wiederanlagerungskinetik be-

stimmt werden. Die vorliegende Erfindung stellt vorteilhafterweise schnelle Temperaturänderungen und eine strenge Temperaturhomogenität innerhalb der Probe bereit, welche im Stand der Technik nicht zur Verfügung steht. Im Gegensatz zum Stand der Technik, werden in der vorliegenden Erfindung Probenbehälter mit einem hohen Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis verwendet (zum Beispiel durch die Verwendung der in **Fig. 11** dargestellten bevorzugten Kapillarröhrchen **320**) und es wird Luft als Wärme übertragendes Medium verwendet, wodurch eine schnelle Steuerung der Probentemperatur bereitgestellt wird, die anderweitig nicht erreichbar ist. Zum Beispiel zeigen Probentemperatur-gegen-Zeit Diagramme, die erhalten werden, wenn Proben in den Probenbehältern der vorliegenden Erfindung bearbeitet werden, scharfe Spitzen bei den Denaturierungs- und den Anlagerungstemperaturen (was eine schnelle Temperaturreaktion anzeigt), im Gegensatz zu den konischen Plastikröhren aus dem Stand der Technik, die einige Sekunden brauchen, damit in allen Proben ein thermisches Gleichgewicht erreicht ist. Darüber hinaus stellen die erfindungsgemäßen Probenröhren verbesserte Ergebnisse gegenüber den als Probenbehälter benutzten geätzten Silizium- oder Glasschnitzel bereit, da die Temperaturzykluszeiten und die Wärmehomogenität der vorliegenden Erfindung, den Temperaturzykluszeiten und der Wärmehomogenität, die mit solchen anderen Strukturen nur möglich sind, überlegen sind.

**[0207]** Durch die Verwendung vorliegender Erfindung werden viele Aspekte der DNS Vervielfältigung, die bis dato nur wenig verstanden wurden, wahrnehmbar. Zum Beispiel entsteht die Produktdenaturierung in weniger als 1 Sekunde, dennoch verlangte der Stand der Technik nach einer Denaturierungszeit von 10 Sekunden bis 1 Minute. Die Beobachtung der Produktschmelze mittels Echtzeit-Fluoreszenzüberwachung mit Doppelstrang-Farbstoffen gemäß vorliegender Erfindung (vgl. die **Fig. 12** und **13**) zeigt, dass die Verwendung kürzerer Denaturierungszeiten sehr effektiv ist. Als weiteres Beispiel: Viele Ursachen des bekannten "Plateau-Effekts" wurden vorgeschlagen, aber es standen wenige Daten zu Verfügung, um zwischen den Alternativen zu unterscheiden. Wie in **Fig. 13** gezeigt, erfolgt die Produktanlagerung sehr schnell. Tatsächlich wird, während den späteren Vervielfältigungszyklen, ein Großteil des Produkts bei jedem Zyklus während der Abkühlung, noch bevor die Primeranlagerungstemperatur erreicht ist, wieder angelagert. Dies passiert bei Kühlgeschwindigkeiten von 5–10°C/sec. Die Wiederanlagerung des Produkts bei den langsameren aus dem Stand der Technik bekannten Temperaturwechseln ist noch größer, da noch mehr Zeit für den Übergang zwischen Denaturierungs- und Anlagerungstemperatur nötig ist. Dieser unerwünschte Effekt begrenzt die Produktausbeute, und ist der Hauptgrund für den aus dem Stand der Technik bekannten "Plateau-Effekt".

**[0208]** Darüber hinaus stellt die vorliegende Erfindung ein günstiges Gerät bereit, das in kommerziellen Anwendungen verwendet werden kann und das die Fluoreszenz während der schnellen zyklischen Vervielfältigung kontinuierlich überwacht. Der erfindungsgemäße zyklische Temperaturwechsler ist dazu fähig, die DNS Vervielfältigung in nicht mehr als 10 bis 20 Minuten auszuführen, und die optischen und die Detektions-Komponenten der vorliegenden Erfindung unterscheiden ein, zwei, drei und mehr Fluorophore. Die bevorzugten Ausführungsbeispiele der vorliegenden Erfindung überwachen eine ganze Anzahl von individuellen Proben, zum Beispiel 24 Proben (die Kapillarröhrchen **320** in **Fig. 11**), einmal alle paar Sekunden, vorteilhafterweise einmal pro Sekunde und noch vorteilhafter 10 Mal pro Sekunde.

**[0209]** Es ist von Vorteil, wenn die bevorzugten Ausführungsbeispiele der vorliegenden Erfindung ein Fluoreszenzfeedback für die Echtzeitsteuerung und die Optimierung des biologischen Prozesses, wie beispielsweise der DNS Vervielfältigung, verwenden, wenn der Prozess stattfindet. Demnach wird bei den hier offenbarten bevorzugten Ausführungsbeispielen die detektierte Fluoreszenz dazu verwendet, den Temperaturzyklus zu steuern. Bei der Verwendung der hier offenbarten Ausführungsbeispiele der vorliegenden Erfindung und bei der Verwendung der bevorzugten kontinuierlichen Überwachungstechniken mit Doppelstrang DNS spezifischen Farbstoffen, wird die Verlängerung nach dem jeweiligen Temperaturzyklus abgebrochen, nachdem die detektierte Fluoreszenz aufgehört hat, anzusteigen. Weiterhin werden erfindungsgemäß die Denaturierungsbedingungen auch dadurch gesteuert, dass die Temperatur nur soweit erhöht wird, bis das Produkt komplett geschmolzen ist. Darüber hinaus wird erfindungsgemäß die Primeranlagerung durch den Resonanzenergietransfer zwischen Fluorescein- und den Cy5™-markierten Oligonukleotiden überwacht. Außerdem werden mit Hilfe der vorliegenden Erfindung die Temperaturzyklen der Probe automatisch abgebrochen, nachdem ein bestimmter Betrag des Produkts hergestellt ist.

**[0210]** Gemäß vorliegender Erfindung und soweit die Verwendung des erfindungsgemäßen Gerät möglich ist, verbessert das schnelle zyklische Temperaturwechseln mit den minimalen Anlagerungs- und Denaturierungstemperaturen die quantitative PCR und vergrößert die Unterscheidbarkeit von der allelen spezifischen Vervielfältigung. Das schnelle zyklische Durchlaufen der Zyklussequenz reduziert Sequenzdoppeldeutigkeiten und minimiert "Shadow-Banden" in wiederholten Vervielfältigungen von Di-Nukleotiden. Gemäß vorliegender Erfindung verbessert sich für die lange PCR, bis zu 35 kb, die Ausbeute, wenn die Probe so wenig wie möglich den hohen Denaturierungstemperaturen ausgesetzt ist.

**[0211]** Im Gegensatz zu den früheren Ansätzen in der PCR, die die PCR als drei Reaktionen-Denaturierung, Anlagerung, Verlängerung, wobei jede bei drei unterschiedlichen Temperaturen auftritt (wie in **Fig. 18** dargestellt)-behandelten, sieht ein Aspekt vorliegender Erfindung vor, dass ein kinetisches Paradigma für die PCR wichtige Verbesserungen leistet. Durch das kinetische Paradigma (wie in **Fig. 18B** dargestellt), besteht die Temperatur-gegen-Zeit Kurve aus kontinuierlichen Übergängen zwischen den sich überlappenden Reaktionen. Das erfindungsgemäße Verfahren und das erfindungsgemäße Gerät sind besonders effizient beim Ausführen der PCR unter dem kinetischen Paradigma. **Fig. 18C** ist ein Graph, der verschiedene Zeit/Temperatur Profile in der Umgebung der Anlagerungstemperatur von 55°C darstellt. In **Fig. 18C** zeigt die durchgängige Linie eine zentral angeordneten "Spitze", die die Temperaturreaktion einer 10 µl Probe darstellt. Im Gegensatz dazu, stellen die als kurze oder lange Linienabschnitte gezeigten Linien in **Fig. 18C** die Temperaturreaktionen von Proben dar, die durch die Verwendung von Geräten mit Heizblock erhalten wurden. Wie aus **Fig. 18C** ersichtlich, produzieren die erfindungsgemäßen Ausführungsbeispiele Anlagerungssegmentspitzen, mit den hier diskutierten Vorteilen, statt der Temperaturplateaus gemäß den herkömmlichen Erkenntnissen aus dem Stand der Technik.

**[0212]** Die früher zur Verfügung stehenden für die Detektion benutzten Instrumente wiesen viele Nachteile auf. Ein schneller präziser Temperaturwechsel wird durch das hier beschriebene erfindungsgemäße System bereitgestellt, im Gegensatz zu den früher zur Verfügung stehenden Instrumenten, die 5 bis 10 Mal langsamer waren. Mit der kontinuierlichen Fluoreszenzüberwachung, die auch durch das erfindungsgemäße System bereitgestellt wird, kann die Temperaturabhängigkeit der Hybridisierung verfolgt werden. Durch das Verfolgen der Hybridisierung während der Temperaturwechsel, kann die Anzahl der erforderlichen Sonden und/oder der erforderlichen Spektralfarben minimiert werden. Das bedeutet, dass verschiedene Produkte und Mutationen durch ihre charakteristischen Schmelzeigenschaften detektiert werden können, statt dass man den Aufwand unternimmt, verschiedene Fluor-markierte Sonden für jede zu detektierende DNS Spezies synthetisieren zu müssen.

**[0213]** Am kostengünstigsten sind eine lichtemittierende Diode mit hoher Intensität, die statt einer Xenon Lichtbogenquelle oder einem Laser für die Probenillumination verwendet werden kann, und Photodioden für die Detektion. Die Proben werden in Glaskapillarröhrchen, oder alternativ in zusammengesetzte Probenbehälter aus Glas/Plastik (siehe **Fig. 21A-D**) in einem 96-Quellenformat, das keine Wärmeversiegelung benötigt, gefüllt. Die Echtzeit-Fluoreszenzsteuerung der Temperaturzyklen verbessert die Vervielfältigungsqualität. Zum Beispiel wenn die Temperatur der Probe nur bis zum Auftreten der Denaturierung erhöht wird, wird das den hohen Temperaturen Aussetzen der Probe minimiert. Dies erhöht die Ausbeute, indem Produkt- und Enzym-Degradation limitiert werden, und erhöht die Spezifität, indem die Vervielfältigung von Produkten mit einer hohen Schmelztemperatur begrenzt wird.

**[0214]** Als nächstes wird auf die **Fig. 19** Bezug genommen, die eine diagrammatische Darstellung eines Vergleichsbeispiels für das kontinuierliche Überwachen einer einzelnen Probe bereitstellt. Es sollte dennoch klar sein, dass die in **Fig. 19** und 20 dargestellten Konstruktionen auch in ein System eingebaut werden können, das automatisch mehrere Proben bearbeitet, wie beispielsweise durch das in **Fig. 11** dargestellte Gerät und wie in Kürze hier erklärt werden wird. In dem Beispiel von **Fig. 19** ist ein einzelner Probenhalter **402** in einem Probenträger angeordnet, der an dem Schnittpunkt von einem die Temperatur kontrollierenden Luftstrom und einem linearen optischen Pfad positioniert ist. Der Probenhalter **402** beinhaltet ein Röhrchen **402A** das die vielen wünschenswerten Eigenschaften eines Kapillarröhrchens aufweist. Verschiedene Ausgestaltungen des Kapillarröhrchens können verwendet werden und das Röhrchen **402A** hat bevorzugt einen rechteckigen Querschnitt. Die biologische Probe ist vorzugsweise am unteren Ende des Probenröhrchens **402A**, wie durch das Bezugszeichen **402B** bezeichnet, angeordnet. Eine Kappe **402C** ist ebenfalls vorzugsweise an dem Probenhalter **402** vorhanden.

**[0215]** Als nächstes wird Bezug genommen auf die **Fig. 19A** bis 19E, die die Auswirkungen der verschiedenen Ausgestaltungen der Probenbehälter auf die Temperaturreaktion der Probe selbst vergleichen. Die in **Fig. 19E** gezeigten Temperatur-Zeit-Linien entsprechen der Reaktion, die erhalten wird, wenn die in den **Fig. 19A** bis 19C bezeigten Ausgestaltungen der Probenbehälter verwendet werden. **Fig. 19D** zeigt den am wenigsten für die vorliegende Erfindung bevorzugten Probenbehälter und ist nur für den Vergleich aufgenommen. Mittels der hier offenbarten Information, können Fachleute optimale Ausgestaltungen der Probenbehälter für spezielle Anwendungen der vorliegenden Erfindung erreichen. Weitere Informationen bezüglich jeder der in den **Fig. 19A** bis 19D dargestellten Ausgestaltungen der Probenbehälter wird weiter unten dargelegt.

<u>Figur</u>	<u>Oberflächen- bereich</u>	<u>Fluidsäulen- länge</u>	<u>Proben- volumen</u>	<u>Quelle</u>
--------------	---------------------------------	-------------------------------	----------------------------	---------------

	<u>(mm<sup>2</sup>/10µl)</u>	<u>(mm)</u>		
19 A	77	47	10 µl	Kimble KIMAX #46485-1
19 B	42	13,8	34 µl	Kimble KIMAX #46485-15
19 C	32	8	59 µl	Kimble KIMAX #34500-99
19 D	18	N/A	10 µl	Microcamp™ tube of Perkin- Elmer Cetus GeneAmp PCR System 9600

**[0216]** In dem Gerät von **Fig. 19** ist eine Anregungsstrahlungsquelle **418**, vorteilhafterweise eine LED und noch vorteilhafter eine blaue LED, bereitgestellt, um den Probenhalter **402** zu beleuchten. Die von der Anregungsstrahlungsquelle **418** emittierte Strahlung verläuft durch asphärische fokussierende Linsen **420** und einen Anregungs-Bandpassfilter **422**, und die Strahlung wird auf den Probenhalter **402** fokussiert.

**[0217]** Die in **Fig. 19** illustrierten optischen Komponenten sind vorzugsweise in einem optischen Gehäuse **412** beinhaltet. Darüber hinaus ist auch ein Gehäuse **406** vorhanden. Ein Ventilator **408** ist vorgesehen, um die Luft durch einen Luftkanal **414** und über den in dem Probenträger **404** gehaltenen Probenhalter **402** zu bewegen. Eine Temperatureinheit **410** ist in dem Luftstromweg angeordnet, um ein Erwärmen oder eine Erwärmen und Kühlen der Luft, die über den Probenträger **404** streicht, bereitzustellen. Ein Rüssel **416** führt die Luft effektiv über den Probenträger **404**.

**[0218]** Die Emissionen, die von der Probe abgegeben werden, passieren noch zwei asphärische Linsen **420** und einen Emissions-Breitbandfilter **424**, und werden von einem Photodetektor **426**, der vorzugsweise eine Photodiode ist, empfangen. Die Fachleute können ohne Probleme die Steuerkomponenten, die vorteilhafterweise für das in **Fig. 19** dargestellte Gerät benötigt werden, durch die hier dargelegten Informationen bereitstellen.

**[0219]** Die **Fig. 19F** und **19G** ist die Seiten- bzw. Endansicht eines bevorzugten Probenbehälters **403**, der ein rechteckiges Probenträger **403A** benutzt. Das Kapillarröhrchen **403A** ist vorzugsweise bei Vitro Dynamics Inc. erhältlich, und weist folgende Abmessungen auf: 1 mm × 3 mm × 50 mm. Ein erstes Kappenelement **403B** und ein zweites Kappenelement **403C** sind durch eine Schraube **403D** zusammengehalten, wobei die Schraube **403D** auch als Halter für das Kapillarröhrchen **403A** fungiert. [TEXT FEHLT] nen Probe detektiert wird. **Fig. 19H** zeigt das rechteckige Kapillarröhrchen derart ausgerichtet, dass seine Kanten in einer Linie mit der optischen Achse der Anregung und der Detektionsoptik ("Kantenanregung und Detektion") sind. **Fig. 19I** zeigt das rechteckige Kapillarröhrchen **403A** derart ausgerichtet, dass seine Breitseiten in einer Linie mit der optischen Achse der Anregung und der Detektionsoptik ("Breitseitenanregung und Detektion") sind. Überraschenderweise ist das Fluoreszenzsignal, das von der in **Fig. 19H** gezeigten Kantendetektions-Ausrichtung erhalten wird, 3- bis 5-fach höher ist als das von der in der **Fig. 19I** gezeigten Breitseitendetektions-Ausrichtung erhaltenen. Die erstrebenswerten Eigenschaften der Verwendung der in der **Fig. 19H** gezeigten Kantendetektions-Ausrichtung sind zumindest teilweise durch die innere Totalreflexion, die in dem Kapillarröhrchen **403A** stattfindet, bedingt, die das Fluoreszenzsignal auf den Rand des Kapillarröhrchens konzentriert.

**[0220]** **Fig. 20** zeigt die optischen Komponenten eines anderen bevorzugten Beispiels. Die in **Fig. 20** dargestellten optischen Komponenten sind vorzugsweise in die in **Fig. 21** dargestellte zyklische Temperaturwechsler- und Probenhandhabungskonstruktion eingebaut, was in Kürze noch genauer beschrieben werden wird, aber können auch in vielen verschiedenen Anordnungen, die eine Überwachung (am vorteilhaftesten eine kontinuierliche Überwachung) einer Probe, die einer Polymerasekettenreaktion unterzogen wird, bereitstellen, verwendet werden.

**[0221]** Im Gegensatz zu den vorherigen hier offenbarten Anordnungen, sind der optische Anregungsweg und der Detektionsweg in dem Beispiel der **Fig. 20** und **21** kombiniert, und werden hier mit Epifluoreszenz-Weg

statt linearem Weg bezeichnet. In den Beispielen der **Fig. 21** und **22**, folgen die Anregungs- und die Emissionsstrahlung dem gleichen optischen Weg zwischen Kapillarröhrchen und dem in dem Anregungsweg benutztem dichroiden Element. Ein Kapillarröhrchen ist speziell für die Verwendung in dem Beispiel der **Fig. 21** und **22** ausgebildet, bedingt durch die totale innere Reflexion (auch als "Lichtführung" bezeichnet) entlang der Länge des Kapillarröhrchens, die dazu benutzt wird, sowohl die Anregungs- als auch die Emissionsintensitäten zu verstärken.

**[0222]** In den Ausführungsbeispielen der **Fig. 20** und **21** ist, um eine maximale Lichtleitung zu erreichen, die optische Achse parallel zu der Länge des Kapillarröhrchens (paraxial) ausgerichtet, wobei die Spitze des Kapillarröhrchens an dem Brennpunkt positioniert ist. Unter der Annahme eines Brechungsindex von 1,33 für die zu detektierende Probe, werden ungefähr 12,3% des emittierten Lichts in die Spitze geleitet. Es ist klar, dass das Zentrifugieren dazu benutzt werden kann, die Probe in die Spitze des Kapillarröhrchens zu bewegen.

**[0223]** **Fig. 22A** zeigt in einem Diagramm die Effektivität der Lichtleitung, wenn die Fluoreszenz an der Spitze des Kapillarröhrchens detektiert werden soll und zeigt eine 10-fache Verstärkung der Signalintensität, wenn die Spitze (ausgefüllte Rauten) statt der Seite (unausgefüllte Kreise) des kapillaren Probenbehälters betrachtet wird. Zudem wurden, wie **Fig. 22B** zeigt, die Ergebnisse, die bei der Verwendung von zwei Kapillarröhrchen unterschiedlicher Größe erhalten werden, und die auf zwei unterschiedliche Längen mit Doppelstrang DNS, die mit SYBR® Green I eingefärbt ist, gefüllt ist, dargestellt. Wie aus den **Fig. 22A** und **22B** vermutet werden kann, steigt die beobachtete Epifluoreszenz, wenn mehr Probe in das Röhrchen zugegeben wird, obwohl sich die Fluoreszenz Effizienz verringert.

**[0224]** Die optischen Eigenschaften der Emission von dem Kapillarröhrchen, wurden durch stimulierende Fluoreszenz in einem mit einer Fluorescein-Lösung gefüllten Kapillarröhrchen bei 470 nm untersucht. Die Emission von dem stumpfen Ende des Kapillarröhrchens wurde als homogen über die Breitseite des Kapillarröhrchens beobachtet, im Gegensatz zu der konzentrierten Emission im Glas, die erwartet werden würde, wenn die Emission das Ergebnis einer Evanescent-Wellen-Fluoreszenz sein würde.

**[0225]** Die in der **Fig. 20** dargestellten optischen Komponenten führen eine paraxiale epifluoreszierende Beleuchtung der Spitze des Kapillarröhrchens aus, die vorteilhafte nicht anders zu erhaltende Ergebnisse bereitstellt. In **Fig. 20** ist die Anregungsstrahlungsquelle **464** vorzugsweise eine blaue LED, wie sie beispielsweise in der Industrie als superhelle LED bekannt ist und von LEDtronics bezogen werden kann. Die emittierten Fluoreszenzsignale werden von den Photodetektoren **466A** und **466B** aufgenommen. Die Anregungsstrahlungsquelle **468** und die Photodetektoren **466A** und **466B** werden von einer Befestigungsplatine **468** gehalten, die auch die notwendigen Schaltkreise beinhaltet und die Filter in die Photodetektoren **466A** und **466B** integriert. Eine bevorzugte Befestigungsplatine ist bei Ealing Electrooptics erhältlich und beinhaltet einen 0,5 inch Interferenzfilter mit Hochleistungssiliziumphotodioden in TO5 Gehäusen. Die Anregungs- und Detektionskomponenten werden direkt von der Befestigungsplatine **468** mit der verbundenen Elektronik getragen. Es ist von Vorteil, wenn die optischen Komponenten vorzugsweise  $\leq 1,0$  inch im Durchmesser aufweisen. Eine Sammellinse **454**, zwei dichroide Filter **456A** und **456B**, ein Spiegel **458**, Interferenzfilter **460A-C**, und asphärische fokussierende Linsen **462A-C** leiten die Strahlung zur Probe und von der Probe weg.

**[0226]** Während in **Fig. 20** nur zwei Farben/Wellenlängen beim Durchführen der Analyse verwendet werden, können die Fachleute das Ausführungsbeispiel problemlos anpassen, damit drei oder mehr Farben analysiert werden können. Um eine Drei- oder Mehrfarbenanalyse bereitzustellen, kann das in **Fig. 20** dargestellte Gerät mit zusätzlichen dichroiden Filtern und Photodetektoren ausgestattet werden. Darüber hinaus ist vom Schutzbereich der vorliegenden Erfindung umfasst, dass eine simultane Aufspaltung der Wellenlängen auf einen linearen Photodetektoraufbau, wie er in der Industrie erhältlich ist, für eine Mehrfarbenaufnahme möglich ist. Wenn ein linearer Photodetektoraufbau benutzt wird, ist es vorteilhaft, dass ein Prisma oder ein Strichgitter zusammen mit einer Linse und einem Photodetektoraufbau oder CCD für die Detektion der mehreren Wellenlängen verwendet werden. Ein bevorzugter linearer Photodetektoraufbau, der industriell erhältlich ist, sammelt 15–30 Wellenlängenbereiche von 10 bis 20 nm, die jeweils zwischen 500 und 800 nm liegen. Verschiedene Konfigurationen der optischen Komponenten, beispielsweise die Littrow Autokollimationskonfiguration für Gitter, die hauptsächlich in Monochrometern verwendet wird, können durch die hier dargelegten Informationen ausgebildet werden, um die beste Anpassung zwischen Sammelleffizienz, spektraler Auflösung und räumlichen Vorgaben zu erzielen. Das Gerät aus **Fig. 20** wird im Folgenden weiter beschrieben, wobei es in einen in **Fig. 21** dargestellten automatischen zyklischen Temperaturwechsler eingebaut ist.

**[0227]** **Fig. 21** stellt eine schematische Darstellung eines anderen Geräts **400** bereit, das Komponenten für das schnelle zyklische Temperaturwechseln, Komponenten für die Probenhandhabung, und die in **Fig. 20** dar-

gestellten optischen Komponenten beinhaltet, die alle zusammenwirken, um eine Fluoreszenzdetektion an der Spitze des Probenbehälters (Epifluoreszenz) bereitzustellen. Der in **Fig. 21** dargestellte schnelle zyklische Temperaturwechsler mit Epifluoreszenzdetektion **400** hat bestimmte Vorteile. Es ist klar, dass das beschriebene Ausführungsbeispiel ausschließlich beispielhaft für die vorliegende Erfindung ist, und dass die Fachleute viele unterschiedliche Anordnungen zum Ausführen der hier beanspruchten Erfindung erreichen können.

**[0228]** In dem in **Fig. 21** dargestellten Beispiel, wird Luft durch eine Öffnung **470** eingesaugt und folgt im allgemeinen dem durch die Linien **472** angezeigten Strömungsweg. Die Temperatur der Luft und demnach die Temperatur des Plastik/Glas-Probenbehälters **450** wird vorzugsweise dadurch angepasst, dass eine 400 Watt Heizkartusche **474**, die vorzugsweise eine bei Reheat Inc. erhältliche ist, verwendet wird. Die Heizkartusche **474** ist innerhalb eines zentralen Kanals **476** angeordnet. Ein Ventilator **498** ist vorgesehen, um die Luft in dem angezeigten Weg **472** zu bewegen. Der Ventilator wird durch eine Antriebswelle **496** und einen Motor **494** angetrieben. Der Motor **494** ist vorzugsweise ein Gleichstrom-Seltenerd-Bremsmotor, der vorzugsweise bei Escap AG erhältlich ist und eine maximale Drehzahl von 15.000 rpm aufweist. Wenn die Plastik/Glas-Probenbehälter **450** erwärmt werden, wird die Heizkartusche proportional angesteuert und der Ventilator läuft mit relativ geringer Geschwindigkeit (12 V, 0,5 A), um eine Temperaturhomogenität für alle Plastik/Glas-Probenbehälter **450** bereitzustellen. Wenn die Plastik/Glas-Probenbehälter gekühlt werden, ist die Heizkartusche ausgeschaltet und der Motor **494** läuft mit einer hohen Geschwindigkeit (beispielsweise mit der oben erwähnten bevorzugten Maximalgeschwindigkeit, die durch Anlegen von 27 V und 1,4 A erreicht wird). Der Ventilator **498** bläst die Luft in die Öffnung **470** und aus dem Auslassanschluss **471**.

**[0229]** In dem schnellen zyklischen Temperaturwechsler mit Epifluoreszenzdetektion **400** ist es vorteilhaft, dass 24 Plastik/Glas-Probenbehälter **450** (von denen zwei in **Fig. 21** dargestellt sind) symmetrisch um die Heizkartusche **474** und den zentralen Kanal **476** angeordnet sind. Die Plastik/Glas-Probenbehälter **450** werden von einer Hülse **451** aufgenommen, die (bedingt durch ihre versetzte Konstruktion) ein präzises Justieren der Position jedes einzelnen individuellen Plastik/Glas-Probenbehälters **450** in einem kreisförmigen Karussell **480** ermöglicht. Die Hülsen **451** sind vorzugsweise aus Messing hergestellt. Die von der Achse versetzte Konstruktion der Hülse **451** ermöglicht es, dass jede Hülse **451** so ausgerichtet werden kann, dass die Spitze der Plastik/Glas-Probenbehälter **450** sowohl lateral als auch longitudinal genau auf dem optischen in **Fig. 21** dargestellten Brennpunkt ausgerichtet ist, zu dem Zeitpunkt zu dem der schnelle zyklische Temperaturwechsler mit Epifluoreszenzdetektion **400** hergestellt wird.

**[0230]** Das Karussell **480** wird von einem Lager **482** über einem Gehäuse **490** getragen. Das Karussell **480** wird durch einen Schrittmotor **488** positioniert, der mit einem Antriebsgetriebe **484**, das mit dem Motor **488** über eine Antriebswelle **486** verbunden ist, ausgestattet ist. Der Schrittmotor **488** ist ein Mirkoschrittmotor (wobei eine Steuerung (nicht explizit in **Fig. 21** dargestellt) von New England Affiliated Technology verwendet wird), um über 10.000 Schritte pro Drehung des Karussells **480** bereitzustellen, wodurch eine genaue Positionierung jedes Plastik/Glas-Probenbehälters **450** bereitgestellt wird. Das Innere des Gehäuses **490** ist mit einem Isoliermaterial **492**, vorzugsweise entsprechend dem vorher beschriebenen Isoliermaterial, ausgestattet. Die Einbauten **476** dienen dazu, den Auslassanschluss **471** zu bilden und das Umgebungslicht abzuschotten.

**[0231]** Die **Fig. 21A** bis **21D** stellen zusätzliche detaillierte Ansichten der Plastik/Glas-Probenbehälter **450** bereit und es wird auf sie Bezug genommen werden, um das bevorzugte Verfahren für ihre Verwendung zu erläutern. Der Plastik/Glas-Probenbehälter **450** beinhaltet einen Kapillarröhrchenteil **450B**, das an einem Ende verschlossen ist. Der Kapillarröhrchenteil **450B** kann verschiedene Ausgestaltungen aufweisen und ist nicht nur auf die Kapillarröhrchen-artige Struktur limitiert. Es ist dennoch vorteilhaft, dass das in dem Plastik/Glas-Probenbehälter **450** enthaltene Fluid nicht mehr als 1 ml ist, um eine Probentemperaturhomogenität und ein schnelles zyklisches Temperaturwechseln zu fördern. Zum Beispiel ist es von Vorteil, dass das Material, aus dem der Kapillarröhrchenteil **450B** hergestellt ist, eine Wärmeleitfähigkeit im Bereich von ungefähr 20 bis 35 aufweist, gemäß der Formel

$$\left( \frac{\text{cal cm}}{\text{cm}^2 \text{ s } ^\circ\text{C}} \right) \times 10.$$

Weitere Informationen bezüglich der Wärmeleitfähigkeit verschiedener Gläser können erhalten werden von: R. C. Weast & M. J. Astle, *Handbook of Chemistry and Physics*, Seite E-6 (1982) (CRC Press). Die Plastik/Glas-Probenbehälter **450** sind außerdem mit einem Reservoirteil **450C** ausgestattet, das vorzugsweise aus einem geeigneten Plastik hergestellt ist und mit dem offenen Ende des Kapillarröhrchenteils **450B** verbunden ist. Während viele unterschiedliche Materialien für den Reservoirteil **450C** verwendet werden können, ist es vorteilhaft, dass ein Plastikmaterial in einer Trichterform ausgebildet wird und an dem Kapillarröhrchenteil

**450B** befestigt wird.

**[0232]** Eine Probe S wird in den zusammengesetzten Plastik/Glas-Probenbehälter **450** mittels einer Pipette P, oder einem anderen geeigneten Instrument, entweder manuell oder in einem automatisierten Ablauf eingefüllt. Es ist vorteilhaft, dass das Volumen der Probe in einem Bereich von ungefähr 0,01 µl bis ungefähr 10.000 µl, noch vorteilhafter in einem Bereich von ungefähr 0,01 µl bis ungefähr 100 µl, und am vorteilhaftesten in einem Bereich von ungefähr 0,01 µl bis ungefähr 10 µl liegt, wobei ungefähr 5 µl das am meisten bevorzugte Volumen ist. Sobald einmal eine Probe in jeden Plastik/Glas-Probenbehälter **450** gegeben ist, werden die Plastik/Glas-Probenbehälter mit geringer Geschwindigkeit zentrifugiert, um die Proben in der Spitze des verschlossenen Endes des Kapillarröhrchenteils **450B** anzuordnen, so dass die Probe eine 0,2 bis 2,0 cm lange Fluidsäule **450A**, wie am besten in **Fig. 21B** zu sehen ist, bildet. Ein Stopper **450D** (der vorteilhafterweise als Plastikstöpsel ausgebildet ist) wird dann in den Reservoirteil **450C** gesetzt, um den Plastik/Glas-Probenbehälter **450**, wie am besten in **Fig. 21C** gezeigt ist, zu versiegeln, und der Plastik/Glas-Probenbehälter **450** wird dann in die Hülse **451** in dem schnellen zyklischen Temperaturwechsler mit Epifluoreszenzdetektion **400** gesetzt. Es können auch andere Konstruktionen zum Versiegeln des Kapillarröhrchenteils **450B** verwendet werden.

**[0233]** Der Kapillarröhrchenteil **450B** des Plastik/Glas-Probenbehälters **450** ist vorzugsweise ein Kapillarröhrchen aus Glas, das in der Industrie erhältlich ist und einen inneren Durchmesser von 0,8 mm und einen äußeren Durchmesser von 1,0 mm aufweist, und das an dem einen Ende geschlossen/versiegelt ist und sich an dem anderen Ende trichterförmig erweitert, um das Plastikreservoir **450C** aufzunehmen. Die Plastik/Glas Probenbehälter **450** können problemlos und wirtschaftlich hergestellt werden. Die Form der Spitze **450E** des Kapillarröhrchenteils **450B** ist für die optische Effizienz optimiert. Flache Spitzen sind genauso wie Spitzen mit unterschiedlicher äußerer und innerer Krümmung auch vom Schutzbereich der vorliegenden Erfindung umfasst. Die Fachleute können die effizienteste Ausgestaltung für die Spitze auswählen.

**[0234]** Wie aus den **Fig. 21A** bis **21D** erkennbar ist, stellt der Zusatz einer Befüllvorrichtung aus Plastik und von Versiegelungskonstruktionen für die Kapillarröhrchen aus Glas große Vorteile bereit und ermöglicht eine effiziente Verwendung der Kapillarröhrchen aus Glas, wobei deren erstrebenswerte thermalen Eigenschaften erhalten bleiben.

**[0235]** Vorteilhafterweise stellt der zusammengesetzte Plastik/Glas-Probenbehälter **450** einen praktischen und kostengünstigen Probenhalter bereit. In dem Beispiel von **Fig. 21** ist es vorteilhaft, dass die Fluoreszenz von einer einzelnen Probe ein- bis zehnmal pro Sekunde aufgenommen wird. Wenn die Fluoreszenz von multiplen Proben mit der vorteilhaften Geschwindigkeit aufgenommen werden soll, müssen die Proben durch eine Drehung des Karussells **480** relativ schnell in Position bewegt werden. Mit dem vorteilhaften Schrittmotor **488** und den entsprechenden Steuervorrichtungen (die mit Hilfe der hier bereitgestellten Information gewählt werden können) kann jede der 24 Proben schnell und genau an die in **Fig. 21** dargestellt Überwachungsposition bewegt werden.

**[0236]** Wenn das Fluoreszenzsignal von jeder Probe für 100 ms aufgenommen wird, beträgt die Signalvariation (mit Repositionierung) weniger als 1% (< 1%). Es wird verständlich sein, dass es innerhalb des Schutzbereichs vorliegender Erfindung liegt, die Signalaufnahmezeit zu verringern, die Übergangsgeschwindigkeiten zu vergrößern, und auch die Variationskoeffizienten durch wiederholte Stichproben zu beobachten. Wenn 24 Proben abgearbeitet werden, und das Karussell ohne Stopp mit einer Geschwindigkeit zwischen 1 bis 10 Umdrehungen pro Sekunde gedreht wird, stehen jeder Probe 0,37 bis 3,7 ms für Anregung und Detektion zur Verfügung.

**[0237]** Durch Verwendung der hier erläuterten Informationen, kann ein Fachmann auswählen, ob das Fluoreszenzsignal mittels Software oder Hardware integriert wird. In einem bevorzugten Ausführungsbeispiel wird eine graphische Programmsprache in Verbindung mit dem schnellen Temperaturwechsler mit Epifluoreszenzdetektion **400** verwendet, die beispielsweise in der Industrie als LabView (erhältlich von National Instruments) bekannt ist, und die Unterprogramme für die Signaldetektion und -Integration aufweist. In einem anderen bevorzugten Ausführungsbeispiel wird die Integration durch die Hardware mit variabler Integrationszeit (Benutzerjustierbare Sensitivitätssteuerung) durchgeführt, so dass die Signale ein Level erreichen, das optimal für eine Analog-zu-Digital Konvertierung ist.

**[0238]** Aufgrund der Verwendung des in **Fig. 21** dargestellten schnellen zyklischen Temperaturwechsler mit Epifluoreszenzdetektion **400**, ermöglicht die kontinuierliche Überwachung der Probe, während die Reaktion stattfindet, eine Festlegung des Temperaturzyklus anforderungen während der Vervielfältigung, die auf der kontinuierlichen Überwachung von Denaturierung, Anlagerung und Verlängerung basieren. Dies steht im Gegen-

satz zum Stand der Technik, bei dem alle Zyklusparameter festgelegt und programmiert sind, bevor die Vervielfältigung anfängt. Gemäß dem Stand der Technik wird, wenn komplementäre Oligonukleotide, die äquivalent zu dem bei der geringsten Temperatur schmelzenden Primer sind, verwendet werden, die Anlagerungseffizienz auch während der frühen Zyklen kontrolliert. In vielen Fällen können Verlängerung und Denaturierung mit Doppelstrang DNS Farbstoffen nur während späterer Zyklen, wenn genügend Produkt hergestellt ist, überwacht werden. Signifikanterweise ist eine solche Anforderung gewöhnlich nicht das Problem, da Denaturierungs- und Verlängerungsbedingungen ausreichend zugänglich gemacht wurden, um die meisten Produkte zu vervielfältigen, und die Daten aus der ersten Vervielfältigung können dazu benutzt werden, die nachfolgenden Durchläufe zu optimieren.

**[0239]** Es wird weiter auf **Fig. 21** Bezug genommen; eine Benutzeroberfläche und eine Instrumentensteuerung **500** können hergestellt werden, wobei die in Verbindung mit **Fig. 11** dargelegten Informationen verwendet werden. Als ein bevorzugtes Beispiel einer Benutzeroberfläche und Instrumentensteuerung, stellt ein PENTIUM™ Mikrocomputer, der die LabView Programmsprache mit einer 12-bit Multifunktions-Eingangs-/Ausgangskarte (erhältlich bei National Instruments) betreibt, die Datenaufnahme und Steuerung bereit. Es ist vorteilhaft, dass die analogen Ausgangssignale dazu verwendet werden, die mit den Photodetektoren **466A** und **466B** in Verbindung stehenden Verstärker zu justieren. Die analogen Eingangskanäle messen sowohl die Temperatur der Probe mit Hilfe des Thermoelements **499** als auch die von der Probe durch die Photodioden detektierte Fluoreszenz. Die in der **Fig. 21** dargestellte Benutzeroberfläche und Instrumentensteuerung stellt auch eine digitale Ausgangssteuerung der Anregungsstrahlungsquelle **468**, der Richtung des Schrittmotors **488**, der Heizkartusche **474**, und des Ventilators **498** bereit.

**[0240]** Wenn eine kontinuierliche Fluoreszenzüberwachung der PCR Proben, die den Doppelstrang DNS Farbstoff SYBR® Green I oder fluoreszierend markierte Oligonukleotide beinhalten, stattfindet, können Sonden dazu verwendet werden, die Hybridisierung und das Schmelzen, während der einzelnen Vervielfältigungszyklen zu überwachen. Diese Information kann für verschiedene Ausgestaltungen der Benutzeroberfläche und Instrumentensteuerung **500** verwendet werden, um verbesserte und kundengerechte Temperaturzyklusbedingungen bereitzustellen. Die Vorteile des Verwendens der Hybridisierungs-Informationen für den Temperaturzyklus beinhalten:

- (A) Das Sicherstellen, dass eine vollständige Denaturierung des PCR Produkts bei jedem Zyklus auftritt, wobei:
  - das den exzessiven hohen Denaturierungstemperaturen Aussetzen minimiert wird, wodurch hitzebedingte Schäden an den Vervielfältigungsprodukten und der Polymerase vermieden werden;
  - die Reaktionsspezifität gesteigert wird, indem die Denaturierungstemperatur minimiert wird, was Produkte mit einem höheren  $T_m$  als das beabsichtigte Vervielfältigungsprodukt ausselektiert.
- (B) Das Maximieren der Vervielfältigungseffizienz, indem eine angemessene Zeit für die Produktverlängerung in jedem Zyklus sichergestellt ist, wobei:
  - der Zeitbetrag, der für die Vervielfältigung erforderlich ist, minimiert wird, indem die Vervielfältigung nicht länger als für die vollständige Produktverlängerung nötig ist, zugelassen wird;
  - die Reaktionsspezifität verbessert wird, indem längere Produkte als das beabsichtigte Vervielfältigungsprodukt ausselektiert werden.
- (C) Das Maximieren der Vervielfältigungseffizienz, indem eine angemessene Zeit für die Produktverlängerung in jedem Zyklus sichergestellt wird, wobei:
  - der für die Vervielfältigung nötige Zeitbetrag minimiert wird, indem die Vervielfältigung als nicht länger als für die vollständige Produktverlängerung zugelassen wird;
  - Die Reaktionsspezifität verstärkt wird, indem Produkte, die länger als das beabsichtigte Vervielfältigungsprodukt sind, ausselektiert werden. Dies würde mehr Zeit erfordern, als Zeit zugeteilt ist, um die Produktverlängerung zu vervollständigen.
- (D) Das Initieren der thermalen Zyklusänderungen abhängig von dem Level der erhaltenen Fluoreszenz oder der gegenwärtigen Effizienz der Vervielfältigung. Zum Beispiel, können Über-Vervielfältigung und nicht-spezifische Reaktionsprodukte dadurch minimiert werden, dass der Temperaturzyklus beendet wird, wenn die Effizienz unter ein bestimmtes Level fällt. Wie in einem anderen Beispiel, kann der Temperaturzyklus modifiziert werden, um langsamere Temperaturrampen für die Schmelzkurvenaufnahme zu initiieren, wenn die Fluoreszenz detektierbar wird. Dies spart Zeit, da die langsameren Rampen nicht in früheren Zyklen verwendet werden müssen. Andere erstrebenswerte Änderungen werden evident durch das regelmäßige Verwenden der Erfindung.
- (E) Das Minimalisieren der Über-Vervielfältigungs-Schäden an dem PCR Produkt und/oder Initiieren der Schmelzkurvenaufnahme, bevor die Über-Vervielfältigung den Hintergrund der nicht-spezifischen Reaktionsprodukte vergrößert hat.

**[0241]** Die Benutzeroberfläche und die Instrumentensteuerung **500** können vorprogrammierten Zeit/Temperatur-Sollwerten folgen, und/oder können, vorteilhafterweise, detektierte Fluoreszenzwerte aufnehmen und die aufgenommenen Fluoreszenzwerte dazu verwenden, einen oder mehrere Reaktionsparameter in Echtzeit zu ändern oder anzupassen, um die erhaltenen Resultate zu optimieren. Wie hier verwendet wird, beinhaltet, aber ist nicht darauf beschränkt, der Begriff "Reaktionsparameter" jeden Parameter, der als Basis für das Steuern einer Reaktion verwendet wird. Diese Reaktionsparameter beinhalten, sind aber nicht darauf beschränkt, die Denaturierungstemperatur und -zeit, die Primeranlagerungstemperatur und -zeit, die Sondenanlagerungstemperatur und -zeit, die Enzymverlängerungstemperatur und -zeit, und die Anzahl der Zyklen. Im allgemeinen ist die Steuerung der Reaktion anfänglich auf einer Abschätzung der Reaktionsparameter aus den Fluoreszenzdaten basiert. Die ursprünglichen Fluoreszenzdaten werden entweder als Änderung der Fluoreszenz über die Zeit (Temperaturspezifische Raten der Denaturierung, Anlagerung und Verlängerung), oder als Änderung der Fluoreszenz über die Temperatur (Produkt- oder Sonden  $T_m$ ), oder als Änderung im Umfang der Vervielfältigung (Vervielfältigungsausbeute und -effizienz) aufgenommen. Diese Geschwindigkeiten,  $T_m$ s, und ihre ersten und zweiten Ableitungen werden dazu verwendet, die optimalen Reaktionsparameter, wie Denaturierungstemperatur und -zeit, Primeranlagerungstemperatur und -zeit, Sondenanlagerungstemperatur und -zeit, Enzymverlängerungstemperatur und -zeit und Anzahl der Zyklen festzulegen.

**[0242]** Wie in dem hochwertigen Blockdiagramm von **Fig. 22C** gezeigt ist, werden die Aufgaben aufgeteilt zwischen denen, die von einem Teil der Benutzeroberfläche und Instrumentensteuerung **500** (was vorzugsweise eine IBM kompatibler Computer sein kann, der eine auf den hier dargelegten Lehren basierende Programmierung verwendet) (die Blöcke **500A** bis **500E** in **Fig. 22C**) ausgeführt werden, und denen, die von den verbleibenden Komponenten (Blöcke **500A** und **500G** bis **500S** in **Fig. 22C**) des schnellen zyklischen Temperaturwechsels mit Epifluoreszenzdetektion **400** ausgeführt werden. Es sollte klar sein, dass das Blockdiagramm von **Fig. 22C** lediglich exemplarisch ist.

**[0243]** Als ein Beispiel für die Vorteile des in **Fig. 22C** gezeigten Aufbaus, wird die Steuerung des Produktschmelzens diskutiert. Ein Schmelzsignal-Fluoreszenzwert wird für das beabsichtigte PCR Produkt aufgenommen und eine Ausgangswert-Fluoreszenz wird für die Probe, die das Reaktionsgemisch enthält, bei der Temperatur, bei der sichtbar ist, dass das Produkt vollständig geschmolzen ist, aufgenommen. Jeder Zyklus der Reaktion benutzt diesen Fluoreszenzwert als Zielwert. Der in diesem Beispiel beschriebene Ansatz verwendet zwei Stufen, um eine Zeitverzögerung bereitzustellen, um der Anforderung zu entsprechen, den Fluoreszenzwert an einen separaten PC Computer zu schicken. Mit jedem Produktschmelzschnitt, wird die Temperatur erhöht bis die Fluoreszenz einen Zwischenwert erreicht, dann wird die an die Heizvorrichtung angelegte Leistung reduziert, so dass eine Temperaturrampe von ungefähr 3°C pro Sekunde ausgeprägt wird, damit der PC Computer genügend Zeit hat, die Fluoreszenz zu analysieren und an die anderen Komponenten zu übermitteln, dass eine Produktdenaturierung aufgetreten ist. Das resultierende Zeit/Temperatur-Diagramm ist in **Fig. 22D** gezeigt. **Fig. 22D** zeigt einen charakteristischen Anstieg in der Schmelztemperatur nach 20 Zyklen, da die Konzentration des Vervielfältigungsprodukts wächst. Dies ist bedingt durch die Tatsache, dass die Produkt  $T_m$  eine Funktion der Produktkonzentration ist.

**[0244]** Als ein Beispiel der weiteren Vorteile des in **Fig. 22C** gezeigten Arrangements wird die Produktanlagerung-/verlängerung diskutiert. Während eines ausgedehnten Haltens auf einer kombinierten Anlagerungs-/Verlängerungstemperatur, wird die Fluoreszenz der Probe aufgenommen, und die Information wird dazu verwendet, dass eine angemessene, aber nicht übermäßige Zeit für die Produktverlängerung zugelassen wird. Die Fluoreszenz wird in 10 Sekunden Intervallen aufgenommen, und, wenn die Fluoreszenz mehr steigt als ein vorher festgelegtes Verhältnis (typischerweise 1,0 bis 1,05), wird der Anlagerungs-/Verlängerungsschritt fortgesetzt. Andererseits wird der nächste Produktschmelzschnitt initiiert. Das Intervall von 10 Sekunden ist so gewählt, dass ein Minimum von 20 Sekunden auf der kombinierten Anlagerungs-/Verlängerungstemperatur garantiert wird.

**[0245]** **Fig. 22E** zeigt ein Fluoreszenz/Zeit Diagramm, das einen charakteristischen Anstieg in der Verweildauer auf der kombinierten Anlagerungs-/Verlängerungstemperatur, wenn die Konzentration des Vervielfältigungsprodukts wächst, darstellt. Dies ist bedingt durch die Tatsache, dass, da die Primerkonzentration und die Polymerase begrenzt werden, mehr Zeit benötigt wird, um die Produktvervielfältigung mit jedem Zyklus zu vollenden.

**[0246]** Als noch ein anderes Beispiel der Vorteile der in **Fig. 22C** gezeigten Anordnung wird das Vervielfältigungs- "Plateau" diskutiert. Am Ende jedes Anlagerungs-/Verlängerungsschritts, wird der Fluoreszenzwert aufgenommen und gespeichert. Wenn dieser Wert auf das 1,2-fache des niedrigsten Endzyklus-Fluoreszenzwerts ansteigt und dann unter einem Benutzer definierbaren Verhältnis (typischerweise 1,0 bis 1,02) aufhört

zu Wachsen, wird der Temperaturzyklus abgebrochen. Alternativ wird ein Schmelzkurven-Aufnahmeschritt initiiert, indem eine langsame Temperaturrampe von  $0,1^{\circ}\text{C/sec}$ – $0,2^{\circ}\text{C/sec}$  durch das Produkt  $T_m$  eingegeben wird und die Fluoreszenz kontinuierlich überwacht wird. Das in **Fig. 22D** gezeigte resultierende Fluoreszenz/Zeit-Diagramm zeigt, dass nach 25 Vervielfältigungszyklen das Verhältnis des Zyklus- für Zyklus Fluoreszenzwachstums unter 1,0 fällt und die Reaktion abgebrochen wird. Es ist verständlich, dass dieser Ansatz dazu verwendet werden kann, für jede Probe eine hoch aufgelöste Schmelzkurve aufzunehmen. Wenn eine Probe sein Vervielfältigungs- "Plateau" erreicht, kann eine Schmelzkurve für diese Probe aufgenommen werden, dann kann der reguläre Temperaturzyklus wieder aufgenommen werden, bis eine andere Reaktion ihr Vervielfältigungs- "Plateau" erreicht.

**[0247]** **Fig. 22E** zeigt nützliche Temperatur-gegen-Zeit Abschnitte für die Fluoreszenz-Hybridisierungs-Überwachung. Die Produktschmelzkurven werden während eines langsamen Temperaturanstiegs auf die Denaturierung erhalten. Indem die Temperatur nach der Denaturierung schnell auf eine konstante Temperatur erniedrigt wird, können Produkt-, Sonden-, oder Primeranlagerung detektiert werden. Die Probenschmelzkurven werden durch ein langsames Erwärmen rund um die Temperatur der Sonden- $T_m$  erhalten. Die Fachleute können ohne Weiteres das in **Fig. 21** dargestellte System dazu verwenden, die nötige Analyse während des Temperaturzyklus bereitzustellen, wenn gewünscht in Echtzeit, um bis dahin die nicht zugänglichen Informationen der Eigenschaften des Produkts, der Sonde und des Primers bereitzustellen, wobei die hier beschriebene Hardware und Software benutzt wird.

