

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
27. April 2006 (27.04.2006)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2006/042838 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
B01L 3/00 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/055303

(22) Internationales Anmeldedatum:
17. Oktober 2005 (17.10.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2004 050 576.4
15. Oktober 2004 (15.10.2004) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **SIEMENS AKTIENGESELLSCHAFT** [DE/DE]; Wittelsbacherplatz 2, 80333 München (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **BARLAG, Heike** [DE/DE]; Äussere Laufer Gasse 10, 90403 Nürnberg (DE). **BIRKLE, Siegfried** [DE/DE]; Veit-Stoss-Strasse 46, 91315 Höchstadt (DE). **GUMBRECHT, Walter** [DE/DE]; In der Röte 1, 91074 Herzogenaurach (DE). **KÜHN, Daniela** [DE/DE]; Bergstrasse 32, 91334 Hemhofen (DE). **PAULICKA, Peter** [CZ/DE]; Franz-Steinmetz-Weg 1, 91056 Erlangen (DE). **STANZEL, Manfred** [DE/DE]; Taurusstrasse 100, 91056 Erlangen (DE).

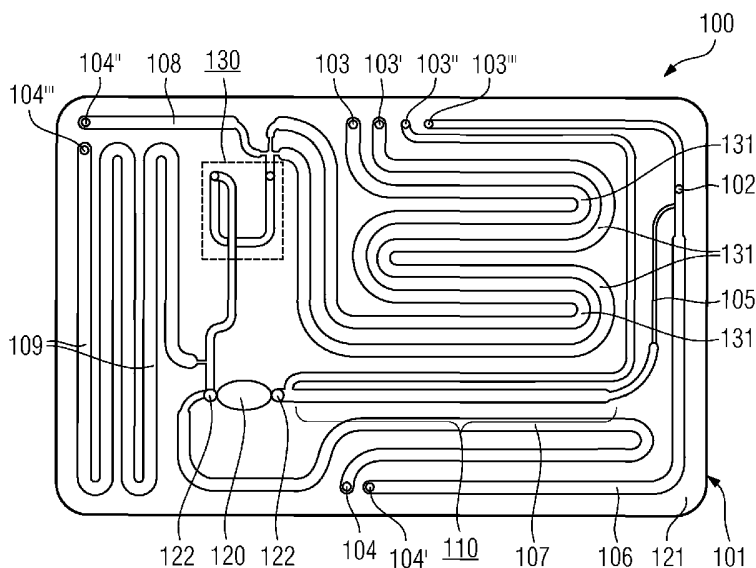
(74) Gemeinsamer Vertreter: **SIEMENS AKTIENGESELLSCHAFT**; Postfach 22 16 34, 80506 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: ARRANGEMENT FOR INTEGRATED AND AUTOMATED DNA OR PROTEIN ANALYSIS IN A SINGLE-USE CARTRIDGE, METHOD FOR PRODUCING SUCH A CARTRIDGE AND OPERATING METHOD FOR DNA OR PROTEIN ANALYSIS USING SUCH A CARTRIDGE

(54) Bezeichnung: ANORDNUNG ZUR INTEGRIERTEN UND AUTOMATISIERTEN DNA- ODER PROTEIN-ANALYSE IN EINER EINMAL VERWENDBAREN CARTRIDGE, HERSTELLUNGSVERFAHREN FÜR EINE SOLCHE CARTRIDGE UND BETRIEBSVERFAHREN DER DNA- ODER PROTEIN-ANALYSE UNTER VERWENDUNG EINER SOLCHEN CARTRIDGE



(57) Abstract: A cartridge (card) having a system of microchannels and/or microcavities is used for automated DNA or protein analysis, wherein said microchannels or microcavities comprise geometrical structures for receiving dry reagents. For the purpose of industrial production, the cartridge is produced from a flat card support, e.g., by injection moulding. The reagents are spotted into the open channels, dried and then the channels are sealed by means of a film. A finished cartridge can thus be provided with a test sample and the fully automated measuring sequence can be initiated by inserting said cartridge into a read-out device.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2006/042838 A1



KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) Zusammenfassung: Zur automatisierten DNA- oder Protein-Analyse wird eine Cartridge (Karte) mit einem System von Mikrokanälen und/oder Mikrokavitäten verwendet, wobei die Mikrokanäle bzw. die Mikrokavitäten geometrische Strukturen zur Aufnahme von Trockenreagenzien aufweisen. Zwecks industrieller Herstellung wird die Cartridge aus einem flachen Kartenkörper hergestellt, beispielsweise durch Spritzgusstechnik, in die offenen Kanäle die Reagenzien gespottet und getrocknet und anschließend werden die Kanäle durch eine Folie verschlossen. Es kann somit eine fertig konfektionierte Cartridge mit einer Messprobe versehen werden und durch Einbringen in ein Auslesegerät der vollautomatisierte Messablauf gestartet werden.

Beschreibung

Anordnung zur integrierten und automatisierten DNA- oder Protein-Analyse in einer einmal verwendbaren Cartridge, Herstellungsverfahren für eine solche Cartridge und Betriebsverfahren der DNA- oder Protein-Analyse unter Verwendung einer solchen Cartridge

Die Erfindung bezieht sich auf eine Anordnung zur integrierten und automatisierten DNA- oder Protein-Analyse in einer einmal verwendbaren Cartridge. Als Cartridge wird dabei eine flache Karte im Scheckkartenformat bezeichnet. Daneben bezieht sich die Erfindung auf die Herstellung einer solchen Cartridge. Schließlich bezieht sich die Erfindung auch auf ein Betriebsverfahren für eine DNA- oder Protein-Analyse unter Verwendung einer solchen Cartridge.

Zur Nukleinsäureanalytik, beispielsweise zur Analytik von weißen Blutzellen aus Vollblut, zwecks Beantwortung von human genomischen Fragestellungen müssen zunächst in einer ersten Station als Probenvorbereitungsschritt die Zellen aufgebrochen und anschließend die dabei freigesetzte DNA isoliert werden. In einer zweiten Station erfolgt eine PCR (Polymerase Chain Reaction = Polymerase-Ketten-Reaktion) zur selektiven DNA-Vervielfältigung (Amplifikation), um die Konzentration der nachzuweisenden DNA soweit zu erhöhen, dass diese in einer dritten Station nachgewiesen werden kann.

Im Labor werden letztere Teilprozesse separat nach bekanntem Stand der Technik durchgeführt. Die vorstehend erläuterten drei Stationen beinhalten jeweils mehrere Arbeitsschritte und werden voneinander unabhängig mit unterschiedlichen Geräten durchgeführt. Die einzelnen Arbeitsschritte erfolgen weitgehend manuell.

Die Realisierung dieser Schritte ist vom Vorhandensein von Laborgeräten - wie einer Zellaufschluss-Apparatur, einem PCR-Gerät (sog. Thermocycler), evtl. einem PCR-Gerät, das für

quantitative PCR geeignet ist, einer Elektrophorese-Apparatur, einer Hybridisierungsstation, einem optischen Reader, sog. Eppendorf-Tubes, mehreren Pipettier-Geräten sowie einem Kühlbehälter für Reagenzien - abhängig und muss von geschultem Personal unter Einhaltung von Sicherheitsvorschriften bezüglich Infektionsgefahr, Abfallentsorgung od. dgl. durchgeführt werden. Insbesondere müssen mehrere volumetrische, d.h. genaue, Dosierungen (Pipettieren) von Reagenzlösungen durchgeführt werden. Solche Arbeitsschritte sind zeitaufwendig und kostenintensiv.

Vom Stand der Technik sind Einrichtungen zur biochemischen Analyse bekannt, die entsprechend der WO 02/073153 A1 Verwendung von insbesondere siliziumbasierten Messmodulen machen, welche in eine Chipkarte integriert werden können. Dabei werden entsprechend der WO 02/072262 A1 bereits die zur Analyse verwendeten Reagenzien in trockengelagerter Form in das Analysemodul integriert.

Davon ausgehend ist Aufgabe der Erfindung die Realisierung eines preisgünstigen, einfach handhabbaren, kompletten DNA- oder Protein-Analyse-Vorganges in einer miniaturisierten Cartridge. Insbesondere sollen folgende Verbesserungen im Vergleich zur Labormethode realisiert werden:

- Eine vollständige Integration aller Stoffe (evtl. außer Wasser) in einer geschlossenen einmal verwendbaren Cartridge;
- eine Bevorratung der Reagenzien in einer bei Raumtemperatur lagerstabilen Form;
- eine automatische Durchführung aller Prozesse in der Cartridge;
- keine manuellen Arbeitsschritte, außer Injektion der zu analysierenden Probe, z.B. Blut;
- Kein direkter Kontakt mit gesundheitsgefährdenden Stoffen (Blut und Reagenzien-Abfall verbleiben in der Cartridge);
- Cartridge-Geometrie erlaubt eine effiziente und schnelle

Thermozyklisierung;

- alle Detektionsvorgänge sollen elektrisch ablaufen und einfach auszulesen sein;
- die verwendete Cartridge ist klein und kostengünstig herzustellen.