**[0248]** Der absolute mengenmäßige Nachweis des Produkts wird ebenfalls vorteilhafterweise gemäß vorliegender Erfindung ausgeführt. Das kontinuierliche Überwachen der Doppelstrang DNS-Bildung erlaubt einen direkten, absoluten mengenmäßigen Nachweis der DNS durch die Wiederanlagerungskinetiken. Die Proben-temperatur wird schnell von der Denaturierungstemperatur verringert und auf einer niedrigeren Temperatur, die aber noch hoch genug ist, um eine Anlagerung der Primer zu verhindern, konstant gehalten. Die dann folgende Wiederanlagerungsgeschwindigkeit des Produkts folgt einer Kinetik zweiter Ordnung. Wenn verschiedene DNS-Konzentrationen getestet werden, ist die Form der Wiederanlagerungskurve charakteristisch für die DNS-Konzentration (vgl. **Fig. 26**). Für jedes beliebige gestellte PCR Produkt und jede Temperatur, kann eine Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung gemessen werden. Ist die Geschwindigkeitskonstante einmal bekannt, kann jede unbekannte DNS-Konzentration aus den experimentellen Wiederanlagerungsdaten bestimmt werden. Die Kurven können durch eine nicht-lineare Fehlerquadratregressionsmethode während des Temperaturzyklus in Echtzeit angepasst werden, indem die LabView Programmierumgebung (vorher erläutert) verwendet wird. Das Kühlen erfolgt nicht instantan, und es tritt ein wenig Wiederanlagerung auf, bevor eine konstante Temperatur erreicht wird, aber gemäß vorliegender Erfindung berücksichtig dies die Regressionsanalyse. Die Technik erfordert eine reines PCR Produkt, aber dies kann verifiziert werden, indem die Schmelzkurven auch während des Temperaturzyklus aufgenommen werden. Der mengenmäßige Nachweis durch die Wiederanlagerungskinetik ist unabhängig von einem Signallevel und wird nicht durch Unterschiede in dem Probenvolumen beeinflusst.

**[0249]** **Fig. 28** ist eine schematische Darstellung eines anderen Geräts, das mehrere in dem Ausführungsbeispiel von **Fig. 21** beinhaltete Strukturen aufweist. Um eine knappe Beschreibung des Ausführungsbeispiels von **Fig. 28** bereitzustellen, werden nur die signifikanten Unterschiede zwischen den in **Fig. 21** dargestellten Komponenten und den in **Fig. 28** dargestellten Komponenten erläutert, wobei es selbstverständlich ist, dass ein Fachmann ohne Weiteres die hier dargelegten Informationen dazu verwenden kann, die erfindungsgemäßigen Ausführungsbeispiele herzustellen. **Fig. 27A** und **27B** sind schematische Querschnittsansichten des in **Fig. 28** dargestellten Ausführungsbeispiel in einem Betriebs- bzw. einem Beladezustand.

**[0250]** Das in **Fig. 28** dargestellte Ausführungsbeispiel ist ein schneller zyklischer Temperaturwechsler, der im allgemeinen mit **502** bezeichnet wird, mit Fluoreszenzdetektion an der Spitze des Probenbehälters, wobei die Probenbehälter automatisch in zwei Dimensionen ausgerichtet werden, was das Fluoreszenzsignal, das von der Probe erhalten wird, verbessert. **Fig. 29** ist eine perspektivische Ansicht des Äußeren eines Geräts, das die in der schematischen Darstellung von **Fig. 28** illustrierten Komponenten beinhaltet.

**[0251]** Wie in **de Fig. 28** und **29** zu sehen ist, hält ein entfernbare kreisförmiges Tablett **483** zweiunddreißig Proben. Das entfernbare kreisförmige Tablett **483** wird dann in den schnellen zyklischen Temperaturwechsler **502** gesetzt, so dass es mit einem Karussell **481**, das durch einen Motor **488** angetrieben wird, in Eingriff geht. Wenn sich das Karussell **481** dreht, wird ein Halleffekt-Positions-Lokalisator verwendet, um das Karussell **481** genau zu positionieren, so dass jede Probe exakt über einem Fluorimeteraufbau **459** positioniert wird. Der Fluorimeteraufbau **459** beinhaltet vorzugsweise eine LED-Quelle **459A**, drei Photodioden **459B**, fokussierende Linsen **459C**, und ein Filteraufbau **459D**. Der Fluorimeteraufbau **459** ähnelt in Konstruktion und Funktion dem

in **Fig. 20** dargestellten.

**[0252]** Besonders vorteilhafterweise ist das Fluorimeter auf einem Schlittenlager **493**, das durch einen lateralen Schrittmotor **491** bewegt wird, angebracht. Wenn sich das Karussell **481** dreht, werden die zusammengesetzten Plastik/Glas-Probenbehälter **450** genau über dem Fluorimeteraufbau **459** in Richtung des Karussells positioniert und die Position wird durch das Gerät mittels eines Halleffekt-Positions-Lokalisators **495** festgestellt, während der laterale Schrittmotor **491** die Position des Fluorimeteraufbau **459** in einer zweiten Dimension justiert, und die Position feststellt. Demnach stellt der zyklische Temperaturwechsler **502** eine verbesserte Platzierung der mehreren Proben in dem Gerät bereit, wobei ein entfernbares Probentablett **483** benutzt wird, und stellt damit eine verbesserte Detektion eines Fluoreszenzsignals von der Probe bereit.

**[0253]** In den **Fig. 30A** bis **30V** sind detaillierte schematische Diagramme bereitgestellt, die die bevorzugten Konfigurationen der elektrischen Komponenten des in den **Fig. 29** und **30** dargestellten schnellen zyklischen Temperaturwechslers **502** zeigen. Es ist selbstverständlich, dass die Diagramme in den **Fig. 30A** bis **30V** lediglich einen bevorzugten Aufbau für das Ausführen der bestimmten Aspekte vorliegender Erfindung darstellen, und die Diagramme nicht beabsichtigen, den Schutzbereich der vorliegenden Erfindung einzuschränken. Um die Klarheit der Diagramm zu verbessern, wurden die Bezeichnungen, die in der Industrie gewöhnlich verwendet werden, in diesen Diagrammen beibehalten und werden in der unten aufgeführten Liste der entsprechenden Teile aufgeführt.

Teilelist - Mainboard			
<u>Artikel</u>	<u>Anzahl</u>	<u>Bezugszeichen</u>	<u>Teil</u>
1	1	BT1	3V Lithium
2	9	C1,C2,C3,C8,C9,C13,C18,C24,C26	.1 UF
3	7	C4,C5,C10,C12,C14,C15,C17	1 UF
4	2	C7,C6	100 UF
5	6	C11,C16,C19,C20,C21,C22	18 pF

6	1	C23	47 UF
7	2	C25, C21	22 UF
8	2	C28,C29	10 UF
9	1	F1	1 A
10	1	IC1	AD594
11	2	IC2,IC3	DS5000FP
12	1	IC4	LM324
13	8	IC5,IC7,IC10,R13,R17,R18,R21,R22	10K
14	2	IC6,IC8	MS62256
15	2	IC9,IC10	DS2003
16	1	IC11	TLC1451
11	1	IC12	7432
18	1	IC13	PT5101
19	1	IC14	PT5102
20	1	IC15	7404
21	1	IC16	PIC16C54
22	1	IC17	MAX232
23	1	IC18	LM4040
24	1	IC19	LTC1293
25	1	IC20	LTC1286
26	1	IC21	LM385 1.2
27	1	IC22	LTC1144
28	2	IC23,IC24	PVG612S
29	1	JP1	HALL SENSOR
30	1	JP2	FLO1
31	1	JP3	FLO3
32	1	JP4	FLO2
33	1	JP5	MAIN HEADER
34	1	J1	CON2
35	1	LED1	STEP
36	1	LED2	TEMP
37	2	LED3,LED4	Rot/Grün LED
38	1	P1	SERIAL CONNECTOR

39	1	Q1	2N5484
40	10	Q2,Q3,Q4;Q5,Q6,Q7,Q8,Q9,Q10,Q11	NDS351
41	1	R1	4.87K 1%
42	4	R2,R4,R5,R6	10K 1%
43	1	R3	2.74K 1%
44	1	R7	200
45	8	RS,R9,R10,R11,R19,R20,R28,R29	470
46	2	R15,R12	100
47	3	R14,R16,R23	1K
48	4	R24,R25,R26,R27	4.7K
49	1	S1	TYPE J
50	1	Y1	20.0000
51	2	Y3,Y2	14.745600

Teileliste - POWER BOARD			
<u>Artikel</u>	<u>Anzahl</u>	<u>Bezugszeichen</u>	<u>Teil</u>
1	3	C1,C5,C6	330UF
2	1	C2	47UF
3	1	C3	1000UF
4	1	C4	22UF
5	1	C7	100UF
6	1	C8	220UF
7	5	C9,C10,C11,C12,C13	.1UF
8	2	C15, C16	10UF
9	2	DR1, DR2	IM481H
10	1	D1	IN5232
11	2	D2,D4	IN4756
12	2	D5,D3	11DQ06
13	1	F1	2A
14	4	IC1,IC2,IC3,IC4	HCPL2630
15	1	IC5	LM2574hv8

16	2	IC7,IC6	PVG612S
17	1	IC8	MOC 3020
18	1	IC9	TLC1451
19	1	IC10	LM324
20	1	IC11	BRIDGE
21	1	IC12	LTC1144
22	1	JP1	HEADER 14
23	2	JP2,JP3	4 HEADER
24	1	JP4	HEADER 12
25	2	L2,L1	330UH
26	1	Q1	4008
27	9	R1,R2,R4,R5,R6,R7,R8,R9,R10	470
28	1	R3	360
29	7	R11,R13,R14,R16,R17,R18,R19	10K
30	1	R12	4.7K
31	1	R15	1K
32	1	R20	261
33	1	R21	866
34	1	R22	650
35	1	R23	180
36	2	S1,S2	110/220
37	1	T1	TRANSFORMER FLAT COMPACT
38	1	VR1	LM2575

Teileliste - INTEGRATOR			
Artikel	Anzahl	Bezugszeichen	Teil
1	2	C1,C2	1UF
2	1	C3	.01
3	1	IC1	ACF2101
4	1	IC2	OPT301
5	1	IC3	OPA627

6	1	IC4	REF200
7	1	J1	CON6
8	1	P1	500
9	1	R1	30M
10	1	R2	100K
11	2	R3,R4	10K
12	2	R5,R6	100

Teileliste - HALL EFFEKT			
Anzahl	Menge	Bezugszeichen	Teil
1	1	IC1	HAL115
2	1	J1	CON3
3	1	R1	10K

**[0254]** Der beispielhafte Programmcode, der in Verbindung mit den Komponenten aus den **Fig. 28, 29 und 30A** bis 30V verwendet wurde, ist im Programmcodeanhang B, der dieser Beschreibung beiliegt beschrieben.

**[0255]** Ein Handhabungssystem ist bereitgestellt, um kleinvolumige Probenbehälter mit flüssigen Proben zu befüllen, insbesondere Proben, die durch die Detektion der emittierten Fluoreszenz analysiert werden. Die Probenbehälter weisen typischerweise ein Volumen von weniger als 1 ml auf, und können in Form eines Röhrchens vorliegen (d. h. ein Kapillarröhrchen) oder einer "flachen" Kapillare, wobei der kapillare Raum durch zwei voneinander räumlich getrennten Platten oder Blättern, die an ihren Enden miteinander verschweißt sind, definiert ist. Die Probenbehälter weisen typischerweise ein Volumen-zu-Außenfläche Verhältnis von ungefähr 1 mm, noch typischerweise von weniger als 0,5 mm auf. Die Kapillarröhrchen mit einem Innendurchmesser von weniger als 1 mm weisen ein Volumen-zu-Oberfläche Verhältnis von weniger als 0,25 mm auf. Das verwendete Behältnis ist vorzugsweise aus einem optisch transparenten Material gebildet. Bevorzugte Materialien sind optisch durchlässig für Licht mit einem Wellenlängenbereich von ungefähr 400 nm bis ungefähr 800 nm. Die Verwendung solcher Materialien ermöglicht die Detektion eines Fluoreszenzsignals, das in einer in dem Behälter enthaltenen flüssigen Probe erzeugt wird. Darüber hinaus ermöglicht die Verwendung von Behältern mit einem niedrigen Volumen-zu-Oberfläche Verhältnis für die Analyse der Fluoreszenz von einer fluoreszierenden Probe eine effizientere Detektion der Fluoreszenz bedingt durch die verbesserte innere Totalreflexion.

**[0256]** Behälter mit einer großen Oberfläche-zu-Volumen Verhältnis (oder andersherum einem niedrigen Volumen-zu-Oberfläche Verhältnis) können schwierig mit einer flüssigen Probe zu befüllen sein. Vorteilhafterweise hilft das Probenhandhabungssystem dabei diese Schwierigkeiten zu überwinden. Ein Behälter mit einem hohen Oberfläche-zu-Volumen Verhältnis und einem offenen Ende ist mit einer trichterförmigen Kappe, die auf das offene Ende des Behälters passt, ausgestattet, um das Einfüllen der flüssigen Proben in den Behälter zu erleichtern. Die trichterförmige Kappe beinhaltet eine erste Probenaufnahmeöffnung und eine zweite Probentransferöffnung und eine Vorrichtung zum lösabaren Befestigen der trichterförmigen Kappe an dem Behälter, so dass die Probentransferöffnung der trichterförmigen Kappe und das offene Ende des Behälters zueinander ausgerichtet sind. Die trichterförmige Kappe kann eine Plastik- oder Gummikonstruktion sein und ist derart ausgebildet, dass der innere Durchmesser der Probentransferöffnung einen Reibschluss mit dem äußeren Durchmesser des Behälters in der Nähe von dessen offenem Ende eingeht. Trotzdem sind den Fachleuten auch andere Vorrichtungen zum aneinander Koppeln der trichterförmigen Kappe und des Behälters bekannt, die die Verwendung von Klebstoff, Klammern, Spangen und ähnlichem umfassen. Das Probenhandhabungssystem kann weiterhin einen Stöpsel für eine zu versiegelnde Reibschlussverbindung mit der Probenaufnahmeöffnung der trichterförmigen Kappe beinhalten. Dennoch kann jede Vorrichtung oder jedes Material, das dazu geeignet ist, die Öffnung der trichterförmigen Kappe effektiv zu versiegeln, verwendet werden, um eine Kontamination oder Verdunstung der eingefüllte Probe zu verhindern.

**[0257]** Vorteilhafterweise können die Behälter in einem Verfahren zum Verbessern der Detektion und Effizi-

enz der Fluoreszenzaufnahme in einer einen Fluorophor umfassenden Probe verwendet werden. Das Verfahren umfasst den Schritt des Platzierens einer Probe in einem Behälter mit Wänden, die aus einem optisch transparenten Material bestehen und ein Volumen mit zumindest erster und zweiter Abmessung definiert. Die erste Abmessung ist kleiner als die zweite Abmessung und das Verhältnis von Volumen-zu-Außenfläche des Behälters beträgt weniger als 1 mm. Die verbesserte Detektion und Effizienz der Aufnahme der Fluoreszenz, die von der Probe erzeugt wird, wird durch das Detektieren der Fluoreszenz entlang einer Achse, die im wesentlichen parallel zu einer Wand entlang der zweiten Abmessung des Behälters ist, erreicht. In einem Ausführungsbeispiel wird die Probenfluoreszenz durch die den Fluorophor anregende Beleuchtung der Proben induziert, wobei die Probe entlang einer Achse beleuchtet wird, die im wesentlichen parallel zu einer Wand entlang der zweiten Abmessung des Behälters ist. In einem bevorzugten Ausführungsbeispiel, wird die optimale Effizienz der Fluoreszenzaufnahme durch eine den Fluorophor anregende Beleuchtung entlang der Fluoreszenz-Detektionsachse (Epifluoreszenz Detektion) erreicht, und die Fluoreszenz wird entlang einer Achse durch eine Wand des Behälters mit der kleinsten Oberfläche, vorzugsweise entlang einer Achse durch den Boden des Behälters, detektiert.

**[0258]** Die Fluoreszenz der biologischen Probe kann temperaturabhängig sein. Zum Beispiel kann das Gefäß eine Probe mit Nukleinsäuresequenzen enthalten, und die fluoreszierende Einheit kann einen Doppelstrang-spezifischen Farbstoff enthalten. Wenn die Temperatur der Probe auf die Denaturierungstemperatur erhöht wird, verringert sich die Fluoreszenz-Intensität. Alternativ kann die fluoreszierende Einheit ein Paar der Oligonukleotid-Sonden enthalten, die in benachbarten Bereichen der Ziel-Nukleinsäuresequenz hybridisieren, wobei eine der Sonden mit einem Donor-Fluorophor eines Fluoreszenzenergietauschers markiert ist.

**[0259]** Der Behälter ist in Form eines Kapillarröhrchens oder einer flachen Kapillare ausgebildet, die vorteilhafterweise in Prozessen, die einen Temperaturzyklus der Probe erfordern, beispielsweise der Vervielfältigung einer Ziel-Nukleinsäuresequenz mittels der Polymerasekettenreaktion, verwendet werden können. In einem Beispiel ist der kapillare Behälter derart ausgebildet, dass er in einen Probenhalter einer für den Temperaturzyklus verwendeten Vorrichtung oder einer für die Fluoreszenzdetektion verwendeten Vorrichtung eingeführt werden kann. Der Probenhalter der Vorrichtung kann nur einen einzelnen Behälter enthalten, oder der Probenhalter kann in Form eines Karussells zum Halten mehrerer Probenbehälter ausgebildet sein.

**[0260]** Das für diese Verwendung geeignete Karussell ist in den **Fig. 31A** und **31B** dargestellt. Das Karussell **1** ist im allgemeinen in der Form einer Scheibe **2** mit einer oberen Fläche **3**, einer unteren Fläche **4** und einem äußeren Rand **5**, der sich dazwischen erstreckt, ausgebildet. Die Scheibe **2** hat in der oberen Fläche mehrere Sätze radial angeordneter Probenaufnahmeöffnungen **6A**, **6B**, und **6C**, im äußeren Rand **5** eine Probenbehälteröffnung **7** und einen Probendurchgang **8**, der die Probenaufnahmeöffnungen **6A**, **6B**, und **6C** und die entsprechende Probenbehälteröffnung **7** miteinander verbindet. Das Karussell **1** wird mit befestigten Probenbehältern, von denen einige mit **9** bezeichnet sind, gezeigt. Die Probenbehälteröffnung **7** und der Probendurchgang **8** sind dazu ausgebildet, die Probenbehälter in der Scheibe **2** aufzunehmen und zu fixieren. In einem Ausführungsbeispiel ist der Probenbehälter **9** lösbar an dem Karussell **1** befestigt, um ein Entfernen des Probenbehälters **9** und dessen Ersatz durch einen anderen Probenbehälter zu ermöglichen, um das Karussell **1** für den mehrfachen Gebrauch zuzulassen. In einem alternativen Ausführungsbeispiel sind die Probenbehälter **9** permanent an der Scheibe **2** befestigt, oder als integrale Komponente von ihr ausgebildet. In einem Ausführungsbeispiel ist der Probenbehälter **9** an der Scheibe **2** durch Reibkontakt zwischen dem Probenbehälter **9** und mindestens einem Teil des Probendurchgangs **8** in der Nähe der Probenbehälteröffnung **7** fixiert. Andere herkömmliche Vorrichtungen zum Befestigen des Probenbehälters in Verbindung mit der Probenbehälteröffnung können verwendet werden. Zum Beispiel können komplementäre Schraubengewinde an der Fläche des Probendurchgangs **8** und an der Außenfläche der Probenbehälter **9** ausgebildet sein. Zusätzlich können Klebstoffe oder andere den Fachleuten bekannte Befestigungsmittel im Zusammenhang mit vorliegender Erfindung verwendet werden, um den Probenbehälter **9** an der Scheibe **2** zu befestigen. Die oberen und unteren Flächen des erfindungsgemäßen Karussells sind vorzugsweise derart ausgebildet, dass mehrere Karusselle übereinander gestapelt werden können, so dass ein Stapel von mehreren Karussellen lösbar mit einer Antriebswelle eines Motors in Eingriff gehen kann, und simultan als Einheit, wie in **Fig. 32** gezeigt wird, gedreht werden kann.

**[0261]** Das in **Fig. 32** gezeigte Ausführungsbeispiel beinhaltet einen Schrittmotor **504** und eine Antriebswelle **506**, die dazu dient, die im allgemeinen als **1** bezeichneten Karusselle zu drehen. Ein Kammerventilator **508** wird dazu verwendet, einen Luftstrom, der durch die Pfeile **512** gekennzeichnet ist, zu erzeugen. Eine Heizvorrichtung **510** dient dazu, die Luft, die an den Probebehältern **9** vorbeiströmt, zu erwärmen. Ein Fluorimeteraufbau **514** beinhaltet eine LED Quelle **514A**, Photodioden **514B**, fokussierende Linsen **514C**, und einen Filteraufbau **514D**. Ein Fluorimeter-Schrittmotor **516** dient dazu, den Fluorimeteraufbau **514** in Richtung des Pfeils **518** zu bewegen. Die Fachleute können problemlos die in der **Fig. 32** dargestellten Anordnungen her-

stellen, wobei die hier dargelegten Informationen verwendet werden.

**[0262]** In einem anderen Ausführungsbeispiel (nicht dargestellt) umfasst das Karussell eine Scheibe mit einer oberen Fläche, einer unteren Fläche, einem sich dazwischen erstreckenden Außenrand, eine Probenaufnahmeöffnung in der oberen Fläche, eine Probenbehälteröffnung in der unteren Fläche und einen Probendurchgang, der die Probenaufnahmeöffnung und die Probenbehälteröffnung miteinander verbindet. Die Probenbehälteröffnung und der Probendurchgang sind dazu ausgebildet, die Probenbehälter in der Scheibe aufzunehmen und zu fixieren. Vorzugsweise werden die Probenbehälter in einem sich radial erstreckenden spitzen Winkel an der unteren Fläche der Scheibe gehalten.

**[0263]** In einem Ausführungsbeispiel umfasst der Probendurchgang der Scheibe einen ersten Teil mit einer Mittelachse, die im wesentlichen parallel zu der oberen und unteren Fläche der Scheibe verläuft, und einen zweiten Teil mit einer Mittelachse, die einen spitzen Winkel mit der oberen und unteren Fläche der Scheibe bildet. In diesem Ausführungsbeispiel sind die Probenbehälteröffnung und der Probendurchgang dazu ausgebildet, einen Probenbehälter an der Scheibe aufzunehmen und zu fixieren, so dass sich der Probenbehälter von der Scheibe weg in einem spitzen Winkel relativ zu der unteren Fläche der Scheibe erstreckt.

**[0264]** Das Karussell **1** ist weiterhin mit einer Vorrichtung zum Verschließen der Probenaufnahmeöffnungen **6A**, **6B**, und **6C** ausgestattet. Die Verschließvorrichtung kann ein Stöpsel (nicht dargestellt) sein, der in die Probenaufnahmeöffnung **6** passt und in Reibschluss mit den umliegenden Wänden des Probendurchgang geht, oder zum Beispiel ein Band mit einer klebenden Rückseite sein, das an der oberen Fläche angebracht wird, um effektiv die Öffnung der Probenaufnahmeöffnung zu versiegeln, um eine Kontamination oder Verdunstung der eingefüllten Probe zu verhindern. Das Karussell **1** ist lösbar mit einer Antriebswelle für eine Rotation verbunden. Jedes geeignete Verbindungsmittel, das den allgemeinen Fachleuten vertraut ist, kann verwendet werden, inklusive Reibschlussverbindung, oder die Verwendung von Schrauben, Bolzen, Haltestiften oder Klammern. In einem Ausführungsbeispiel ist die Scheibe **2** als Ring mit einem Mittelloch, das dazu ausgebildet ist, die Antriebswelle aufzunehmen (vgl. **506** in **Fig.** 32), ausgebildet. Das Ende der Antriebswelle ist vorzugsweise mit Strukturen, um die Scheibe an Ort und Stelle zu halten, ausgestattet.

**[0265]** Das Karussell **1** kann dazu verwendet werden, eine flüssige Probe in einen Probenbehälter **9** zu liefern. In einem Ausführungsbeispiel ist der Probenbehälter ein kapillarer Behälter, der eine vorgemischte Mischung (zum Beispiel eine Reagenzmischung) enthält, die mit einem oder mehreren Komponenten der einführt Probe interagieren. Gemäß einem Ausführungsbeispiel wird eine vorgemischte Mischung in den Probenbehälter zugegeben, bevor ein kapillarer Probenbehälter in der Probenbehälteröffnung positioniert wird. Alternativ ist der Probenbehälter mit einer vorgemischten Probe bereits fertig abgepackt. Die vorgemischte Probe kann ein Reagenz enthalten, das mit der Probe reagiert oder interagiert, um ein detektierbares Signal oder ein Produkt-Derivat zu erhalten.

**[0266]** Die Probendurchgänge **8** des Karussells **1** sind vorzugsweise mit einer oder mehreren Barrieren **10** ausgestattet, die verhindern, dass eine durch die Probenaufnahmeöffnungen **6A**, **6B**, und **6C** gelieferte Probe in die Probenbehälteröffnung **7** fließt, ohne dass eine beeinflussende Kraft auf die flüssige Probe wirkt. Die Bezeichnung "Barriere" wird hier verwendet, um jede Konstruktion, die den freien Fluss einer in einer Probenaufnahmeöffnung angelieferten Probe zu der Probenbehälteröffnung behindert, zu umfassen. Beispiele geeigneter Barrieren für die Verwendung in dem Probendurchgang des Karussells beinhalten in dem Probendurchgang ausgebildete Vertiefungen oder Senken, den Probendurchgang verengende Vorsprünge oder ringförmige Ränder, die sich von der Oberfläche des Probendurchgangs erstrecken, poröse Membrane, gerichtete Ventile, oder Klappen, die zu einer geschlossene Position tendieren.

**[0267]** Die Barrieren sind derart ausgebildet, dass die flüssige Probe die Barriere überwinden kann, wenn eine beeinflussende Kraft auf eine flüssige Probe, die in dem Probendurchgang vorhanden ist und durch die Barriere blockiert wird, angelegt wird. Das Anlegen einer beeinflussenden Kraft auf die Probe wird vorzugsweise durch eine Zentripetalkraft, die durch die Drehung des Karussells erzeugt wird, versehen. Deshalb können, in einem Karussell mit mehreren Sätzen von Probenaufnahmeöffnungen **6A**, **6B**, und **6C**, in der oberen Fläche, wobei jeder Satz mit einem entsprechenden Probendurchgang und einer entsprechenden Probenbehälteröffnung ausgestattet ist, die Proben individuell den verschiedenen Probenaufnahmeöffnungen zugegeben werden, und die Barriere wird die flüssige Probe lokalisieren und die Proben daran hindern, in die entsprechenden Probenbehälteröffnungen zu fließen. Nachdem alle Proben in den entsprechenden Aufnahmeöffnungen angeliefert sind, wird das Karussell gedreht, um die Proben an die entsprechende Probenbehälteröffnung und in ein damit verbundenen Probenbehälter zu liefern.

**[0268]** Jeder Probendurchgang des Karussells ist mit einer einzelnen Probenbehälteröffnung und mehreren Probenaufnahmehöfnnungen verbunden. Gemäß diesem Ausführungsbeispiel kann der Probendurchgang optional einen Mittelverbindungsweg aufweisen, der sich verzweigt, um sich mit den mehreren Probenaufnahmehöfnnungen zu verbinden, oder alternativ, wie in den **Fig. 31A** und **31B** gezeigt ist, können die mehreren Probenaufnahmehöfnnungen **6A**, **6B**, und **6C** entlang einer gemeinsamen Achse, die radial von der Mitte der Scheibe verläuft, ausgerichtet sein, wobei jede der Öffnungen durch den einen Verbindungsweg mit einem Probenbehälter in Verbindung steht, der in der Probenbehälteröffnung aufgenommen ist. Der Probendurchgang kann mit einer oder mehreren Barrieren **9A** ausgestattet sein, die eine Probe, die an einer der mehreren Probenaufnahmehöfnnungen zugegeben wurde, daran hindern, in die Probenbehälteröffnung zu fließen, wenn keine beeinflussende Kraft auf die flüssige Probe wirkt. Darüber hinaus kann jeder Probendurchgang mit mehreren Barrieren ausgestattet sein, von denen jede einen unterschiedlichen Betrag der beeinflussenden Kraft erfordert, um die Probe über die Barriere zu transferieren. Gemäß diesem Ausführungsbeispiel können, nachdem die Probe an die entsprechenden Probenaufnahmehöfnnung geliefert ist, die individuellen Proben selektiv zu der Probenbehälteröffnung und in den Probenbehälter transferiert werden, indem die Rotationsgeschwindigkeit des Karussells gesteuert wird.

**[0269]** Zum Beispiel kann eine erste Probe in eine erste Probenaufnahmehöfnnung und eine zweite Probe in eine zweite Probenaufnahmehöfnnung geliefert werden, wobei die erste und zweite Probenaufnahmehöfnnung über einen gemeinsamen Probendurchgang in Verbindung miteinander stehen, und die erste und die zweite Probenaufnahmehöfnnung jeweils mit einer Barriere ausgestattet sind, die den Fluss der ersten bzw. zweiten Probe behindert. Die Barrieren ermöglichen, dass die Scheibe als Teil eines Bausatzes mit vorgegebenen Mengen von ausgewählten Reagenzien, Katalysatoren, Enzymen, Ölen, etc. die bereits in den Probendurchgang über die eine oder die mehreren Probenaufnahmehöfnnungen vorgefüllt wurden, vorgesehen sein können.

**[0270]** In einem Ausführungsbeispiel ist die Barriere für die zweite Probenaufnahmehöfnnung derart ausgebildet, dass eine größere beeinflussende Kraft an die Probe, die an der zweiten Probenaufnahmehöfnnung angeliefert wurde, angelegt werden muss, damit sie die zugehörige Barriere überwindet, als für eine Probe, die an der ersten Probenaufnahmehöfnnung angeliefert wurde, erforderlich ist, um deren zugehörige Barriere zu überwinden. Gemäß diesem Ausführungsbeispiel, liefert die Drehung des Karussells mit einer ersten Geschwindigkeit die erste Probe an die Probenbehälteröffnung und in den Probenbehälter, während die zweite Probe daran gehindert wird, zu der Probenbehälteröffnung und in den Probenbehälter zu fließen. Die Drehung mit einer erhöhten zweiten Geschwindigkeit wird dann die Zentripetalkraft auf die zweite Probe verstärken, und in der Anlieferung der zweiten Proben an der Probenbehälteröffnung und in dem Probenbehälter resultieren. Basierend auf diesem Prinzip können verschiedene Proben an mehrere Probenaufnahmehöfnnungen, die mit einem gemeinsamen Probendurchgang miteinander in Verbindung stehen, geliefert werden, und nachdem alle Proben eingefüllt wurden, können die individuellen Proben eine nach der anderen oder simultan an die Probenbehälteröffnung und in den Probenbehälter abgegeben werden, indem die Rotationsgeschwindigkeit des Karussells gesteuert wird. In einem Ausführungsbeispiel wird eine erste Probe mit einem Fluorophor einer ersten Probenaufnahmehöfnnung zugegeben und eine zweite Probe mit Öl wird an der zweiten Probenaufnahmehöfnnung angeliefert. Das Karussell wird dann gedreht, um die erste Probe in den Probenbehälter zu liefern, gefolgt von dem Öl. Das Öl (oder eine andere Flüssigkeit, die effektiv die erste Probe in dem Probenbehälter versiegelt) dient dazu, die Verdunstung der ersten Probe zu verringern und das Risiko der Kontamination der ersten Probe zu reduzieren.

**[0271]** In einem Beispiel wird ein Mehrere-Proben-Karussell dazu verwendet, mehrere Proben simultan zu handhaben. Das Karussell ist eine Scheibenförmige Struktur mit einer Vielzahl von Probenaufnahmehöfnnungen in der oberen Fläche der scheibenförmigen Struktur und in Fluidverbindung mit den entsprechenden an der Scheibe angebrachten Probenbehältern. Die an den Probenöffnungen zugegebenen Proben werden durch die Rotation des Karussells zu ihren entsprechenden Probenbehältern transferiert. Das Karussell kann auch mehrere Probenaufnahmehöfnnungen aufweisen, die mit jeweils einem individuellen Probenbehälter in Verbindung stehen. Die Reagenzien können von einem Benutzer in eine zweite Probenaufnahmehöfnnung, die mit dem Probenbehälter in Verbindung steht, platziert werden, um eine weitere Probe, die dem ersten Probenaufnahmehöfnnung zugegeben wurde, an den Behälter zu liefern, oder alternativ, können vorgegebene Reagenzien in einer zweiten Probenaufnahmehöfnnung durch einen Hersteller angeordnet sein, d. h. bei dem das Karussell, die Probenbehälter und die vorgegebenen Reagenzien bereits in einer verpackten Form sind. Die Reagenzien werden zusammen mit der Probe durch die Rotation des Karussells an den Probenbehälter geliefert. Ein Öl zum Überlagern der wässrigen Probe kann in eine dritte Probenaufnahmehöfnnung gegeben werden, die in flüssiger Verbindung mit dem Probenbehälter steht (und den ersten und zweiten Probenaufnahmehöfnnungen), oder das Öl kann von dem Hersteller dem Karussell zugegeben sein.

**[0272]** Alternativ können eine Probe, Reagenzien und Öl für die Probenüberlagerung an einer einzigen Probenaufnahmöffnung abgegeben werden. Das Karussell kann gedreht werden, um jede Zusammensetzung oder Probe an den entsprechenden Behälter abzugeben, bevor eine zweite oder nachfolgende Probe oder andere Zusammensetzung an die Probenaufnahmöffnung abgegeben wird.

**[0273]** Ein bevorzugtes Probenbehälterkarussell beinhaltet vorzugsweise, aber optional, drei Probenaufnahmöffnungen, die in radialer Ausrichtung arrangiert sind und in Fluidverbindung mit einem gemeinsamen Probenbehälter stehen. Gemäß diesem Ausführungsbeispiel sind ungefähr 1 bis 5 µl eines Ölüberzugs, der vorzugsweise schwarz gefärbt ist, in der vorverpackten Form vorhanden oder wird an die radial am innersten liegende Probenaufnahmöffnung abgegeben. Der Ölüberzug umfasst ein Mineralöl und ungefähr 0,01% bis ungefähr 1% eines organischen schwarzen Farbstoffs, wie beispielsweise Waxoline® Black OBP, das von Zenica Inc, Wilmington, DE erhältlich ist. Ungefähr 1 µl bis ungefähr 9 µl einer Reagenzhauptmischung liegen in vorverpackter Form vor oder werden an die radial am äußersten liegende Probenaufnahmöffnung abgegeben. Die Reagenzhauptmischung umfasst einen Teil der, oder alle nötigen Reaktionskomponenten. Ein flüssige Probe, die eine zu testende Vorlagen-Nukleinsäure enthält, wird manuell oder mit Hilfe eines Roboters in die radial in der Mitte liegende Probenaufnahmöffnung abgegeben. Die Scheibe wird dann mit einer Geschwindigkeit, die die Probe in den Reagenzabschnitt überführt, aber mit einer Rotationsgeschwindigkeit, die nicht ausreicht, die Probe in den Probenbehälter zu befördern, gedreht. Die Probe und das Reagenz können optional durch schnelle Änderungen der Rotationsgeschwindigkeit der Scheibe gemischt werden. Die Scheibe wird dann mit einer höheren Geschwindigkeit gedreht, damit die Probe und die Reagenzmischung, aber nicht das Öl, sich in den Probenbehälter bewegen. Die Scheibe wird dann mit einer noch höheren Rotationsgeschwindigkeit gedreht, um den Ölüberzug zu dem Probenbehälter zu befördern. Das Öl überlagert die wässrige Probe, da es eine niedrigere Dichte aufweist, und blockiert den Lichteintritt aufgrund seines Farbstoffgehalts. Der selektive Transfer von Öl, Reagenz und Probe durch das Verändern der Rotationsgeschwindigkeit des Karussells wird erreicht durch eine Kombination aus: 1) Variieren des Durchmessers des Fluiddurchgangs; 2) Variieren der Größe oder der Form der physikalischen Barrieren, die in dem Fluiddurchgang vorhanden sind; und 3) durch die Verwendung der Abhängigkeit der Zentrifugalkraft von dem variierenden Abstand (Radius) jeder Probenaufnahmöffnung von der Mitte der Scheibe.

**[0274]** Das Karussell kann lösbar mit einer Antriebswelle und einem Motor (**506** bzw. **504** in **Fig. 32**) zum Drehen des Karussells verbunden sein. Des Weiteren können einzelne erfindungsgemäße Karusselle übereinander gestapelt werden und mit einer Antriebswelle für eine simultane Rotation (wie in **Fig. 32** gezeigt ist) verbunden werden. Eine Vorrichtung kann vorgesehen sein, um die Fluoreszenz der in einem Probenbehälter (vgl. Bezugszeichen **514** in **Fig. 32**) enthaltenen Probe zu überwachen. Der Probenbehälter umfasst ein optisch transparentes Material und weist Wände auf, die ein Volumen mit zumindest einer ersten und einer zweiten Abmessung definieren, wobei die erste Abmessung kleiner ist als die zweite Abmessung, und wobei das Verhältnis von Volumen-zu-Außenflächen des Behälters kleiner als 1 mm ist. In einem Ausführungsbeispiel umfasst das Gerät eine Kammer, einen Probenbehälterhalter, eine lichtemittierende Quelle, die in der Kammer angebracht ist und derart angeordnet ist, dass sie die Probe entlang einer Achse, die im wesentlichen parallel zu einer Wand entlang der zweiten Abmessung des Behälters ist, beleuchtet. Die lichtemittierende Quelle und der Lichtdetektor gemäß dem einen Ausführungsbeispiel sind auf einer Platte angebracht, die angehoben oder abgesenkt werden kann (wie durch die Pfeil **518** in **Fig. 32** angezeigt ist). In diesem Ausführungsbeispiel können die lichtemittierende Quelle und der Lichtdetektor derart positioniert werden, dass sie die Fluoreszenz der Probenbehälter (entlang einer Achse, die im wesentlichen parallel zu einer Wand entlang der zweiten Abmessung des Geräts ist) der mehreren Karusselle messen, wenn die einzelnen Karussell übereinander gestapelt sind und mit einer Antriebswelle zum simultanen Drehen (vgl. **Fig. 32**) verbunden sind.

**[0275]** In einem Ausführungsbeispiel umfasst der Probenbehälterhalter ein Karussell zum Halten mehrerer Kapillarröhrchen, und das Karussell ist drehbar in der Kammer angebracht. Die lichtemittierende Quelle ist derart angeordnet, dass sie das Kapillarröhrchen durch den Boden des Kapillarröhrchens beleuchtet, und der Lichtdetektor ist angebracht, um die Fluoreszenz durch den Boden des Kapillarröhrchens zu detektierten. Zudem ist das Gerät mit einem Schrittmotor zum Drehen des Karussells und einer Vorrichtung zum Koppeln des Karussells an den Motor ausgestattet.

**[0276]** Gemäß einem bevorzugten Ausführungsbeispiel ist die Kammer der Fluoreszenz-Detektionsvorrichtung des weiteren mit einer Heizvorrichtung (siehe Bezugszeichen **510** in **Fig. 32**), und einem Ventilator (siehe Bezugszeichen **508** in **Fig. 32**), die in dem Gerät angebracht sind und in Luftströmverbindung mit der Kammer stehen, und einer Steuervorrichtung zum schnellen zyklischen Wechseln der Temperatur der Kammer, wobei, zumindest anfänglich, vorgegebene Zeit- und Temperaturparameter verwendet werden, ausgestattet. Das Gerät ist fähig, eine Polymerasekettenreaktion in den von dem Karussell gehaltenen Probenbehältern durchzu-

führen. Insbesondere berücksichtigt das Gerät ein verbessertes Verfahren zum Ausführen der PCR-Reaktionen, da der Fortschritt der Reaktion in Echtzeit überwacht werden kann, und ermöglicht deshalb die Justierung der Temperatur- und Zeitparameter während des Ablaufs der Reaktion, um die Ausbeute und Reinheit der vervielfältigen Ziel-Nukleinsäuresequenz zu optimieren.

**[0277]** Des weiteren wird ein Verfahren zum Vervielfältigen einer Ziel-Nukleinsäuresequenz einer biologischen Probe beschrieben, das die Schritte umfasst:

- Zugeben eines effektiven Betrags von zwei Nukleinsäuresonden zu der biologischen Probe, die in benachbarten Regionen der Ziel-Sequenz hybridisieren, wobei die eine Sonde mit einem Akzeptor-Fluorophor und die andere Sonde mit einem Donor-Fluorophor eines Fluoreszenzenergietransferpaars markiert sind, so dass bei der Hybridisierung der zwei Sonden mit der Ziel-Sequenz, die Donor- und Akzeptor-Fluorophore innerhalb 0 bis 15 Nukleotiden, noch vorteilhafter innerhalb 1 bis 5 Nukleotiden voneinander existieren,
- Vervielfältigen der Ziel-Nukleotidsequenz mittels der Polymerasekettenreaktion,
- Beleuchten der biologischen Probe mit einer ausgewählten Lichtlängenwelle, die von dem Donor-Fluorophor während der Polymerasekettenreaktion absorbiert wird,
- Überwachen der Fluoreszenzemissionen von der Probe, und
- Anpassen der Temperatur- und Zeitparameter gemäß den durch den Überwachungsschritt erzeugten Daten.

**[0278]** Demnach wird ein Gerät für das Ausführen von PCR-Reaktionen beschrieben. Die Vorrichtung umfasst eine Kammer, eine Heizvorrichtung und einen Ventilator, die in dem Gerät angebracht sind und in Luftzugverbindung mit der Kammer stehen, und ein Karussell zum Halten mehrerer Probenbehälter. Die in Verbindung mit diesem Gerät verwendeten Probenbehälter umfassen ein optisch transparentes Material und Wände, die ein Volumen mit zumindest einer ersten und einer zweiten Abmessung definieren, wobei die erste Abmessung kleiner ist als die zweite Abmessung, und wobei das Verhältnis von Volumen-zu-Außenflächen des Behälters kleiner als 1 mm ist. Das Karussell ist drehbar in der Kammer angebracht. Die Vorrichtung umfasst weiterhin eine lichtemittierende Quelle, die in der Kammer angebracht ist und derart positioniert ist, dass sie zumindest einen der Probenbehälter entlang einer Achse, die im wesentlichen parallel zu einer Wand entlang der zweiten Abmessung des Geräts ist, beleuchtet, und einen Lichtdetektor, der in der Kammer angebracht ist und derart positioniert ist, dass er zumindest die Fluoreszenz von einem der Probenbehälter entlang einer Achse, die im wesentlichen parallel zu einer Wand entlang der zweiten Abmessung des Behälters ist, misst. Des Weiteren kann das Gerät mit einem Schrittmotor zum Drehen des Karussells ausgestattet sein, um die entsprechenden von dem Karussell gehaltenen Kapillarröhrchen für die Beleuchtung und die Fluoreszenzdetektion zu positionieren. Die Überwachung der PCR-Reaktion in Echtzeit und das Festlegen mindestens eines der Reaktionsparameter gemäß der detektierten Fluoreszenz ermöglicht die Anpassung der Reaktionsbedingungen, um die Reaktion zu optimieren. In einem bevorzugten Ausführungsbeispiel werden ein oder mehrere Werte, die den Zustand der Reaktion repräsentieren, in visuell wahrnehmbarer Art in Echtzeit angezeigt.

**[0279]** Das Karussell kann auch dazu verwendet werden, eine flüssige Probe in einen kapillaren Probenbehälter abzugeben. Das Karussell umfasst eine Scheibe mit einer oberen Fläche, einer unteren Fläche und einem sich dazwischen erstreckenden äußeren Rand, einer Probenaufnahmeöffnung in der oberen Fläche, einer Probenbehälteröffnung in dem äußeren Rand, und einen Probendurchgang, der die Probenaufnahmeöffnung und die Probenbehälteröffnung verbindet. Die Probenbehälteröffnung und der Probendurchgang sind dazu ausgebildet einen Probenbehälter in der Scheibe aufzunehmen und zu fixieren. Das Verfahren zum Verwenden des Karussells, um flüssige Proben in einen kapillaren Probenbehälter zu befördern umfasst die Schritte des Auswählens eines Karussells zum Aufnehmen einer flüssigen Probe und zum Halten eines Probenbehälters, des Abgebens der flüssigen Probe in die Probenaufnahmeöffnung des Karussells, des Positionierens eines kapillaren Probenbehälters in der Probenbehälteröffnung, und des Drehens des Karussells, um die Probe in den kapillaren Probenbehälter abzugeben.

**[0280]** Im Hinblick auf das Voranstehende, ist klar, dass die vorliegende Erfindung ein Gerät bereitstellt, um biologische Proben zielgenau einem Temperaturzyklus zuzuführen, und die Temperatur der biologischen Probe schnell und genau zu variieren.

**[0281]** Darüber hinaus stellt die vorliegende Erfindung ein Gerät bereit, das eine biologische Probe einem schnellen zyklischen Temperaturwechsel unterziehen kann, wobei Luft als Wärme übertragendes Medium verwendet wird, und sie stellt ein System und ein Verfahren bereit, um eine PCR schnell auszuführen und die Reaktion simultan zu überwachen. Des Weiteren stellt die Erfindung auch ein System und ein Verfahren bereit, um eine PCR schnell auszuführen und kontinuierlich die Reaktion während ihres Ablaufs zu überwachen, und, um die Reaktionsparameter während des Ablaufs der Reaktion anzupassen.