Die Aufgabe ist erfindungsgemäß durch eine Anordnung mit einer Cartridge gemäß Patentanspruch 1 gelöst. Die Herstellung einer solchen Cartridge ist Gegenstand des Patentanspruches 10 34. Betriebsverfahren mit solchen Cartridges sind Gegenstand der nebengeordneten Patentansprüche 38 und 42. Dabei ist Anspruch 38 auf die DNA-Analyse und Anspruch 42 auf die Protein-Analyse gerichtet. Weiterbildungen der Anordnung, des Herstellungsverfahrens und der Betriebsweise bei der Analyse 15 sind in den jeweiligen Unteransprüchen angegeben.

Die Erfindung geht insbesondere von der WO 02/072262 A1 und dem dort genannten weiteren Stand der Technik aus. Dort wird eine Analyseeinrichtung mit in Fluidkanälen trockengelagerten, bei Raumtemperatur stabilen Reagenzien beschrieben, die 20 durch Zuführen von Wasser kurz vor ihrer bestimmungsgemäßen Verwendung in Lösung gebracht werden. Die Erfindung geht weiterhin von der nicht vorveröffentlichten DE 10 2004 021780 A1 und der nicht vorveröffentlichten DE 10 2004 021822 A1 aus. 25 Daneben ist es auch bekannt, speziell elektrisch auslesbare Detektionsmodule zu verwenden.

Demgegenüber ist Gegenstand der Erfindung eine solche einmal verwendbare Cartridge mit einem System aus Mikrokanälen 30 und/oder Mikrokavitäten für einen vorgegebenen Prozessablauf nach der Probenaufnahme, wobei die Cartridge Strukturen zur Aufnahme der Trockenreagenzien aufweist und diesen Strukturen Mittel zur Durchführung sowohl des Zellaufschlusses einerseits und der PCR andererseits, aber auch der elektrochemischen Detektion zugeordnet sind. Insbesondere haben dabei die 35 Kanäle unterschiedliche, problemangepasste Strukturen. Speziell der Aufschlusskanal hat vorteilhafterweise gestufte Querschnitte zur optimalen Benetzung mit dem Trockenreagenz,

während die PCR-Kammer und die Elisa-Reagenzkanäle töpfchenförmige Vertiefungen aufweisen.

5 Es kann somit erreicht werden, dass in einem Verfahrensablauf die Zuführung und Aufbereitung der Probe, die DNA-Amplifikation und die eigentliche Detektion der DNA möglich ist.

10 Durch das erfindungsgemäße System der geometrischen Strukturen in den Mikrokanälen bzw. Mikrokavitäten zur Aufnahme von Trockenreagenzien ergeben sich geeignete Randbedingungen für die DNA-Analyse einerseits und die Protein-Analyse andererseits. Folgende Merkmale und Maßnahmen sind wesentlich:

15 - Die im Mikrokanal bzw. in der Mikrokavität eingebrachten Reagenzien sind trockenbare Substanzen mit vernachlässigbarem Dampfdruck. Durch die bei Raumtemperatur stabilen Substanzen bleiben deren Eigenschaften für Zellaufschluss und/oder PCR und/oder Detektion erhalten. Dabei können Gemische aus den Substanzen mit Hilfsstoffen
20 Dünnschichten bilden und können die Gemische mit dünnen Paraffinschichten wasserdicht abgedeckt sein.

Bei der Erfindung werden die Reagenzien und Hilfsstoffe bereits bei der Herstellung der Cartridge als Trockensubstanzen
25 in Vertiefungen der Cartridgekanäle eingebracht. Daraus ergeben sich folgende Vorteile:

- einfache und präzise Applikation der Reagenzien bei der Herstellung der Cartridge
- Schutz der Reagenzien beim Befüllen der Reagenzkanäle,
30 d.h. die Reagenzien werden durch einen sog. Wasserflow nicht weggespült, sondern bleiben beim Füllen des gesamten Kanals erhalten. Erst nach dem Befüllen des Kanals lösen sich die Reagenz-Spots über Diffusionsvorgänge auf und es entsteht eine homogene Reagenzlösung.