## Programmcode Anhang A folgt

```

NEW
1  GOTO 50:REM          ***I/O stepper (I=$(0), 0=z(72))***
3  IF (XBY(65507).AND.64)=0 THEN Z(0)=XBY(65506) : GOTO 3
4  DO : WHILE (XBY(65507).AND.128)=128
5  I=0 : DO : I=I+1 : XBY(65506)=ASC($(0),I)
6  WHILE ASC(S(0),I)<>13 : RETURN
7  DO : WHILE (XBY(65507).AND.64)=64
8  I=0 : DO : Z(I)=XBY(65506)
9  I=I+1 : UNTIL Z(I-1)=32 : RETURN

10 REM    ***error check***
15 IF TX<0 THEN TX=0
16 RETURN
20 IF TX<-251 THEN TX=-251
21 RETURN
25 IF TX>251 THEN TX=251
26 RETURN

30 GOSUB 50:TP1=TP:T1=TIME
32 DO:UNTIL TIME>T1+0.2
34 GOSUB 50:TP2=TP:T2=TIME
36 SL=(TP2-TP1)/(T2-T1):IF SL<>0 THEN IT=(TG-TP2)/SL
38 PRINT USING(##.##),"SL=",SL,"IT=",IT,"AT TEMP=",TP2
40 IF IT>1 GOTO 30
42 RETURN

49 REM    ***temperature measurement***
50 E=XBY(65504):F=XBY(65505):G=XBY(65504):TP=(F*256+G+300)/38.3: RETURN

60 CLEAR : STRING 150,72 : DIM Z(72)
72 DTEMP=95:DTIM=1:DS=10
74 ATEMP=60:ATIM=1:AS=20
76 ETEMP=74:ETIM=15:ES=1:CYCLE=100
80 PRINT USING(##.##),"#",TAB (20),"TEMP",TAB (30),"TIME",TAB (40),"SLOPE"
82 PRINT "1) DENATURATION", TAB(20),DTEMP,TAB(30),DTIM,TAB(40),DS
84 PRINT "2) ANNEALING",TAB(20),ATEMP,TAB(30),ATIM,TAB(40),AS
86 PRINT "3) EXTENSION",TAB(20),ETEMP,TAB(30),ETIM,TAB(40),ES
88 PRINT "4) CYCLES",CYCLE:PRINT
110 INPUT "TYPE # TO CHANGE OR 0 IF OK (CHOICES ARE 0,1,2,3, OR 4)?",J
114 IF J=0 THEN GOTO 170
116 ON J GOSUB ,120,130,150,160
118 PRINT:GOTO 80
120 INPUT "ENTER DENATURATION Temp, Time, Slope: ",DTEMP,DTIM,DS
125 IF DTEMP>98 GOTO 120
126 RETURN
130 INPUT "ENTER ANNEALING Temp, Time, Slope: ",ATEMP,ATIM,AS
140 IF AS<0 GOTO 130
142 IF AS>21 GOTO 130
145 RETURN
150 INPUT "ENTER EXTENSION Temp, Time, Slope: ",ETEMP,ETIM,ES:RETURN
160 INPUT "ENTER Number of Cycles: ",CYCLE:RETURN.
170 $(0)="mcr1 500;sp1 200;hf1 2,rt2 1,esr": GOSUB 3 : GOSUB 7
175 FOR I=0 TO 10 : PRINT CHR(Z(I)), : NEXT I : PRINT

200 $(0)="gol nd;hf1 2,wfo =x..,s1":GOSUB 3:           rem open
210 PRINT "WAIT FOR COOLING":XBY(65504)=3
220 DO : GOSUB 50 : UNTIL TP<45
230 PRINT "TEMP=",TP," LOAD SAMPLES AND THEN PRESS A KEY"
240 W=GET : IF W=0 GOTO 240

300 TMC=0 : WS=0: CLOCK 0 : TIME=0 : DBY(71)=0 : CLOCK 1
305 $(0)="hf1 1;sp1 100;gol,wfo =x..,s1":GOSUB 3:           REM CLOSE
310 FOR V=1 TO CYCLE
315 PRINT "D", : TG=DTEMP:XBY(65509)=4:IF V=1 THEN TG=DTEMP+(DS/4)

```

```

320   WS=(DS*10+WS*9)/10:TX=INT(WS+0.5):GOSUB 15
325   XBY(65508)=TX:GOSUB 50:IF TP>TG GOTO 340
330   IF TX<>DS*10 GOTO 320
333   GOSUB 30
335   GOSUB 50:IF TP<TG GOTO 335
340   TG=DTEMP:EB=TIME
345   WS=(6*WS+10*(TG-TP))/7 :TX=INT(WS+0.5)
350   IF TX>=0 THEN GOSUB 25:XBY(65508)=TX:XBY(65509)=4
355   IF TX<0 THEN GOSUB 20:XBY(65508)=0:XBY(65509)=4-TX
360   IF V=1 THEN IF DTIM+5>(TIME-EB) GOTO 380
370   IF DTIM<(TIME-EB) GOTO 500
380   GOSUB 50 : GOTO 345

500   PRINT "A",:XBY(65508)=0:TG=ATEMP
505   $(0)="spl 200,go1 nd,hf1 2,wfo =x..,s1":GOSUB 3:      rem open
510   XBY(65509)=WS*10
515   GOSUB 30
520   EB=TIME:WS=-AS*10
525   WS=(4*WS+20*(TG-TP))/5:TX=INT(WS+0.5)
530   IF TX>=0 THEN GOSUB 25:XBY(65508)=TX:XBY(65509)=4
535   IF TX<0 THEN GOSUB 20:XBY(65508)=0:XBY(65509)=4-TX
540   IF ATIM+1<(TIME-EB) GOTO 925
545   GOSUB 50 : GOTO 525

925   PRINT:PRINT "E ",:XBY(65509)=4:TG=ETEMP+1
930   $(0)="hf1 1,spl 50,go1,wfo =x..,s1":GOSUB 3:WS=0: REM CLOSE
935   WS=(ES*10+WS*9)/10:TX=INT(WS+0.5):GOSUB 15:GOSUB 25:XBY(65508)=TX
937   GOSUB 50:IF TP>TG-1 GOTO 970
940   IF TX<>ES*10 GOTO 935
950   GOSUB 50 : IF TP<TG-1 GOTO 950
955   EB=TIME
960   WS=(WS+5*(TG-TP))/2 :TX=INT(WS+0.5)
965   IF TX>=0 THEN GOSUB 25:XBY(65508)=TX:XBY(65509)=4
970   IF TX<0 THEN GOSUB 20:XBY(65508)=0:XBY(65509)=4-TX
975   IF ETIM<(TIME-EB) GOTO 1000
980   GOSUB 50 : GOTO 980
985   CTIM=TIME-TMC : TMC=TIME : PRINT "CYCLE=",V,"TIME=",CTIM
990   NEXT V

1055  XBY(65508)=0:XBY(65509)=255
1060  INPUT "STRAND REANNEALING (Y/N) ?":$(1)
1070  IF ASC($(1),1)=78 GOTO 1290
1100  PRINT "STRAND REANNEALING IN PROCESS... "
1110  TG=DTEMP:XBY(65509)=4
1120  WS=(DS*10+WS*9)/10:TX=INT(WS+0.5):GOSUB 15
1130  XBY(65508)=TX:GOSUB 50:IF TP>TG GOTO 1170
1140  IF TX<>DS*10 GOTO 1120
1150  GOSUB 30
1160  GOSUB 50:IF TP<TG GOTO 1160
1170  EB=TIME
1180  WS=(11*WS+10*(TG-TP))/12 :TX=INT(WS+0.5)
1185  IF TX>=0 THEN GOSUB 25:XBY(65508)=TX:XBY(65509)=4
1190  IF TX<0 THEN GOSUB 20:XBY(65508)=0:XBY(65509)=4-TX
1193  IF 5<(TIME-EB) GOTO 1200
1196  GOSUB 50 : GOTO 1180
1200  XBY(65508)=0:XBY(65509)=255:WS=0
1210  DO:GOSUB 50:UNTIL TP<75

1220  EB=TIME
1230  WS=(WS+5*(75-TP))/2 :TX=INT(WS+0.5)
1240  IF TX>=0 THEN GOSUB 25:XBY(65508)=TX:XBY(65509)=4
1250  IF TX<0 THEN GOSUB 20:XBY(65508)=0:XBY(65509)=4-TX
1260  IF 60<(TIME-EB) GOTO 1280
1270  GOSUB 50 : GOTO 1230

1280  XBY(65508)=0:XBY(65509)=255
1290  INPUT "ANOTHER RUN (Y/N) ?":$(1)
1300  IF ASC($(1),1)=78 GOTO 2000
1400  PRINT:$(0)="gol nd,hf1 9,wfo =x..,s1":GOSUB 3:GOTO 80
2000  $(0)="gol nd,hf1 9,wfo =x..,s1":GOSUB 3:END

```

Programmcode Anhang B folgt  
Temperaturprozessor (IC2) Hex Datei (Temp24a.hex)

:03000000020033C8  
:05000B00C0D002312508  
:05001300C0D00230D74F  
:05002300C0D00232BA5A  
:05002B00C0D0023042CC  
:20003300C2AFC2D4C2D3752100752200752300D215D28AAF81758130858115C0D0C0F0C098  
:20005300E0C08753C6FB1230897527405388CF5389F012317D78FC12305D12324912365439  
:20007300C20EC20FC208759850D2ACD2AFE587D0E0D000D001D0D030E20530E4028012  
206A  
:20009300E602800DBF070280089038A974FA02373975C7AA75C755438740907471C082C03F  
:2000B3008378187A00C000C0029037A6C082C083D003D001D005D004D002D00012309590D6  
:2000D3007084C082C08378007A00D083D082E8F0907060C082C08378007A00D083D082E8C1  
:2000F300F0A3EAF002013BD281D29090705CC2D57400C4C0A8C2AFC282C2907908C282  
A28C  
:2001130081339280D282D9F5F5F07904C282A28133D282D9F7C282D290D0A8F0E5F0C454C9  
:200133000FA3F030D501222202015BD2A3C2A122D2A3D2A122C2A3D2A122C2A222D2A  
22248  
:20015300D2A022C2A02222212015612014812015012015A907055C082C08378017A00D0FF  
:2001730083D082E8F078007A001230D278007A0012319D123216A8887A00C000C00278F7F2  
:200193007A00C000C002D003D001D002D00012322D8888A8887A00C000C00278407A00C06B  
:2001B30000C002D003D001D002D00012323188890232FA882AA83123235D217907471127D  
:2001D30033931233D8123416D297907087C082C08378007A00D083D082E8F0122328122357  
:2001F3002890705AC082C08390705CE0F8A3E0FAD083D082E8F0A3EAF01225FF907087  
E09D  
:20021300F87A00C000C00278007A00C000C002D003D001D002D00012342FE84A6003020110  
:20023300F112232812015312014390707EC082C08378007A00D083D082E8F0A3EAF09070B2  
:200253007CC082C08378007A00D083D082E8F0A3EAF0907088C082C08378017A00D083D07B  
:2002730082E8F078007A001230D2907074C082C08378017A00D083D082E8F0A3EAF0907025  
:2002930062C082C083907060E0F8A3E0FAD083D082E8F0A3EAF0907060C082C08390708947  
:2002B300C082C083907074E0F8A3E0FAC000C00278087A00C000C002D003D001D002D00099  
:2002D30012348EC000C002C000C00278E87A03C000C002D003D001D002D000123508E84A0D  
:2002F30070030230C278017A00C000C002D003D001D002D0001234CFC000C002D003D0018E  
:20031300D002D00012350EC000C002D003D00189828B83123528D083D082E8F0A3EAF0909B  
:200333007080C082C083907089C082C083907074E0F8A3E0FAC000C00278087A00C000C062  
:2003530002D003D001D002D0001234CFC000C00278017A00C000C002D003D001D002D000F0

:2003730012350EC000C002C000C00278E87A03C000C002D003D001D002D000123508E84AEB  
:2003930070030230C278017A00C000C002D003D001D002D0001234CFC000C002D003D001ED  
:2003B300D002D00012350EC000C002D003D00189828B83123528C000C00278D27A00C0007F  
:2003D300C002D003D001D002D0001234CFC000C002907089C082C083907074E0F8A3E0FA94  
:2003F300C000C00278087A00C000C002D003D001D002D0001234CFC000C00278027A00C05B  
:2004130000C002D003D001D002D00012350EC000C002C000C00278E87A03C000C002D00336  
:20043300D001D002D000123508E84A70030230C278017A00C000C002D003D001D002D00093  
:200453001234CFC000C002D003D001D002D00012350EC000C002D003D00189828B831235D1  
:2004730028C000C002D003D001D002D00012350ED083D082E8F0A3EAF0907085C082C08320  
:20049300907089C082C083907074E0F8A3E0FAC000C00278087A00C000C002D003D001D000  
:2004B30002D00012348EC000C00278037A00C000C002D003D001D002D000123512C000C06B  
:2004D30002C000C00278E87A03C000C002D003D001D002D000123508E84A70030230C27880  
:2004F300017A00C000C002D003D001D002D0001234CFC000C002D003D001D002D000123582  
:200513000EC000C002D003D00189828B83123528D083D082E8F0907089C082C0839070740D  
:20053300E0F8A3E0FAC000C00278087A00C000C002D003D001D002D00012348EC000C002B9  
:2005530078057A00C000C002D003D001D002D000123512C000C002C000C00278E87A03C0CF  
:2005730000C002D003D001D002D000123508E84A70030230C278017A00C000C002D003D060  
:2005930001D002D0001234CFC000C002D003D001D002D00012350EC000C002D003D00189C4  
:2005B300828B83123528C000C00278C87A00C000C002D003D001D002D00012352DE84A700F  
:2005D300030205DA020A16907068C082C083907088E0F87A00C000C00278017A00C000C046  
:2005F3002D003D001D002D000123512D083D082E8F0A3EAF0907068C082C083907068E018  
:20061300F8A3E0FAC000C002907089C082C083907074E0F8A3E0FAC000C00278087A00C  
0BD  
:2006330000C002D003D001D002D00012348EC000C00278047A00C000C002D003D001D0025B  
:20065300D000123512C000C002C000C00278E87A03C000C002D003D001D002D00012350866  
:20067300E84A70030230C278017A00C000C002D003D001D002D0001234CFC000C002D003A9  
:20069300D001D002D00012350EC000C002D003D00189828B83123528C000C002D003D001AB  
:2006B300D002D000123537D083D082E8F0A3EAF0907068E0F8A3E0FAC000C00278007A  
00DC  
:2006D300C000C002D003D001D002D00012352DE84A7003020A16907052C082C083907089A4  
:2006F300C082C083907074E0F8A3E0FAC000C00278087A00C000C002D003D001D002D00055  
:200713001234CFC000C00278057A00C000C002D003D001D002D00012350EC000C002C000D9  
:20073300C00278E87A03C000C002D003D001D002D000123508E84A70030230C278017A0064  
:20075300C000C002D003D001D002D0001234CFC000C002D003D001D002D00012350EC00  
0CC  
:20077300C002D003D00189828B83123528D083D082E8F0A3EAF0907060E0F8A3E0FAC00009  
:20079300C002907052E0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D00012354DE84A70030207CA09

:2007B300907014C082C08378FF7AFFD083D082E8F0A3EAF00207DE907014C082C083780

1AA

:2007D3007A00D083D082E8F0A3EAF0907012C082C083907089C082C083907074E0FPES8A3E

:2007F300FAC000C00278087A00C000C002D003D001D002D00012348EC000C00278067A005A

:20081300C000C002D003D001D002D000123512C000C002C000C00278E87A03C000C002D071

:2008330003D001D002D000123508E84A70030230C278017A00C000C002D003D001D002D08C

:20085300001234CFC000C002D003D001D002D00012350EC000C002D003D00189828B831202

:200873003528D083D082E8F0A3EAF0907012C082C083907012E0F8A3E0FAC000C00290708E

:2008930014E0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D00012348ED083D082E8F0A3EAF090

7046

:2008B30068C082C083907068E0F8A3E0FAC000C002907012E0F8A3E0FAC000C002D003

D06D

:2008D30001D002D00012348ED083D082E8F0A3EAF0907068C082C083907068E0F8A3E0F

AEA

:2008F300C000C002907060E0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D000123512D083D082E800

:20091300F0A3EAF0907068E0F8A3E0FAC000C00278007A00C000C002D003D001D002D0

005E

:20093300123553E84A7003020951907068C082C08378007A00D083D082E8F0A3EAF0907030

:2009530014E0F8A3E0FAC000C00278017A00C000C002D003D001D002D00012342FE84A7

0C7

:20097300030209BC907068E0F8A3E0FAC000C002907052E0F8A3E0FAC000C002D003D0018E

:20099300D002D00012354DE84A70030209B9907068C082C083907052E0F8A3E0FAD083D0EE

:2009B30082E8F0A3EAF00209FE907068E0F8A3E0FAC000C002907052E0F8A3E0FAC000

C0DE

:2009D30002D003D001D002D000123508E84A70030209FE907068C082C083907052E0F8A305

:2009F300E0FAD083D082E8F0A3EAF0907060C082C083907068E0F8A3E0FAD083D082E8

F0F1

:200A1300A3EAF0907060C082C083907060E0F8A3E0FAC000C00278207A00C000C002D00

3C3

:200A3300D001D002D00012348ED083D082E8F0A3EAF0907082C082C08378017A00D083

D045

:200A530082E8F0907062E0F8A3E0FAC000C002907060E0F8A3E0FAC000C002D003D001

D045

:200A730002D00012342FC000C00290705CE0F8A3E0FAC000C002907060E0F8A3E0FAC0

00F2

:200A9300C002D003D001D002D000123537123559C000C00278207A00C000C002D003D00163

:200AB300D002D000123568C000C002D003D001D002D00012356EE84A7003020AE190708241

:200AD300C082C08378007A00D083D082E8R0907057C082C083907089C082C083907074E0D1  
 :200AF300F8A3E0FAC000C00278087A00C000C002D003D001D002D00012348EC000C002  
 785C  
 :200B1300077A00C000C002D003D001D002D000123512C000C002C000C00278E87A03C0007F  
 :200B3300C002D003D001D002D000123508E84A70030230C278017A00C000C002D003D00199  
 :200B5300D002D0001234CFC000C002D003D001D002D00012350EC000C002D003D001898  
 27D  
 :200B73008B83123528D083D082E8R0120DEF121231907074C082C083907074E0F8A3E0FA43  
 :200B9300C000C00278017A00C000C002D003D001D002D000123512D083D082E8F0A3EA  
 F0B2  
 :200BB300907074E0F8A3E0FAC000C002907089C082C08378027A00C000C002C000C0027859  
 :200BD300E87A03C000C002D003D001D002D000123508E84A70030230C278017A00C000C07A  
 :200BF30002D003D001D002D0001234CFC000C002D003D001D002D00012350EC000C002  
 D016  
 :200C130003D00189828B83123528C000C002D003D001D002D00012352DC000C00290708720  
 :200C3300E0F87A00C000C00278007A00C000C002D003D001D002D00012342FC000C002D04C  
 :200C530003D001D002D000123575E84A7003020291907088C082C083907088E0F87A00C06E  
 :200C730000C00278017A00C000C002D003D001D002D0001235127A00D083D082E8F0907094  
 :200C930088E0F87A00C000C002907089C082C08378007A00C000C002C000C00278E87A0304  
 :200CB300C000C002D003D001D002D000123508E84A70030230C278017A00C000C002D00329  
 :200CD300D001D002D0001234CFC000C002D003D001D002D00012350EC000C002D003D0  
 0136  
 :200CF30089828B83123528C000C002D003D001D002D00012357CC000C002907087E0F87A73  
 :200D130000C000C00278007A00C000C002D003D001D002D00012342FC000C002D003D001E9  
 :200D3300D002D000123575E84A700302027D120150907087C082C08378007A00D083D08216  
 :200D5300E8F0D21778FF7A00E81233A41233D812341678007A0012319D1225FF12318FC0EA  
 :200D730000C00278EE7A02C000C002D003D001D002D00012354DC000C002907087E0F87A05  
 :200D930000C000C00278017A00C000C002D003D001D002D00012342FC000C002D003D00168  
 :200DB300D002D000123575E84A7003020D6C907087E0F87A00C000C00278017A00C000C0D4  
 :200DD30002D003D001D002D00012342FE84A60030202341201481201560201DD907085E06D  
 :200DF300F87A00C000C00278007A00C000C002D003D001D002D00012352DC000C00290703C  
 :200E130085E0F87A00C000C002780A7A00C000C002D003D001D002D000123553C000C00286  
 :200E3300D003D001D002D00012356EE84A7003020E6D907054C082C08378017A00D083D093  
 :200E530082E8F090700CC082C08378047A00D083D082E8F0A3EA F0020E92907054C082C0AC  
 :200E73008378007A00D083D082E8F090700CC082C08378087A00D083D082E8F0A3EA F09058  
 :200E93007080E0F8A3E0FAC000C00278007A00C000C002D003D001D002D00012354DE84  
 AF8

:200EB3007003020ECC90700CC082C083780C7A00D083D082E8F0A3EAF0122328907085E085  
:200ED300F87A00C000C00278007A00C000C002D003D001D002D00012342FE84A7003020F26  
:200EF30005907085C082C08378C87A00D083D082E8F090705EC082C08390705CE0F8A3E0FF  
:200F1300FAD083D082E8F0A3EAF090705CE0F8A3E0FAC000C002907060E0F8A3E0FAC  
00022  
:200F3300C002D003D001D002D00012352DE84A7003020FC0907068C082C08390705CE0F88B  
:200F5300A3E0FAC000C002907060E0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D000123537D0  
8331  
:200F7300D082E8F0A3EAF090706AC082C08378FF7AFFD083D082E8F0A3EAF0907068E  
0F89E  
:200F9300A3E0FAC000C00278407A00C000C002D003D001D002D00012352DE84A7003020  
F1B  
:200FB300BA12013E020FBD120143020FD790706AC082C08378017A00D083D082E8F0A3E  
A1B  
:200FD300F0120143907057E0F87A00C000C00278037A00C000C002D003D001D002D00012BE  
:200FF300342FE84A7003021038907085C082C08378C87A00D083D082E8F0907072C082C0D7  
:201013008378017A00D083D082E8F0A3EAF090700CC082C08378087A00D083D082E8F0A  
3A2  
:20103300EAF0021230907060E0F8A3E0FAC000C00278007A0AC000C002D003D001D002  
D084  
:201053000012352DE84A700302112C907060E0F8A3E0FAC000C00278807A0CC000C002D01E  
:2010730003D001D002D00012352DE84A70030210D890706AE0F8A3E0FAC000C00278017AB0  
:2010930000C000C002D003D001D002D00012342FE84A70030210C1907072C082C083780217  
:2010B3007A00D083D082E8F0A3EAF00210D5907072C082C083780E7A00D083D082E8F0  
A3AB  
:2010D300EAF002112990706AE0F8A3E0FAC000C00278017A00C000C002D003D001D002  
D0EB  
:2010F3000012342FE84A700302115907072C082C08378067A00D083D082E8F0A3EAF002B0  
:201113001129907072C082C083780C7A00D083D082E8F0A3EAF00211F7907060E0F8A3E0CE  
:20113300FAC000C00278807A07C000C002D003D001D002D00012352DE84A70030211A6907D  
:20115300706AE0F8A3E0FAC000C00278017A00C000C002D003D001D002D00012342FE84  
A69  
:20117300700302118F907072C082C083780A7A00D083D082E8F0A3EAF00211A3907072C072  
:2011930082C08378027A00D083D082E8F0A3EAF00211F790706AE0F8A3E0FAC000C0027  
8C6  
:2011B300017A00C000C002D003D001D002D00012342FE84A70030211E3907072C082C083D2  
:2011D300780A7A00D083D082E8F0A3EAF00211F7907072C082C08378017A00D083D082E885

:2011F300F0A3EAF0907085E0F87A00C000C002780A7A00C000C002D003D001D002D000  
1240  
:201213003553E84A7003021230907072C082C08378017A00D083D082E8F0A3EAF022907044  
:2012330054E0F87A00C000C00278017A00C000C002D003D001D002D00012342FE84A70039E  
:2012530002125912013E907057E0F87A00C000C00278027A00C000C002D003D001D002D0D6  
:2012730000123582E84A70030212811225F4907057E0F87A00C000C00278037A00C000C08D  
:2012930002D003D001D002D00012342FE84A70030212CF907062C082C08390705CE0F8A338  
:2012B300E0FAD083D082E8F0A3EAF0907056C082C08378017A00D083D082E8F0D21790  
374C  
:2012D300B5123588907088E0F87A00C000C00278207A00C000C002D003D001D002D000122F  
:2012F3003512E81233A4907074E0F8A3E0FAC000C00278207A00C000C002D003D001D0026E  
:20131300D000123512E81233A41233D8123416907082E0F87A00C000C00278017A00C0003E  
:20133300C002D003D001D002D00012342FE84A700302149412189A122328907068C082C043  
:2013530083907060E0F8A3E0FAC000C00290705CE0F8A3E0FAC000C002D003D001D002  
D047  
:2013730000123537D083D082E8F0A3EAF090706AE0F8A3E0FAC000C00278FF7AFFC000  
C031  
:2013930002D003D001D002D00012342FE84A70030213D5907068C082C083907068E0F8A31E  
:2013B300E0FAC000C00278FF7AFFC000C002D003D001D002D00012348ED083D082E8F0  
A312  
:2013D300EAF0907068E0F8A3E0FAC000C00290700CE0F8A3E0FAC000C002D003D001D  
00288  
:2013F300D00012352DC000C002907087E0F87A00C000C00278017A00C000C002D003D001A0  
:20141300D002D00012342FC000C002D003D001D002D00012356EC000C00290707EE0F8A  
3AA  
:20143300E0FAC000C00278007A00C000C002D003D001D002D000123596C000C002D003D081  
:2014530001D002D00012356EC000C00290707CE0F8A3E0FAC000C00278007A00C000C002D8  
:20147300D003D001D002D000123596C000C002D003D001D002D00012356EE84A600302130F  
:2014930047120150907054E0F87A00C000C00278017A00C000C002D003D001D002D000129A  
:2014B300342FE84A70030214BF120143907072C082C08378017A00D083D082E8F0A3EAF002  
:2014D300907085C082C08378007A00D083D082E8F0907054C082C08378007A00D083D08210  
:2014F300E8F090706AC082C08378017A00D083D082E8F0A3EAF0907080E0F8A3E0FAC0  
0090  
:20151300C00278007A00C000C002D003D001D002D00012354DE84A70030215FD78007A00FD  
:201533001230D278007A0012319D12232812189A12359CC000C002907080E0F8A3E0FAC097  
:2015530000C002D003D001D002D000123508C000C002907087E0F87A00C000C00278017A51  
:2015730000C000C002D003D001D002D000123596C000C002D003D001D002D00012356EC076

:2015930000C00290707EE0F8A3E0FAC000C00278007A00C000C002D003D001D002D0001255  
:2015B3003596C000C002D003D001D002D00012356EC000C00290707CE0F8A3E0FAC000C  
0FD  
:2015D3000278007A00C000C002D003D001D002D000123596C000C002D003D001D002D00097  
:2015F30012356EE84A600302153D907057E0F87A00C000C00278007A00C000C002D003D0F8  
:2016130001D002D00012352DC000C00290707EE0F8A3E0FAC000C00278007A00C000C00255  
:20163300D003D001D002D000123596C000C002D003D001D002D00012356EC000C002907075  
:2016530087E0F87A00C000C00278017A00C000C002D003D001D002D00012342FC000C0026A  
:20167300D003D001D002D00012356EE84A7003021863907057E0F87A00C000C00278027A1B  
:2016930000C000C002D003D001D002D00012342FC000C002907057E0F87A00C000C00278D5  
:2016B300037A00C000C002D003D001D002D00012342FC000C002907056E0F87A00C000C0B3  
:2016D3000278017A00C000C002D003D001D002D00012342FC000C002D003D001D002D00  
0FD  
:2016F30012356EC000C002D003D001D002D000123575E84A70030217C0907057C082C08344  
:2017130078017A00D083D082E8F012232812189A907087E0F87A00C000C00278017A00C017  
:2017330000C002D003D001D002D00012342FC000C00290707EE0F8A3E0FAC000C0027800CA  
:201753007A00C000C002D003D001D002D000123596C000C002D003D001D002D00012356  
EDA  
:20177300C000C00290707CE0F8A3E0FAC000C00278007A00C000C002D003D001D002D00  
0C7  
:20179300123596C000C002D003D001D002D00012356EE84A600302171D90707CC082C08310  
:2017B30078007A00D083D082E8F0A3EAF0907057C082C08378017A00D083D082E8F01225A7  
:2017D300F412232812189A907087E0F87A00C000C00278017A00C000C002D003D001D0029B  
:2017F300D00012342FC000C00290707EE0F8A3E0FAC000C00278007A00C000C002D003D  
0A3  
:2018130001D002D000123596C000C002D003D001D002D00012356EC000C00290707CE0F8E2  
:20183300A3E0FAC000C00278007A00C000C002D003D001D002D000123596C000C002D00  
3AA  
:20185300D001D002D00012356EE84A60030217D490707EC082C08378007A00D083D082E849  
:20187300F0A3EAF090707CC082C08378007A00D083D082E8F0A3EAF078007A001230D27  
87D  
:20189300007A0012319D22907057E0F87A00C000C00278037A00C000C002D003D001D002A1  
:2018B300D00012342FE84A7003021993907068C082C083907062E0F8A3E0FAC000C00290C7  
:2018D300705CE0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D000123537D083D082E8F0A3EAF  
09004  
:2018F3007068C082C083907068E0F8A3E0FAC000C00290706AE0F8A3E0FAC000C002D00325

:20191300D001D002D00012348ED083D082E8F0A3EAF0907068E0F8A3E0FAC000C0027801BB  
:201933007A00C000C002D003D001D002D000123553C000C002907056E0F87A00C000C0020C  
:2019530078007A00C000C002D003D001D002D00012342FC000C002D003D001D002D000126B  
:20197300356EE84A7003021990907056C082C08378017A00D083D082E8F01225F4021CBA13  
:20199300907085E0F87A00C000C00278007A00C000C002D003D001D002D00012342FC000EC  
:2019B300C002907085E0F87A00C000C00278C87A00C000C002D003D001D002D00012342F02  
:2019D300C000C002D003D001D002D000123575E84A7003021A04907062C082C08390706064  
:2019F300E0F8A3E0FAD083D082E8F0A3EAF0021CBA907058C082C08312359CC000C00290DB  
:201A13007085E0F87A00C000C002D003D001D002D0001234CFC000C00278207A00C000C07B  
:201A330002D003D001D002D0001234CFD083D082E8F0A3EAF0907058C082C083907058E027  
:201A5300F8A3E0FAC000C002780A7A00C000C002D003D001D002D0001231AAD083D082E83E  
:201A7300F0A3EAF0907068C082C083907058E0F8A3E0FAD083D082E8F0A3EAF0907058C03A  
:201A930082C08312318FC000C00278647A00C000C002D003D001D002D00012350EC000C027  
:201AB3000278197A00C000C002D003D001D002D0001231AAC000C002907085E0F87A00C038  
:201AD30000C002D003D001D002D0001234CFC000C00278087A00C000C002D003D001D00262  
:201AF300D0001234CFC000C00278647A00C000C002D003D001D002D0001231AAD083D082BC  
:201B1300E8F0A3EAF0907068C082C083907068E0F8A3E0FAC000C002907058E0F8A3E0F84  
:201B3300C000C002D003D001D002D00012350ED083D082E8F0A3EAF0907068E0F8A3E0FABE  
:201B5300C000C00278007A10C000C002D003D001D002D00012352DE84A7003021B8590706B  
:201B730068C082C08378007A10D083D082E8F0A3EAF0907068C082C083907068E0F8A3E0B9  
:201B9300FAC000C00290706AE0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D00012348ED083D082B6  
:201BB300E8F0A3EAF0907062C082C083907068E0F8A3E0FAC000C00290705EE0F8A3E0FAE4  
:201BD300C000C002D003D001D002D000123512D083D082E8F0A3EAF090706AE0F8A3E0FA18  
:201BF300C000C00278017A00C000C002D003D001D002D00012342FE84A7003021C679070F6  
:201C130062E0F8A3E0FAC000C002907060E0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D0001235B4

:201C33002DE84A7003021C64907062C082C083907060E0F8A3E0FAD083D082E8F0A3EA  
F0A7  
:201C5300907085C082C08378C87A00D083D082E8F0021CBA907062E0F8A3E0FAC000C0  
021F  
:201C7300907060E0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D000123553E84A7003021CBA907  
0BD  
:201C930062C082C083907060E0F8A3E0FAD083D082E8F0A3EA F0907085C082C08378C87  
AD7  
:201CB30000D083D082E8F0907016C082C083907084E0F87A00C000C002C000C002781E7A0F  
:201CD30000C000C002D003D001D002D000123508E84A70030230C278027A00C000C002D0FB  
:201CF30003D001D002D0001234CFC000C002D003D001D002D00012350EC000C00290705C4B  
:201D1300E0F8A3E0FAC000C00290705AE0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D000123  
537E4  
:201D3300D083D082E8F0A3EA F0907070C082C08378007A00D083D082E8F0A3EA F09070  
763F  
:201D5300C082C08378007A00D083D082E8F0A3EA F090700AC082C08378137A00D083D0  
82C6  
:201D7300E8F0A3EA F0907008C082C08378017A00D083D082E8F0A3EA F0907070C082C0  
838C  
:201D9300907070E0F8A3E0FAC000C002907016C082C083907076E0F8A3E0FAC000C002C041  
:201DB30000C002781E7A00C000C002D003D001D002D000123508E84A70030230C278027A9A  
:201DD30000C000C002D003D001D002D0001234CFC000C002D003D001D002D00012350E  
C036  
:201DF30000C002D003D00189828B831235ASC000C002D003D001D002D000123512D083D021  
:201E130082E8F0A3EA F0907076C082C083907076E0F8A3E0FAC000C002907008E0F8A3E  
02D  
:201E3300FAC000C002D003D001D002D000123512D083D082E8F0A3EA F0907076E0F8A3  
E0A9  
:201E5300FAC000C00290700AE0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D0009070081235AB  
E8EA  
:201E73004A6003021D8C907070C082C083907070E0F8A3E0FAC000C002907072E0F8A3E0EE  
:201E9300FAC000C002D003D001D002D00012348EC000C00278027A00C000C002D003D00  
1FD  
:201EB300D002D0001235B7D083D082E8F0A3EA F0907080E0F8A3E0FAC000C00278007A  
002C  
:201ED300C000C002D003D001D002D000123596E84A7003021F18907070C082C08390707007

:201EF300E0F8A3E0FAC000C00278027A00C000C002D003D001D002D0001235B7D083D08299  
:201F1300E8F0A3EAF0907054E0F87A00C000C00278017A00C000C002D003D001D002D00076  
:201F330012342FC000C002907085E0F87A00C000C00278007A00C000C002D003D001D00254  
:201F5300D00012342FC000C00212359CC000C00278017A00C000C002D003D001D002D00087  
:201F730012354DC000C002D003D001D002D00012356EC000C002D003D001D002D00012352E  
:201F930075E84A700302225B907054E0F87A00C000C00278017A00C000C002D003D001D084  
:201FB30002D00012342FE84A7003021FEB907010C082C08378147A00D083D082E8F0A3EA71  
:201FD300F090700EC082C08378F67AFFD083D082E8F0A3EAF0022013907010C082C0837848  
:201FF300287A00D083D082E8F0A3EAF090700EC082C08378D87AFFD083D082E8F0A3EAF0DC  
:2020130090706CC082C083907062E0F8A3E0FAC000C00290705CE0F8A3E0FAC000C002D080  
:2020330003D001D002D000123537D083D082E8F0A3EAF0907068C082C08390705CE0F8A3DB  
:20205300E0FAC000C002907070E0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D000123512C000C0AB  
:2020730002907062E0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D000123537C000C00278027A00D8  
:20209300C000C002D003D001D002D0001235B7D083D082E8F0A3EAF090706CC082C08390EC  
:2020B300706CE0F8A3E0FAC000C002907068E0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D00012C3  
:2020D3003537D083D082E8F0A3EAF090706CE0F8A3E0FAC000C002907010E0F8A3E0FAC01F  
:2020F30000C002D003D001D002D00012352DE84A700302212090706CC082C083907010E088  
:20211300F8A3E0FAD083D082E8F0A3EAF090706CE0F8A3E0FAC000C00290700EE0F8A3E091  
:20213300FAC000C002D003D001D002D000123553E84A700302216290706CC082C083907015  
:202153000EE0F8A3E0FAD083D082E8F0A3EAF090706EC082C083907062E0F8A3E0FAC000A5  
:20217300C00278117A00C000C002D003D001D002D0001235B7C000C00278467A00C000C087  
:2021930002D003D001D002D000123537C000C00290706CE0F8A3E0FAC000C002D003D001FD  
:2021B300D002D000123512D083D082E8F0A3EAF0907083C082C08378007A00D083D082E890  
:2021D300F0907083C082C083907083E0F87A00C000C00278017A00C000C002D003D001D0B4  
:2021F30002D0001235127A00D083D082E8F0907083E0F87A00C000C00290706EE0F8A3E08A  
:20221300FAC000C002D003D001D002D000123568E84A700302223012014D02223312015027

:20223300907083E0F87A00C000C00278C87A00C000C002D003D001D002D000123582E84AB7  
:2022530070030221D40222A990705CE0F8A3E0FAC000C002907070E0F8A3E0FAC000C00  
2BA  
:20227300D003D001D002D000123512C000C002907062E0F8A3E0FAC000C002D003D001D  
07D  
:2022930002D000123568E84A70030222A612014D0222A91201501225FF90705AC082C08396  
:2022B30090705CE0F8A3E0FAD083D082E8F0A3EAF0907084C082C083907084E0F87A00  
C0C1  
:2022D30000C00278017A00C000C002D003D001D002D0001235127A00D083D082E8F090701E  
:2022F30084E0F87A00C000C00278137A00C000C002D003D001D002D00012352DE84A70038D  
:20231300022327907084C082C08378007A00D083D082E8F0221200FA1200FA22907087E023  
:20233300F87A00C000C00278017A00C000C002D003D001D002D00012342FE84A700302259A  
:20235300F1907057E0F87A00C000C00278017A00C000C002D003D001D002D00012342FE836  
:202373004A700302239090707CC082C08378017A00D083D082E8F0A3EAF00225F19070577B  
:20239300E0F87A00C000C00278027A00C000C002D003D001D002D00012342FE84A7003027E  
:2023B30023B81225F4907057E0F87A00C000C00278037A00C000C002D003D001D002D0001C  
:2023D30012342FE84A70030225F1907056C082C08378007A00D083D082E8F0907064C082C8  
:2023F300C083907089C082C083907074E0F8A3E0FAC000C00278087A00C000C002D003D00F  
:2024130001D002D00012348EC000C00278037A00C000C002D003D001D002D000123512C0DA  
:2024330000C002C000C00278E87A03C000C002D003D001D002D000123508E84A700302307A  
:20245300C278017A00C000C002D003D001D002D0001234CFC000C002D003D001D002D00  
00F  
:2024730012350EC000C002D003D00189828B83123528C000C00278207A00C000C002D0035D  
:20249300D001D002D00012348EC000C002780A7A00C000C002D003D001D002D0001235B79E  
:2024B300D083D082E8F0A3EAF0907064C082C083907064E0F8A3E0FAC000C00290706A  
E0A1  
:2024D300F8A3E0FAC000C002D003D001D002D00012348ED083D082E8F0A3EAF0907062  
C0BC  
:2024F30082C083907062E0F8A3E0FAC000C002907064E0F8A3E0FAC000C002D003D001  
D01C  
:2025130002D000123512D083D082E8F0A3EAF090706AE0F8A3E0FAC000C00278017A00  
C08F  
:2025330000C002D003D001D002D00012342FE84A700302259E907062E0F8A3E0FAC000C06A  
:2025530002907060E0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D00012352DE84A700302259B907E  
:202573007062C082C083907060E0F8A3E0FAD083D082E8F0A3EAF0907057C082C0837801ED  
:202593007A00D083D082E8F00225F1907062E0F8A3E0FAC000C002907060E0F8A3E0FAC  
06B

:2025B30000C002D003D001D002D000123553E84A70030225F1907062C082C083907060E082  
:2025D300F8A3E0FAD083D082E8F0A3EAF0907057C082C08378017A00D083D082E8F002  
35F6  
:2025F300EFC29775F005D5F0FDD29722907086C082C08312361A750200D083D082E8F090D8  
:202613007086E0F87A00C000C00278087A00C000C002D003D001D002D00012342FE84A7004  
:2026330003022D1E907068C082C08378007A00D083D082E8F0A3EAF090707AC082C08378E7  
:20265300007A00D083D082E8F0A3EAF0907006C082C08378077A00D083D082E8F0A3EA  
F075  
:20267300907004C082C08378017A00D083D082E8F0A3EAF0907086C082C08312361A7502ED  
:2026930000D083D082E8F0907086E0F87A00C000C00278007A00C000C002D003D001D00266  
:2026B300D00012366CE84A7003022687907068C082C083907068E0F8A3E0FAC000C0029073  
:2026D3007086E0F87A00C000C002D003D001D002D000123512D083D082E8F0A3EAF090  
7084  
:2026F30089C082C08390707AE0F8A3E0FAC000C002C000C00278E87A03C000C002D003  
D0E4  
:2027130001D002D000123508E84A70030230C278017A00C000C002D003D001D002D000124E  
:2027330034CFC000C002D003D001D002D00012350EC000C002907086E0F87A00C000C0028A  
:2027530078207A00C000C002D003D001D002D0001235377A00D083D082E8F090707AC0825B  
:20277300C08390707AE0F8A3E0FAC000C002907004E0F8A3E0FAC000C002D003D001D0  
0261  
:20279300D000123512D083D082E8F0A3EAF090707AE0F8A3E0FAC000C002907006E0F8  
A331  
:2027B300E0FAC000C002D003D001D002D0009070041235ABE84A6003022687907066C08282  
:2027D300C083907068E0F8A3E0FAC000C00278D27A00C000C002D003D001D002D00012  
3591  
:2027F300B7D083D082E8F0A3EAF0907066C082C083907066E0F8A3E0FAC000C00278D2  
7A29  
:2028130000C000C002D003D001D002D00012348ED083D082E8F0A3EAF0907068C082C08322  
:20283300907068E0F8A3E0FAC000C002907066E0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D0  
00C3  
:20285300123537D083D082E8F0A3EAF0907086C082C08312361A750200D083D082E8F090FC  
:202873007086E0F87A00C000C00278007A00C000C002D003D001D002D00012366CE84A706B  
:202893000302285F907086C082C083907086E0F87A00C000C00278207A00C000C002D003CD  
:2028B300D001D002D0001235377A00D083D082E8F0907086E0F87A00C000C002907068E07B  
:2028D300F8A3E0FAC000C002D003D001D002D00012366CE84A70030228FBD2179037B7  
12B1  
:2028F30035881233D8123416907068E0F8A3E0FAC000C002907086E0F87A00C000C002D026

:2029130003D001D002D00012342FE84A7003022637D2179037B91235881233D81234169074  
:202933007078C082C08378017A00D083D082E8F0A3EAF0907068C082C08378007A00D083F8  
:20295300D082E8F0A3EAF090707AC082C08378007A00D083D082E8F0A3EAF0907002C0  
828E  
:20297300C08378077A00D083D082E8F0A3EAF0907000C082C08378017A00D083D082E8F019  
:20299300A3EAF0907086C082C08312361A750200D083D082E8F0907086E0F87A00C000C0EE  
:2029B3000278007A00C000C002D003D001D002D00012366CE84A7003022996907068C08284  
:2029D300C083907068E0F8A3E0FAC000C002907086E0F87A00C000C002D003D001D002  
D0C2  
:2029F30000123512D083D082E8F0A3EAF0907089C082C083907078E0F8A3E0FAC000C00214  
:202A130078087A00C000C002D003D001D002D00012348EC000C00290707AE0F8A3E0FA  
C0FC  
:202A330000C002D003D001D002D000123512C000C002C000C00278E87A03C000C002D003EC  
:202A5300D001D002D000123508E84A70030230C278017A00C000C002D003D001D002D0004D  
:202A73001234CFC000C002D003D001D002D00012350EC000C002907086E0F87A00C000C037  
:202A93000278207A00C000C002D003D001D002D0001235377A00D083D082E8F090707AC098  
:202AB30082C08390707AE0F8A3E0FAC000C002907000E0F8A3E0FAC000C002D003D001  
D0A2  
:202AD30002D000123512D083D082E8F0A3EAF090707AE0F8A3E0FAC000C002907002E0  
F893  
:202AF300A3E0FAC000C002D003D001D002D0009070001235ABE84A6003022996907066C010  
:202B130082C083907068E0F8A3E0FAC000C00278D27A00C000C002D003D001D002D0001200  
:202B330035B7D083D082E8F0A3EAF0907066C082C083907066E0F8A3E0FAC000C00278  
D22A  
:202B53007A00C000C002D003D001D002D00012348ED083D082E8F0A3EAF0907068C082  
C0E8  
:202B730083907068E0F8A3E0FAC000C002907066E0F8A3E0FAC000C002D003D001D002  
D0FD  
:202B930000123537D083D082E8F0A3EAF0907086C082C08312361A750200D083D082E8F049  
:202BB300907086E0F87A00C000C00278007A00C000C002D003D001D002D00012366CE84A08  
:202BD3007003022BA0907086C082C083907086E0F87A00C000C00278207A00C000C002D0D9  
:202BF30003D001D002D0001235377A00D083D082E8F0907068E0F8A3E0FAC000C002907098  
:202C130086E0F87A00C000C002D003D001D002D00012342FE84A7003022C6ED2179037BBE0  
:202C33001235881233D8123416907078C082C083907078E0F8A3E0FAC000C00278017A00FA  
:202C5300C000C002D003D001D002D000123512D083D082E8F0A3EAF0022C7CD2179037  
BD2F  
:202C73001235881233D8123416907078E0F8A3E0FAC000C002907089C082C08378027A00A8

:202C9300C000C002C000C00278E87A03C000C002D003D001D002D000123508E84A70030282  
 :202CB30030C278017A00C000C002D003D001D002D0001234CFC000C002D003D001D002  
 D077  
 :202CD3000012350EC000C002D003D00189828B83123528C000C002D003D001D002D0001204  
 :202CF300352DE84A7003022946907087C082C08378017A00D083D082E8F0907086C082C045  
 :202D13008378007A00D083D082E8F0907086E0F87A00C000C00278097A00C000C002D00304  
 :202D3300D001D002D00012342FE84A7003022D5790707EC082C08378017A00D083D082E8EA  
 :202D5300F0A3EAF0907086E0F87A00C000C002780A7A00C000C002D003D001D002D000  
 12C3  
 :202D7300342FE84A7003022DDP907087C082C083907087E0F87A00C000C00278017A00C010  
 :202D930000C002D003D001D002D0001235127A00D083D082E8F0907087E0F87A00C000C06F  
 :202DB3000278017A00C000C002D003D001D002D00012352DE84A7003022DDF907087C08253  
 :202DD300C08378007A00D083D082E8F0907086E0F87A00C000C002780B7A00C000C002D085  
 :202DF30003D001D002D00012342FE84A7003022E15907086C082C08378007A00D083D08249  
 :202E1300E8F0907086E0F87A00C000C002780C7A00C000C002D003D001D002D00012342F32  
 :202E3300E84A7003022F03907086C082C08312361A750200D083D082E8F0907086E0F87A6D  
 :202E530000C000C00278007A00C000C002D003D001D002D00012366CE84A7003022E3A90D0  
 :202E73007086C082C083907086E0F87A00C000C00278207A00C000C002D003D001D002D090  
 :202E9300001235377A00D083D082E8F0907087E0F87A00C000C00278007A00C000C002D00B  
 :202EB30003D001D002D00012342FE84A7003022EF2907086E0F87A00C000C00278017A0000  
 :202ED300C000C002D003D001D002D00012342FE84A7003022EEF120153022EF2120156905D  
 :202EF3007086C082C08378007A00D083D082E8F0907086E0F87A00C000C002780D7A00C0BC  
 :202F130000C002D003D001D002D00012342FE84A7003022FF7907086C082C08312361A7572  
 :202F33000200D083D082E8F0907086E0F87A00C000C00278007A00C000C002D003D001D0BD  
 :202F530002D00012366CE84A7003022F28907087E0F87A00C000C00278007A00C000C0020B  
 :202F7300D003D001D002D00012342FE84A7003022FE6907055C082C083907086E0F87A0015  
 :202F9300C000C00278207A00C000C002D003D001D002D0001235377A00D083D082E8F090BD  
 :202FB3007055E0F87A00C000C00278007A00C000C002D003D001D002D00012342FE84A7094  
 :202FD30003022FDD120159022FE612015A120148120156907086C082C08378007A00D083C9  
 :202FF300D082E8F0907086E0F87A00C000C002780E7A00C000C002D003D001D002D0001260  
 :20301300342FE84A700302302D907086C082C08378007A00D083D082E8F0907086C082C034  
 :203033008378007A00D083D082E8F0220236728587E020E5FAD0D0D0E0D0E0D2D574AA  
 759A  
 :20305300F055900033C082C0833253883F53892F438920438780888D758B00D28E2275C770  
 :20307300AA75C755D2BF2212307175C7AA75C755438704D21D2275C7AA75C7555387FB  
 C238  
 :203093001D2289828B83E493C082C08388828A83F06017DC09E4F0158115810230CAA3A81F

:2030B30082AA83D083D082A380DC15811581229037BF74460237399037D374500237398852  
 :2030D300298A2A2230191C301705D21AD0D0222008FDC082C08390748BC2D5D21BC21A  
 C026  
 :2030F300D0800ED0D032C082C083907489D2D5C0D0C0E0C0F0C000C001C002C003C004  
 C06A  
 :2031130005C006C007D215E0F8A3E0F583850082E473301052C0E085278CE52804B4C808F3  
 :20313300E40529B52902052AF52830113820133520120EE52BB52A07E52CB5290280025064  
 :203153002420171F20081CE5C620E217D0E0D213C212C211C082C083903173C082C083322E  
 :203173000230FDD212D0E0D0D032E4F529F52AF528F52CF52BC211C212C213228528E07588  
 :20319300F005A485E00085F002227501057503001231AA85002822C3E94B7005D30232065D  
 :2031B300227F007E007C007D0075F0101231EFEE33FEEF33FFC3EF9B40117005C3EE994060  
 :2031D3000AC3EE99FEEF9BFFD38001C31231F7D5F0DA8C008D028F038E01C322C3E83  
 3F81A  
 :2031F300EA33FA22EC33FCED33FD229037F374140237399037E4740A023739903810742866  
 :203213000237395389F0D21043A882D28C22907489E8F0A3EAF043A88222E859F822E84991  
 :20323300F82290748BE8F0A3EAF0D219D2BCC2BAD2B943A884229074F87475F0A37400  
 F090  
 :203253009074F67475F0A37400F0751000751101C208C21722C2ACC082C083F89074F6E0EB  
 :20327300F9A3E0F5828983E8F0A3E582B45003907500A882E5829074F7F088828983A3E534  
 :2032930082B45003907500A8829074F8A3E0B50008D2AC0000C2AC80F4200804D208D29956  
 :2032B300D083D082D2AC22209846C299300E03023390C0E0C082C083C000C001C002C0032C  
 :2032D3009074F7E0FA9074F8E0F9A3E0FBB50205C208023382850382850183E0F599A3E56D  
 :2032F30082B45003907500E5829074F9F0023382C0E0E599C29820150302338EB4030620D2  
 :203313000F030233EEB41304D20E806FB41109300E69D299C20E8063C082C083C000C00132  
 :20333300C002C003FA90749FE0F890749DAB829074A0E0F9A3E0F5828983A3E582B503036A  
 :2033530090748DEAF0E583A9829074A0F0E9A3F0B5001C90749EE0F5838882A3E582B503B5  
 :203373000390748DE583A98290749EF0E9A3F0D003D002D001D000D083D082D0E0D0D0  
 3298  
 :20339300E060061233A4A380F72008FD222008FD221233AB123268227911B42000400207DE  
 :2033B30022B40D03770122B408021722B40A07D0E0D0E00233DD22C000C0E0123268D0E06E  
 :2033D300D000D8F322740D1233A4740A123268E5106005F8E41233CA22C2AF9033F6C082B6  
 :2033F300C08332C3721B721A5008903405C082C083323008033099FD851581301D04C2AFB3  
 :2034130080FE222008FDC21712341F22301A0C90342EC082C083C0D00230D722123435026F  
 :203433003462C2D5EB33EA123459903441738012D322200EACBFAE8C9F812347620D5017A  
 :20345300B3221234762233333C3540622B2D5A2D58008B3B0D58003B372D5400302348595  
 :20347300023489C2D5EAB50308C2D5E8B50102D2D522E4F8FA2278FF7AFF22EB33EA12  
 34E1

:2034930059C0E090349A73800F802780031234F61234FFEA5B33401F1234CFEA30E70A33EB  
:2034B300487014D0E030D01122D0E030D0031234F6221234F680E115810231FEC3E889F0B1  
:2034D300A4FCADF0E960088AF0A420D2122DFDEB600688F0A420D2072D4004FAA804  
22D38D  
:2034F3000231FEE4C398F8E49AFAC322E4C399F9E49BFBC322123476023467D2D58002C218  
:20351300D5C3E829F8EA3BFA10D504A2D2C2D250030231FE22E0F87A0022123435023466B6  
:20353300D2D58002C2D5C3E899F8EA9BFA10D504A2D2C2D250030231FE221234760234  
660E  
:20355300123435023467EA30E70A1234F6EA30E70302320E2212343502346CE859F8EA5BF6  
:20357300FA22E849F8EA4BFA2212347C02346612343502346BE49360061233A4A380F62029  
:2035930008FD22123476023462E52AA829B52AF9FA22E0F8A3E0FA22C3A3E033400302355F  
:2035B30068023582EB33EA1234599035C17380118013801E1234F61234FF1231AA1234FFC2  
:2035D300221231AA221234F61231AA1234F61234FF221234FF1231AA1234F622D007D0069E  
:2035F300D005D004D003D002D001D000D0F0D0E0D0D020D509D083D082D0D0C21B32  
D08314  
:20361300D082D0D0C21322C0A853A8EB9074A1E0F890749DAB8290749EE0F9A3E0B500  
045E  
:203633007800801A8983F582A3E582B5030390748DE0F8AB82E58390749EF0EBA3F0D0A897  
:203653002290748DAA83A98290749EEAF0A3E9F09074A0EAFA0A3E9F022123476023460C224  
:20367300111233A080FE7433C3301B02940EF5F0E581B51500400C747FF42581400525F022  
:2036930040012285158102369C9038717464023739C082C0831233D890389712358812362A  
:2036B300BFD083D0821235881233D82290389E12358890755B1235A5907551A982AB831243  
:2036D30036E29075511233939038A512358822C3E84A7006C0E07C01800E7C00790A1237D5  
:2036F30007C0010CE84A70F47930D0E029F0A3DCF9E4F022AF02AE00AB0178077902EF  
8BEE  
:20371300F084AAFF18E6D7C48BF084AAFF0C4C6C4D7C48BF084AAFF0D6A806AA07A  
9F022E5  
:20373300E8F0A3EAF022B42800500122C0E0C000C002C0E0C082C0839075591235A590751A  
:203753005B123733D083D082D0E0B4280040061236A42008FDD002D000D0E090755DF0B49F  
:20377300500122B42800500122B4960122301B0B301A0890378EC082C08332C2AF80FEC2A2  
:20379300AF301B0B301A089037A2C082C08332C2AF80FE5045533A54454D5020322E34356F  
:2037B30061006100420047004700417272617920496E64657820546F6F204269670087  
:2037D300537472696E67205472756E636174656400446976696465206279205A65726F0085  
:2037F3004D617468204F766572666C6F77004D61746820556E646572666C6F77004D617436  
:203813006820417267756D656E742042616400496E7075742056616C756520546F6F2042C2  
:20383300696700496E7075742056616C7565204572726F7200496E7075742056616C756521  
:20385300204E656761746976650049737461636B2F42353220436F6E666C696374004973BD

:203873007461636B204572726F7200566563746F722072656C6F636174696F6E20464149B5  
 :203893004C4544004552524F522000284C696E652000293A2000535441525455502F52454A  
 :0438B3005345540025  
 :00003301CC

Schrittprozessor (IC3) Hex Datei (Step23.hex)

:03000000020033C8  
 :05000B00C0D0021EB68A  
 :05001300C0D0021E68D0  
 :05002300C0D0021FDF48  
 :05002B00C0D0021C3CE6  
 :20003300C2AFC2D4C2D3752100752200752300D215D28AAF81758130858115C0D0C0F0C098  
 :20005300E0C08753C6FB121C837527405388CF5389F0121F0E78FC121C57121F6E1221AC99  
 :20007300C20EC20FC208759850D2ACD2AFE587D0E0D000D001D0D030E20530E4028012  
 206A  
 :20009300E602800DBF0702800890245374FA0222E475C7AA75C755438740907058C082C030  
 :2000B3008378177A00C000C002902351C082C083D003D001D005D004D002D000121C8F905A  
 :2000D3007024C082C08378197A00C000C002C000C002781A7A00C000C002D003D001D002E1  
 :2000F300D000121CCCE84A7003021CBC78027A00C000C002D003D001D002D000121D00  
 C0F9  
 :2001130000C002D003D001D002D000121D3FC000C00278547A3DC000C002D002D000D0  
 83DA  
 :20013300D082E8F0A3EAF0907009C082C083783C7A00D083D082E8F002068D907004C082F1  
 :20015300C08378007A00D083D082E8F0907010E0F8A3E0FAC000C00278807A3EC000C002C1  
 :20017300D003D001D002D000121D59E84A70030201B4907010C082C083907010E0F8A3E042  
 :20019300FAC000C00278807A3EC000C002D003D001D002D000121D8ED083D082E8F0A3  
 EA91  
 :2001B300F0907010E0F8A3E0FAC000C00278007A00C000C002D003D001D002D000121D  
 A4C8  
 :2001D300E84A7003020209907010C082C083907010E0F8A3E0FAC000C00278807A3EC0006E  
 :2001F300C002D003D001D002D000121D43D083D082E8F0A3EAF0907010E0F8A3E0FAC  
 00053  
 :20021300C00278407A1FC000C002D003D001D002D000121D59E84A7003020272907004C089  
 :2002330082C08378017A00D083D082E8F0120631907010C082C08378807A3EC000C00290D6

:200253007010E0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D000121D8ED083D082E8F0A3EAF  
090A7  
:200273007012C082C083907010E0F8A3E0FAC000C00290700EE0F8A3E0FAC000C002D003C5  
:20029300D001D002D000121DAAD083D082E8F0A3EAF090700CC082C08390700CE0F8A  
3E00D  
:2002B300FAC000C002907012E0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D000121D43D083D0  
8269  
:2002D300E8F0A3EAF090700CE0F8A3E0FAC000C00278807A3EC000C002D003D001D00  
2D05B  
:2002F3000121DFDE84A700302032D90700CC082C08390700CE0F8A3E0FAC000C00278807C  
:200313007A3EC000C002D003D001D002D000121D8ED083D082E8F0A3EAF0907010E0F8  
A308  
:20033300E0FAC000C00278017A00C000C002D003D001D002D000121D59E84A70030205D  
28D  
:20035300907015E0F87A00C000C00278017A00C000C002D003D001D002D000121DA4E84AE1  
:200373007003020389907015C082C08378017A00D083D082E8F0907015E0F87A00C000C078  
:2003930002780B7A00C000C002D003D001D002D000121D59E84A70030203BF907015C0823B  
:2003B300C083780B7A00D083D082E8F090701EC082C083907010E0F8A3E0FAC000C002786B  
:2003D300027A00C000C002D003D001D002D000121E03D083D082E8F0A3EAF090701EE0  
F8A3  
:2003F300A3E0FAC000C002907015E0F87A00C000C002D003D001D002D000121E57E84A7093  
:200413000302042E90701EC082C083907015E0F87A00D083D082E8F0A3EAF090701CC08230  
:20043300C08378017A00D083D082E8F0A3EAF090701AC082C08378157A00D083D082E8F056  
:20045300A3EAF0907012C082C083907010E0F8A3E0FAC000C00290701EE0F8A3E0FAC0  
005B  
:20047300C00290701CE0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D000121D00C000C00278027  
AC9  
:2004930000C000C002D003D001D002D000121D00C000C002D003D001D002D000121D8A  
D001  
:2004B30083D082E8F0A3EAF0907020C082C083907012E0F8A3E0FAC000C00278C87A00  
C0F7  
:2004D30000C002D003D001D002D000121E03D083D082E8F0A3EAF0907022C082C083907  
02D  
:2004F30012E0F8A3E0FAC000C00278C87A00C000C002907020E0F8A3E0FAC000C002D0  
03FA  
:20051300D001D002D000121D00C000C002D003D001D002D000121D8AD083D082E8F0A3  
EA9B

:20053300F0907022E0FE907020E0FF90701EE0F890701CE0F990701AE0FA74FF88F0C0F03F  
:200553009A89F0C0F0D2A0F5F0D5F0FDC2A0F5F0D5F0FDD0F0D5F0EBD0F0D5P0E1F  
BEF24BF  
:2005730001FFDF0302059475F0C8C0F0D2A08BF0D5F0FDC2A08BF0D5F0FDD0F0D5F0  
EBDF71  
:20059300E6EE2401FEDF030205ADD2A08BF0D5F0FDC2A08BF0D5F0FDDE0EB88F0C  
0F02A63  
:2005B30089F0C0F0D2A0F5F0D5F0FDC2A0F5F0D5F0FDD0F0D5F0EBD0F0D5F0E10206  
089067  
:2005D3007010E0F8A3E0FAC000C00278017A00C000C002D003D001D002D000121E5DE8  
4A37  
:2005F3007003020608D2A075F0FFD5F0FDC2A075F0FFD5F0FD907004E0F87A00C000C0  
026D  
:2006130078017A00C000C002D003D001D002D000121E5DE84A700302063012063122907037  
:200633000EE0F8A3E0FAC000C00278FF7AFFC000C002D003D001D002D000121E5DE84  
A70DB  
:200653000302067090700EC082C08378017A00D083D082E8F0A3EAF0D2A202068690700E7C  
:20067300C082C08378FF7AFFD083D082E8F0A3EAF0C2A222D2A122C2A12278007A0012  
1E36  
:200693006378007A00121F2E121F3BA8887A00C000C00278F77A00C000C002D003D001D01C  
:2006B30002D000121F528888A8887A00C000C00278407A00C000C002D003D001D002D0009C  
:2006D300121F5688889019BAA882AA83121F5AD297C2A3D2A2C2A4C2A1D21790705812  
20AD  
:2006F300B81220FD12213B90700EC082C08378017A00C000C002D002D000D083D082E8F06B  
:20071300A3EAF0907016C082C08378007A00D083D082E8F0907008C082C08378007A00D0F0  
:2007330083D082E8F0907018C082C08378007A00D083D082E8F0907019C082C08378197A44  
:2007530000D083D082E8F078007A00121E6378007A00121F2E121F20C000C00278FA7A0074  
:20077300C000C002D003D001D002D000121E57E84A700302078C121AFE120C9E907016E001  
:20079300F87A00C000C00278017A00C000C002D003D001D002D000121E5DE84A700302075C  
:2007B30068907018E0F87A00C000C00278017A00C000C002D003D001D002D000121D59E8A7  
:2007D3004A7003020B2590700AC082C08378017A00D083D082E8F0A3EAF0907002C082C097  
:2007F30083907018E0F87A00D083D082E8F0A3EAF0907000C082C08378017A00D083D082E2  
:20081300E8F0A3EAF090700AE0F8A3E0FAC000C002907019E0F87A00C000C002D003D0  
01FE  
:20083300D002D000122154E84A700302096E907010C082C083907024C082C08390700AE036  
:20085300F8A3E0FAC000C002C000C002781A7A00C000C002D003D001D002D000121CCC  
E856

:200873004A7003021CBC78027A00C000C002D003D001D002D000121D00C000C002D003D0BE  
:2008930001D002D000121D3FC000C002D003D00189828B8312215AC000C002907024C08280  
:2008B300C083907019E0F87A00C000C002C000C002781A7A00C000C002D003D001D002D09F  
:2008D30000121CCCE84A7003021CBC78027A00C000C002D003D001D002D000121D00C00E1  
:2008F300C002D003D001D002D000121D3FC000C002D003D00189828B8312215AC000C00221  
:20091300D003D001D002D000121D8AD083D082E8F0A3EA F0907010C082C083907010E0F84E  
:20093300A3E0FAC000C00290700EE0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D000121DAAD0834E  
:20095300D082E8F0A3EA F0907015C082C083780A7A00D083D082E8F012014E907019C0820E  
:20097300C08390700AE0F8A3E0FA7A00D083D082E8F0121A2090700AC082C08390700AE006  
:20099300F8A3E0FAC000C002907000E0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D000121D43D0EE  
:2009B30083D082E8F0A3EA F090700AE0F8A3E0FAC000C002907002E0F8A3E0FAC000C00240  
:2009D300D003D001D002D000907000122160E84A6003020818907010C082C083907024C0FB  
:2009F30082C08378017A00C000C002C000C002781A7A00C000C002D003D001D002D0001242  
:200A13001CCCE84A7003021CBC78027A00C000C002D003D001D002D000121D00C000C002EF  
:200A3300D003D001D002D000121D3FC000C002D003D00189828B8312215AC000C0029070A1  
:200A530024C082C083907019E0F87A00C000C002C000C002781A7A00C000C002D003D00139  
:200A7300D002D000121CCCE84A7003021CBC78027A00C000C002D003D001D002D000121D5D  
:200A930000C000C002D003D001D002D000121D3FC000C002D003D00189828B8312215AC081  
:200AB30000C002D003D001D002D000121D8AD083D082E8F0A3EA F0907010C082C0839070D3  
:200AD30010E0F8A3E0FAC000C00290700EE0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D000121DC2  
:200AF300AAD083D082E8F0A3EA F0907015C082C083780A7A00D083D082E8F012014E9070CB  
:200B130019C082C08378017A00D083D082E8F0020C87907019E0F87A00C000C00278017A3F  
:200B330000C000C002D003D001D002D000122154E84A7003020C73907010C082C083907098  
:200B530024C082C08378017A00C000C002C000C002781A7A00C000C002D003D001D002D00E  
:200B730000121CCCE84A7003021CBC78027A00C000C002D003D001D002D000121D00C003E

:200B9300C002D003D001D002D000121D3FC000C002D003D00189828B8312215AC000C0027E  
:200BB300907024C082C083907019E0F87A00C000C002C000C002781A7A00C000C002D003A9  
:200BD300D001D002D000121CCCE84A7003021CBC78027A00C000C002D003D001D002D  
0005A  
:200BF300121D00C000C002D003D001D002D000121D3FC000C002D003D00189828B8312210B  
:200C13005AC000C002D003D001D002D000121D8AD083D082E8F0A3EAF0907010C082C  
08357  
:200C3300907010E0F8A3E0FAC000C00290700EE0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D0  
008F  
:200C5300121DAAD083D082E8F0A3EAF0907015C082C083780A7A00D083D082E8F01201  
4E3A  
:200C7300907019C082C08378017A00D083D082E8F0121A20907016C082C08378007A00D0AA  
:200C930083D082E8F0121AF302075A907017C082C083122172750200D083D082E8F09070DD  
:200CB30017E0F87A00C000C00278097A00C000C002D003D001D002D000121E5DE84A700341  
:200CD300021834120687907008C082C08378007A00D083D082E8F090700EE0F8A3E0FAC0F5  
:200CF30000C00278FF7AFFC000C002D003D001D002D000121E5DE84A7003020D1312063  
1CA  
:200D130090700CC082C08378007A00D083D082E8F0A3EAF0907015C082C08378057A00D0E2  
:200D330083D082E8F0907005C082C08378007A00D083D082E8F0907017C082C083122172B9  
:200D5300750200D083D082E8F0907017E0F87A00C000C00278007A00C000C002D003D00189  
:200D7300D002D000122154E84A7003020D49907017E0F87A00C000C00278527A00C000C08B  
:200D930002D003D001D002D000121E5DE84A7003020DA9120631907017E0F87A00C000C  
0DC  
:200DB3000278507A00C000C002D003D001D002D000121E5DE84A7003020DE5907010C0829C  
:200DD300C08378017A00D083D082E8F0A3EAF012014E907017E0F87A00C000C00278447  
A4E  
:200DF30000C000C002D003D001D002D000121E5DE84A7003020E58907010C082C083780A67  
:200E13007A00D083D082E8F0A3EAF012014E90700CE0F8A3E0FAC000C002786B7A3EC  
000AC  
:200E3300C002D003D001D002D000121D59E84A7003020E58907005C082C08378017A00D0B5  
:200E530083D082E8F0907017E0F87A00C000C00278467A00C000C002D003D001D002D000E7  
:200E7300121E5DE84A7003020ECB907010C082C08378147A00D083D082E8F0A3EAF0120  
1AA  
:200E93004E90700CE0F8A3E0FAC000C002786B7A3EC000C002D003D001D002D000121D  
5923  
:200EB300E84A7003020ECB907005C082C08378017A00D083D082E8F0907017E0F87A00C07C

:200ED30000C00278477A00C000C002D003D001D002D000121E5DC000C002907005E0F87  
**AD6**  
 :200EF30000C000C00278007A00C000C002D003D001D002D000122154C000C002D003D001F6  
 :200F1300D002D0001221D2E84A7003020D49907005E0F87A00C000C00278007A00C000C0CF  
 :200F330002D003D001D002D000121E5DE84A700302181590700EE0F8A3E0FAC000C0027898  
 :200F5300017A00C000C002D003D001D002D000121E5DE84A7003020F6F120631907017C069  
 :200F730082C083122172750200D083D082E8F0907017E0F87A00C000C00278007A00C00063  
 :200F9300C002D003D001D002D000122154E84A7003020F6F907017C082C083907017E0F8FF  
 :200FB3007A00C000C00278207A00C000C002D003D001D002D000121D8E7A00D083D082  
**E884**  
 :200FD300F0907010C082C08378967A00C000C002907017E0F87A00C000C002D003D001D010  
 :200FF30002D000121D8ED083D082E8F0A3EAF0907015C082C083780A7A00D083D082E8  
**F042**  
 :2010130012014E907024C082C08378017A00C000C002C000C002781A7A00C000C002D0035B  
 :20103300D001D002D000121CCCE84A7003021CBC78027A00C000C002D003D001D002D0  
**00F5**  
 :20105300121D00C000C002D003D001D002D000121D3FC000C00278007A00D083D082E8F027  
 :20107300A3EAF0907007C082C08378017A00D083D082E8F0907010C082C08378367A05D052  
 :2010930083D082E8F0A3EAF0907015C082C083780A7A00D083D082E8F012014E90700CC0D3  
 :2010B30082C08378CA7AFAD083D082E8F0A3EAF0120631907017C082C083122172750200A7  
 :2010D300D083D082E8F0907017E0F87A00C000C00278007A00C000C002D003D001D002D  
**0DB**  
 :2010F30000122154E84A70030210C6907017E0F87A00C000C002784E7A00C000C002D00359  
 :20111300D001D002D000121E5DE84A7003021178907007C082C083907007E0F87A00C000E7  
 :20113300C00278017A00C000C002D003D001D002D000121D437A00D083D082E8F0907010A6  
 :20115300C082C083789B7A02D083D082E8F0A3EAF0907015C082C083780A7A00D083D08233  
 :20117300E8F012014E907017E0F87A00C000C00278477A00C000C002D003D001D002D00037  
 :20119300121E5DE84A70030210C6907017C082C083122172750200D083D082E8F0907017E6  
 :2011B300E0F87A00C000C00278007A00C000C002D003D001D002D000122154E84A70030260  
 :2011D300119D907007C082C083907017E0F87A00C000C00278207A00C000C002D003D0019F  
 :2011F300D002D000121D8E7A00D083D082E8F0907010C082C08378807A3EC000C0029070BF  
 :201213000CE0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D000121D8ED083D082E8F0A3EAF09  
**070DB**  
 :2012330015C082C083780A7A00D083D082E8F012014E90700EE0F8A3E0FAC000C00278F  
**FCB**  
 :201253007AFFC000C002D003D001D002D000121E5DE84A700302126E120631D21790235F42  
 :201273001221C41220FD12213B907017C082C083122172750200D083D082E8F0907017E09B

:20129300F87A00C000C00278007A00C000C002D003D001D002D000122154E84A700302124D  
:2012B3007C907007E0F87A00C000C00278017A00C000C002D003D001D002D000121E5DE894  
:2012D3004A700302130C907018C082C08378017A00D083D082E8F0D2179023611221C4120A  
:2012F30020FD12213B907019C082C08378017A00D083D082E8F0021812907014C082C0837D  
:2013130078007A00D083D082E8F0907018C082C08378017A00D083D082E8F0907017C082E5  
:20133300C083122172750200D083D082E8F0907017E0F87A00C000C00278007A00C000C061  
:2013530002D003D001D002D000122154E84A700302132E907017E0F87A00C000C00278520E  
:201373007A00C000C002D003D001D002D000121E5DE84A700302138E120631907017E0F80B  
:201393007A00C000C00278507A00C000C002D003D001D002D000121E5DE84A70030213CA23  
:2013B300907010C082C08378017A00D083D082E8F0A3EAF012014E907017E0F87A00C0000E  
:2013D300C00278447A00C000C002D003D001D002D000121E5DE84A7003021417907010C00B  
:2013F30082C083780A7A00D083D082E8F0A3EAF0907015C082C08378047A00D083D082E802  
:20141300F012014E907017E0F87A00C000C00278467A00C000C002D003D001D002D000126B  
:201433001E5DE84A70030214E0907010C082C08378147A00D083D082E8F0A3EAF0907015D9  
:20145300C082C08378087A00D083D082E8F090700CE0F8A3E0FAC000C00278287A3CC00084  
:20147300C002D003D001D002D000121DA4C000C002907018E0F87A00C000C002907007E029  
:20149300F87A00C000C002D003D001D002D0001221D9C000C002D003D001D002D0001221F8  
:2014B300DFE84A70030214C112014E0214E0D2179023631221C41220FD12213B907014C000  
:2014D30082C08378017A00D083D082E8F0907017E0F87A00C000C00278547A00C000C00211  
:2014F300D003D001D002D000121E5DE84A700302152D907010C082C083782C7A01D083D046  
:2015130082E8F0A3EAF0907015C082C083780A7A00D083D082E8F012014E907017E0F87A04  
:2015330000C000C00278477A00C000C002D003D001D002D000121E5DE84A70030216C39078  
:201553007017C082C083122172750200D083D082E8F0907017E0F87A00C000C00278007AF6  
:2015730000C000C002D003D001D002D000122154E84A7003021552907017C082C08390705F  
:2015930017E0F87A00C000C00278207A00C000C002D003D001D002D000121D8E7A00D083E9  
:2015B300D082E8F0907018C082C083907018E0F87A00C000C00278017A00C000C002D0031D  
:2015D300D001D002D000121D437A00D083D082E8F0907024C082C083907018E0F87A00C049  
:2015F30000C002C000C002781A7A00C000C002D003D001D002D000121CCCE84A7003021  
C03  
:20161300BC78027A00C000C002D003D001D002D000121D00C000C002D003D001D002D0  
0048  
:20163300121D3FC000C00290700CE0F8A3E0FAC000C00278957A00C000C002D003D001  
D047  
:2016530002D000121D8AC000C002907017E0F87A00C000C002D003D001D002D000121D3  
FCB  
:20167300D083D082E8F0A3EAF0907018E0F87A00C000C002907007E0F87A00C000C002D0C6  
:2016930003D001D002D0001221E6E84A70030216C3D2179023651221C41220FD12213B9003

:2016B3007014C082C08378017A00D083D082E8F0907014E0F87A00C000C00278017A00C003  
:2016D3000C002D003D001D002D000121E5DE84A700302132E907010C082C08378807A3E35  
:2016F300C000C00290700CE0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D000121D8ED083D082  
E8E2  
:20171300F0A3EAF0907010E0F8A3E0FAC000C00278007A00C000C002D003D001D002D0  
00A8  
:20173300121DA4E84A700302176C907010C082C083907010E0F8A3E0FAC000C00278807AAB  
:201753003EC000C002D003D001D002D000121D43D083D082E8F0A3EAF0907010E0F8A3  
E099  
:20177300FAC000C00278407A1FC000C002D003D001D002D000121D59E84A70030217C412A5  
:201793000631907010C082C08378807A3EC000C002907010E0F8A3E0FAC000C002D003D0AE  
:2017B30001D002D000121D8ED083D082E8F0A3EAF0907015C082C083780A7A00D083D0  
8281  
:2017D300E8F012014E90700EE0F8A3E0FAC000C00278FF7AFFC000C002D003D001D002  
D020  
:2017F30000121E5DE84A7003021801120631907019C082C08378017A00D083D082E8F00230  
:201813001823D2179023671221C41220FD12213B907017C082C08378007A00D083D082E8C8  
:20183300F0907017E0F87A00C000C00278087A00C000C002D003D001D002D000121E5DE883  
:201853004A700302186A907017C082C08378007A00D083D082E8F0907017E0F87A00C00000  
:20187300C002780A7A00C000C002D003D001D002D000121E5DE84A70030218A0907017C00C  
:2018930082C08378007A00D083D082E8F0907017E0F87A00C000C002780C7A00C000C00296  
:2018B300D003D001D002D000121E5DE84A70030218D6907017C082C08378007A00D083D  
0FC  
:2018D30082E8F0907017E0F87A00C000C002780D7A00C000C002D003D001D002D000121EB9  
:2018F3005DE84A7003021972907017C082C083122172750200D083D082E8F0907017E0F822  
:201913007A00C000C00278007A00C000C002D003D001D002D000122154E84A70030218FBBD  
:20193300907017E0F87A00C000C00278217A00C000C002D003D001D002D000121E5DE84A0F  
:20195300700302195E12068702196112068A907017C082C08378007A00D083D082E8F09030  
:201973007017E0F87A00C000C002780E7A00C000C002D003D001D002D000121E5DE84A7002  
:20199300030219A8907017C082C08378007A00D083D082E8F0907017C082C08378007A00D5  
:2019B300D083D082E8F022907016E0F87A00C000C00278007A00C000C002D003D001DC02A1  
:2019D300D000121E5DE84A7003021A1D907018E0F87A00C000C00278007A00C000C002D089  
:2019F30003D001D002D000121D59E84A7003021A1AD2A4907016C082C08378017A00D083A4  
:201A1300D082E8F0021A1D121AF30221EC78007A00121F2E121F20C000C002907009E0F81D  
:201A33007A00C000C002D003D001D002D000122217E84A7003021A27D2A378007A00121F86  
:201A53002E907006C082C083A8A07A00C000C00278207A00C000C002D003D001D0C2D00  
09C

:201A7300121F52D083D082E8F0907006E0F87A00C000C00278007A00C000C002D003D00161  
:201A9300D002D000121E5DE84A7003021A54C2A3C2A4907006C082C083A8A07A00C000  
C057  
:201AB3000278207A00C000C002D003D001D002D000121F52D083D082E8F0907006E0F87  
ADF  
:201AD30000C000C00278007A00C000C002D003D001D002D000122154E84A7003021AA522A8  
:201AF300C29775F005D5F0FDD29722907010C082C083907024C082C08378197A00C000C0FA  
:201B130002C000C002781A7A00C000C002D003D001D002D000121CCCE84A7003021CBC  
7869  
:201B3300027A00C000C002D003D001D002D000121D00C000C002D003D001D002D000121  
D28  
:201B53003FC000C002D003D00189828B8312215AC000C002907024C082C083907019E0F84B  
:201B73007A00C000C002C000C002781A7A00C000C002D003D001D002D000121CCCE84A  
7064  
:201B930003021CBC78027A00C000C002D003D001D002D000121D00C000C002D003D001  
D074  
:201BB30002D000121D3FC000C002D003D00189828B8312215AC000C002D003D001D002D  
03E  
:201BD30000121D8AD083D082E8F0A3EAF0907010C082C083907010E0F8A3E0FAC000C0  
02C3  
:201BF30090700EE0F8A3E0FAC000C002D003D001D002D000121DAAD083D082E8F0A3E  
AF0D4  
:201C1300907015C082C083780A7A00D083D082E8F012014E907019C082C08378197A00D0C4  
:201C330083D082E8F02202221D8587E020E5FAD0D0D0E0D0E0D2D574AA75F055900033  
C094  
:201C530082C0833253883F53892F438920438780888D758B00D28E2275C7AA75C755D2BF80  
:201C730022121C6B75C7AA75C755438704D21D2275C7AA75C7555387FBC21D2289828B8  
3DA  
:201C9300E493C082C08388828A83F06017DC09E4F015811581021CC4A3A882AA83D083D  
0D3  
:201CB30082A380DC158115812290236974460222E490237D7450022E4121CE8021CD9B2A9  
:201CD300D5A2D58008B3B0D58003B372D54003021CF7021CFBC2D5EAB50308C2D5E8B  
50181  
:201CF30002D2D522E4F8FA2278FF7AFF22C3E889F0A4FCADF0E960088AF0A420D2122  
DFDFE  
:201D1300EB600688F0A420D2072D4004FAA80422D3021D2790239D74140222E490238E7463

:201D33000A0222E49023BA74280222E4D2D58002C2D5C3E829F8EA3BFA10D504A2D2C  
2D2D1  
:201D53005003021D2722121D5F021CD8C2D5EB33EA121D83901D6B738012D3222200EA  
CBF7  
:201D7300FAE8C9F8121CE820D501B322121CE82233333C3540622D2D58002C2D5C3E89  
9B8  
:201D9300F8EA9BFA10D504A2D2C2D25003021D2722121D5F021CD9EB33EA121D83C0  
E0909E  
:201DB3001DB673800F80278003121DEB121DF4EA5B33401F121D00EA30E70A33487014  
D0F4  
:201DD300E030D01122D0E030D003121DEB22121DEB80E11581021D27E4C398F8E49AF  
AC325  
:201DF30022E4C399F9E49BFBC322121D5F021CDDC3E94B7005D3021D2F227F007E007C  
0065  
:201E13007D0075F010121E48EE33FEEF33FFC3EF9B40117005C3EE99400AC3EE99FEEF  
9B8C  
:201E3300FFD38001C3121E50D5F0DA8C008D028F038E01C322C3E833F8EA33FA22EC33  
FC0F  
:201E5300ED33FD22121CE8021CD8121D5F021CD488298A2A2230191C301705D21AD0D  
022BE  
:201E73002008FDC082C083907071C2D5D21BC21AC0D0800ED0D032C082C08390706FD2  
D549  
:201E9300C0D0C0E0C0F0C000C001C002C003C004C005C006C007D21SE0F8A3E0F58385  
00F4  
:201EB30082E473301052C0E085278CE52804B4C808E40529B52902052AF52830113820134D  
:201ED3003520120EE52BB52A07E52CB529028002502420171F20081CE5C620E217D0E0D2BD  
:201EF30013C212C211C082C083901F04C082C08332021E8ED212D0E0D0D032E4F529F52AF1  
:201F1300F528F52CF52BC211C212C213228528E075F005A485E00085F00222750105750326  
:201F330000121E03850028225389F0D21043A882D28C2290706FE8F0A3EAF043A88222E8B6  
:201F530059F822E849F822907071E8F0A3EAF0D219D2BCC28AD2B943A884229070DE74  
7116  
:201F7300F0A37400F09070DC7471F0A37400F0751000751101C208C21722C2ACC082C083DB  
:201F9300F89070DCE0F9A3E0F5828983E8F0A3E582B45003907100A882E5829070DDF088AB  
:201FB300828983A3E582B45003907100A8829070DEA3E0B50008D2AC0000C2AC80F420089E  
:201FD30004D208D299D083D082D2AC22209846C299300E030220B5C0E0C082C083C000  
C04A

## SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

:201FF30001C002C0039070DDE0FA9070DEE0F9A3E0FBB50205C2080220A785038285018  
3FA  
:20201300E0F599A3E582B45003907100E5829070DFF00220A7C0E0E599C29820150302205C  
:20203300B3B40306200F03022113B41304D20E806FB41109300E69D299C20E8063C082C086  
:2020530083C000C001C002C003FA907085E0F8907083AB82907086E0F9A3E0F5828983A3D5  
:20207300E582B50303907073EAF0E583A982907086F0E9A3F0B5001C907084E0F5838882A2  
:20209300A3E582B50303907073E583A982907084F0E9A3F0D003D002D001D000D083D08287  
:2020B300D0E0D0D032E060061220C9A380F72008FD222008FD221220D0121F8D227911B482  
:2020D300200040020722B40D03770122B408021722B40A07D0E0D0E002210222C000C0E041  
:2020F300121F8DD0E0D000D8F322740D1220C9740A121F8DE5106005F8E41220EF22C2A  
FOO  
:2021130090211BC082C08332C3721B721A500890212AC082C083323008033099FD85158147  
:20213300301D04C2AF80FE222008FDC21712214422301A0C902153C082C083C0D0021E689C  
:2021530022121CE8021CD2E0F8A3E0FA22C3A3E033400302216C021DFD121D5F021CDE  
C01C  
:20217300A853A8EB907087E0F8907083AB82907084E0F9A3E0B500047800801A8983F58281  
:20219300A3E582B50303907073E0F8AB82E583907084F0EBA3F0D0A822907073AA83A98230  
:2021B300907084EAF0A3E9F0907086EAF0A3E9F022E49360061220C9A380F62008FD22E814  
:2021D30049F8EA4BFA22121CEE021CD9E859F8EA5BFA22121CEE021CD4D007D006D0  
05D04D  
:2021F30004D003D002D001D000D0F0D0E0D0D020D509D083D082D0D0C21B32D083D08  
2D0AB  
:20221300D0C21322121CE8021CDDC2111220C580FE7433C3301B02940EF5F0E581B515001D  
:20223300400C747FF42581400525F040012285158102224790241B74640222B4C082C0833B  
:202253001220FD9024411221C412226AD083D0821221C41220FD229024481221C490715B76  
:2022730012215A907151A982AB8312228D9071511220B890244F1221C422C3E84A7006C0CF  
:20229300E07C01800E7C00790A1222B2C0010CE84A70F47930D0E029F0A3DCF9E4F022  
AF69  
:2022B30002AE00AB0178077902EF8BF084AAF0FF18E6D7C48BF084AAF0C4C6C4D7C48  
BF098  
:2022D30084AAF0D6A806AA07A9F022E8F0A3EAF022B42800500122C0E0C000C002C0E  
0C095  
:2022F30082C08390715912215A90715B1222DED083D082D0E0B42800400612224F2008FD92  
:20231300D002D000D0E090715DF0B4500122B42800500122B4960122301B0B301A089023CC  
:2023330039C082C08332C2AF80FEC2AF301B0B301A0890234DC082C08332C2AF80FE504557  
:20235300533A5354455020322E333004F004500450045004500417272617920496E6465BC  
:202373007820546F6F2042696700537472696E67205472756E63617465640044697669641D

:2023930065206279205A65726F004D617468204F766572666C6F77004D61746820556E643B  
:2023B3006572666C6F77004D61746820417267756D656E742042616400496E7075742056E1  
:2023D300616C756520546F6F2042696700496E7075742056616C7565204572726F7200491F  
:2023F3006E7075742056616C7565204E656761746976650049737461636B2F4235322043F9  
:202413006F6E666C6963740049737461636B204572726F7200566563746F722072656C6FEC  
:20243300636174696F6E204641494C4544004552524F522000284C696E652000293A200049  
:0E245300535441525455502F52455345540096  
:00003301CC

Serieller Snoop-Prozessor (IC16) Hex Datei (Serial5.hex)

:1000000680006061E0A1209080C2A0003042803C9  
:10001000606E8051009EA02060A08022900000A95  
:10002000540C130A6C0C2B00EB02140A0008010C90  
:10003000600000C0500060C2500000A120C8901C0  
:1000400043066504130C890143066505140C8901F8  
:1000500043060504150C890143060505160C8901A4  
:1000600043062504170C890143062505180C890150  
:1000700043064504190C890143064505200C2B0055  
:06008000EB02400A000A39  
:0203FE00170ADC  
:00000001FF

### Patentansprüche

1. Vorrichtung zur Durchführung einer PCR und Überwachung der Reaktion in Echtzeit während eines Temperaturwechsels mit; einer Vielzahl von Probenccontainern jeweils zur Aufnahme einer PCR-Probe, wobei jeder Probenccontainer ein optisch klares Material hat, wobei jeder Probenccontainer weniger als 1 Milliliter einer Probe aufnimmt und jeder Probenccontainer eine erste Seite, eine zweite Seite und ein Ende hat; einem drehbaren Karussell zum aufeinanderfolgenden Bewegen der PCR-Probenccontainer einer nach dem anderen zu einem Überwachungsort während einer Verstärkung; einer thermischen Wechseinrichtung mit einem Zwangslufterwärmer zur gleichzeitigen Erwärmung sämtlicher PCR-Proben; einer Einrichtung zur gleichzeitigen Abkühlung aller PCR-Proben; und einer Steuereinrichtung zum wiederholenden Betreiben der thermischen Wechseinrichtung, um die PCR-Proben dem thermischen Wechsel auszusetzen; einer Einrichtung zur optischen Anregung einer der Proben, um zu veranlassen, dass diese Probe fluoresziert; und einer Einrichtung zur Erfassung der Fluoreszenz der angeregten Probe, wenn die angeregte Probe an dem Überwachungsort ist.

2. Vorrichtung zur Durchführung einer PCR und Überwachung der Reaktion in Echtzeit während eines Temperaturwechsels nach Anspruch 1 desweiteren mit; einer Einrichtung zur Bestimmung wenigstens eines Reaktionsparameters entsprechend der erfassten Fluoreszenz; und einer Einrichtung zur Einstellung der Steuereinrichtung entsprechend des Reaktionsparameters.

3. Vorrichtung zur Durchführung einer PCR und Überwachung der Reaktion in Echtzeit während eines Temperaturwechsels nach Anspruch 2, in der die Steuereinrichtung die Betätigung der Einrichtung zur Erwärmung und der Einrichtung zur Abkühlung einstellt, um die Zeiten zu ändern, in denen die Einrichtung zur Erwärmung und die Einrichtung zur Abkühlung entsprechend des Reaktionsparameters arbeiten.

4. Vorrichtung zur Durchführung einer PCR und Überwachung der Reaktion in Echtzeit während eines Temperaturwechsels nach Anspruch 2, in der die Steuereinrichtung die Betätigung der Einrichtung zur Erwärmung und die Einrichtung zur Abkühlung einstellt, um die Rate, bei der die biologischen Proben erwärmt und abgekühlt werden, entsprechend des Reaktionsparameters zu ändern.

5. Vorrichtung zur Durchführung einer PCR und Überwachung der Reaktion in Echtzeit während eines Temperaturwechsels nach Anspruch 1, wobei jeder Probentyp wenigstens teilweise aus Glas hergestellt ist, wobei jeder Probentyp ein Volumen hat, das nicht größer als etwa 10,000 µl ist.

6. Vorrichtung zur Durchführung einer PCR und Überwachung der Reaktion in Echtzeit während eines Temperaturwechsels nach Anspruch 1, desweiteren mit einer Einrichtung zur Positionierung der Einrichtung zur optischen Anregung der Probe und der Einrichtung zur Erfassung der Fluoreszenz der angeregten Probe, um die Fluoreszenz zu optimieren, die erfasst wird.

7. Vorrichtung zur Durchführung einer PCR und Überwachung der Reaktion in Echtzeit während eines Temperaturwechsels nach Anspruch 1, wobei die Einrichtung zur Abkühlung einen Luftbewegungsmechanismus hat, der Außenluft zu den Probentypen transportiert.

8. Vorrichtung zur Durchführung einer PCR und Überwachung der Reaktion in Echtzeit während eines Temperaturwechsels nach Anspruch 1, wobei die Steuereinrichtung einen Mikroprozessor hat.

9. Vorrichtung zur Durchführung einer PCR und Überwachung der Reaktion in Echtzeit während eines Temperaturwechsels nach Anspruch 1, wobei die Einrichtung zur optischen Anregung der Probe eine Photomitteranordnung hat, die so positioniert ist, dass die Fluoreszenz, die von dieser emittiert wird, auf dem Probentyp auftritt, in dem die angeregte Probe aufgenommen ist.

10. Vorrichtung zur Durchführung einer PCR und Überwachung der Reaktion in Echtzeit während eines Temperaturwechsels nach Anspruch 9, wobei die Einrichtung zur Erfassung der Fluoreszenz der angeregten Probe eine Photodetektoranordnung hat, die so positioniert ist, dass die Fluoreszenz, die von der Seite des Probentypen der angeregten Probe emittiert wird, erfasst wird.

11. Vorrichtung zur Durchführung einer PCR und Überwachung der Reaktion in Echtzeit während eines Temperaturwechsels nach Anspruch 1, wobei die Einrichtung zur optischen Anregung der Probe eine Photomitteranordnung hat, die so positioniert ist, dass die Fluoreszenz, die von dieser emittiert wird, auf das Ende des Probentypen mit der angeregten Probe auftritt.

12. Vorrichtung zur Durchführung einer PCR und Überwachung der Reaktion in Echtzeit während eines Temperaturwechsels nach Anspruch 11, wobei die Einrichtung zur Erfassung der Fluoreszenz der angeregten Probe eine Photodetektoranordnung hat, die so angeordnet ist, dass die Fluoreszenz, die von dem Ende des Probentypen mit der angeregten Probe emittiert wird, erfasst wird.

13. Vorrichtung zur Durchführung einer PCR und Überwachung der Reaktion in Echtzeit während eines Temperaturwechsels nach Anspruch 1, wobei die Einrichtung zur Bestimmung wenigstens eines Reaktionsparameters entsprechend der erfassten Fluoreszenz eine Rechnereinrichtung zur Bestimmung wenigstens eines Reaktionsparameters hat, der aus der Gruppe ausgewählt ist, die besteht aus: einer Produktschmelztemperatur, Produktschmelzzeit, einer Produktnachglühtemperatur, einer Produktnachglühzeit, einer Messfühlerschmelztemperatur, einer Messfühlerschmelzzeit, einer ersten Ausglüh-/Ausdehnungstemperatur und einer ersten Ausglüh-/Ausdehnungszeit.

14. Vorrichtung zur Durchführung einer PCR und Überwachung der Reaktion in Echtzeit während eines Temperaturwechsels nach Anspruch 1, wobei die Steuereinrichtung eine Einrichtung hat, die die Proben abkühlt, wenn die Einrichtung zur Erfassung der Fluoreszenz der angeregten Probe erfasst, dass das Produkt vollständig geschmolzen ist.

15. Vorrichtung zur Durchführung einer PCR und Überwachung der Reaktion in Echtzeit während eines Temperaturwechsels nach Anspruch 1, wobei die Steuereinrichtung eine Einrichtung zur Erwärmung der Proben hat, wenn die Einrichtung zur Erfassung der Fluoreszenz der angeregten Probe erfasst, dass keine weitere Produktgenerierung erfolgt.

16. Vorrichtung zur Durchführung einer PCR und Überwachung der Reaktion in Echtzeit während eines

Temperaturwechsels nach Anspruch 1, wobei die Einrichtung zur optischen Anregung positioniert ist, um mit der ersten Seite des Probencontainers zu interagieren, und die Einrichtung zur Erfassung der Fluoreszenz positioniert ist, um mit der zweiten Seite des Probencontainers mit der angeregten Probe zu interagieren.

17. Vorrichtung zur Durchführung einer PCR und Überwachung der Reaktion in Echtzeit während eines Temperaturwechsels nach Anspruch 1, wobei die Einrichtung zur optischen Anregung positioniert ist, um mit dem Ende des Containers mit der angeregten Probe zu interagieren, und die Einrichtung zur Erfassung der Fluoreszenz positioniert ist, um mit dem Ende des Probencontainers mit der angeregten Probe zu interagieren.

18. Verfahren zur Durchführung einer Nukleinsäureverstärkung, während der Fortschritt der Verstärkung überwacht wird, wobei das Verfahren die Schritte hat:

- (a) Bereitstellung eines drehbaren Karussells, das eine Vielzahl von biologischen Proben vorsieht, wobei jede Probe in einem Container ist, um sich der Nukleinsäureverstärkung zu unterziehen;
- (b) gleichzeitige Beaufschlagung aller Probencontainer mit Heißluft, um einen ersten Temperaturübergang in den biologischen Proben von einer ersten Temperatur zu einer zweiten Temperatur zu induzieren;
- (c) gleichzeitiges Abkühlen aller Probencontainer, um einen zweiten Temperaturübergang in den biologischen Proben von der zweiten Temperatur zur ersten Temperatur zu induzieren;
- (d) Anregung der biologischen Proben während des Temperaturübergangs, derart, dass die Fluoreszenz von der Probe emittiert wird;
- (e) Drehung des Karussells, um die Proben nacheinander aufeinanderfolgend zu einem Überwachungsort während der Verstärkung zu bewegen; und
- (f) Erfassung der Fluoreszenz, die von den Proben wenigstens einmal emittiert wird, wenn jeder Probencontainer an dem Überwachungsort ist, um wenigstens einen Reaktionsparameter zu bestimmen.

19. Verfahren zur Durchführung einer Nukleinsäureverstärkung nach Anspruch 18, wobei der Schritt (f) während des ersten Temperaturübergangs stattfindet und den Schritt zur Bestimmung der Schmelztemperatur eines Produkts aufweist.

20. Verfahren zur Durchführung einer Nukleinsäureverstärkung nach Anspruch 18, wobei der Schritt (f) während des ersten Temperaturübergangs stattfindet und den Schritt zur Bestimmung der Schmelztemperatur einer Probe enthält.

21. Verfahren zur Durchführung einer Nukleinsäureverstärkung nach Anspruch 18, wobei der Schritt (b) des Weiteren den Schritt zur Steigerung der Temperatur der biologischen Proben mit einer Rate von wenigstens 2,5°C/sec. enthält.

22. Ein Verfahren zur Durchführung einer Nukleinsäureverstärkung nach Anspruch 18, wobei Schritt (b) des Weiteren den Schritt zur Steigerung der Temperatur der biologischen Proben auf wenigstens 40°C während einer Periode enthält, die nicht länger als 10 Sekunden dauert.

23. Verfahren zur Durchführung einer Nukleinsäureverstärkung nach Anspruch 18, wobei Schritt (d) während des ersten Temperaturübergangs stattfindet und den Schritt zur Erfassung der Fluoreszenz, die von der angeregten Probe emittiert wird, wenigstens zweimal während des Temperaturübergangs enthält.

24. Verfahren zur Durchführung einer Nukleinsäureverstärkung nach Anspruch 18, wobei Schritt (b) des Weiteren den Schritt zur Steigerung der Temperatur der biologischen Proben aufweist, bis das Produkt in der angeregten Probe vollständig geschmolzen ist.

25. Vorrichtung zur Durchführung einer PCR und Überwachung der Reaktion in Echtzeit während eines Temperaturwechsels nach Anspruch 1 mit einer Überwachungseinrichtung zur Feststellung der biologischen Reaktion; und einer Steuereinrichtung zur Steuerung des Betriebs des Karussells, einer thermischen Wechseinrichtung und der Überwachungseinrichtung, derart, dass der Fortschritt der biologischen Reaktion erfasst wird, wenn der Wechsel stattfindet, wobei:

die thermische Wechseinrichtung wiederholend sowohl in der Überwachungs- als auch in der Nichtüberwachungsposition erwärmt als auch abkühlt;

die Einrichtung zur optischen Anregung einer der Proben hat eine Anregungsquelle, die Anregungsfluoreszenz emittiert; und

eine Einrichtung zur Leitung der Anregungsfluoreszenz zur Überwachungsposition, derart, dass die Probe, die in der Überwachungsposition angeordnet ist, Fluoreszenz emittiert; und

die Einrichtung zur Erfassung der Fluoreszenz der angeregten Probe hat

eine Einrichtung zur Verarbeitung der emittierten Fluoreszenz zu einem elektrischen Signal;  
eine Einrichtung zur Aufbereitung des elektrischen Signals, um zu einem Reaktionsparameter zu gelangen;  
eine Einrichtung zum Anzeigen des Reaktionsparameters; und  
eine Einrichtung zur Aufzeichnung des Reaktionsparameters.

26. Vorrichtung zur Durchführung einer PCR und Überwachung der Reaktion in Echtzeit während eines Temperaturwechsels nach Anspruch 25, wobei der Reaktionsparameter aus einer Gruppe ausgewählt ist, die besteht aus: einer Denaturierungstemperatur und -zeit, einer ersten Ausglühtemperatur und -zeit, einer Mess-fühlerausglühtemperatur und -zeit, einer Enzymausdehnungstemperatur und -zeit und einer Anzahl von Zyklen.

27. Vorrichtung zur Durchführung einer PCR und Überwachung der Reaktion in Echtzeit während eines Temperaturwechsels nach Anspruch 25, wobei:  
die Anregungsquelle eine Photoemitterquelle hat, wobei die Photoemitterquelle aus einer Gruppe ausgewählt ist, die aus einer Xenonlampe und einer Lichtemittierdiode besteht;  
die Einrichtung zur Umwandlung der emittierten Fluoreszenz in ein elektrisches Signal ein Photoerfassungs-gerät hat, wobei das Photoerfassungsgerät aus einer Gruppe ausgewählt ist, die aus einem Photovervielfacher und einer Photodiode besteht; und  
die Einrichtung zur Verarbeitung des elektrischen Signals, um zu einem Reaktionsparameter zu gelangen, einen Mikroprozessor hat.

28. Vorrichtung zur Durchführung einer PCR und Überwachung der Reaktion in Echtzeit während eines Temperaturwechsels nach Anspruch 27, wobei die Einrichtung zur Umwandlung der emittierten Fluoreszenz in ein elektrisches Signal ein erstes Photodetektionsgerät hat, wobei das erste Photodetektionsgerät aus einer Gruppe ausgewählt ist, die aus einem Photovervielfacher und einer Photodiode besteht, und ein zweites Photodetektionsgerät, welches aus einer Gruppe ausgewählt ist, die aus einem Photovervielfacher und einer Photodiode besteht.

29. Verfahren zur Durchführung einer Nukleinsäureverstärkung nach Anspruch 18, wobei  
die angeregte biologische Probe eine Substanz aufweist, die bei einer ersten Wellenlänge Fluoreszenz emittiert, die auf den Fortschritt der Nukleinsäureverstärkung bezogen ist;  
der Temperaturübergang von der ersten Temperatur zur zweiten Temperatur einen ersten Bereich definiert; Schritt (f) desweiteren die Erfassung der Fluoreszenz aufweist, die von der angeregten biologischen Probe mehrmals emittiert wird, wenn die Temperatur der Probe in dem ersten Bereich ist;  
und desweiteren mit den Schritten:  
(g) Einstellung der Temperatur aller Proben über einem zweiten Bereich, der die zweite Temperatur und eine dritte Temperatur aufweist, wobei die dritte Temperatur von der zweiten Temperatur verschieden ist; und  
(h) Erfassung der Fluoreszenz, die von der angeregten biologischen Probe mehrmals emittiert wird, wenn die Temperatur der Probe in dem zweiten Bereich ist.

30. Verfahren zur Durchführung einer Nukleinsäureverstärkung nach Anspruch 29, desweiteren mit dem Schritt:  
(i) Einstellung wenigstens eines Parameters der Verstärkungsreaktion entsprechend der Fluoreszenz, die in dem Schritt (d) oder (h) erfasst wird.

31. Verfahren zur Durchführung einer Nukleinsäureverstärkung nach Anspruch 29, wobei Schritt (b) desweiteren den Schritt zur Beendigung der Einstellung der Temperatur der Proben über einen ersten Bereich aufweist, wenn das Produkt im wesentlichen vollständig geschmolzen ist.

32. Verfahren zur Durchführung einer Nukleinsäureverstärkung nach Anspruch 29, wobei Schritt (g) desweiteren den Schritt zur Beendigung der Einstellung der Temperatur der Proben über einen zweiten Bereich enthält, wenn die erste Ausglühung im wesentlichen beendet ist.

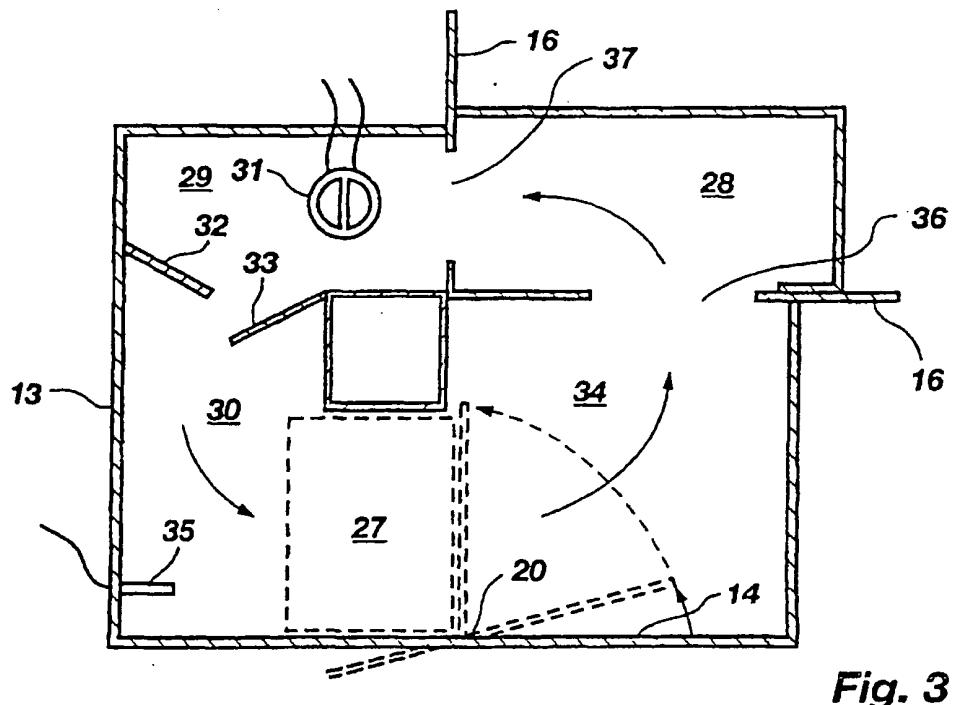
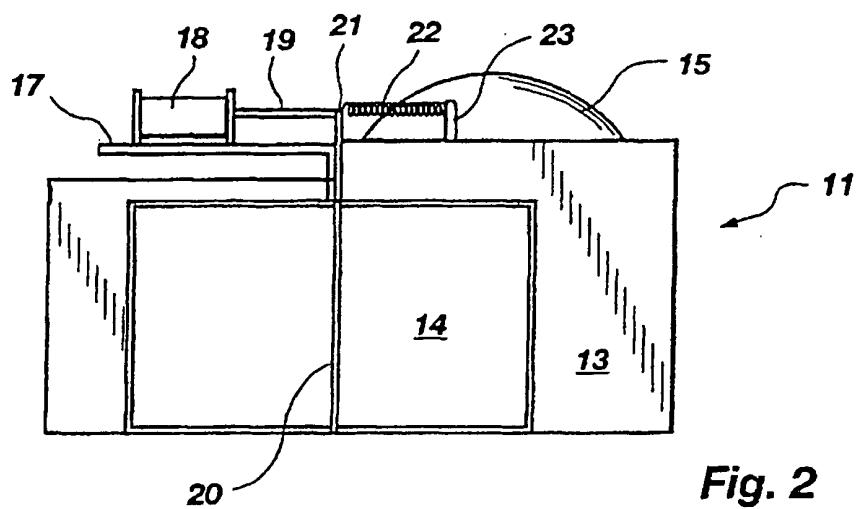
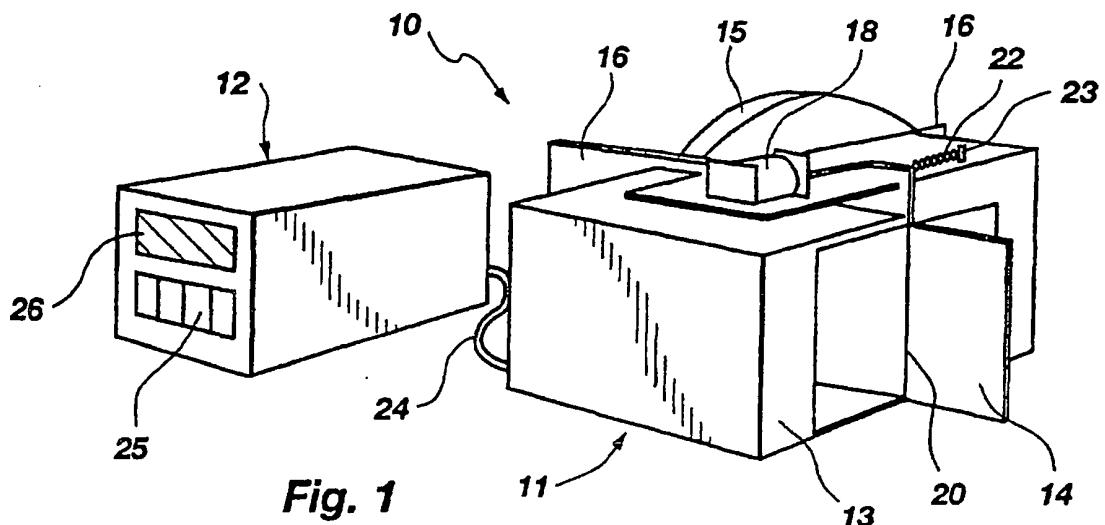
33. Verfahren zur Durchführung einer Nukleinsäureverstärkung nach Anspruch 29 desweiteren mit dem Schritt:  
(j) Einstellung der Temperatur sämtlicher Proben über einen dritten Bereich und Beendigung der Einstellung der Temperatur der Proben über den dritten Bereich, wenn die Produktakkumulation ein wirksames Niveau erreicht.