35

In einer weiteren besonderen Ausführungsform sind die Vertiefungen in vordefinierten Abständen entlang des Reagenzkanals lokalisiert. Dabei können die Abstände äquidistant sein oder

besonders vorteilhaft in variablen Abstandsmustern angeordnet sein.

Die Vertiefungen können vorteilhafterweise mit variablen Trockenreagenzmengen befüllt sein. Durch die Kombination von
5 verschiedenen Trockenreagenzmengen und Abstandsmustern der Vertiefungen können die gewünschten Konzentrationsprofile der fertigen Reagenzlösungen eingestellt werden.

10 Für bestimmte Funktionen wie z.B. Zellaufschluss in Gegenwart von Magnet-Beads und Lyse-Reagenzien ist eine gleichmäßige Verteilung der unlöslichen Komponenten, d.h. der Beads, im Trockenreagenz erforderlich. Dazu werden die Magnet-Beads als
15 Suspension in den Lyse-Kanal dispensiert. Beim Verdampfen des Lösungsmittels wird beobachtet, dass sich die Beads in die Randbereiche des Lyse-Kanals zurückziehen und eine gleichmäßige Verteilung dadurch nicht gegeben ist. Durch stufenartige
20 Strukturierung des Lyse-Kanal-Querschnittes verteilen sich die Magnet-Beads über die Stufen und eine gleichmäßige Verteilung wird erreicht.

Damit mit der erfindungsgemäßen Cartridge gleichermaßen ein Zellaufschluss, eine PCR und ein so genannter DNA-/Protein-ELISA-Test durchgeführt werden kann, ist es vorteilhaft, dass
25 in den Mikrokanälen bzw. Mikrokavitäten Substrate mit DNA-bindenden Eigenschaften, insbesondere die DNA-bindenden Magnet-Beads, vorhanden sind. Dabei können die Lyse-Reagenzien und die Magnet-Beads zusammen in einer einzigen Trockenmatrix
30 enthalten sein. Weiterhin sind in der Karte auch die Reagenzien für einen ELISA-Assay vorhanden. Im Einzelnen werden für das ELISA-Assay zwei Reagenzien benötigt, d.h. als erstes Reagenz ein Label-Enzym und als
zweites Reagenz ein Enzym-Substrat.

35 Insbesondere ist in der Cartridge ein Detektionsmodul zur elektrischen Detektion der Hybridisierungsvorgänge angeordnet. Das Detektionsmodul besteht vorteilhafterweise aus einem Edelmetall/Plastik-Verbund oder einem halbleiterprozessierten

Siliziumchip mit Edelmetallelektroden. Für eine elektrische Detektion geeignet sind dabei insbesondere elektrochemische, magnetische oder piezoelektrische Messverfahren.

5 Zur Anwendung der Erfindung der erfindungsgemäßen Cartridge ist insbesondere ein Eingabeport für eine Vollblutprobe vorhanden. Weiterhin sind Mittel zur Zufuhr von Wasser vorhanden, beispielsweise Zufluss-Ports zum Anschluss an eine externe Wasserzufuhr oder ein integriertes Wasserreservoir. In
10 den Mikrokanälen bzw. Mikrokavitäten haben trockene Puffer-substanzen definierte Ionenstärke nach der Wasserzufuhr.

Bei Anwendung der Erfindung zur Analytik von weißen Blutzellen aus Vollblut sind vorteilhafterweise Mittel zum Mischen
15 einer Vollblutprobe mit Wasser bzw. einer Pufferlösung vorhanden. Dabei sind Mittel zum Durchströmen des mit Lyse-/Bead/Reagenz beschichteten Mikrokanals bzw. Mikrokavität mit Blut bzw. Blut/Wasser- oder Blut/Puffer-Gemische vorhanden.

20 Für die in der erfindungsgemäßen Cartridge bei Anwendung speziell zur DNA-Analyse durchzuführende PCR sind weiterhin Mittel zum Generieren eines Magnetfeldes zum Fixieren des DNA-/Magnetbead-Komplexes in einer PCR-Kavität vorhanden. Für diesen Zweck muss die PCR-Kavität geeignet verschlossen werden können und müssen Mittel zur Thermozyklisierung vorhanden
25 sein.