34. Verfahren zur Durchführung einer Nukleinsäureverstärkung nach Anspruch 29, wobei die Schritte (f)

und (h) desweiteren den Schritt zur Erfassung der Fluoreszenz, die von der angeregten biologischen Probe emittiert wird, im Bereich über 400 nm bis 800 nm enthalten.

Es folgen 58 Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen



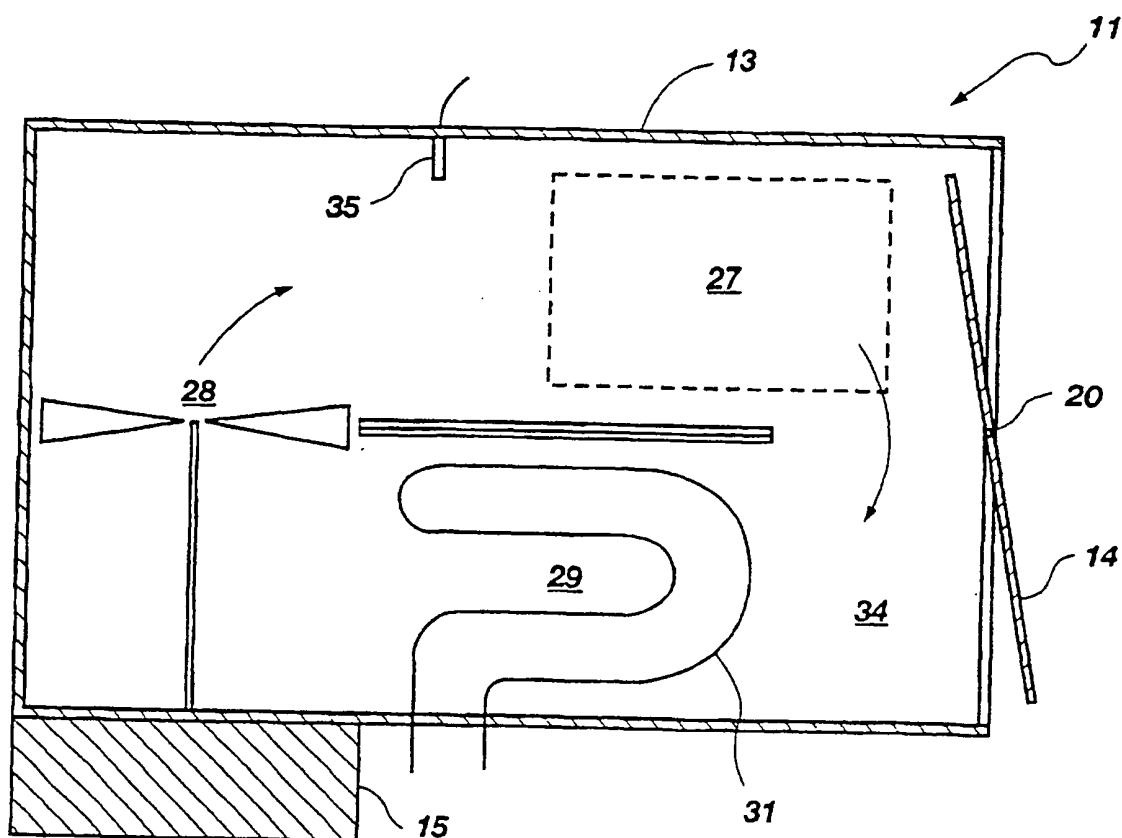


Fig. 4

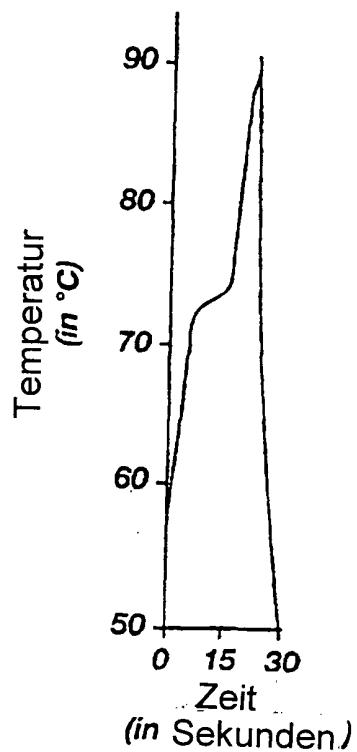
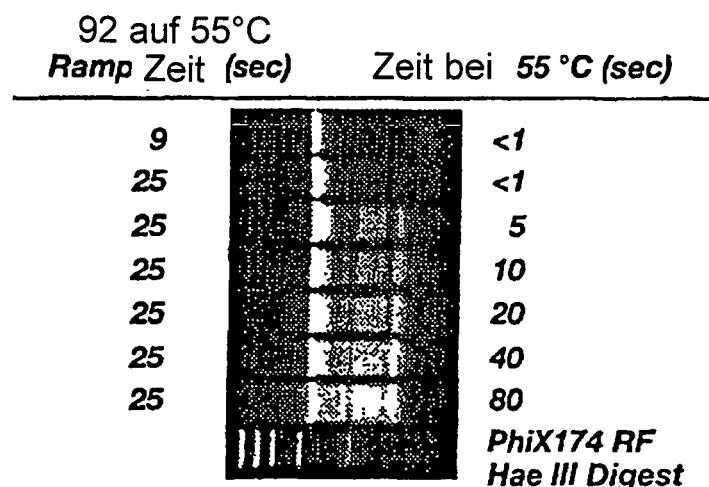


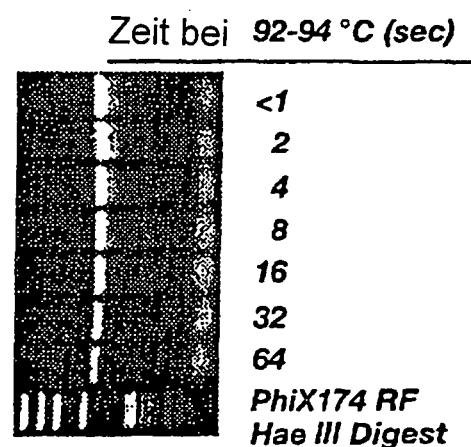
Fig. 5

Effekt der Anlagerungszeit auf die Produktausbeute und die Hintergrundverstärkung



*Fig. 7*

Effekt der Denaturierungszeit  
auf die Produktausbeute



*Fig. 6*

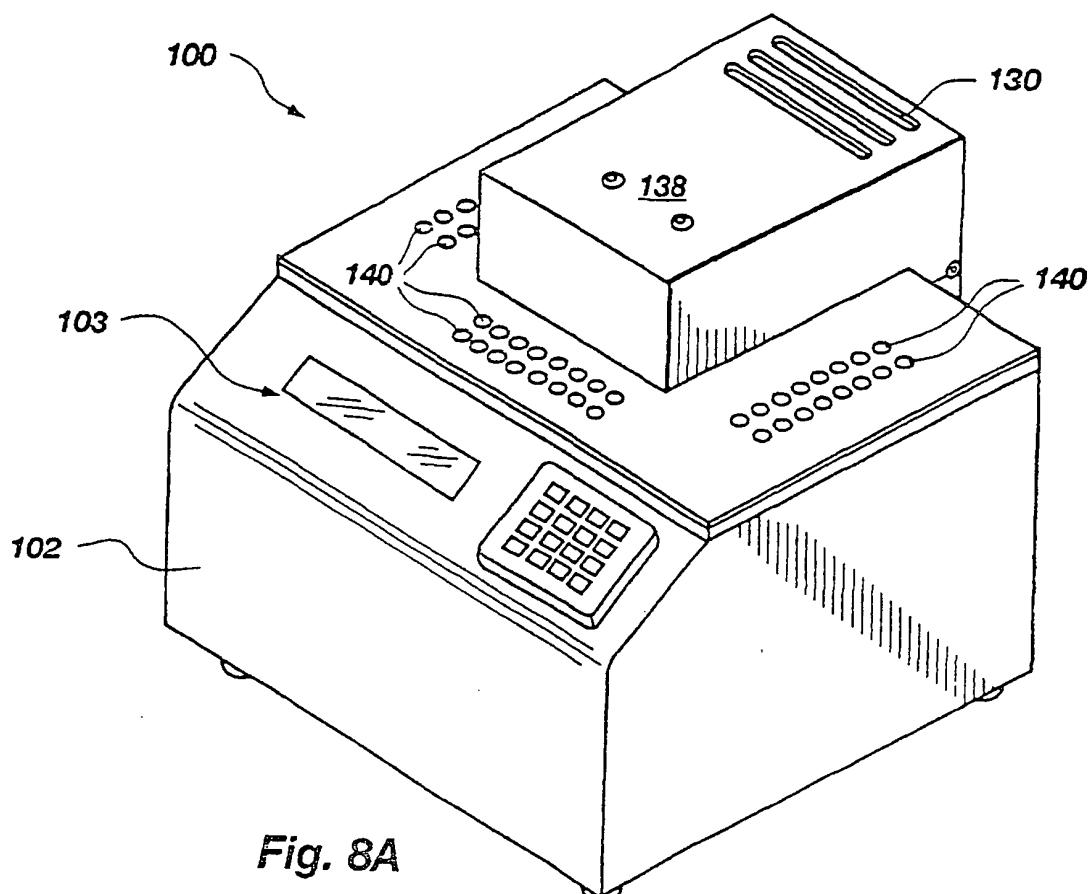


Fig. 8A

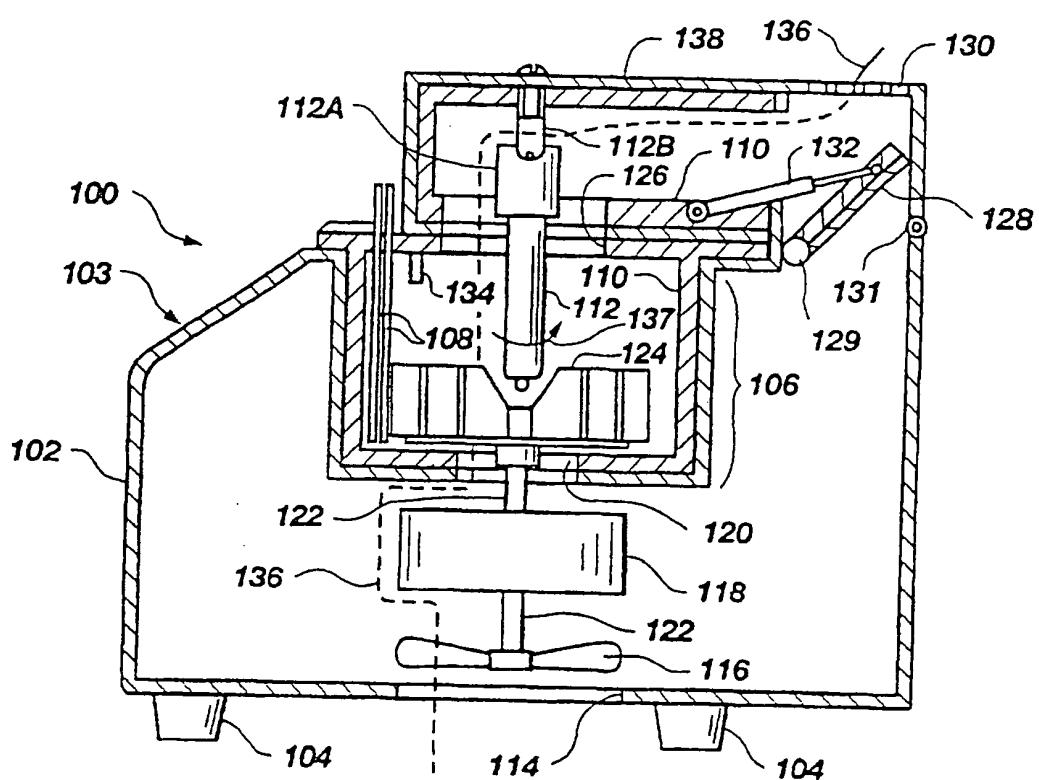
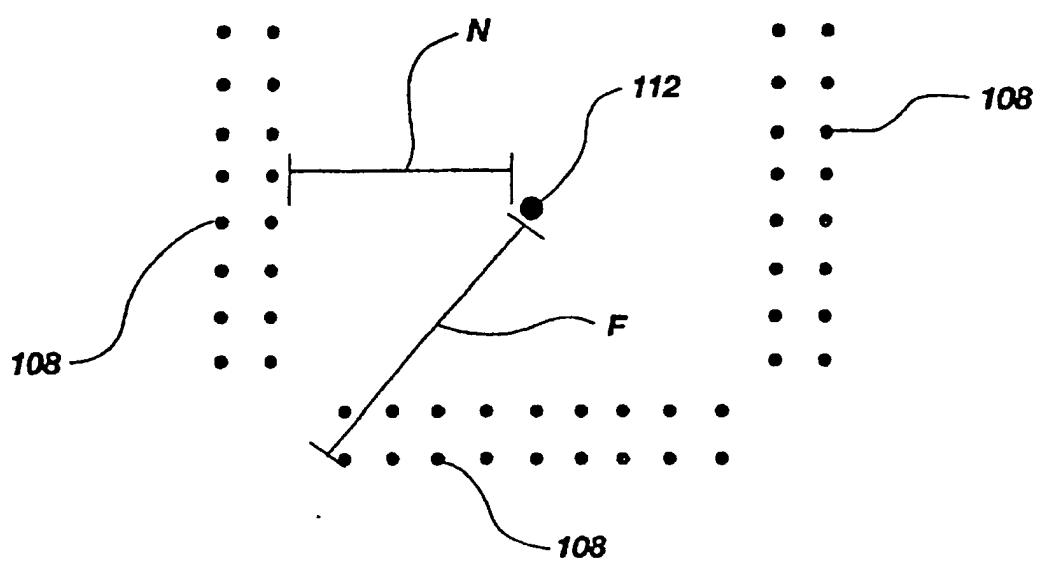


Fig. 8B



*Fig. 8C*

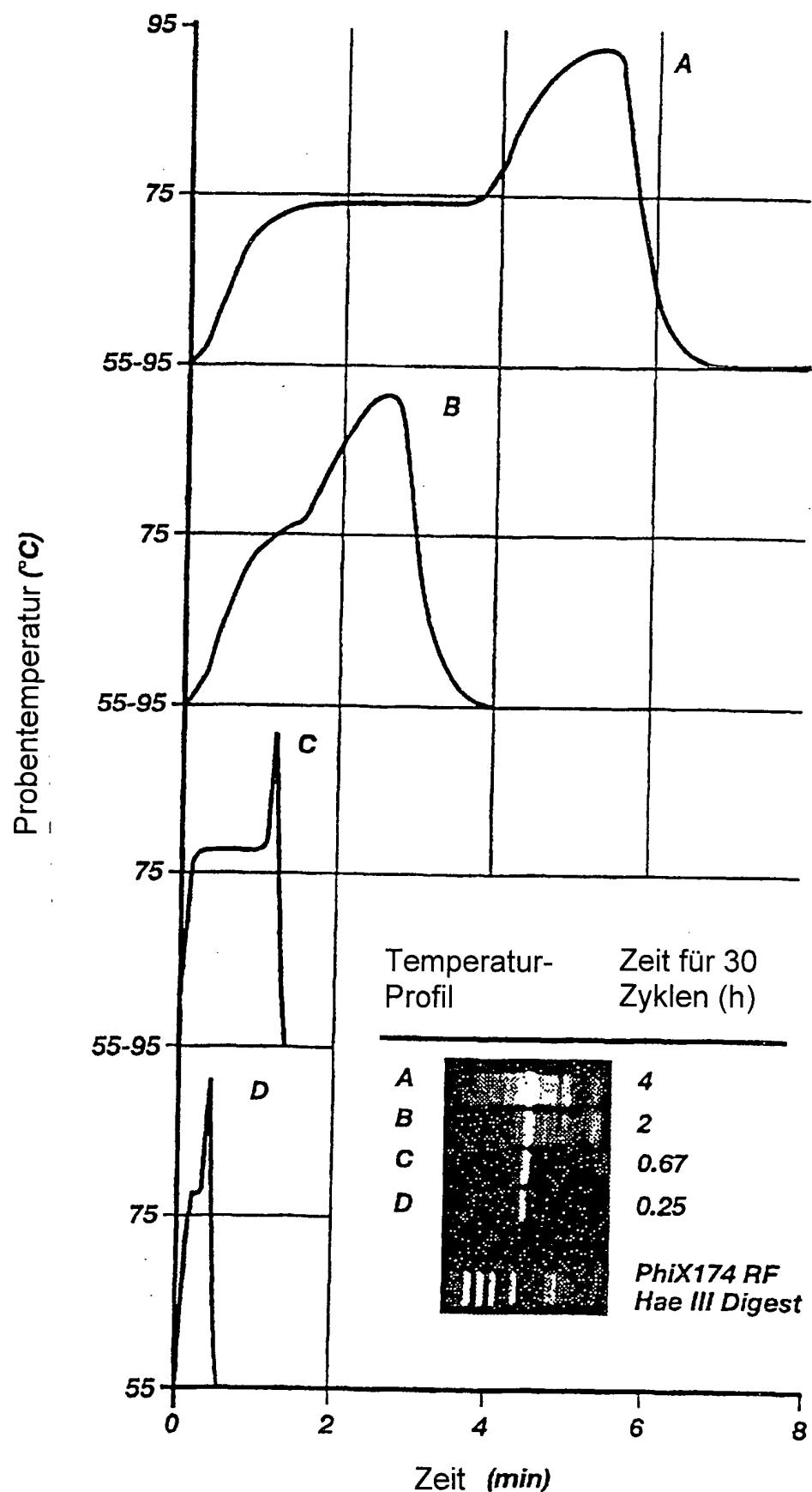


Fig. 9A

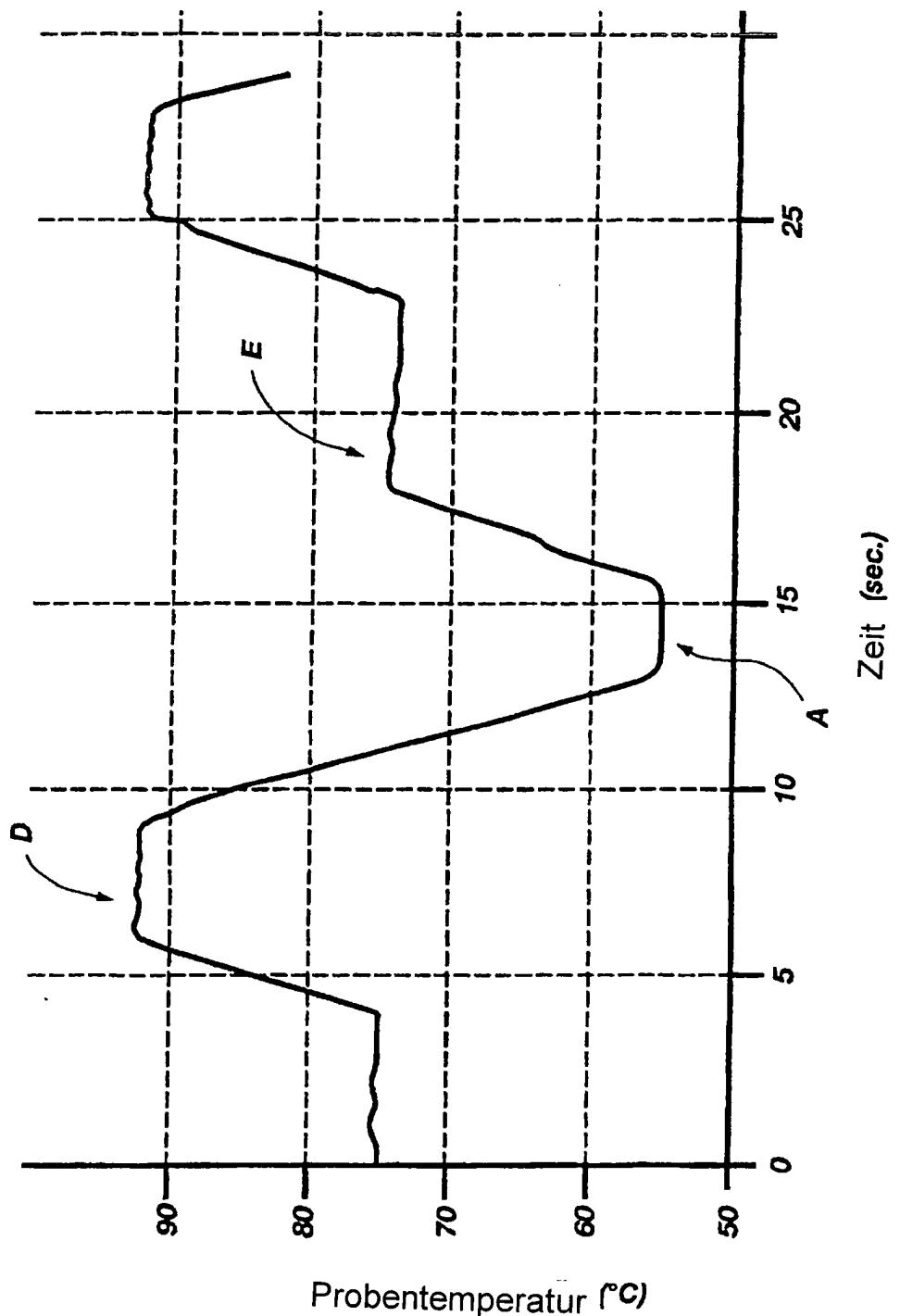


Fig. 9B

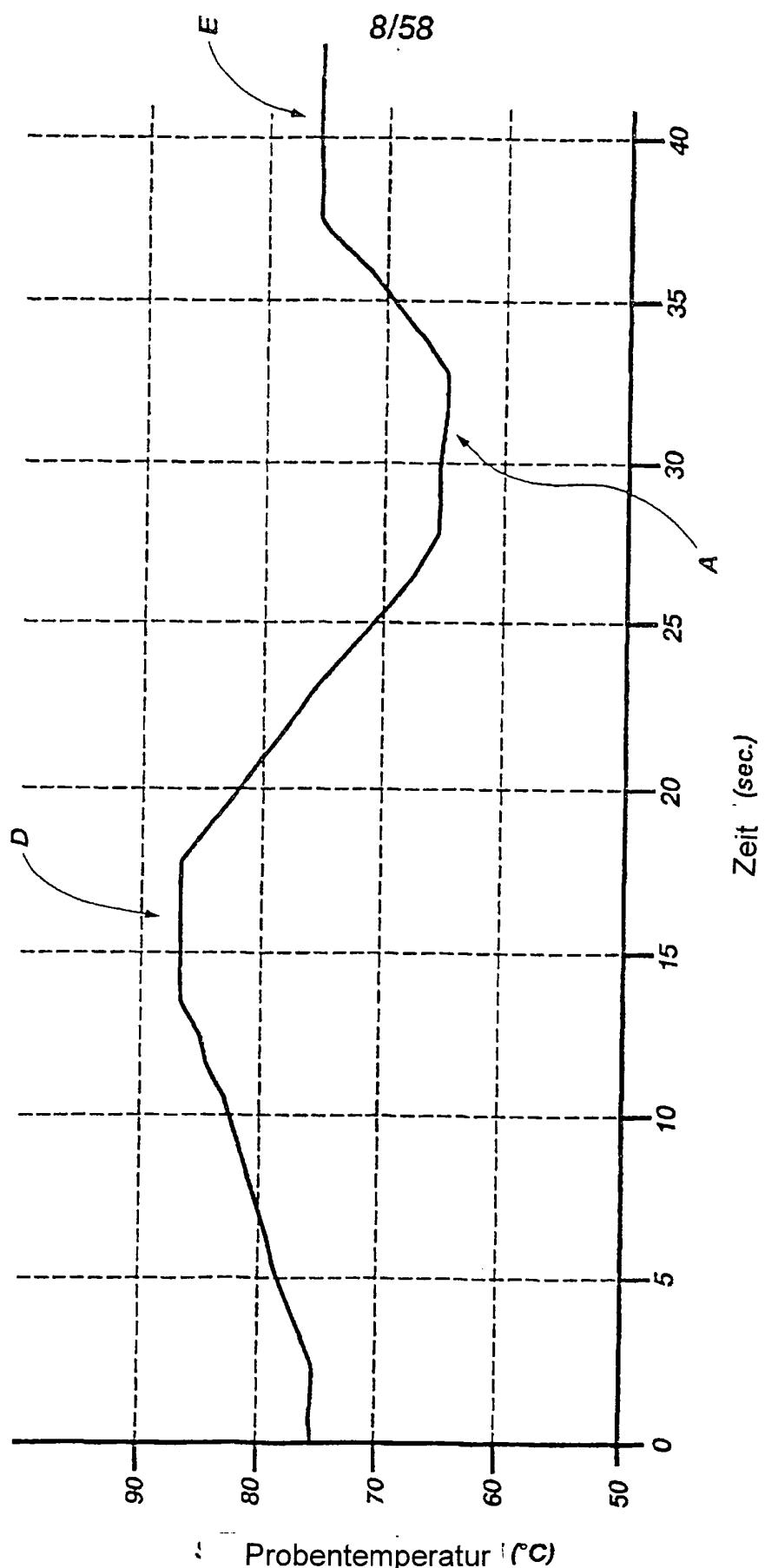


Fig. 9C

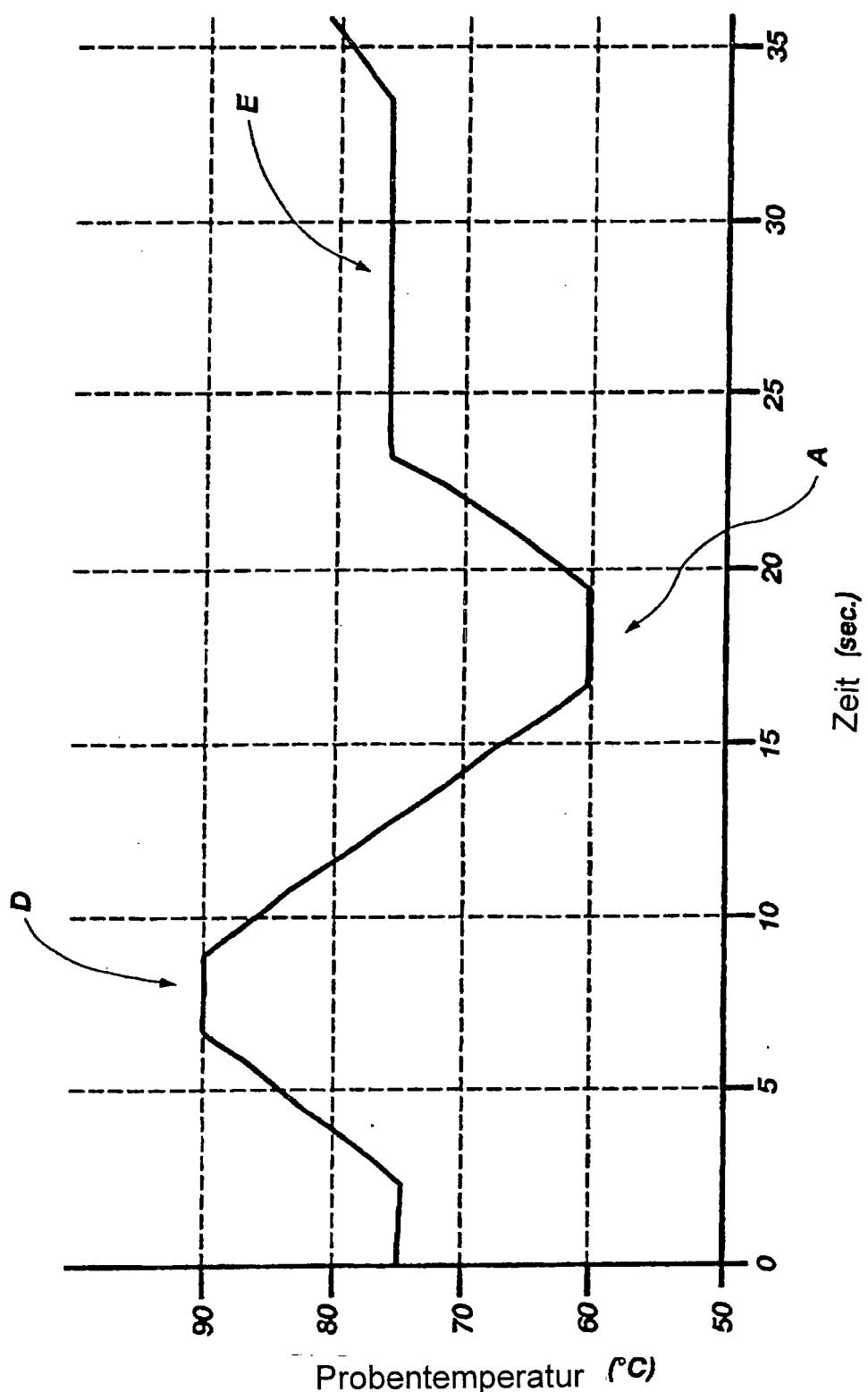


Fig. 9D

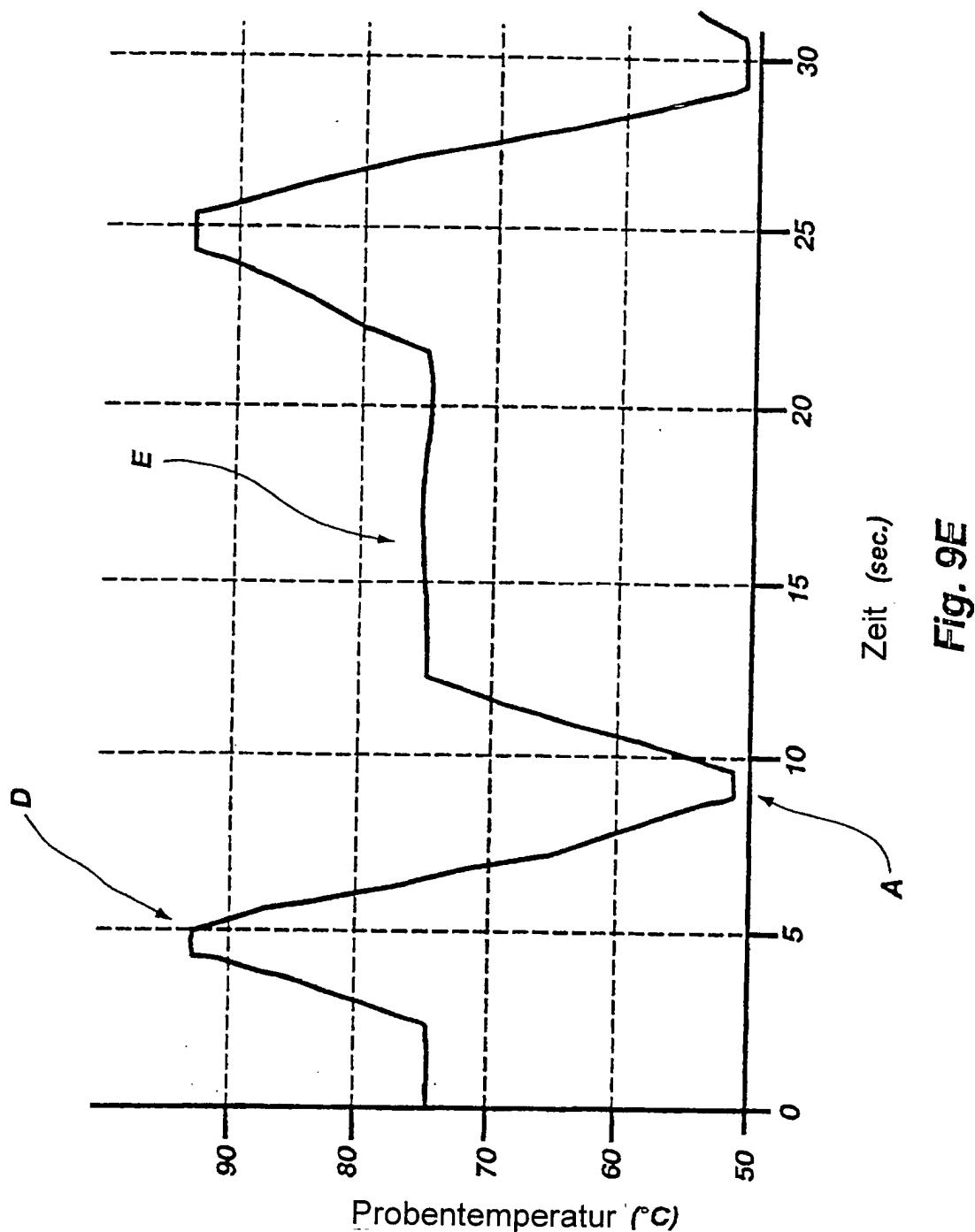


Fig. 9E

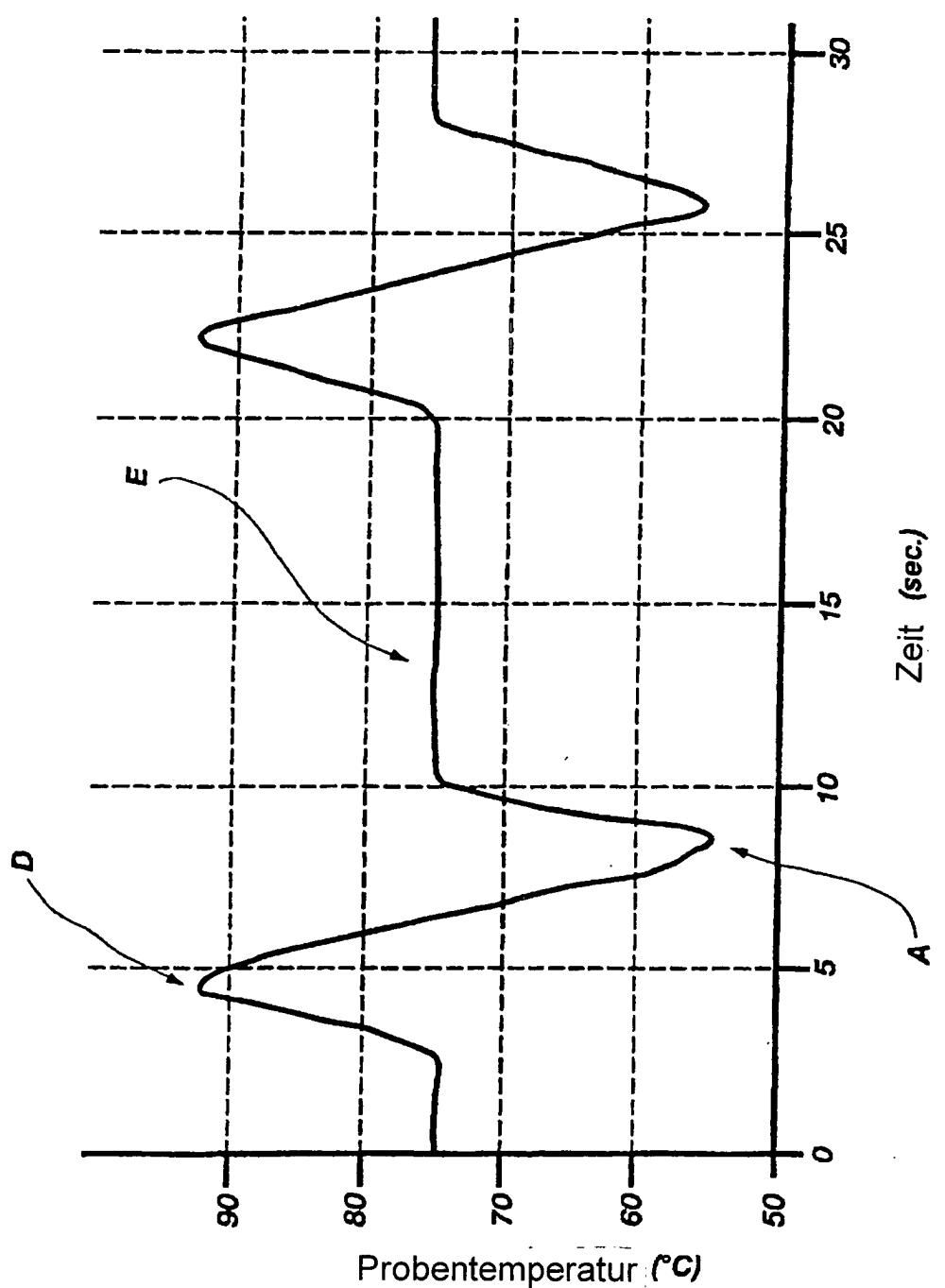


Fig. 9F

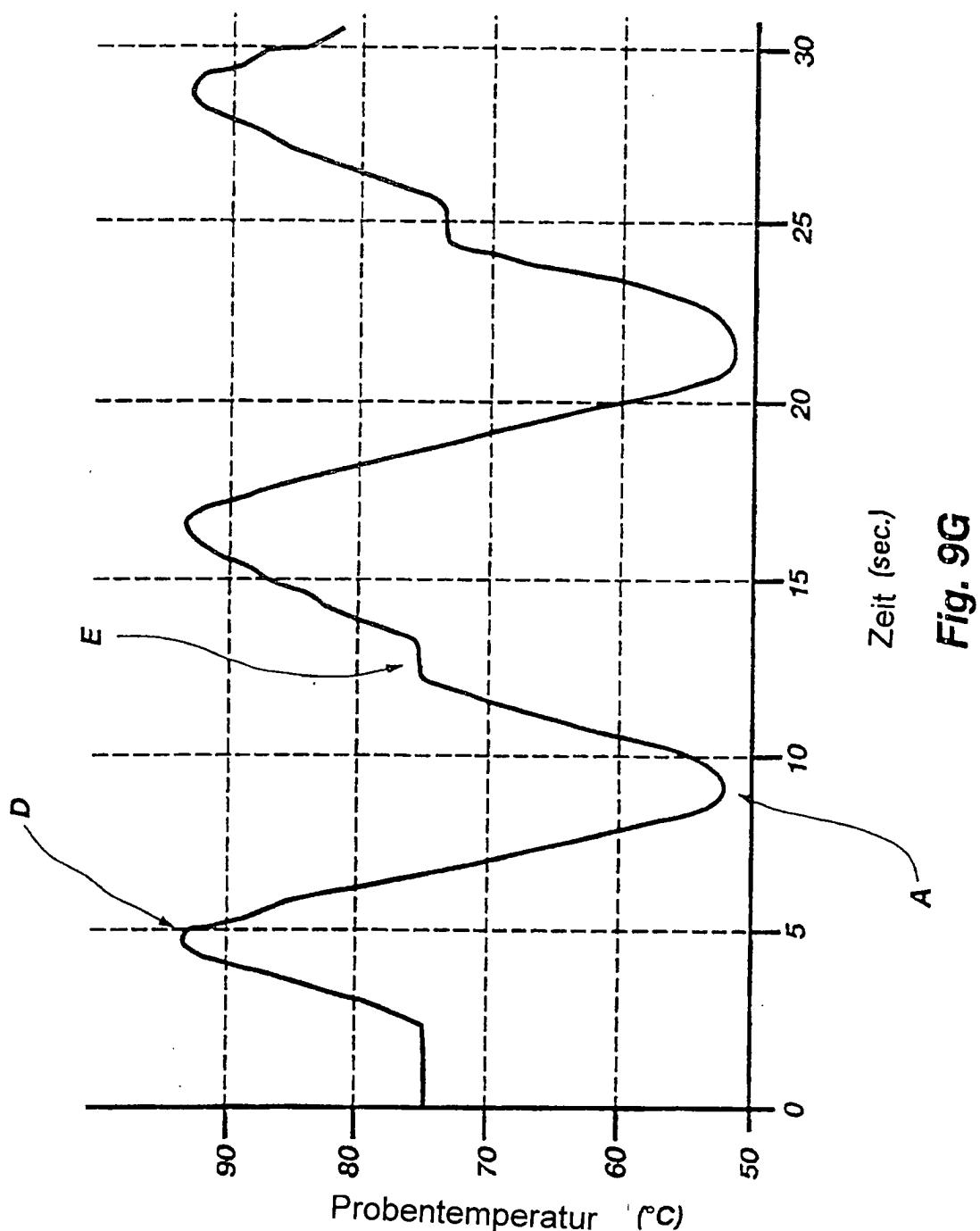


Fig. 9G

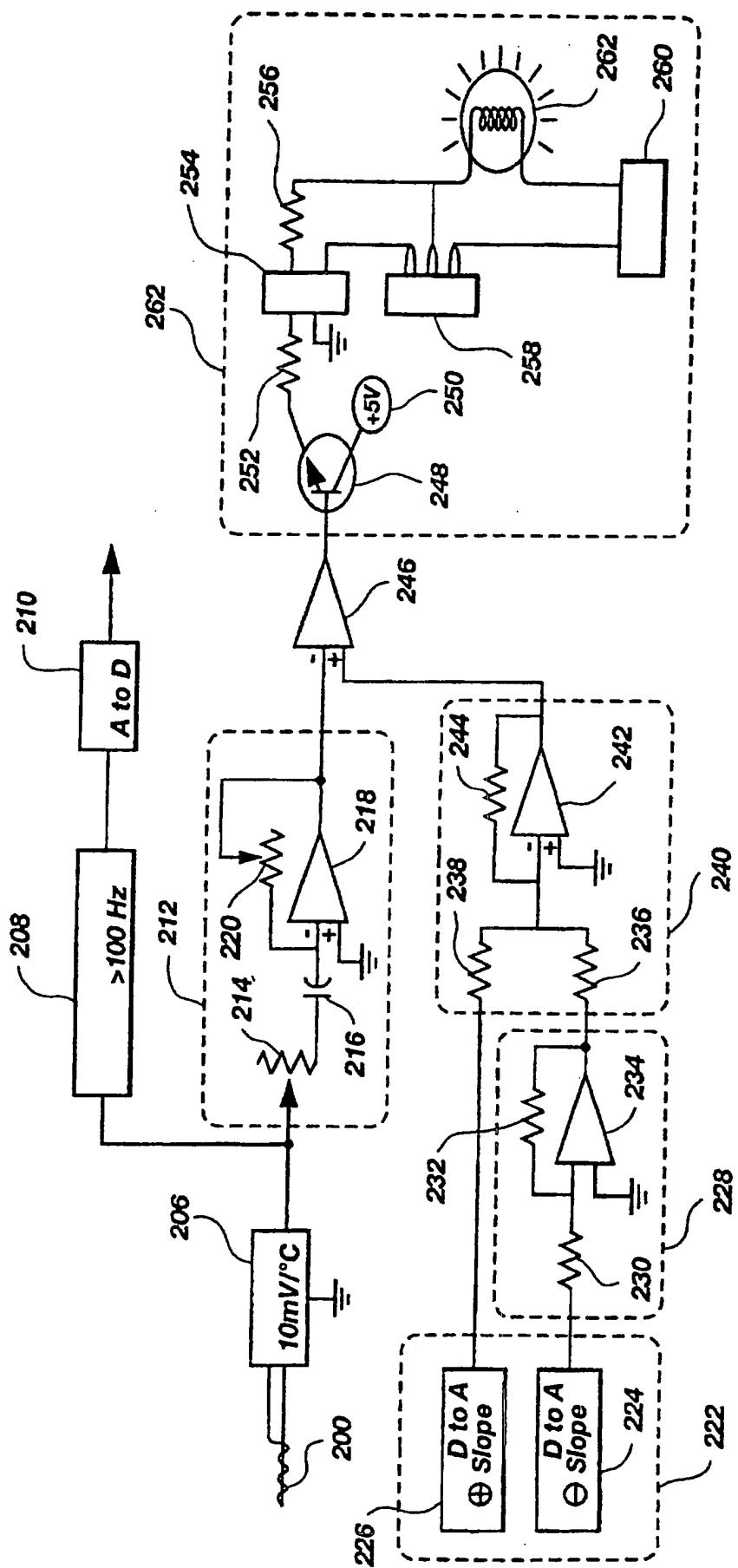
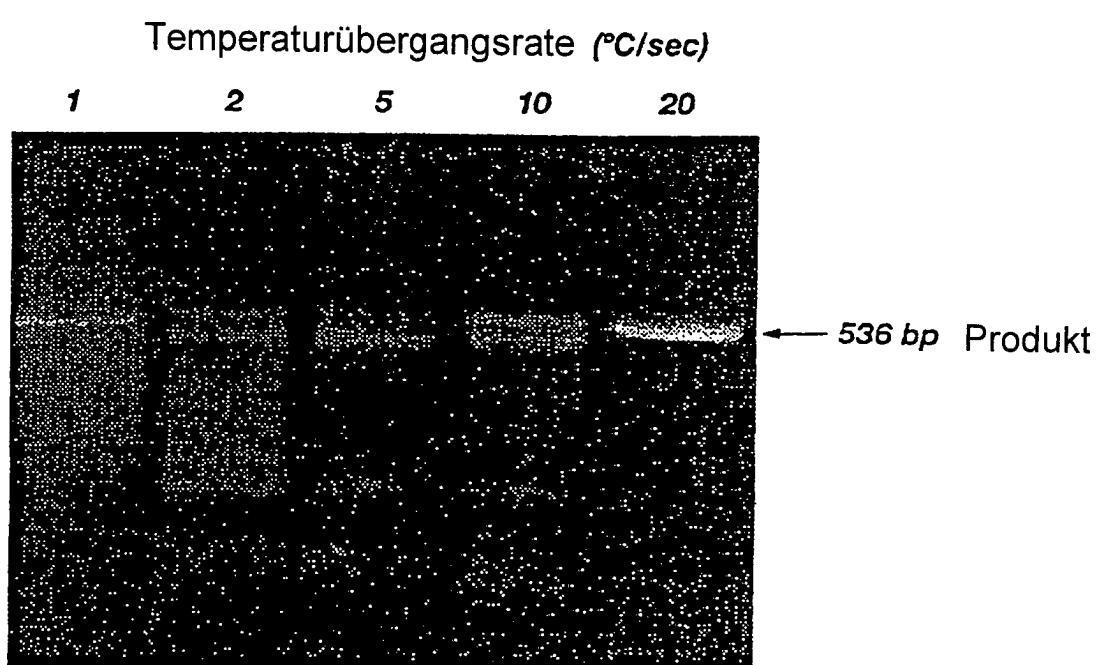


Fig. 10



**Fig. 10A**

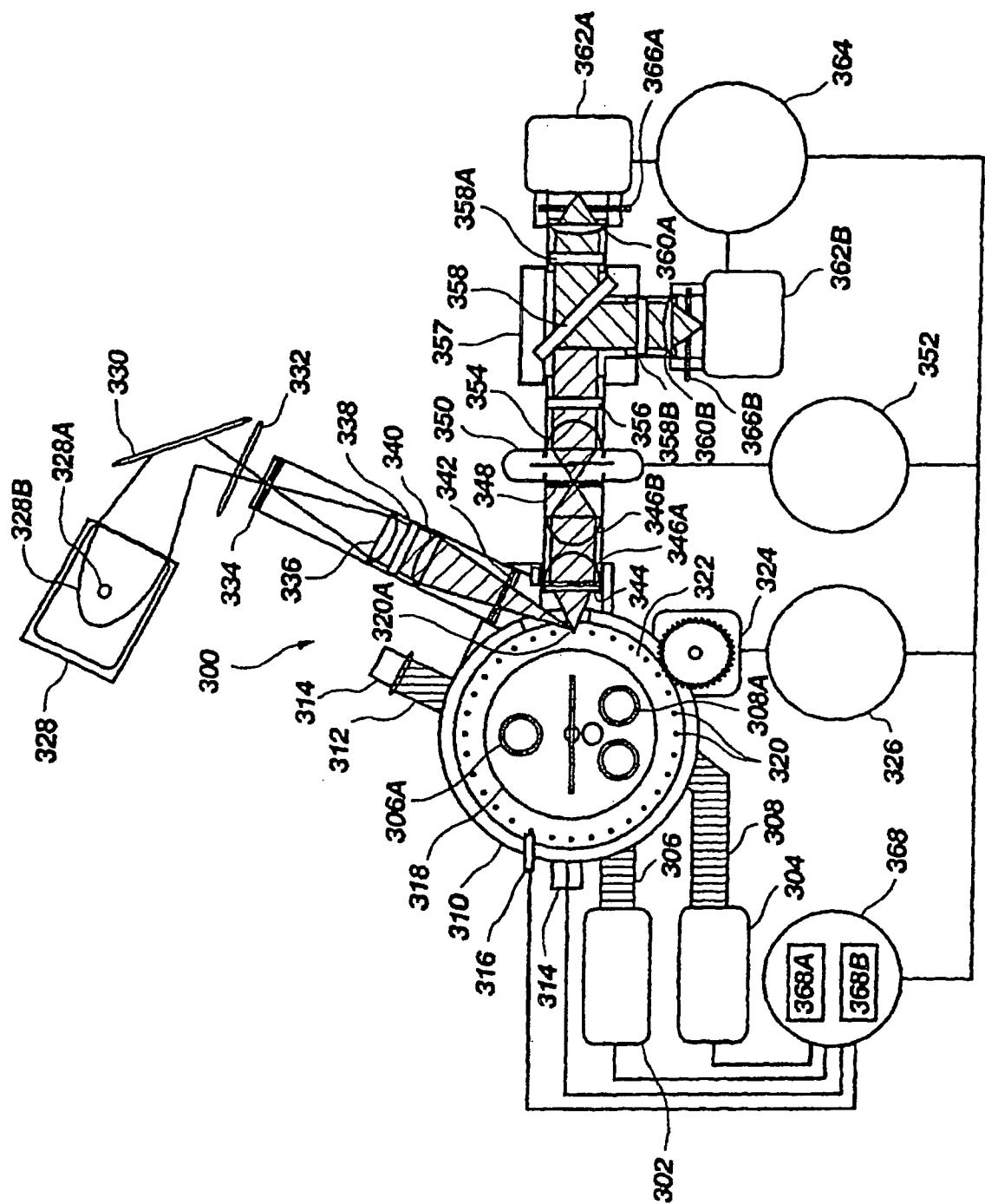
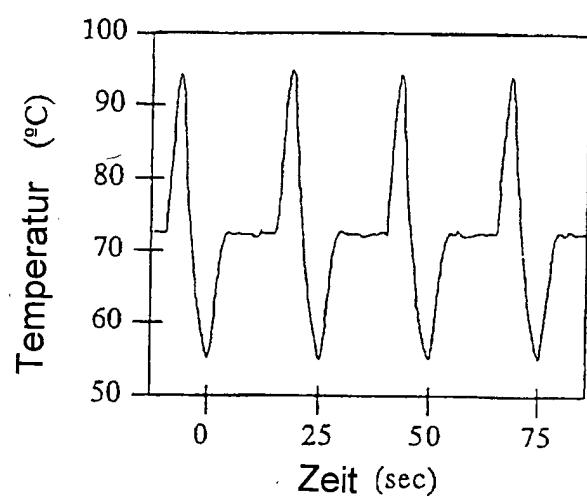
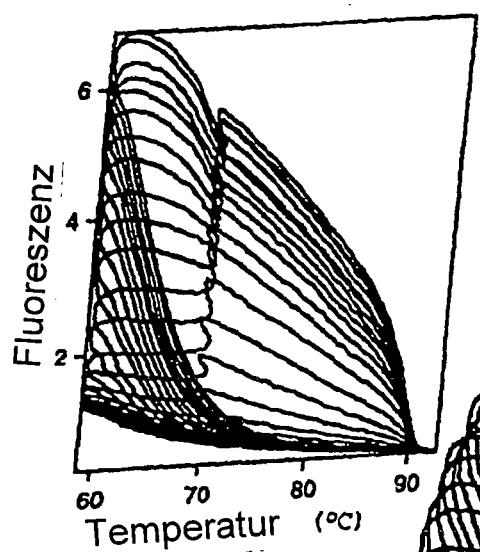


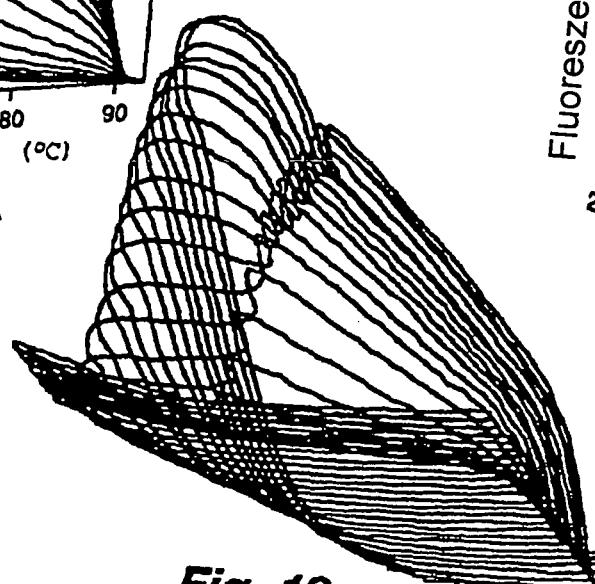
Fig. 11



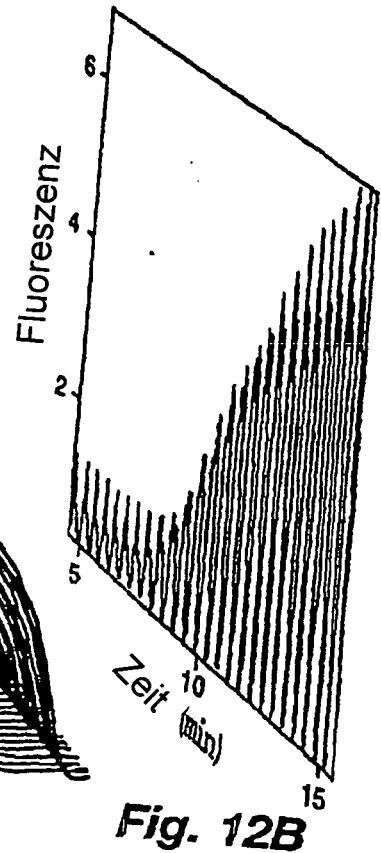
*Fig. 11A*



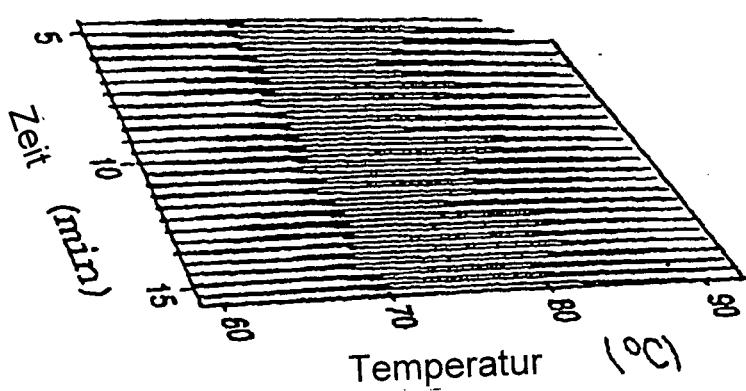
**Fig. 12C**



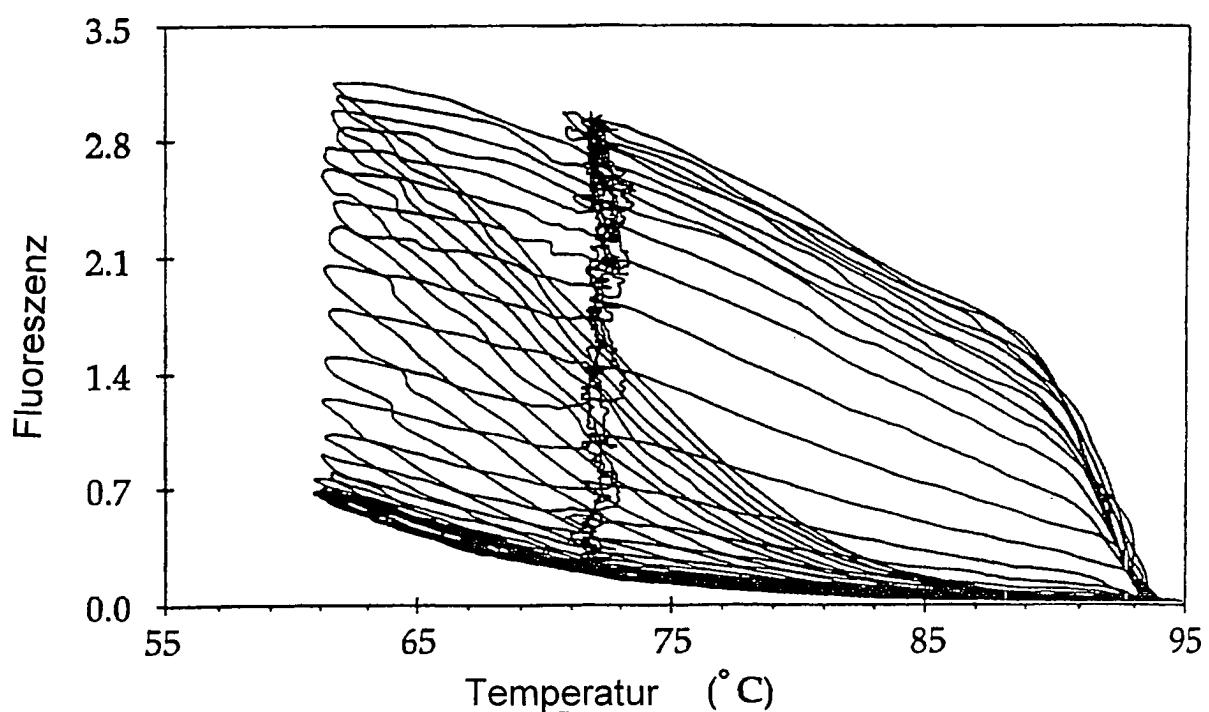
**Fig. 12**



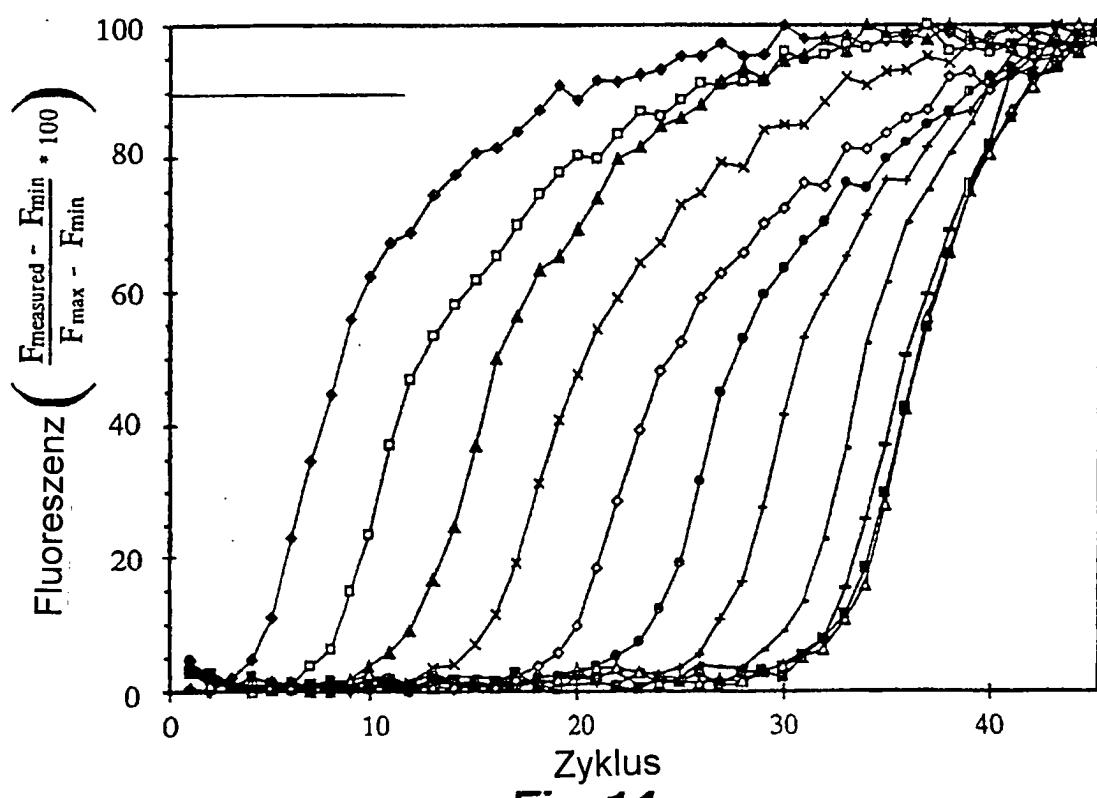
**Fig. 12B**



**Fig. 12A**



**Fig. 13**

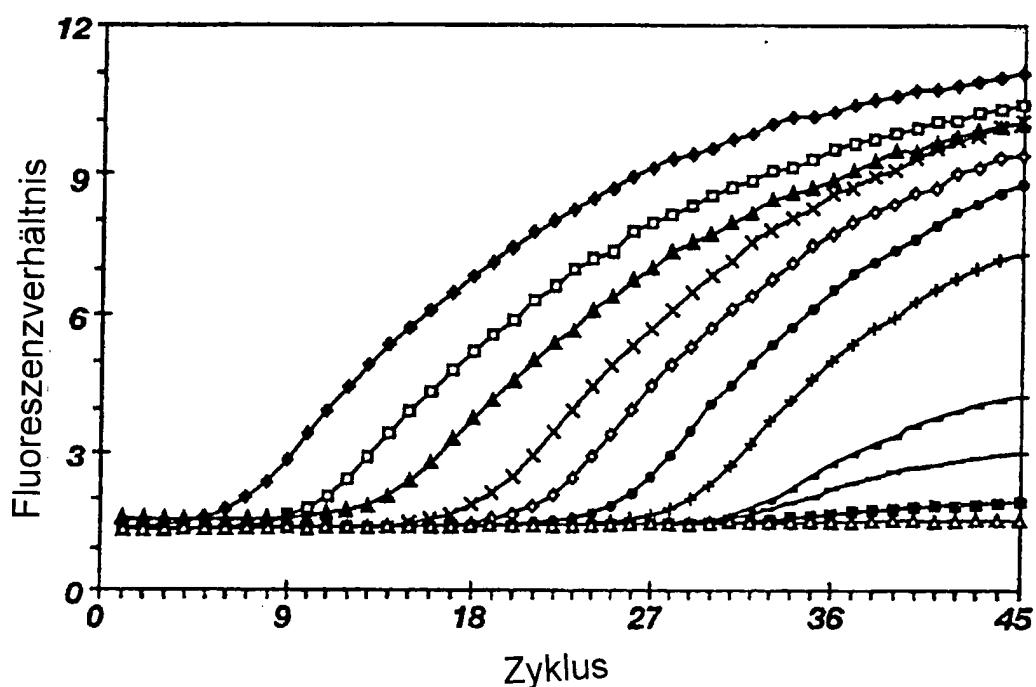


**Fig. 14**

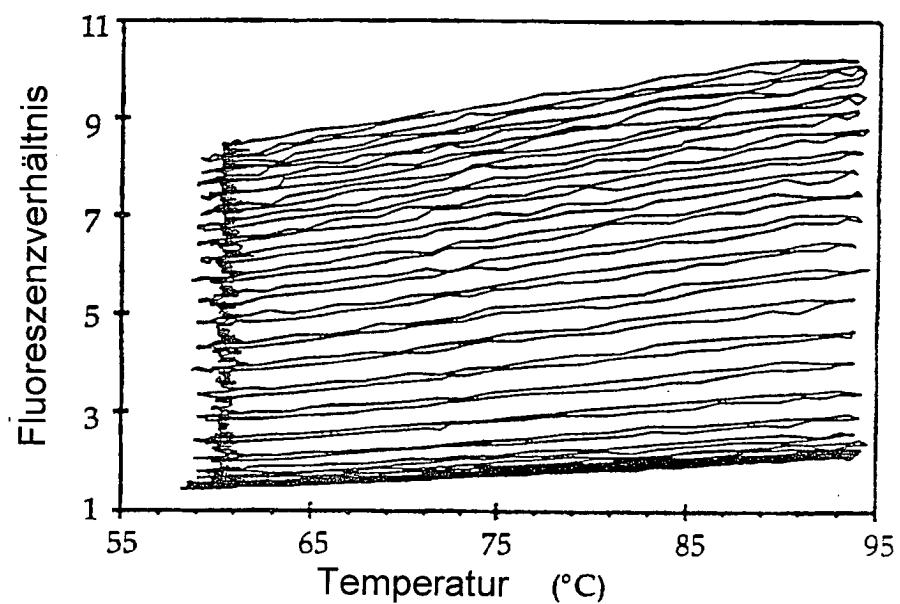
Anfängliche  
Vorlagekopien

- ◆  $10^9$
- $10^8$
- ▲  $10^7$
- ×  $10^6$
- ◊  $10^5$
- $10^4$
- +  $10^3$
- $10^2$
- $10^1$
- $10^0$
- △  $0$

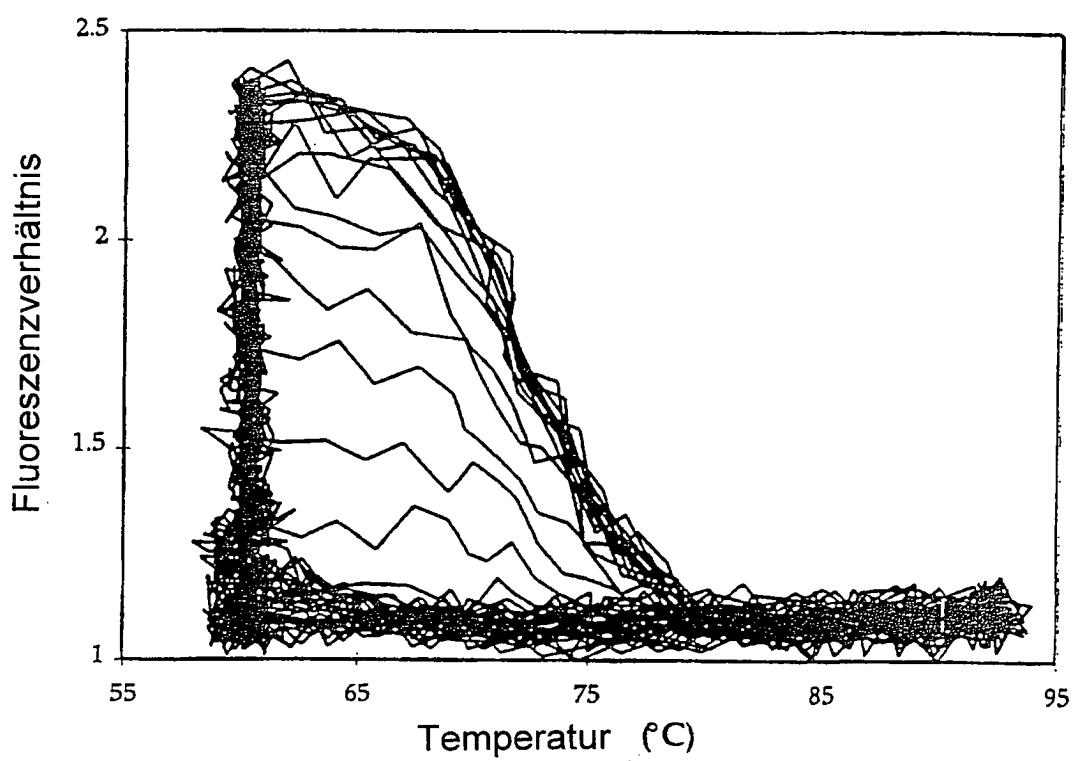
**Fig. 14A**



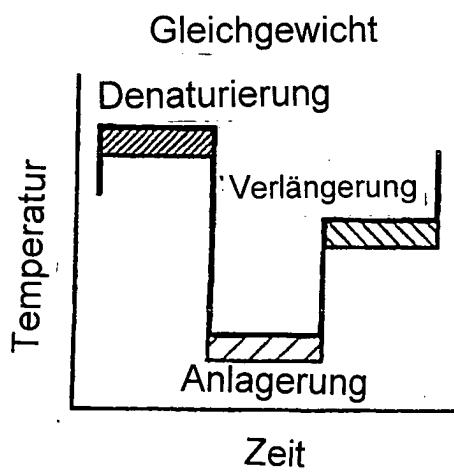
**Fig. 15**



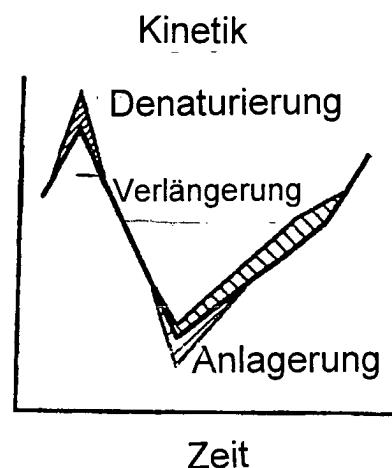
*Fig. 16*



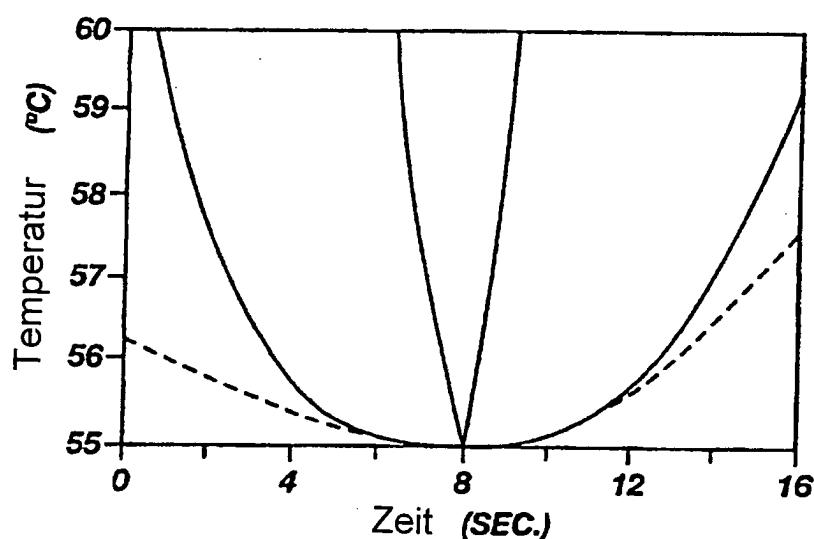
*Fig. 17*



**Fig. 18A**



**Fig. 18B**



**Fig. 18C**

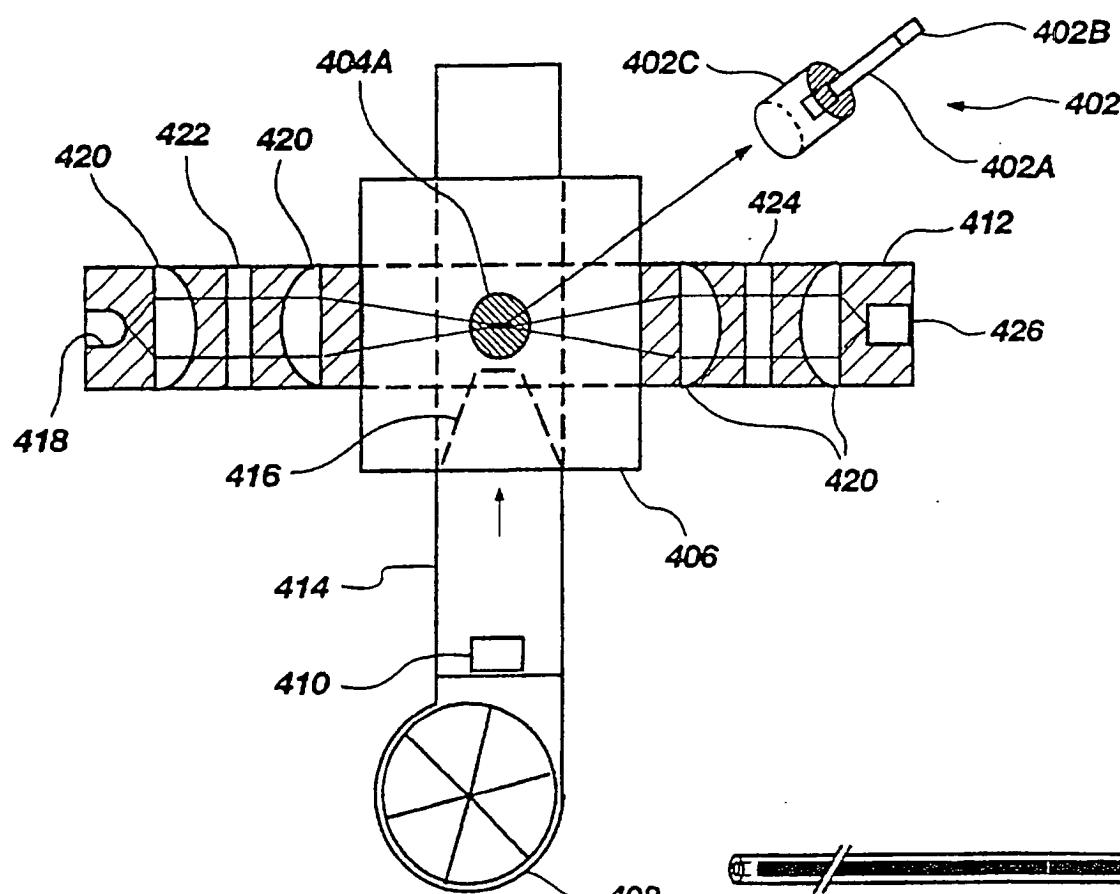


Fig. 19

Fig. 19A

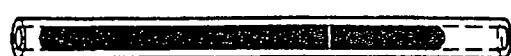


Fig. 19B



Fig. 19C

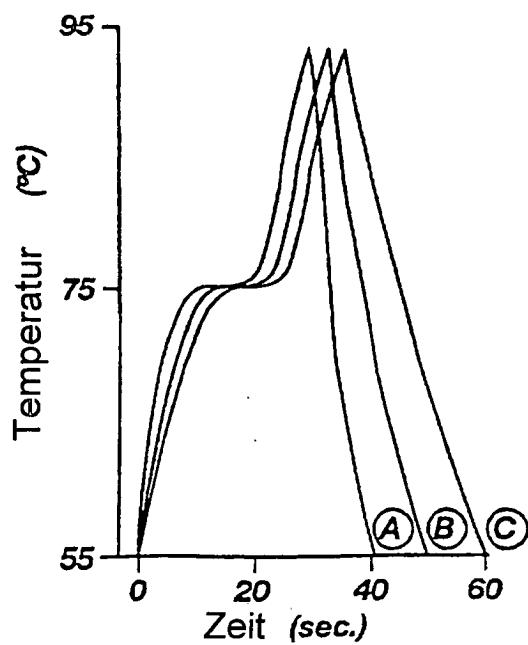
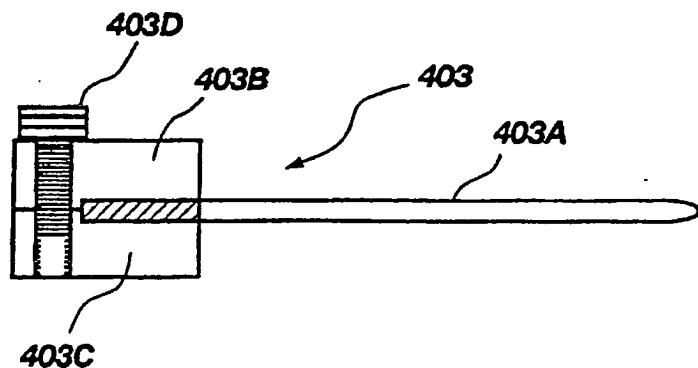


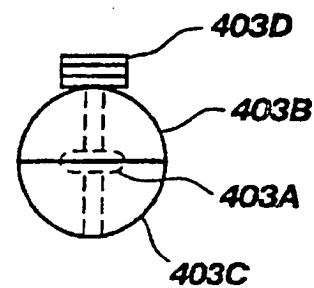
Fig. 19E



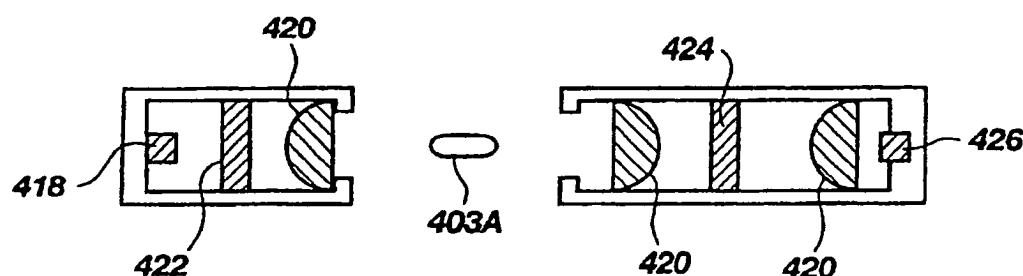
Fig. 19D



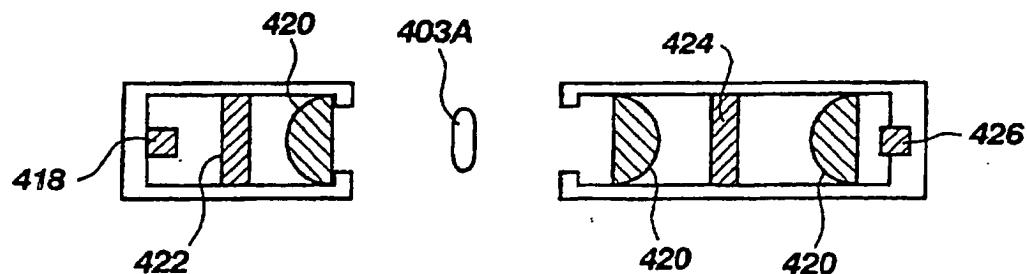
*Fig. 19F*



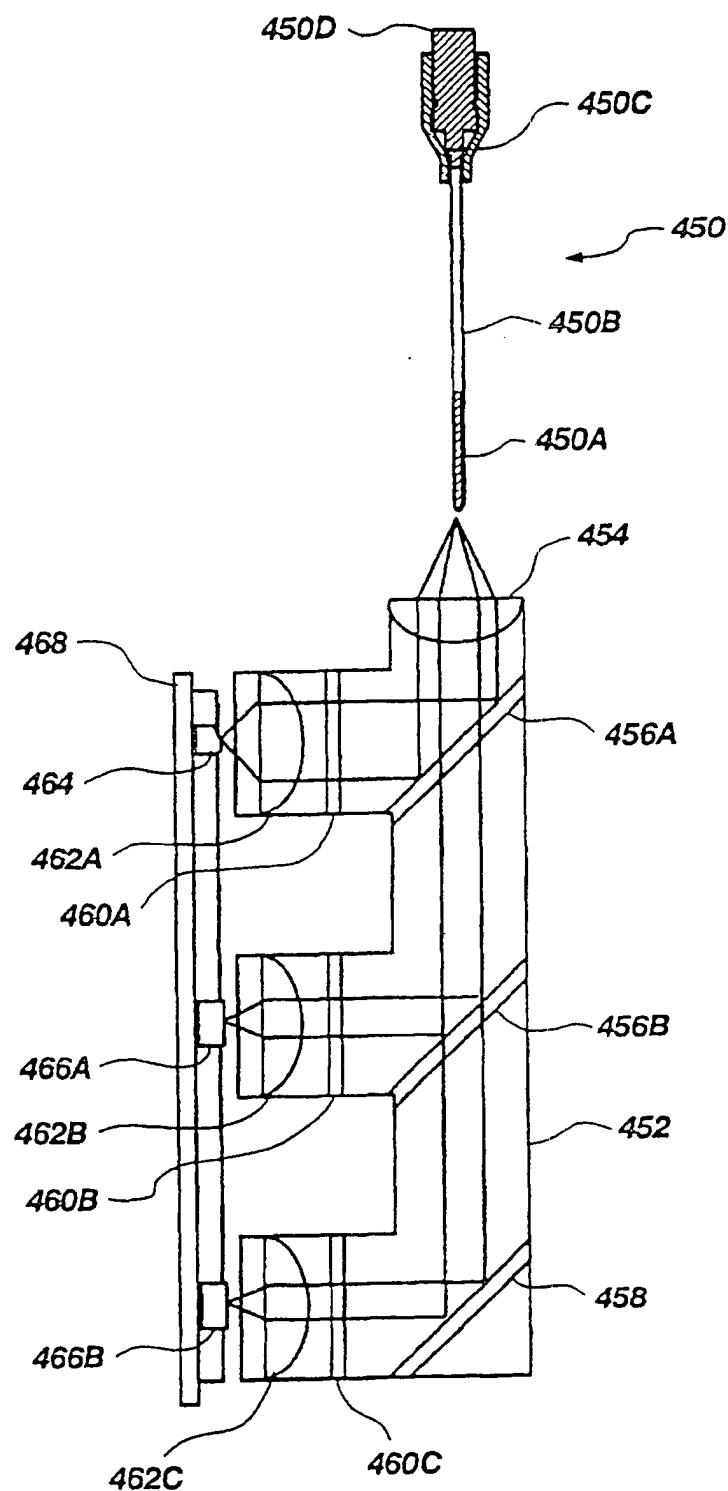
*Fig. 19G*



*Fig. 19H*



*Fig. 19I*



*Fig. 20*

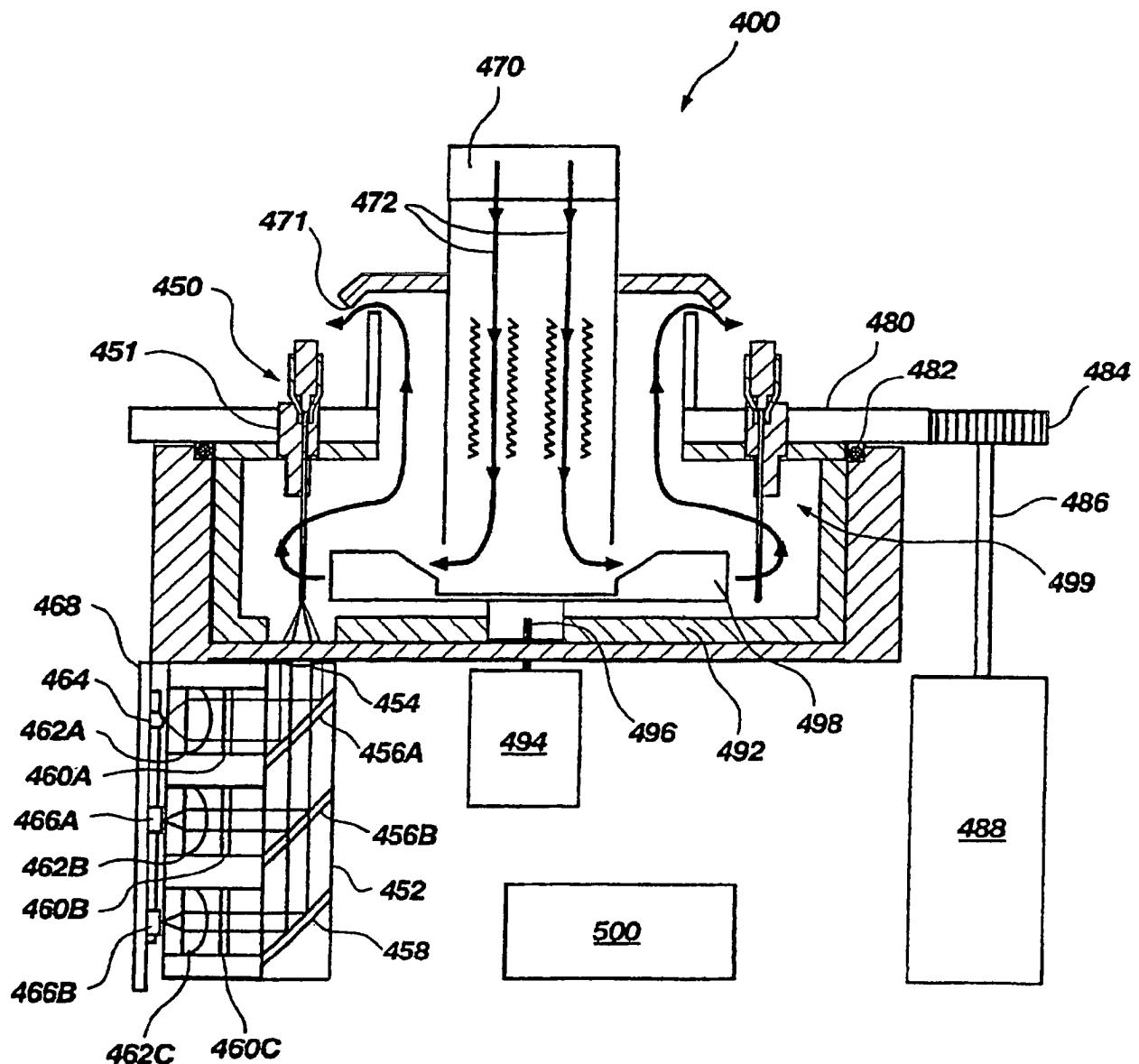
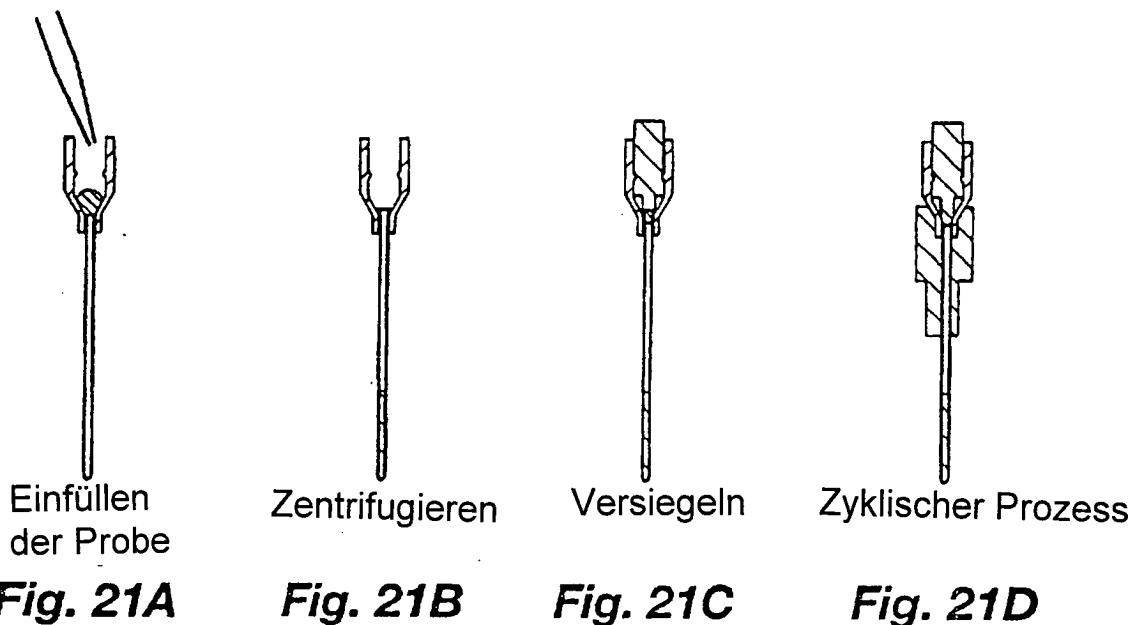


Fig. 21

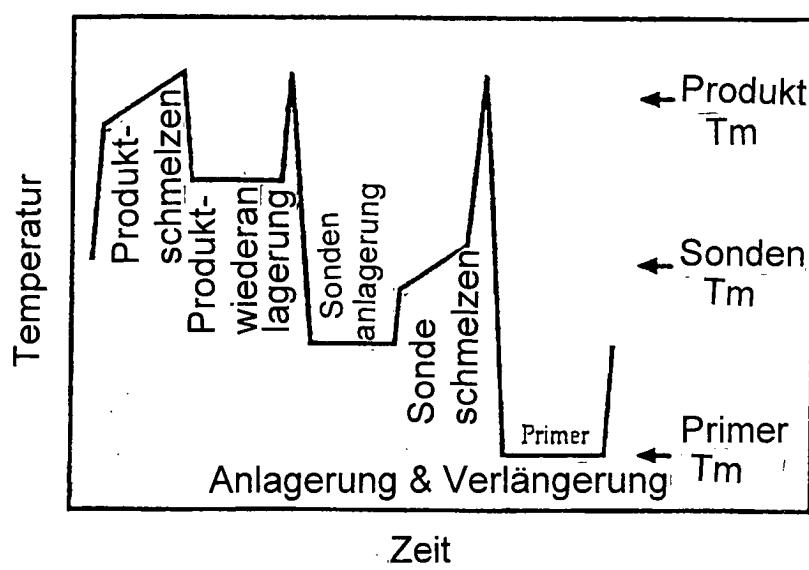


**Fig. 21A**

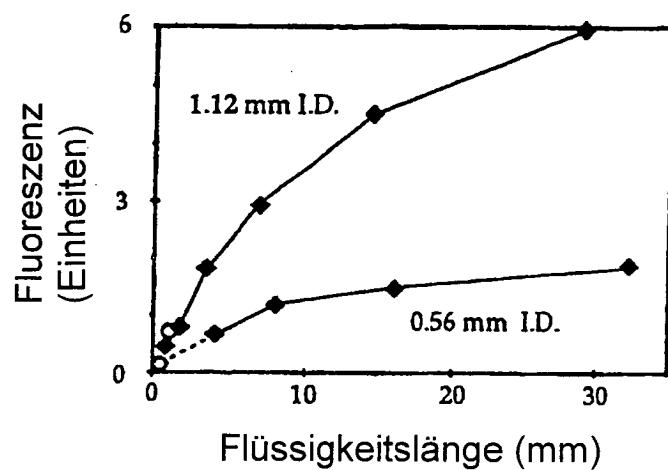
**Fig. 21B**

**Fig. 21C**

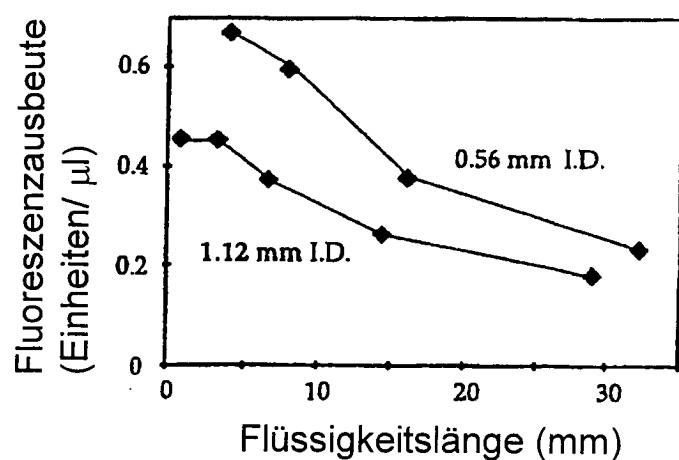
**Fig. 21D**



**Fig. 22**



**Fig. 22A**



**Fig. 22B**

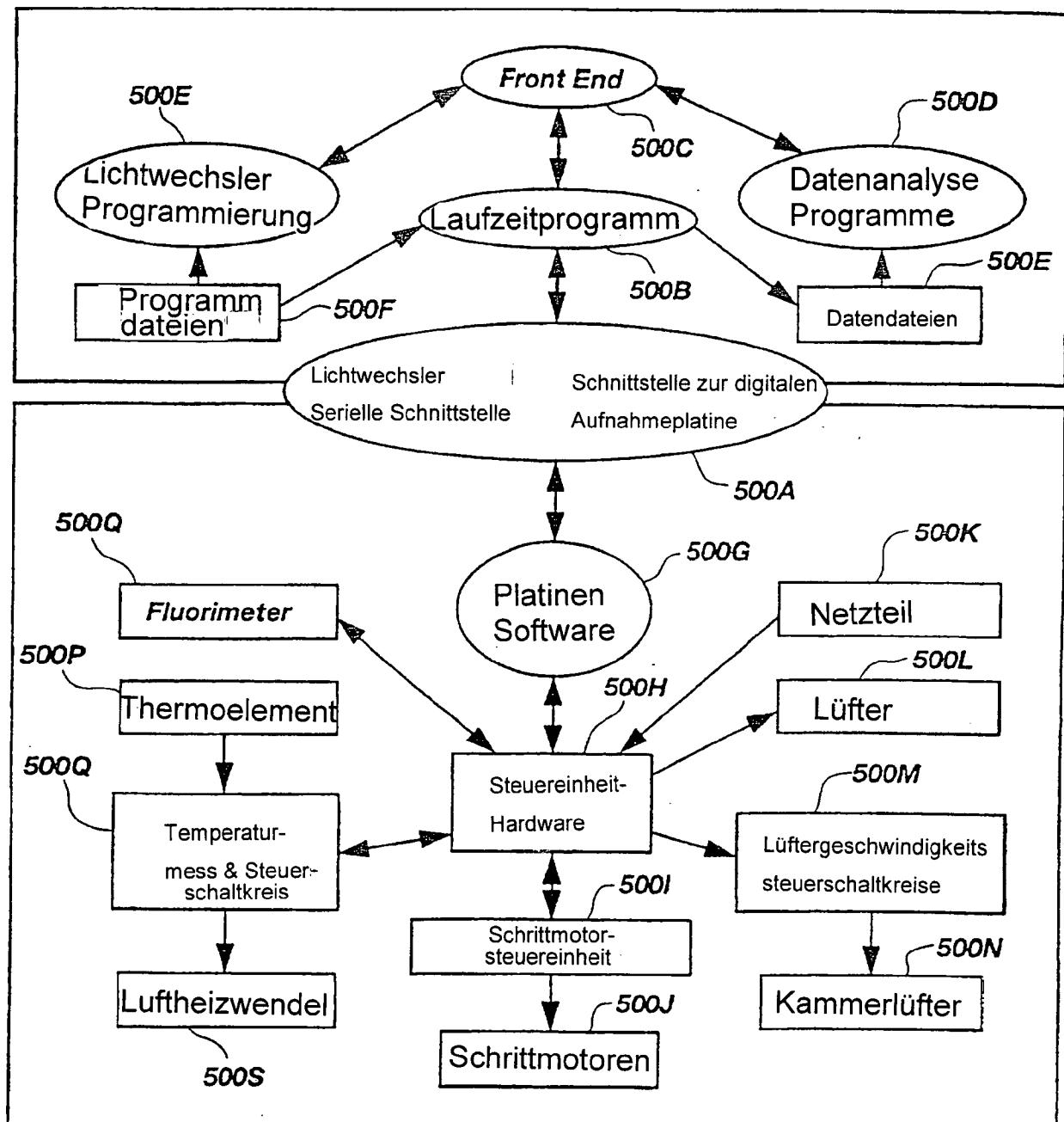
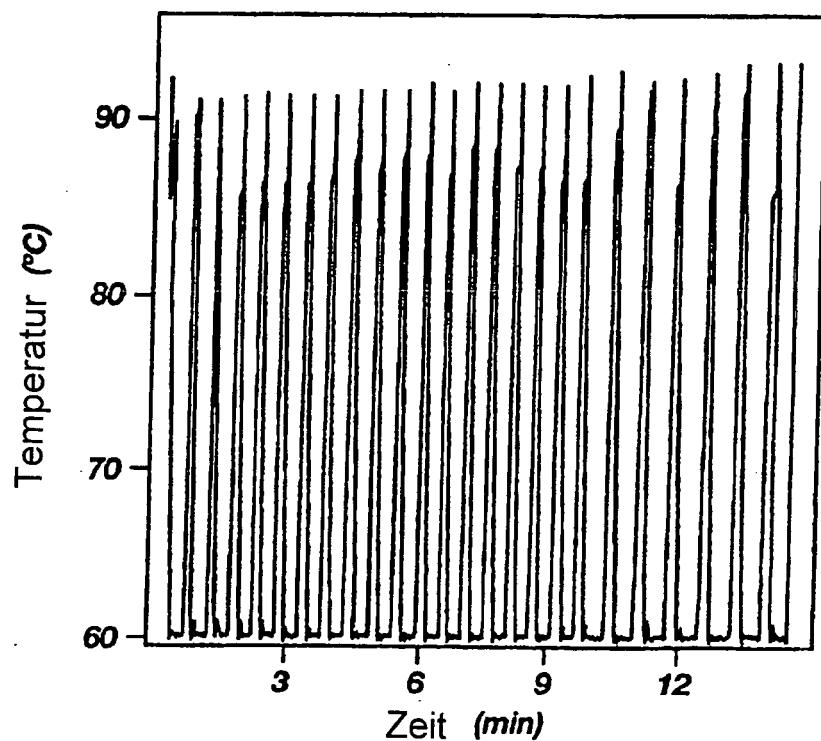
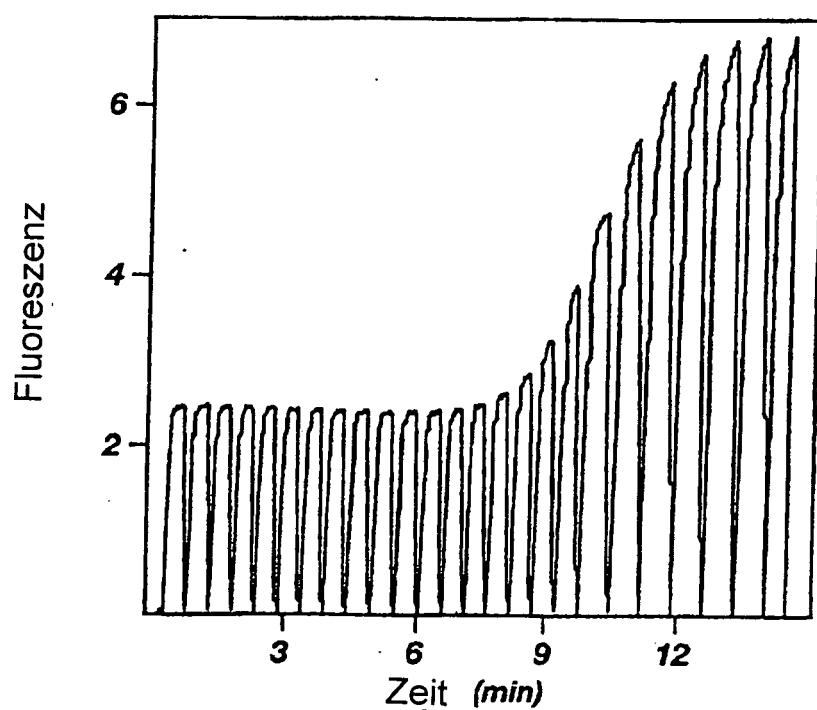