Schließlich ist es bei der erfindungsgemäßen Cartridge wesentlich, dass Mittel zum Lagern von verbrauchtem Probenmaterial und verbrauchten Reagenzien vorhanden sind, die Abfall-
30 Reservoirs bilden. Dabei müssen die Mittel zur keimdichten, zell- bzw. partikelfreien Entlüftung von mindestens einem Abfallreservoir geeignet sein. Zum Auslesen der Cartridge in einem Auslesegerät, das nicht Gegenstand der Erfindung ist,
35 müssen schließlich Mittel zur Fixierung der Cartridge vorhanden sein.

Weitere Einzelheiten und Vorteile der Erfindung ergeben sich

aus der nachfolgenden Figurenbeschreibung von Ausführungsbeispielen anhand der Zeichnung in Verbindung mit den Patentansprüchen. Es zeigen in jeweils schematischer Darstellung

- 5 Figur 1 eine Cartridge mit einer Übersicht über einzelne
 Mikrokanal-/ Kavitäten-Systeme mit den zugehörigen
 Funktionsbezeichnungen,
 Figur 2 die Draufsicht auf einen Zellaufschlusskanal,
 Figur 3 den Querschnitt durch den Zellaufschlusskanal ge-
10 mäß Figur 5,
 Figur 4 zwei Alternativen des Durchflusskanalquerschnittes
 in vergrößerter Darstellung,
 Figur 5 die Draufsicht auf die PCR-Kammer in Figur 1,
 Figuren 6 und 7 den Querschnitt durch die PCR-Kammer gemäß
15 Figur 5,
 Figur 8 die Draufsicht auf einen ELISA-Reagenzkanal in Fi-
 gur 1,
 Figuren 9, 10 den Querschnitt des ELISA-Reagenzkanals gemäß
 Figur 8 sowie die
20 Figuren 11 bis 23 die Draufsicht auf die Cartridge gemäß Fi-
 gur 1 in verschiedenen Verfahrenszuständen während
 einer automatisierten Auswertung.

25 In den Figuren haben gleiche bzw. gleichwirkende Elemente
 gleiche Bezugszeichen. Insbesondere die Figuren 1 bis 10 ei-
 nerseits und die Figuren 11 bis 23 andererseits werden ge-
 meinsam beschrieben.

30 In Figur 1 ist eine Cartridge 100 für einen ELISA("Enzyme
 Linked Immuno Sorbent ASSAY")- Test mit einem Aufriss des
 darin vorhandene Mikrokanal- bzw. Kavitäten-System darge-
 stellt, wobei der Übersicht halber die zugehörigen Funktions-
 bezeichnungen zusätzlich bezeichnet sind. Die Cartridge 100
 besteht im Einzelnen aus einem Kunststoff-Grundkörper 101 mit
35 dort eingebrachten Fluidik-Strukturen, die von einer
 Kunststoffolie abgedeckt sind. Die Strukturen werden anhand
 der Figuren 2 bis 10 weiter unten beschrieben.

Aus der Draufsicht gemäß Figur 1 ist ein Probenport 102 mit daran anschließender Dosierstrecke 105, über den definiert flüssige Proben zur insbesondere Nukleinsäureanalytik, beispielsweise zur Analytik von weißen Blutzellen aus Vollblut, zwecks Beantwortung von humangenomischen Fragestellungen eingebracht werden können, ersichtlich. Es schließt sich ein Kanalbereich 110 für den Zellaufschluss der Probe und weiterhin speziell für eine der DNA-Analyse ein Bereich 120 für eine PCR (Polymerase Chain Reaction = Polymerase-Ketten-Reaktion) zur selektiven DNA-Vervielfältigung (Amplifikation) an, um die Konzentration der nachzuweisenden DNA soweit zu erhöhen, dass diese in einer dritten Station nachgewiesen werden kann. Die eigentliche PCR-Kammer ist durch Ventile 122, 122' verschließbar. Die Detektion der so aufbereiteten Probe, insbesondere gemäß dem ELISA-Verfahren, erfolgt dann im Bereich 130.

Aus Figur 1 sind weiterhin Wasserports 103 bis 103''' ersichtlich. Darüber ist bei der Aufbereitung einer Probe Wasser als Transport- und Lösungsmittel in die Cartridge 100 einbringbar. Weiterhin sind Entlüftungsporens 104 bis 104''' vorhanden.