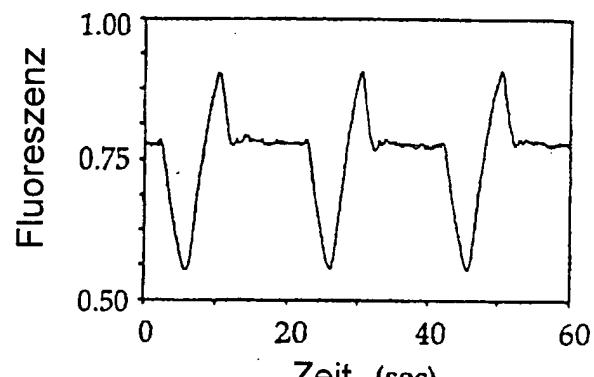
Fig. 22C



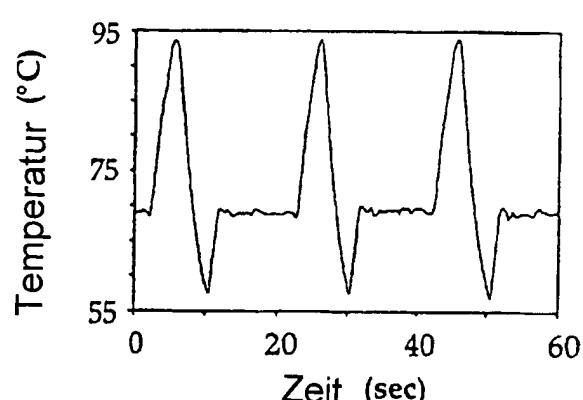
**Fig. 22D**



**Fig. 22E**



**Fig. 23**



**Fig. 24**

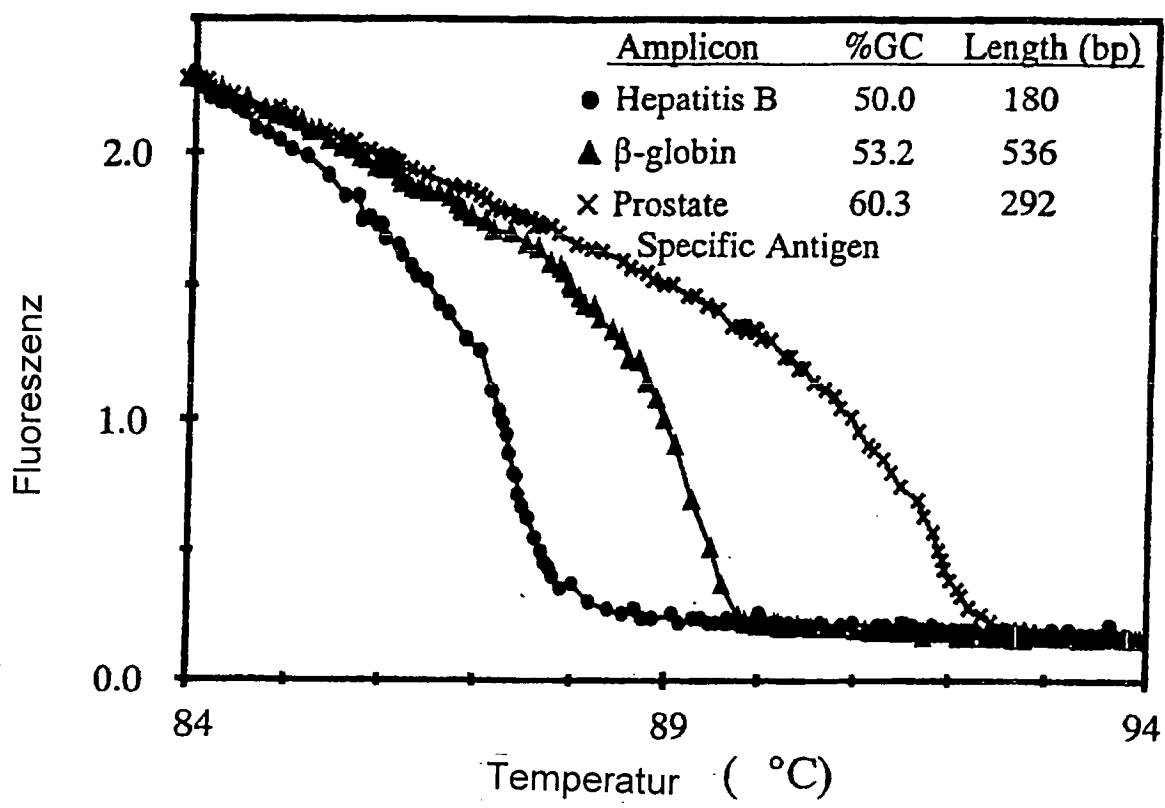


Fig. 25

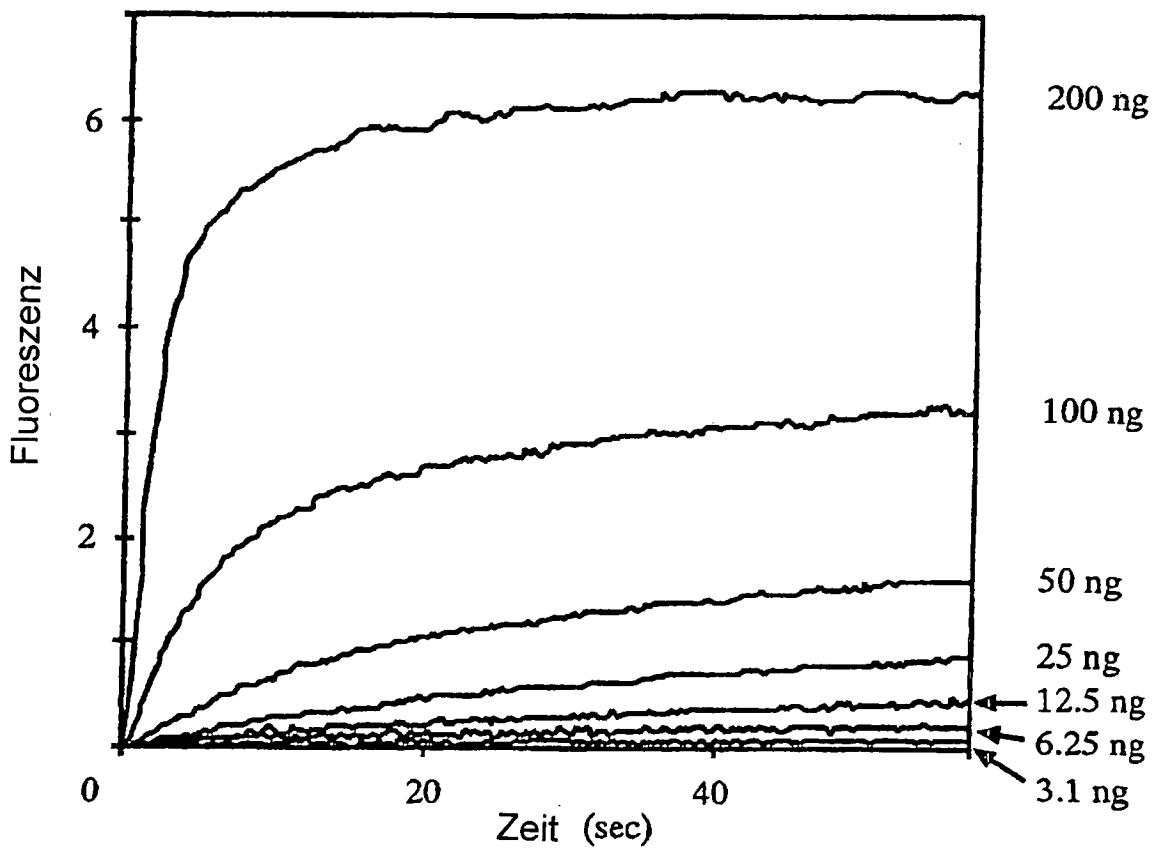


Fig. 26

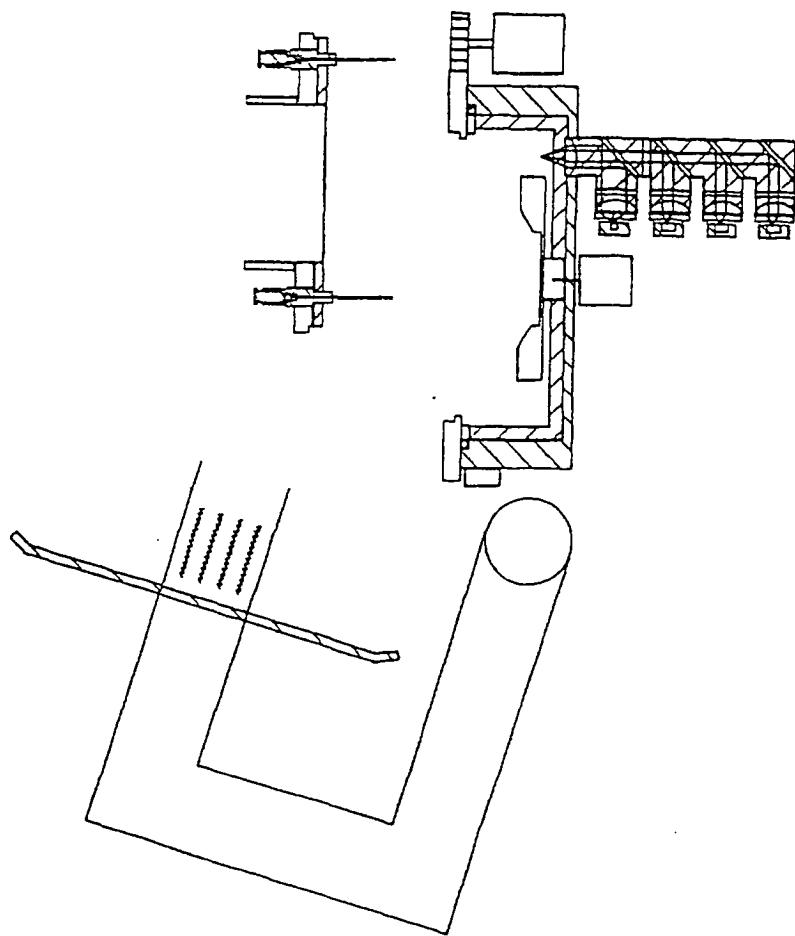


Fig. 27B

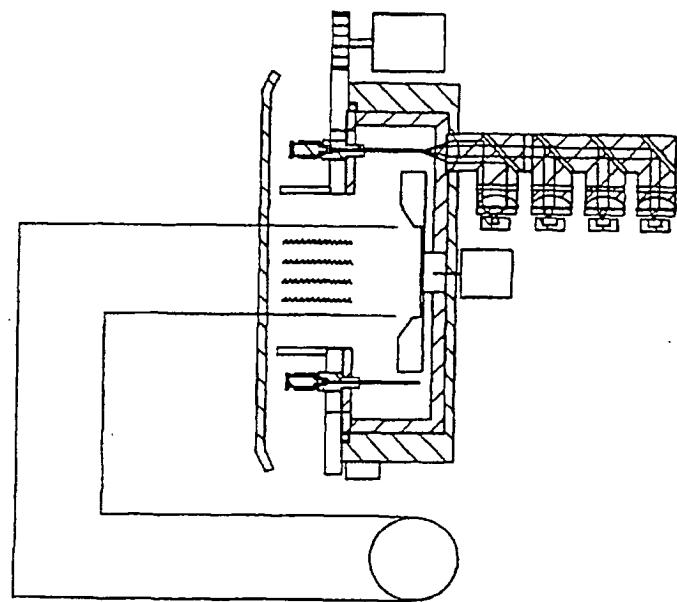
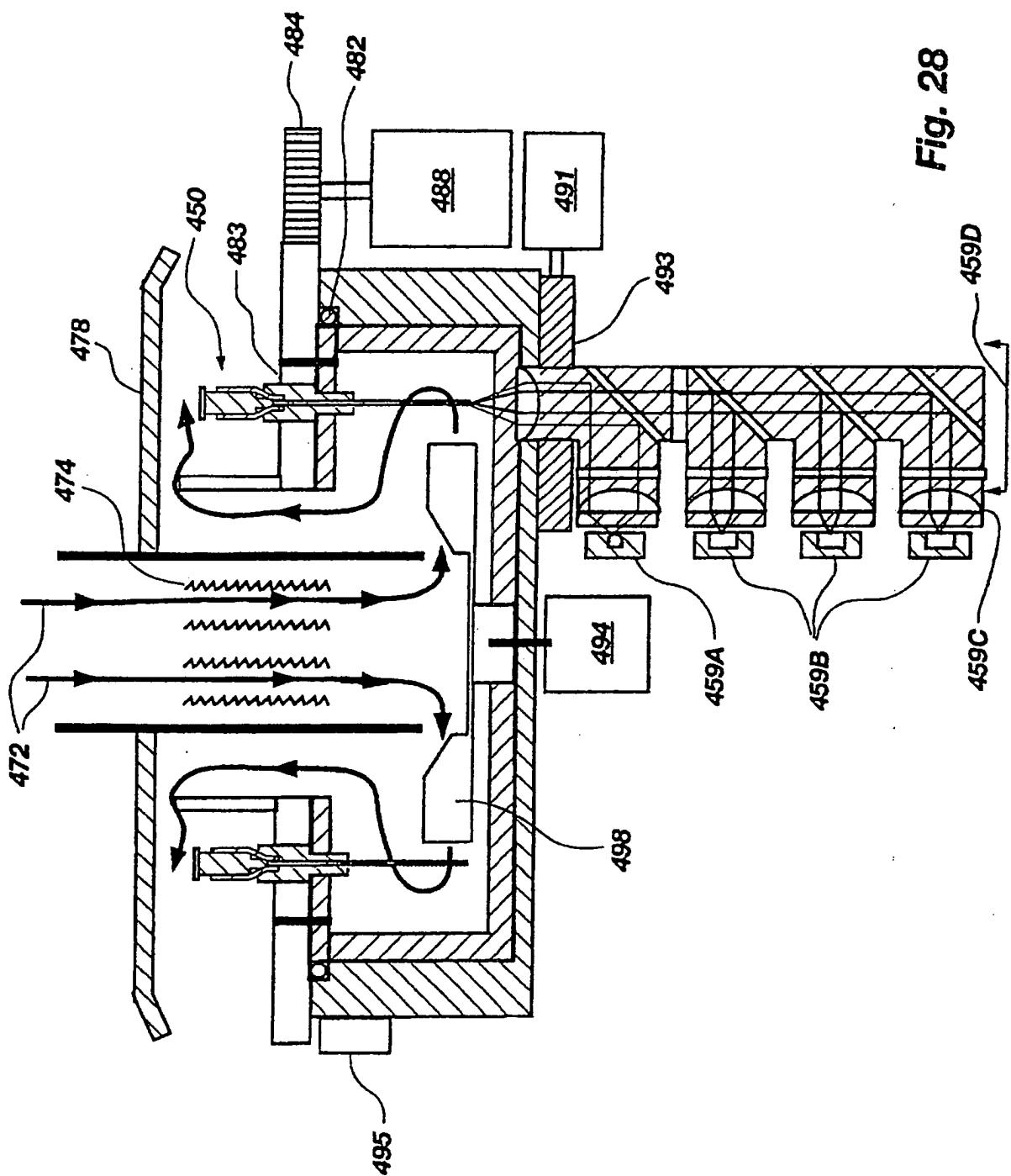


Fig. 27A



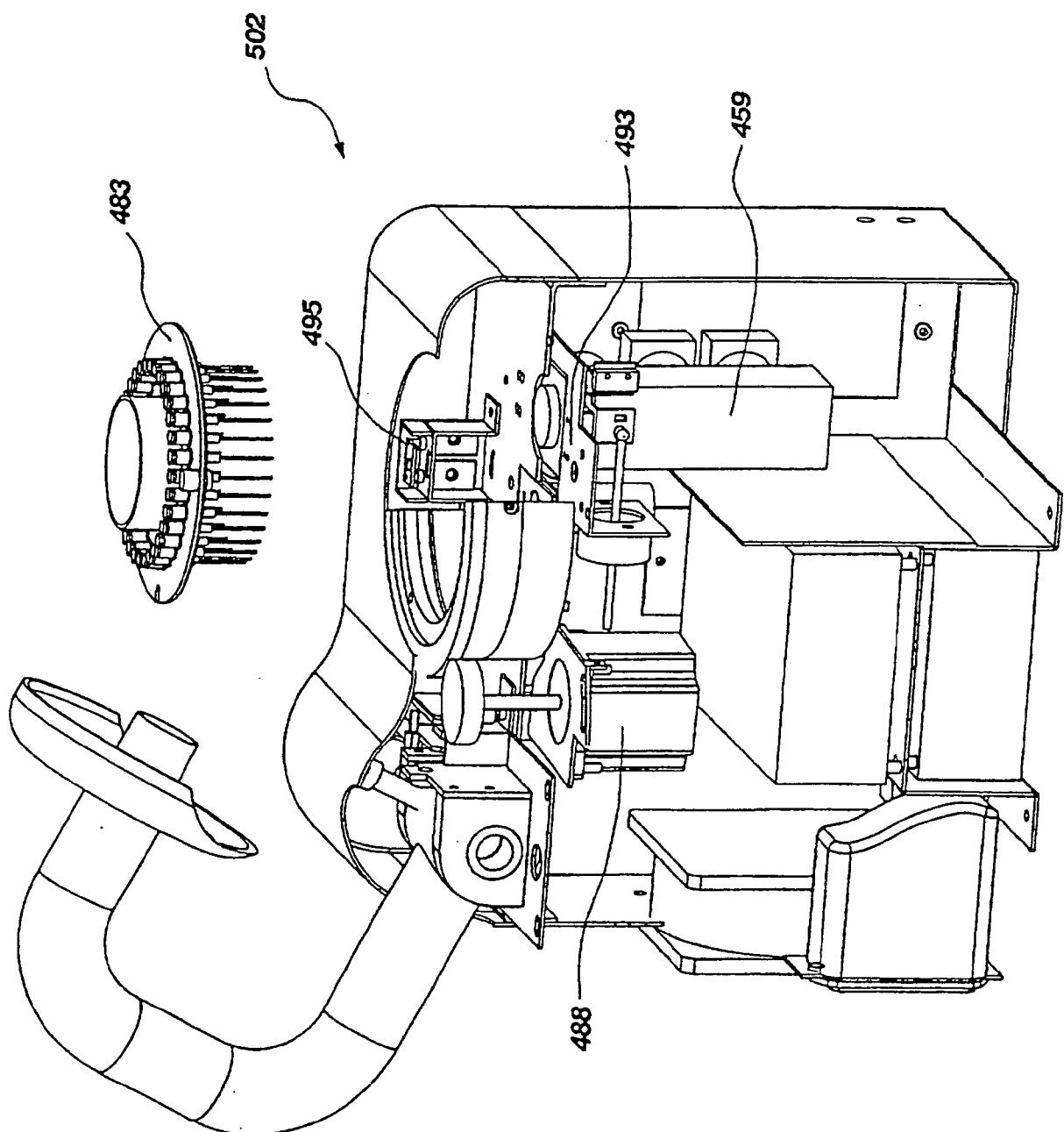


Fig. 29

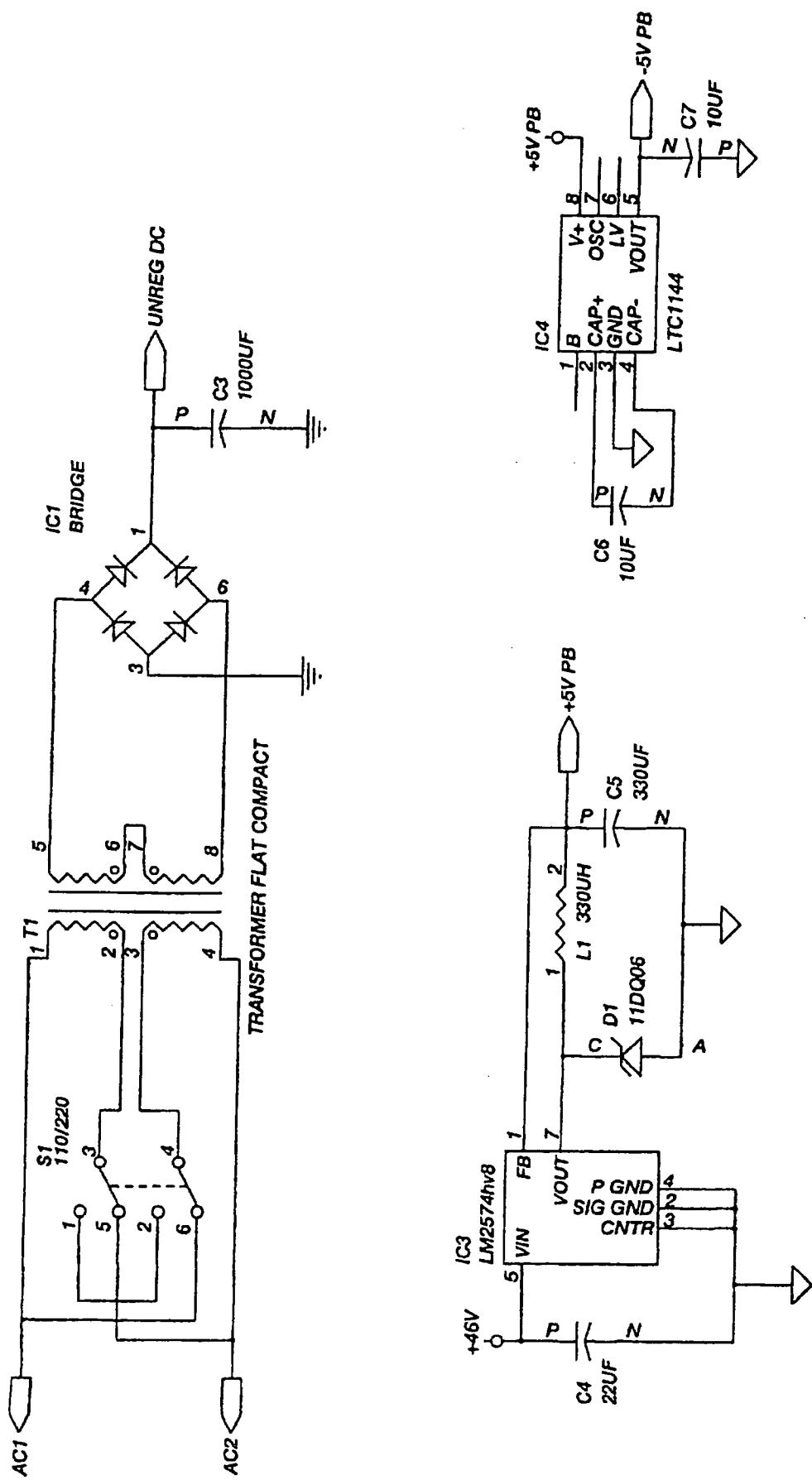


Fig. 30A

36/58

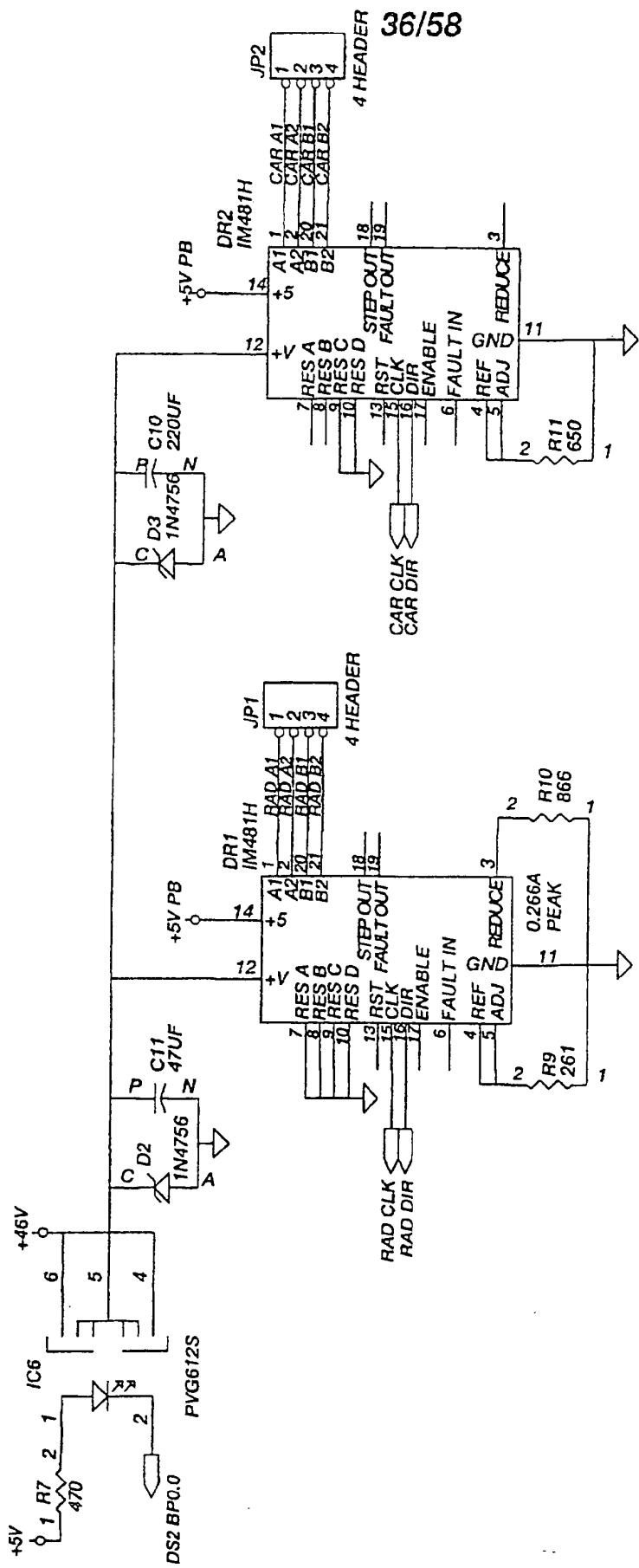


Fig. 30B

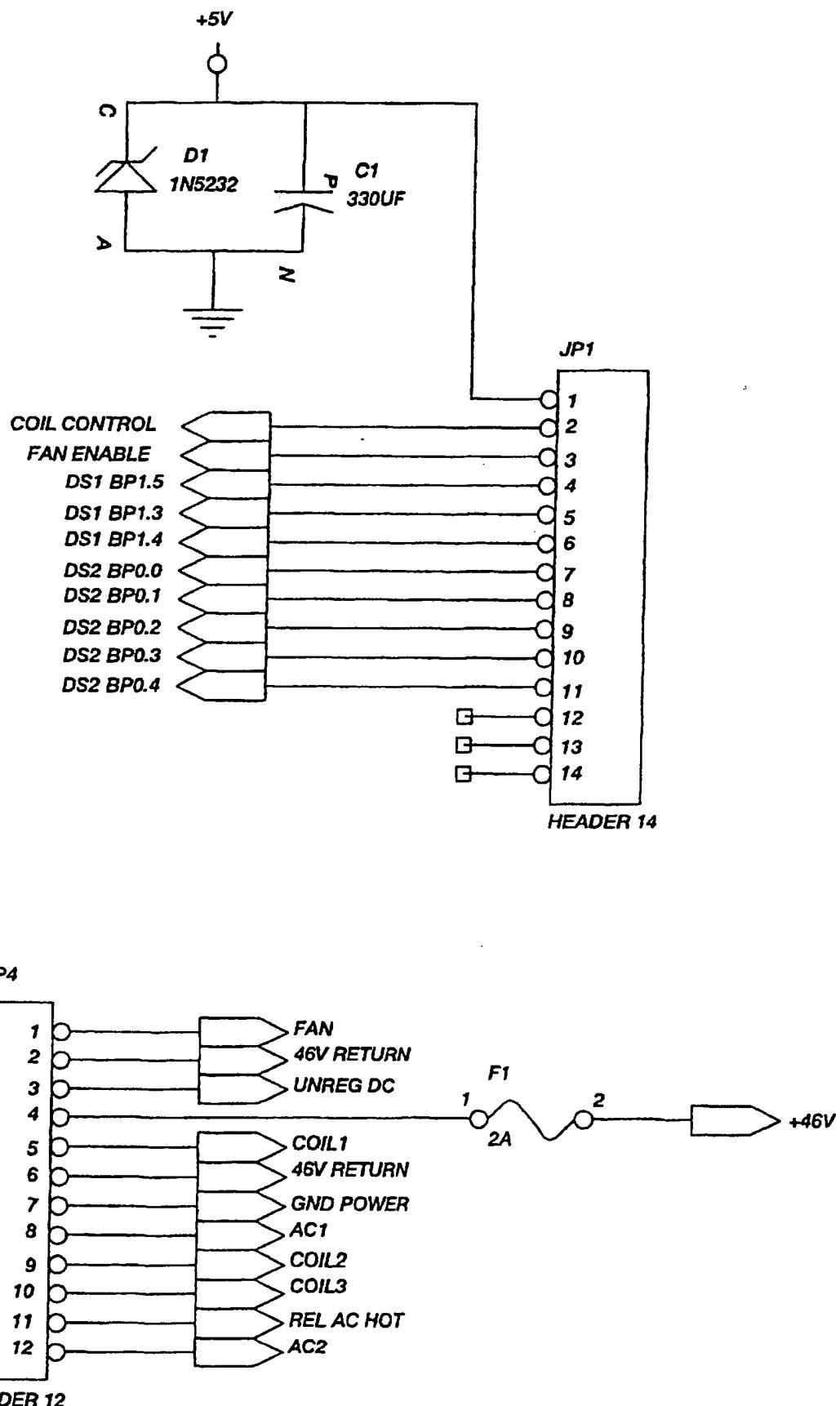


Fig. 30C

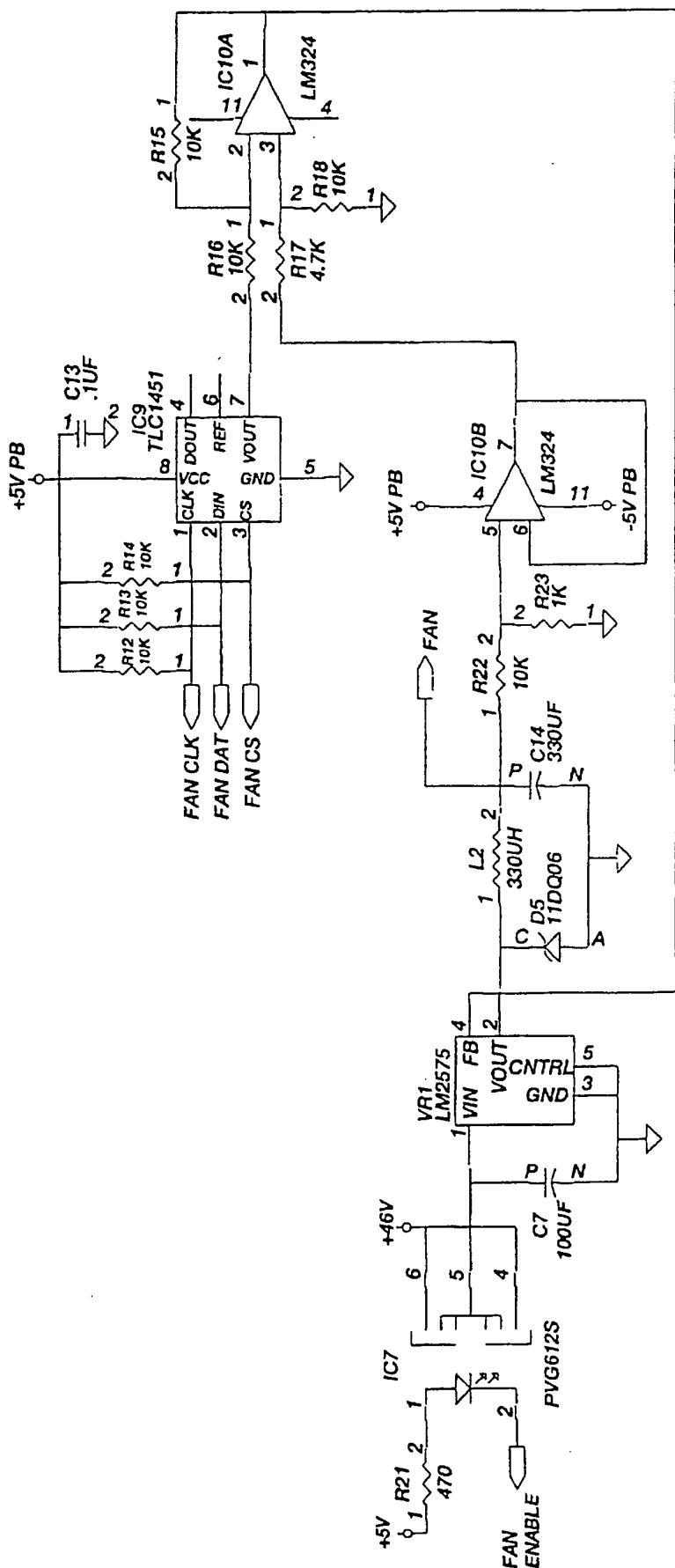
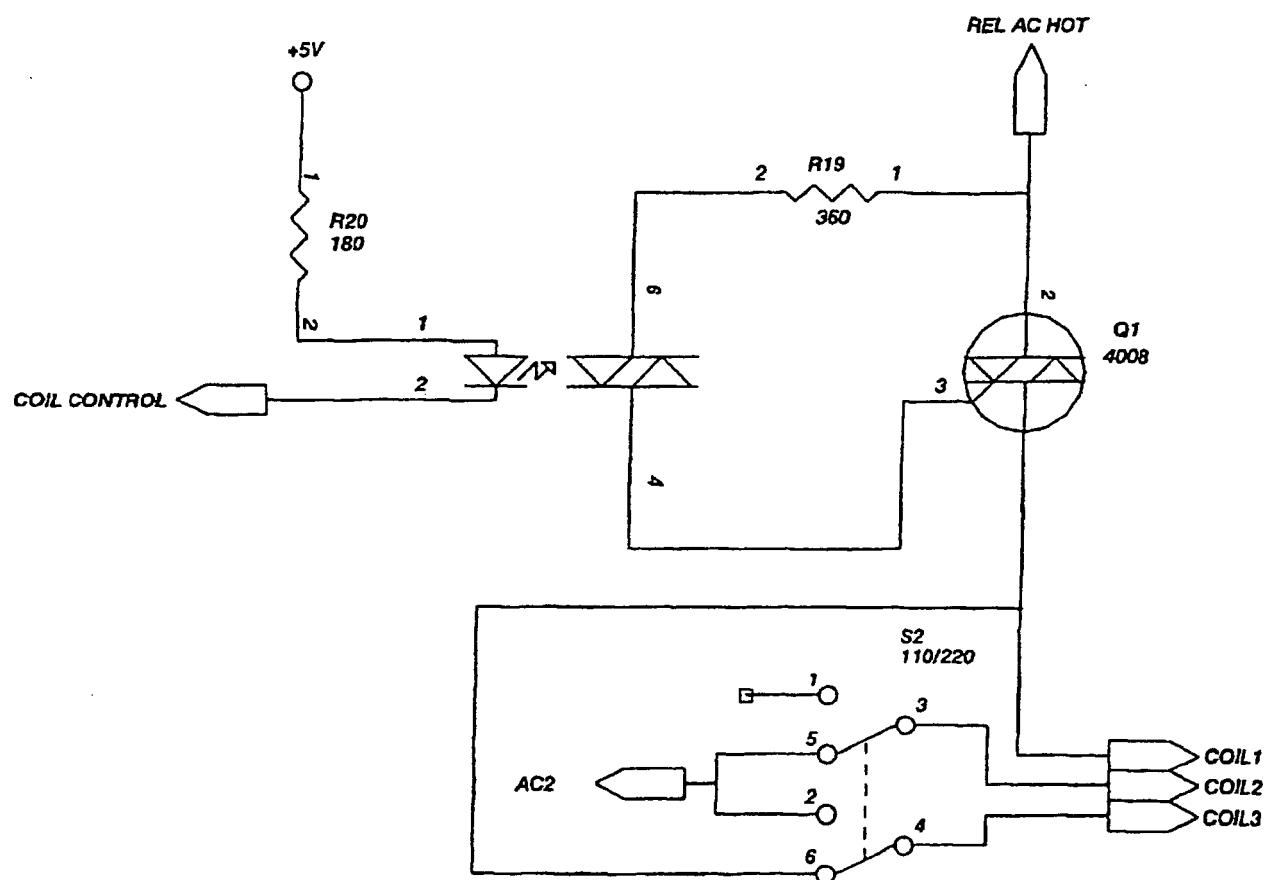
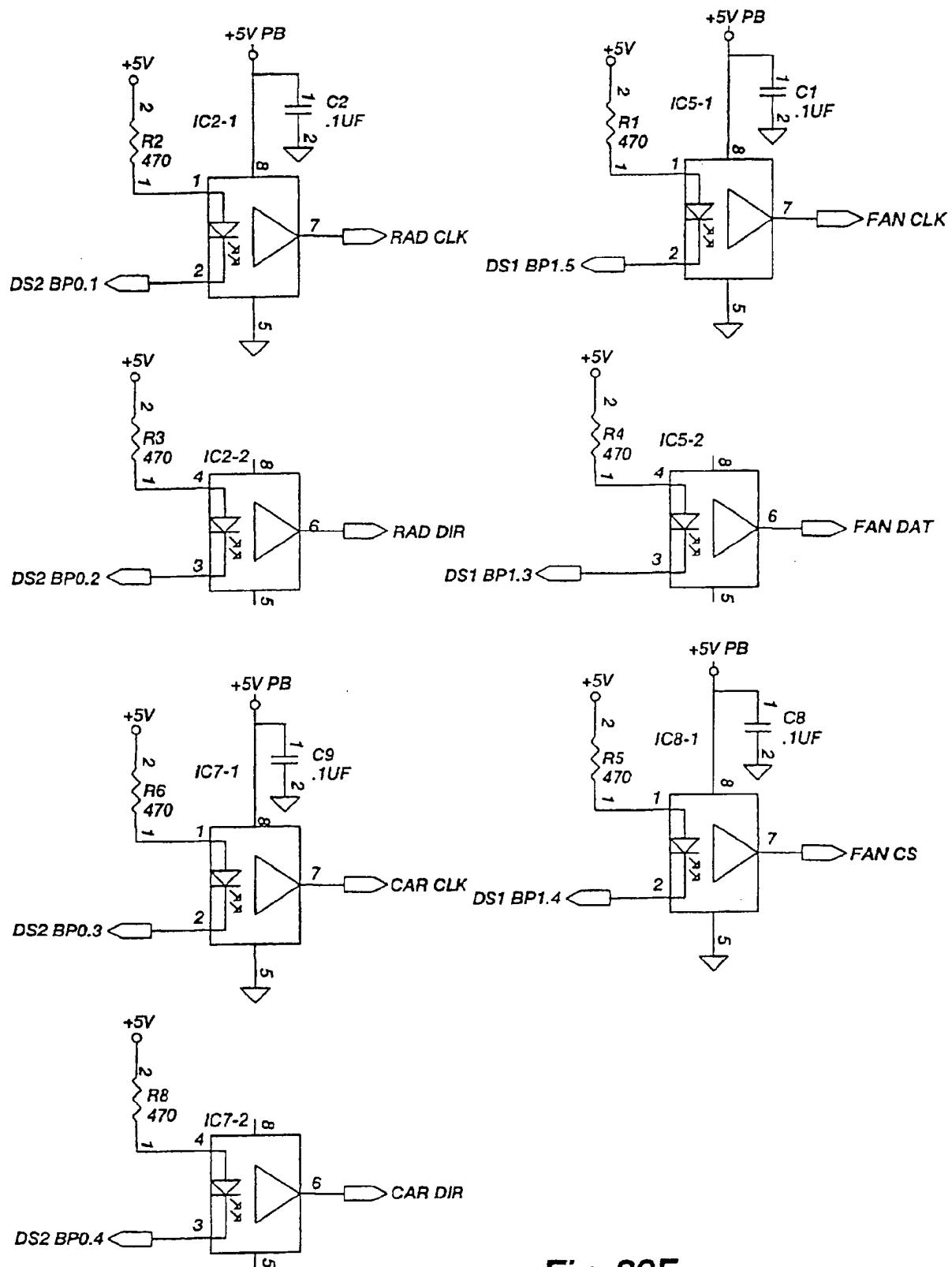


Fig. 30D



**Fig. 30E**



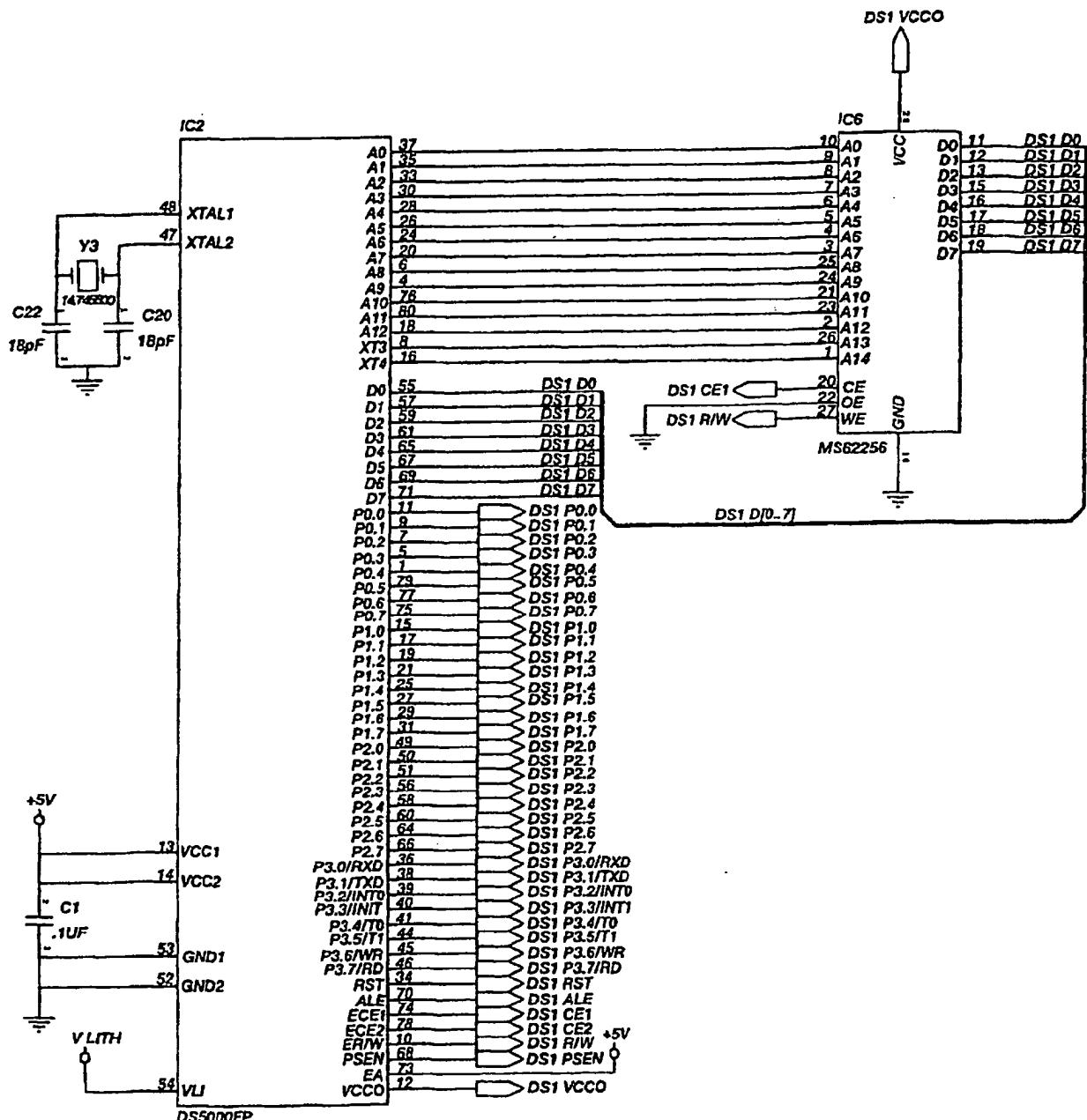


Fig. 30G

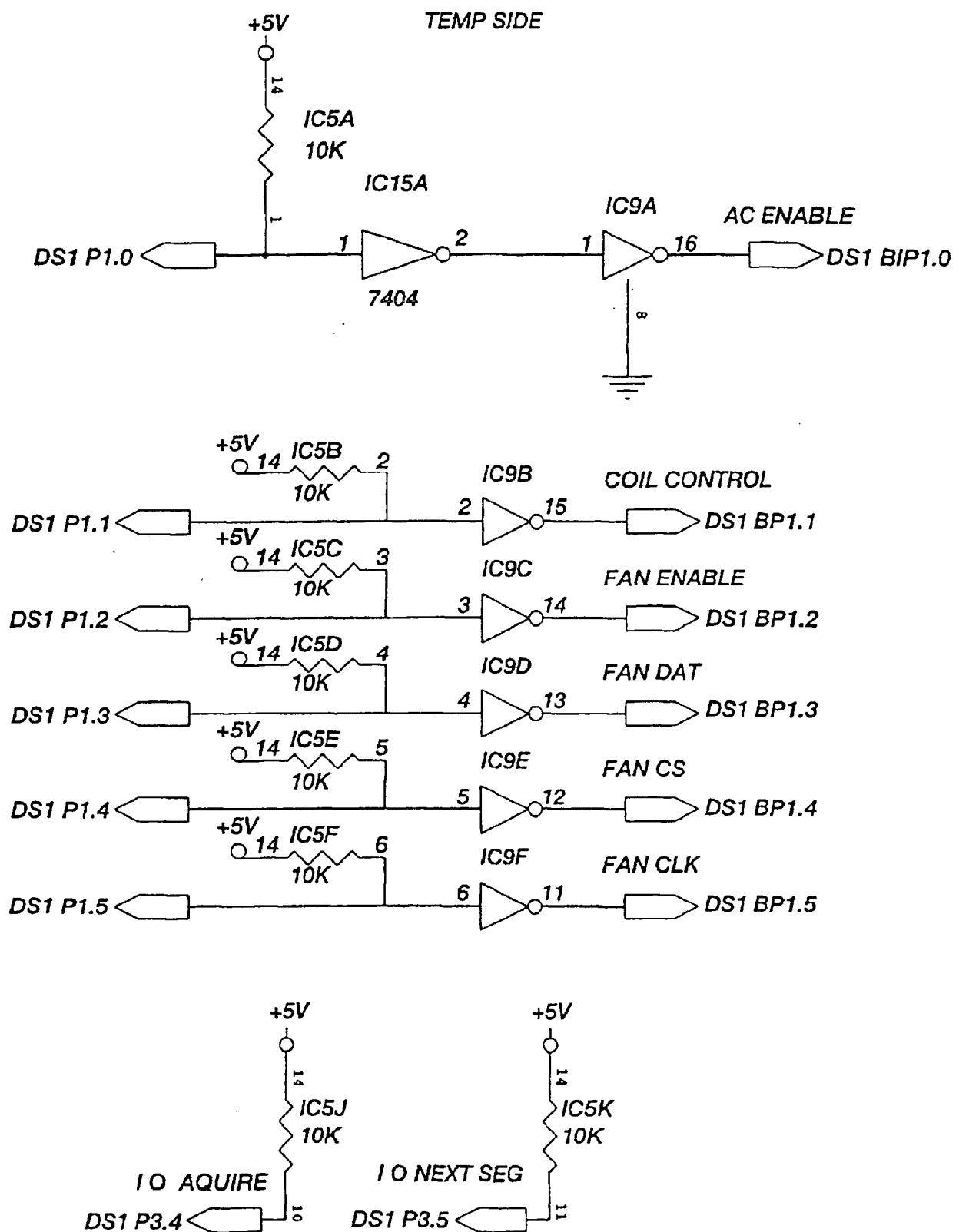


Fig. 30H

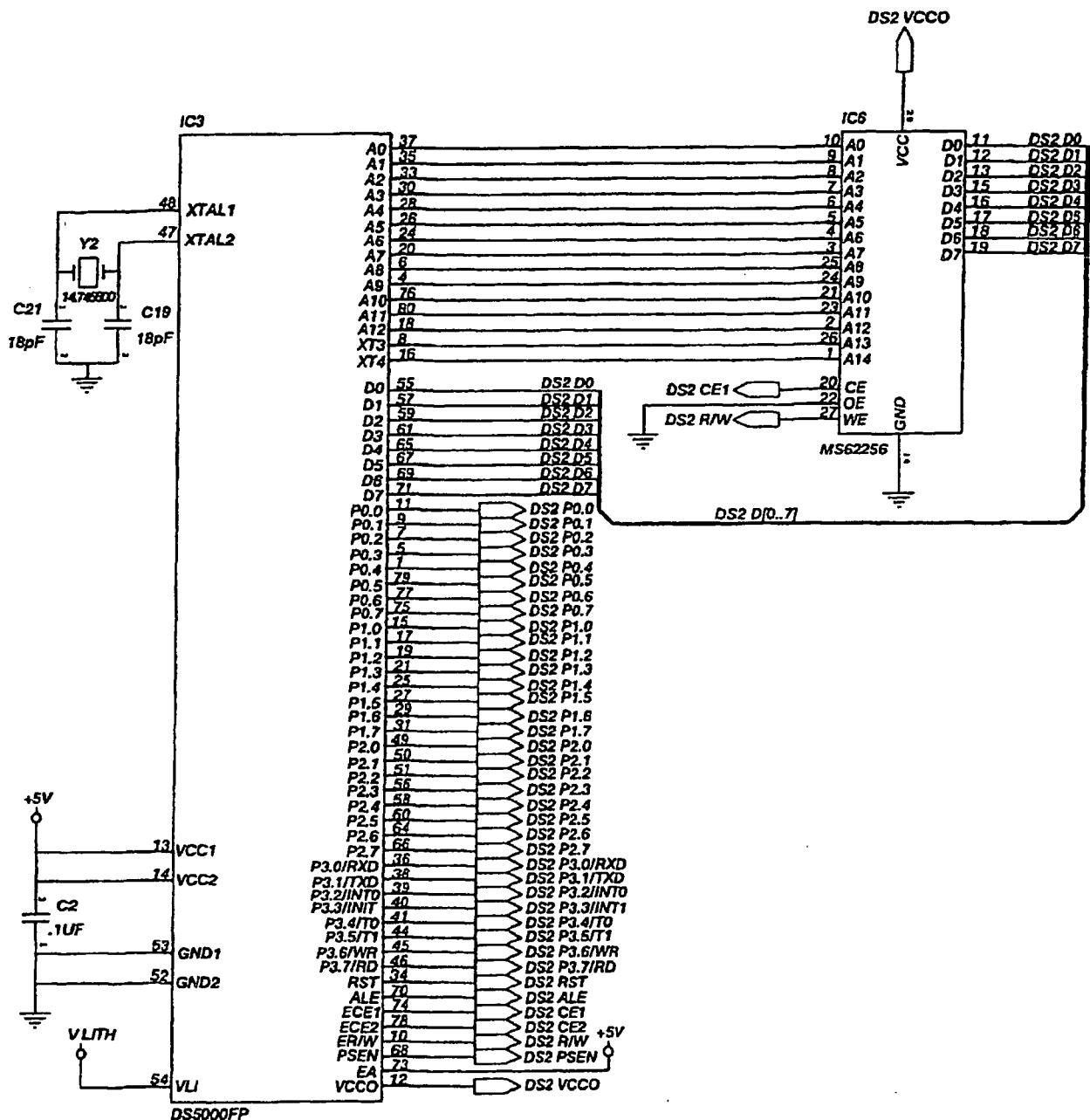
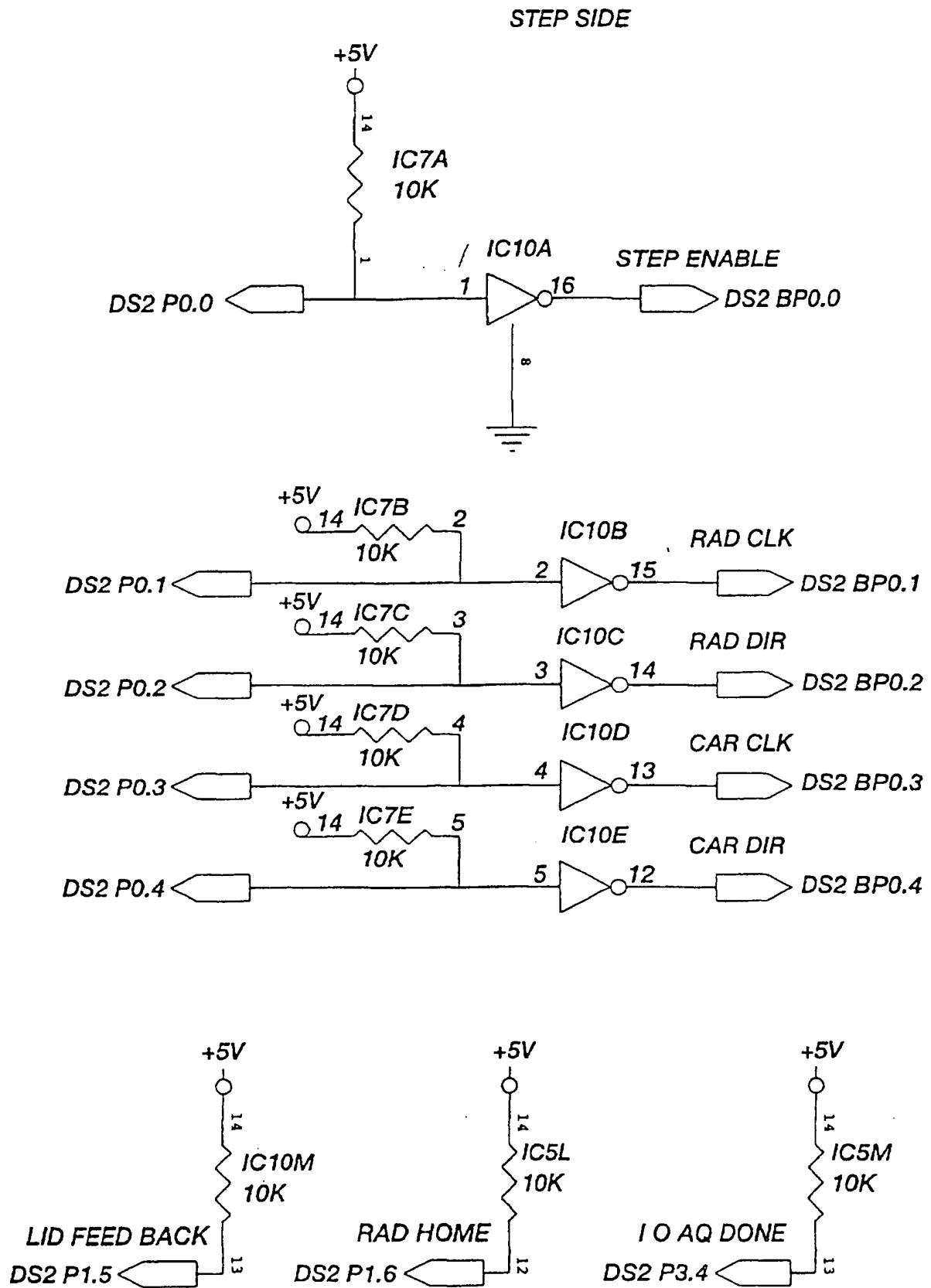


Fig. 301

**Fig. 30J**

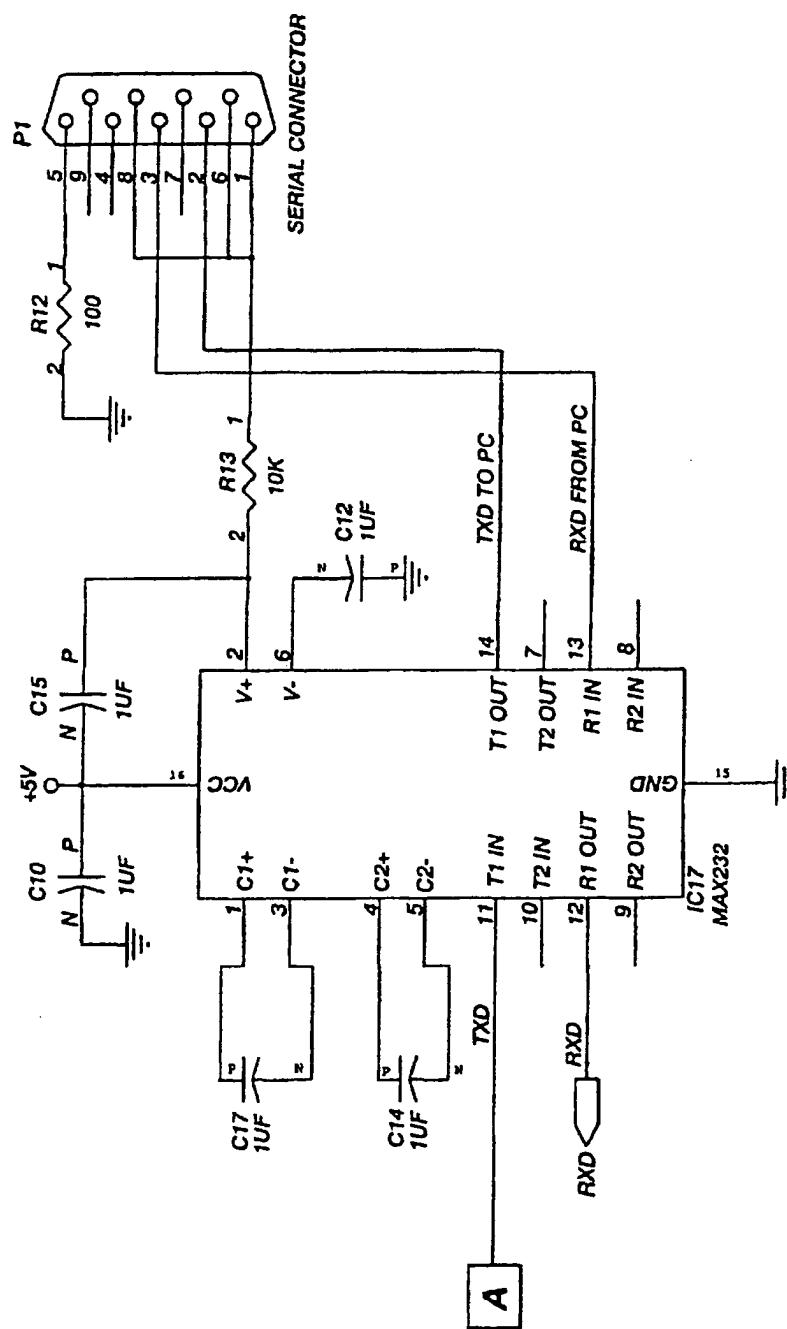


Fig. 30K

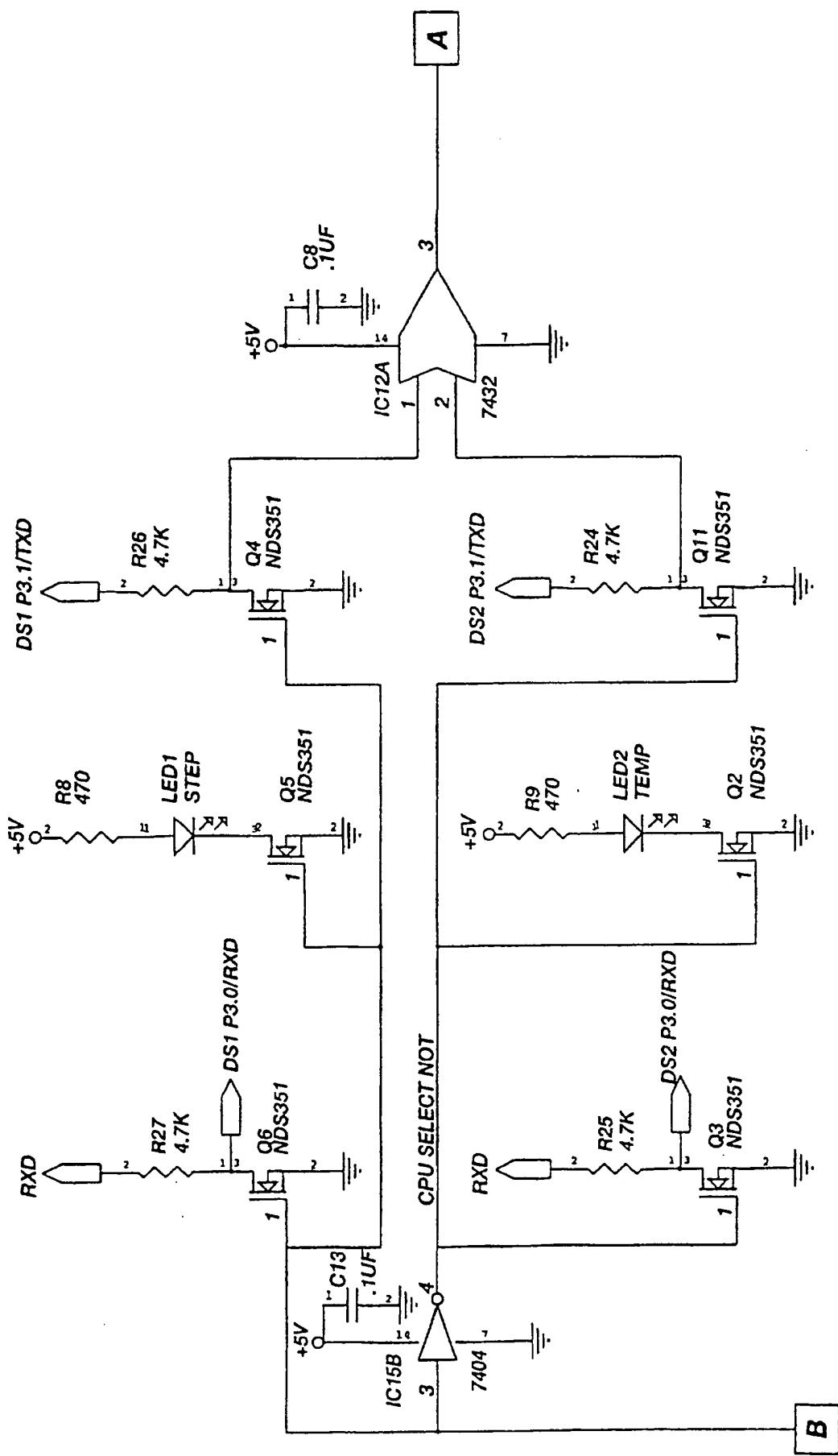
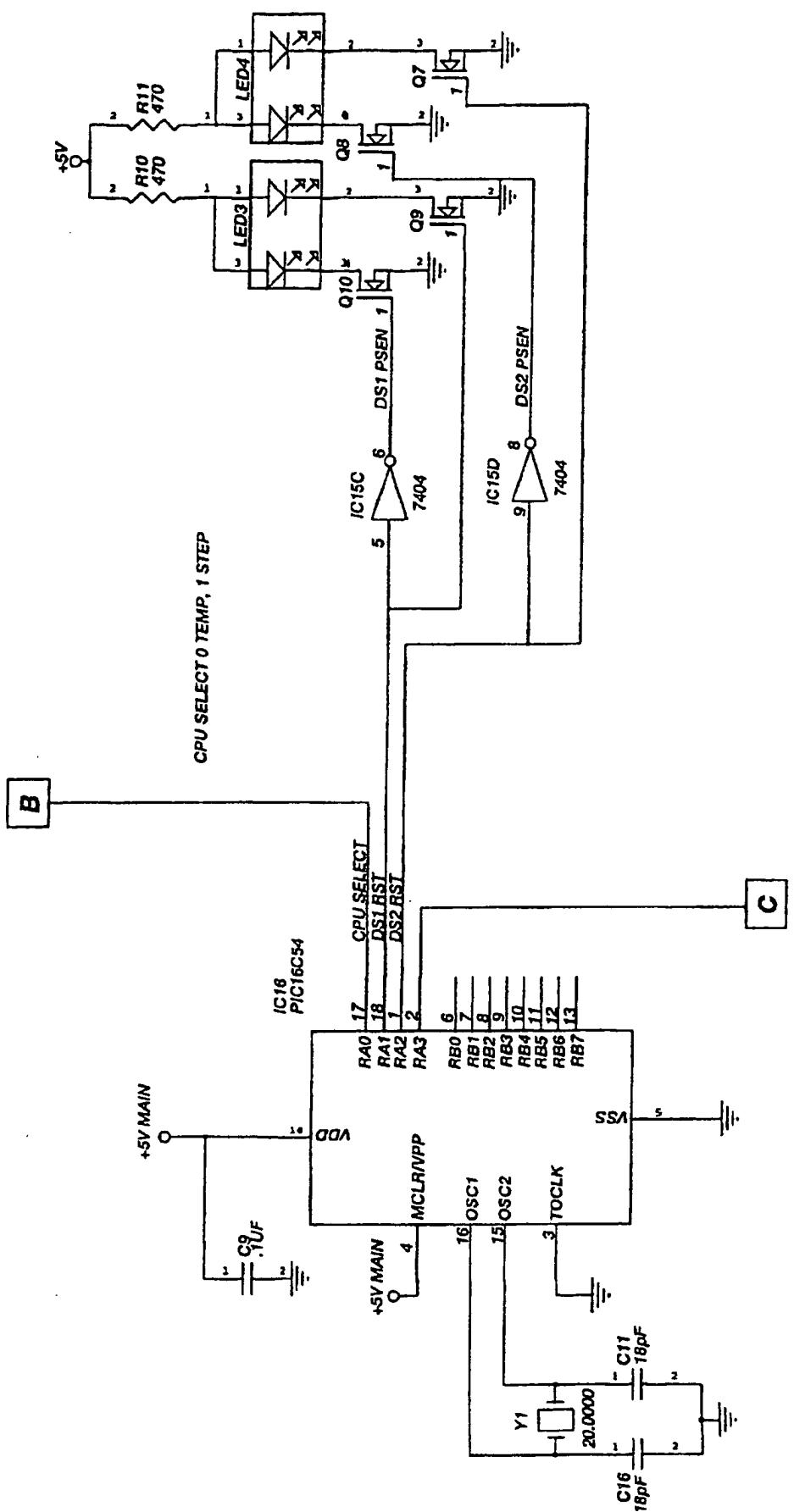


Fig. 30L



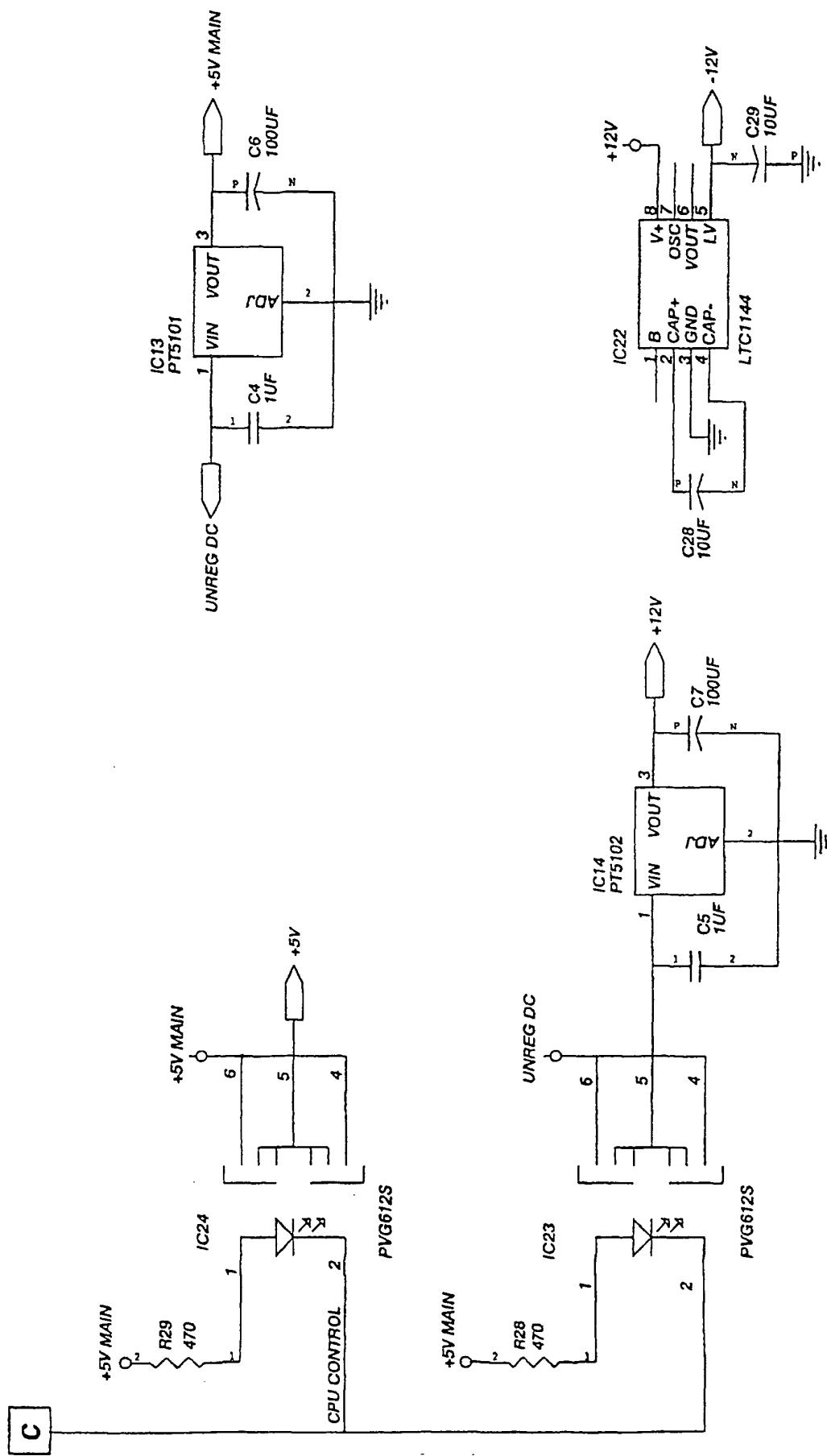


Fig. 30N

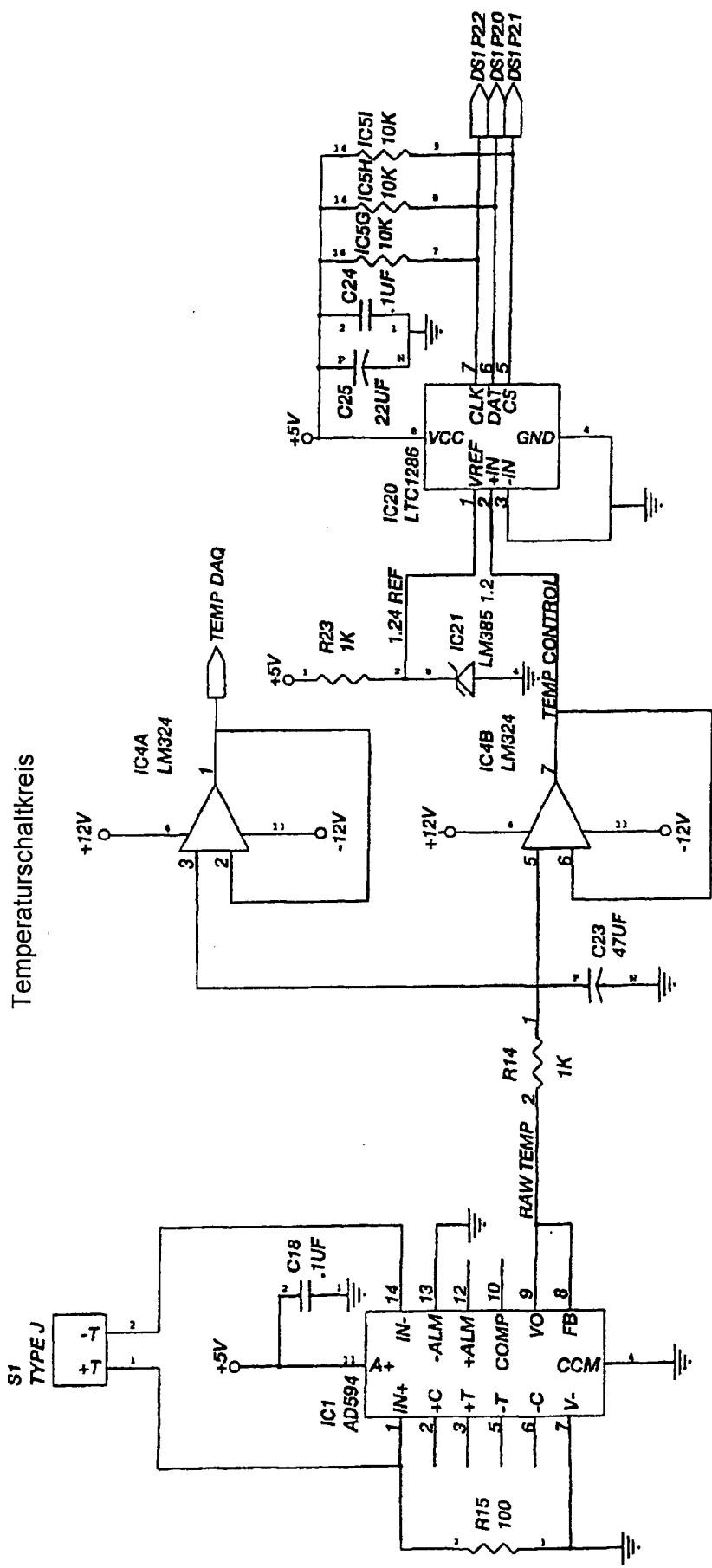


Fig. 300

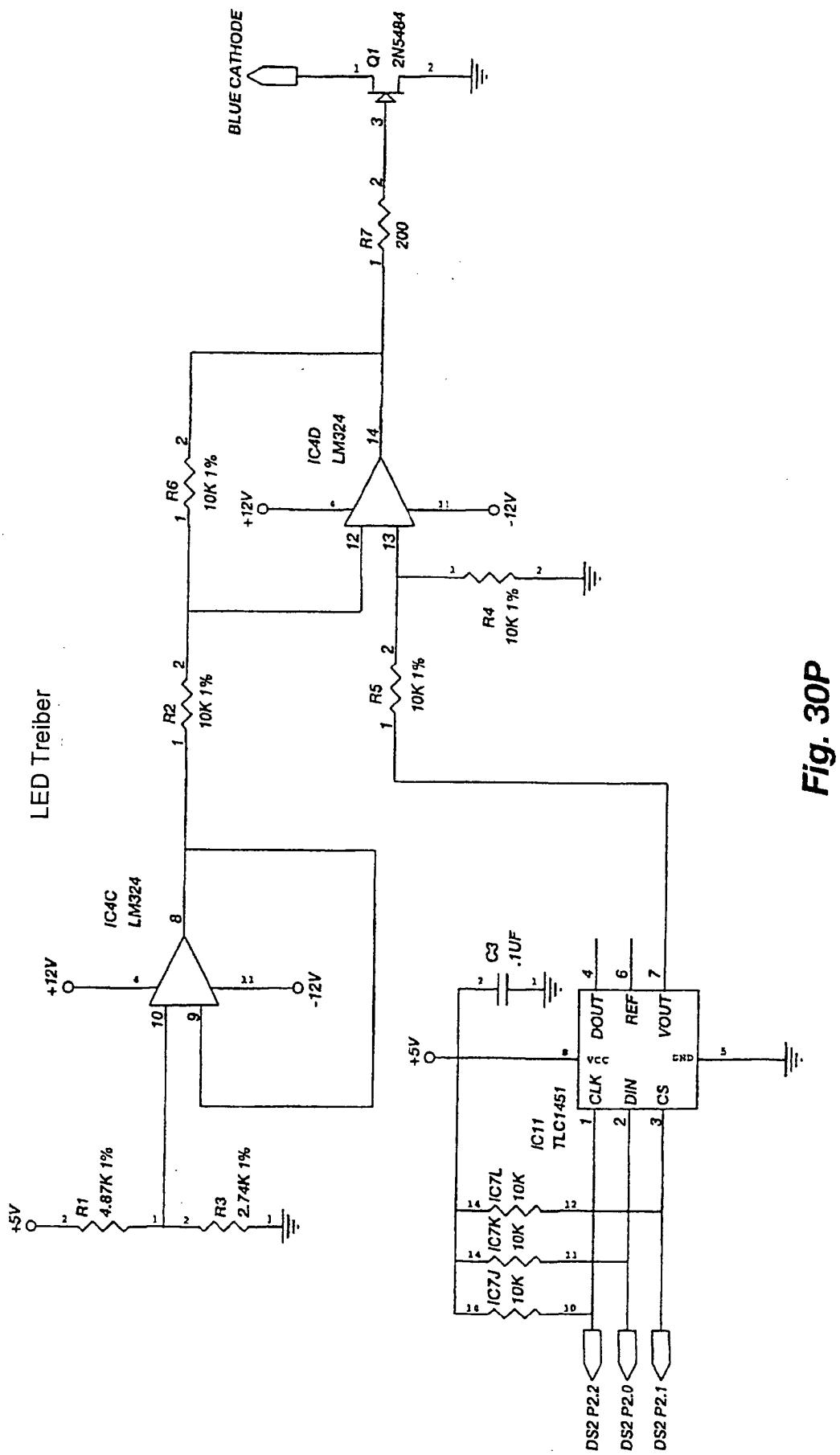


Fig. 30P

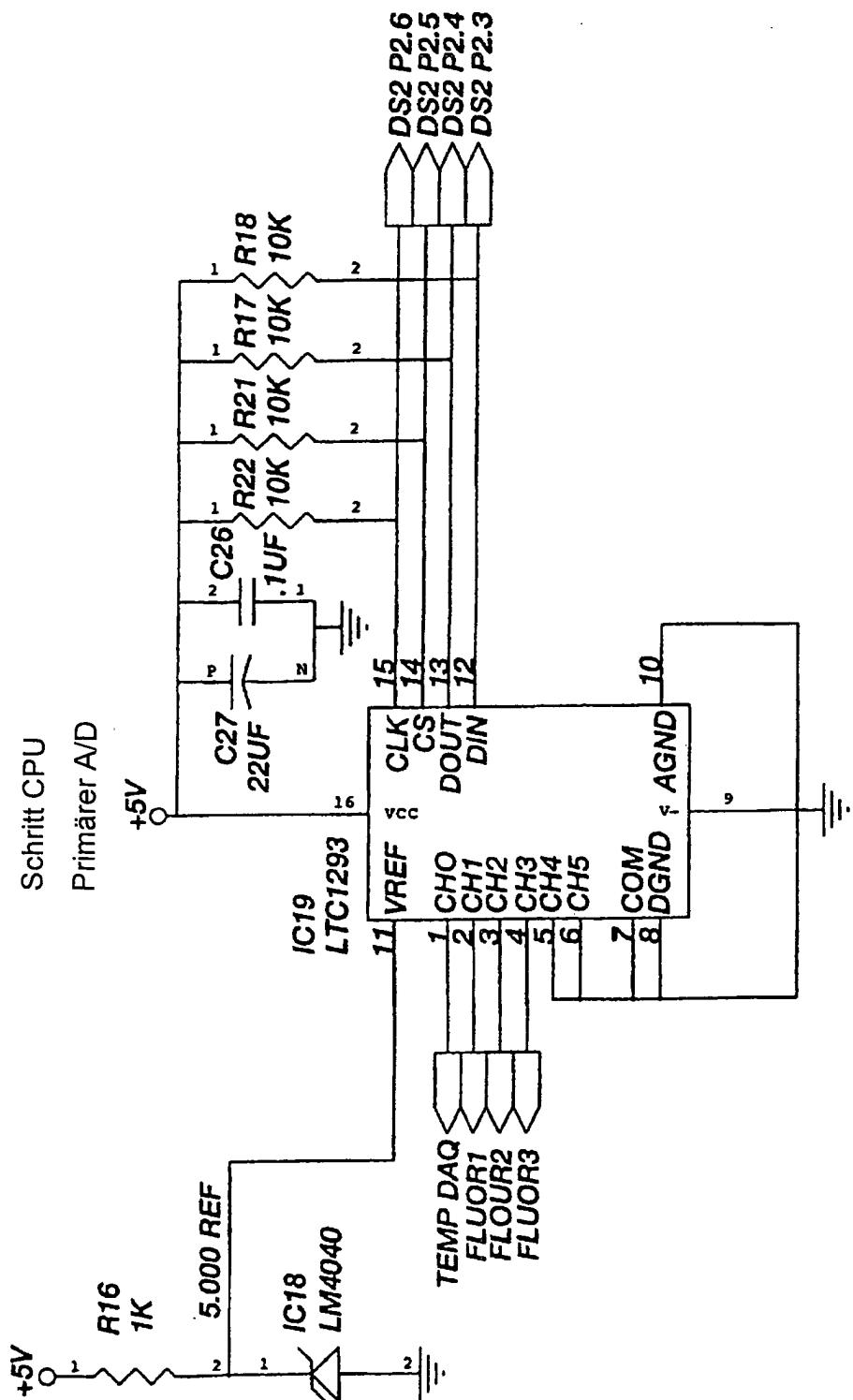


Fig. 30Q

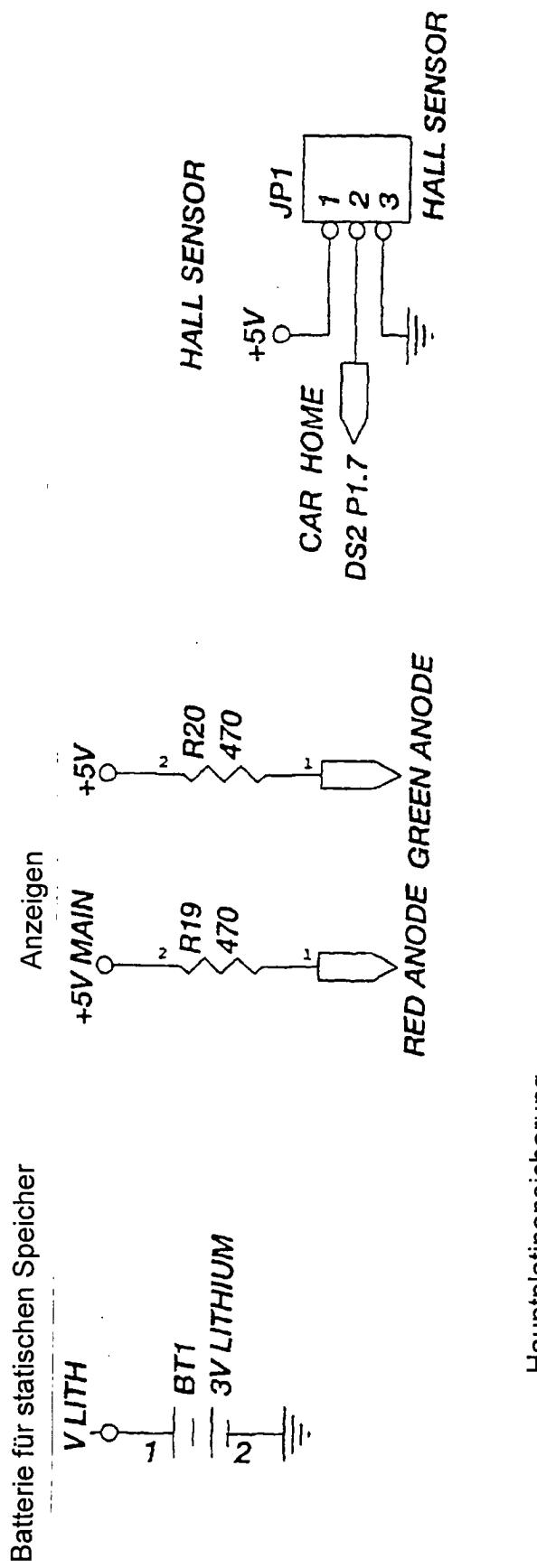


Fig. 30R

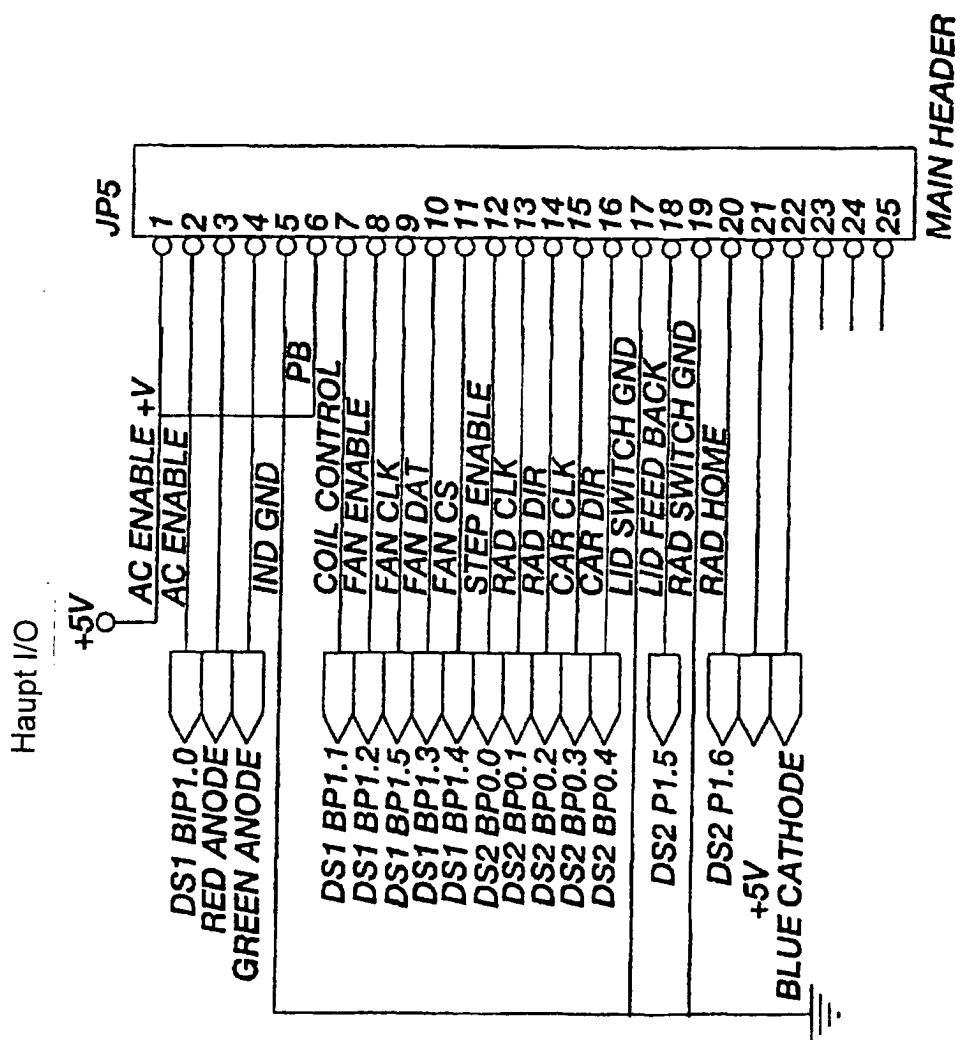
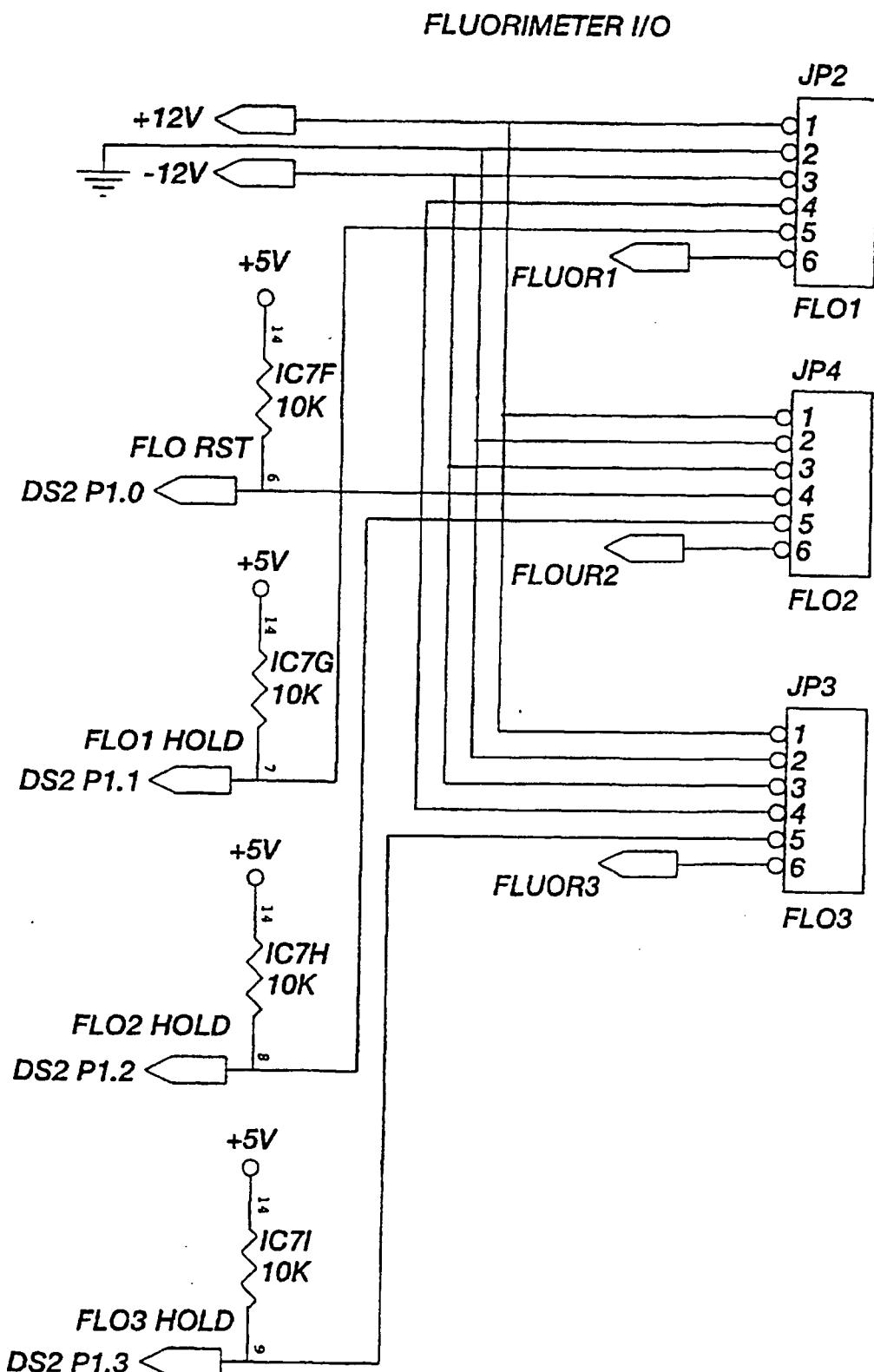


Fig. 30S

**Fig. 30T**

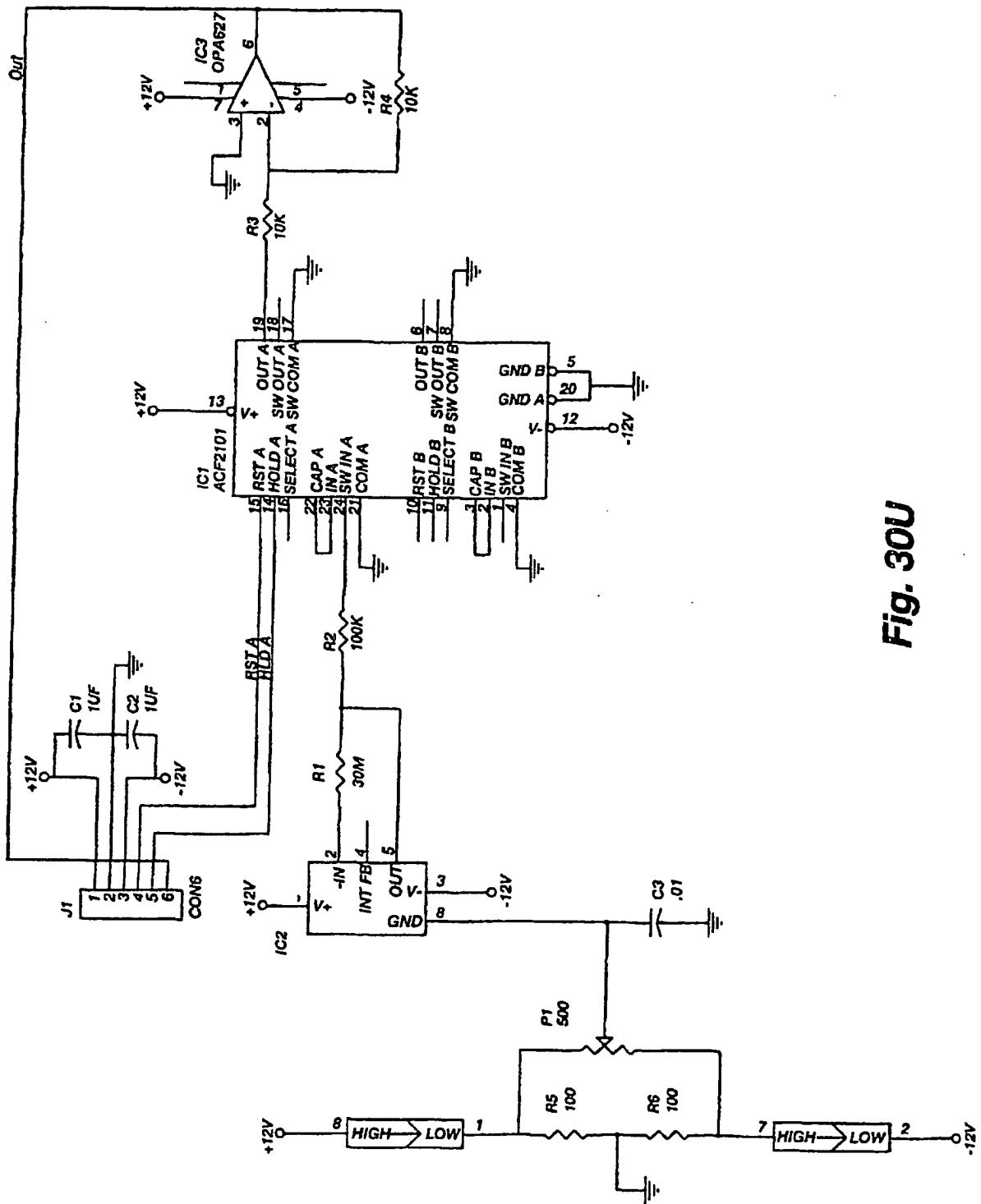
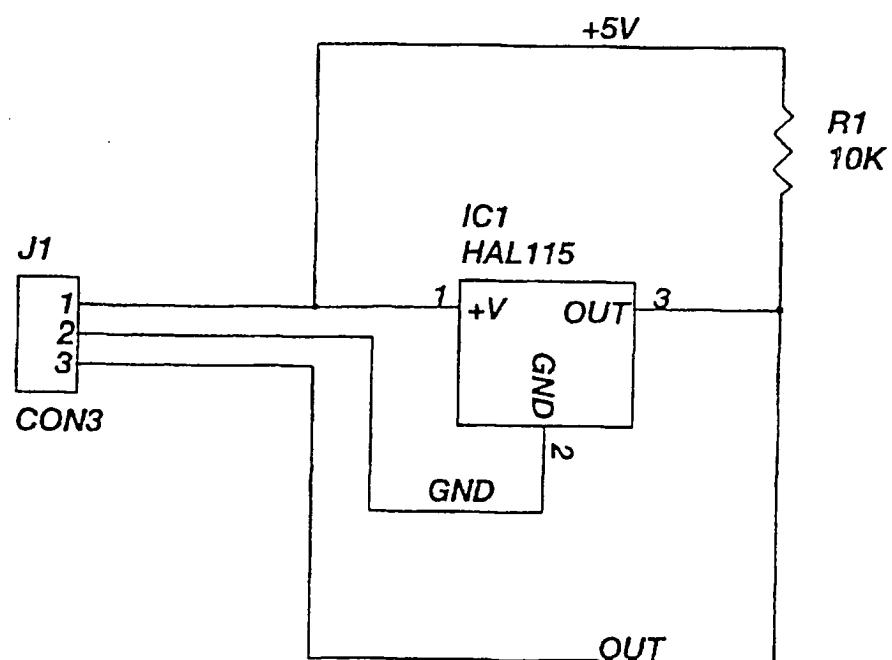
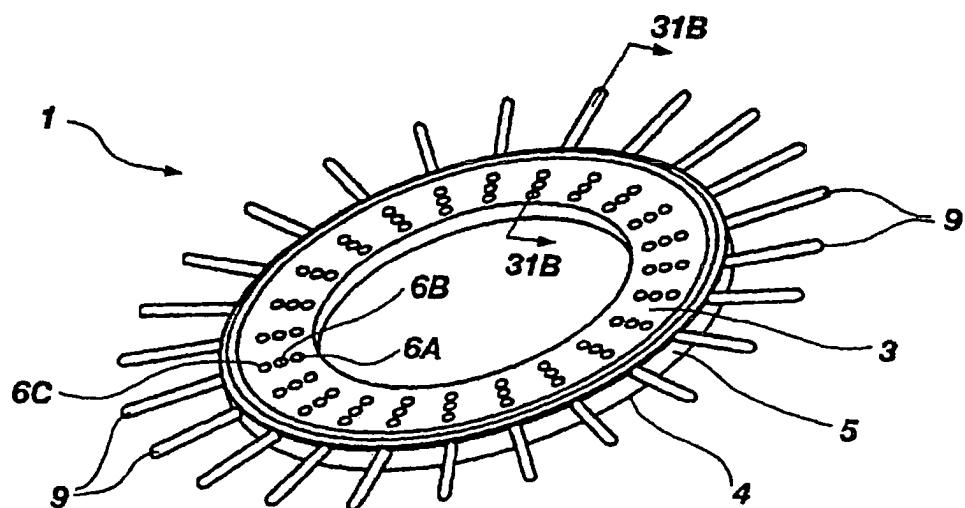


Fig. 30U

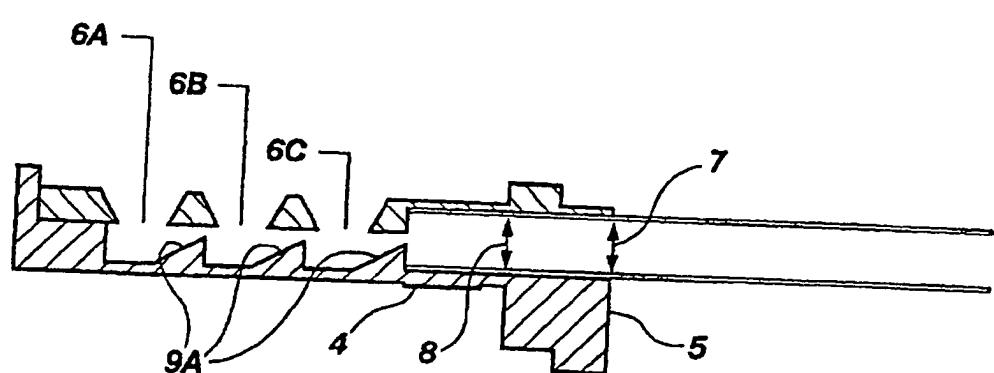
Karussell **HOME POSITION SENSOR**



**Fig. 30V**



**Fig. 31A**



**Fig. 31B**

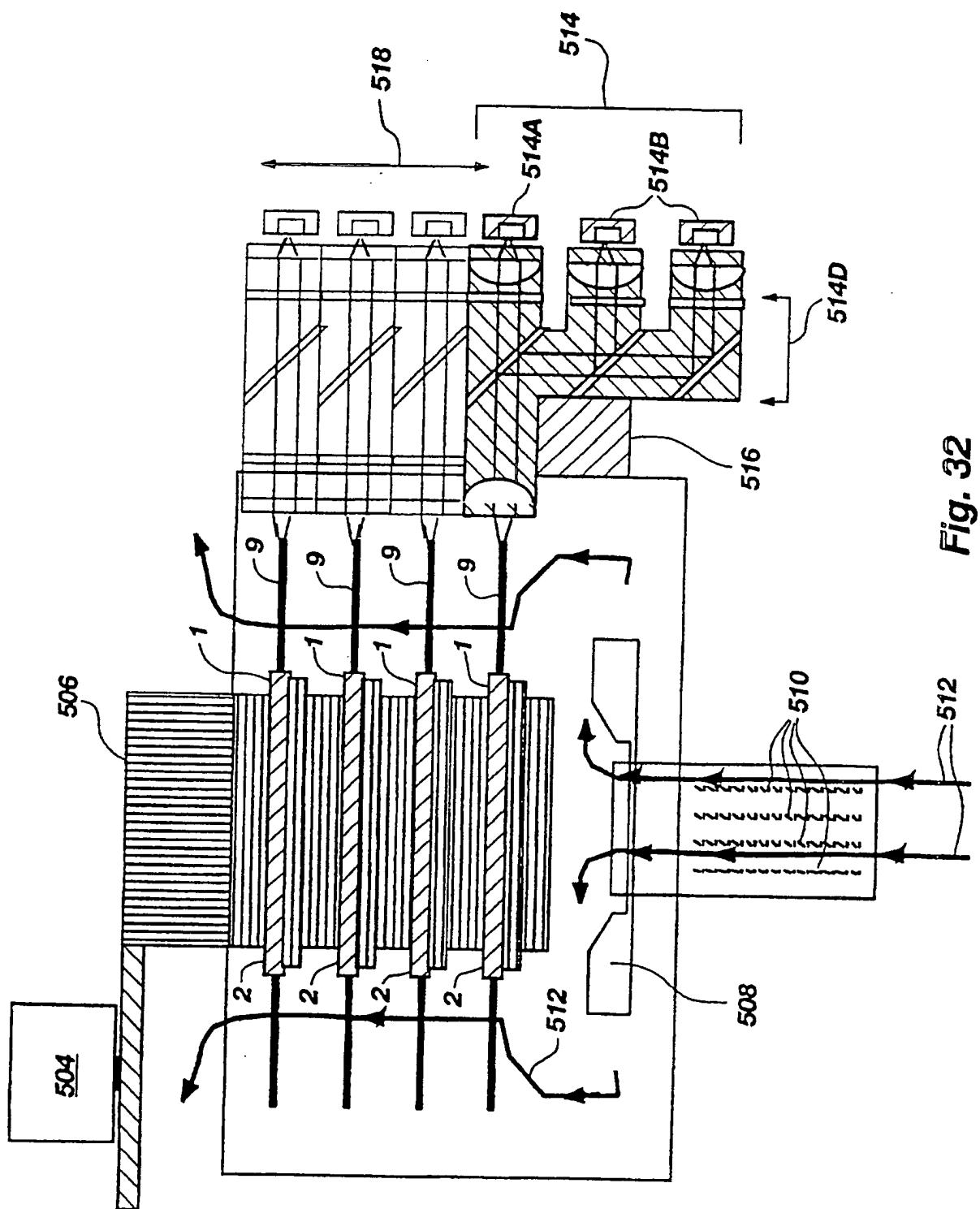


Fig. 32