Wie erwähnt hat die Cartridge 100 insbesondere einen Eingabeporens 102 für eine Vollblutprobe. Dazu sind Mittel zur Zufuhr von Wasser vorhanden. Es kann ein Zuflussporens zum Anschluss an eine externe Wasserzufuhr vorhanden sein oder der Zuflussporens kann an ein integriertes Wasser-Reservoir angeschlossen werden.

Die Mikrokanäle bzw. Mikrokavitäten 101 bis 131 sind im Normalfall mit trockenen Puffersubstanzen gefüllt, die eine definierte Ionenstärke nach Wasserzufuhr gewährleisten. Für die Blutanalyse sind Mittel zum Mischen von Vollblutproben und Wasser bzw. der Pufferlösung und/oder Mittel zum Durchströmen eines mit einem Lyse-Bead-Reagenz beschichteten Mikrokanals bzw. der Mikrokavität mit Blut oder mit Blut-Wasser- bzw. Blut-Puffer-Gemisch vorhanden.

Im Kanalsystem sind weite Bereiche 106, 107, 108, 109 als Reservoirs für die Aufnahme von Abfall ("Waste") vorgesehen. Daneben ist ein Bereich mit Kanälen 131 bzw. 131' für die Aufnahme unterschiedlicher ELISA-Reagenzien vorhanden.

In den Figuren 2 bis 4 kennzeichnen jeweils Bezugszeichen 101 wieder den Cartridge-Grundkörper. Der Körper beinhaltet speziell für einen Zellaufschluss ("Lyse") einen in besonderer Weise ausgeformten Durchflusskanal 111 mit durch die Seitenkanten gebildeten stufenförmigen Vertiefungen 112 zur Aufnahme von Trockenreagenzien. Die Vertiefungen 112 weisen dabei mehrere Stufen mit Stufenhöhen von 10 bis 500 µm auf und haben eine Ausdehnung von ca. 1 mm und eine Tiefe von etwa 100 µm.

Speziell in der Darstellung gemäß der Figur 4a ergibt sich die alternative Möglichkeit, bei einem Durchflusskanal ohne Zusatzvertiefungen die Aufnahme der Lyse-Reagenzien nur im Bereich 113 der Kanten des Durchflusskanals 111 vorzusehen. In Figur 4b sind dagegen derartige Reagenzien, die insbesondere auch Magnet-Beads zur Bindung der freigesetzten DNA enthalten, gleichmäßig zwischen den Stufen 112 über den Durchflusskanal 111 verteilt. Magnet-Beads haben DNA- und Proteinbindende Eigenschaften, sofern sie entsprechend vorbehandelt sind. Sie können mit DNA-bindenden Eigenschaften u. gegebenenfalls auch mit Antikörpern beschichtet sein. Zum Einbringen von Trockensubstanzen als Matrix mit Lyse-Reagenz und Magnet-Beads wird insbesondere auf die ältere DE 10 2004 021780 A1 und die ältere DE 10 2004 021822 der Anmelderin verwiesen.

In den Figuren 5 bis 7 ergibt sich die Struktur einer PCR-Kammer 120 im Cartridge-Grundkörper 101 mit Strömungskanal 111. Die Ventilanordnung zum Abschluss der PCR-Kammer bei bestimmungsgemäßer Anwendung ist hier nicht dargestellt. Wesentlich ist, dass in der PCR-Kammer 120 rundzylindrische Vertiefungen 124, 124' zur Aufnahme spezifischer Reagenzien

127, 127', die bei der Durchführung der PCR benötigt werden, vorhanden sind. Speziell in Figur 7 ist dazu dargestellt, dass ein trocken lagerbares, bei Raumtemperatur stabiles PCR-Reagenz 127, 127' zunächst von einer Paraffinschicht 128, 128' abgedeckt ist.

Die sachgerechte Durchführung der PCR mit ventilgesteuerter Thermozyklisierung innerhalb einer Cartridge wird im Einzelnen in den parallelen Anmeldungen DE 10 2004 050576.4 und DE 10 2004 050510.1 Anmelderin mit gleicher Anmeldepriorität beschrieben, auf die im vorliegenden Zusammenhang ausdrücklich verwiesen wird ("Incorporation by Reference"). Insbesondere wird darin die Verwendung von Magnet-Beads zur DNA-Bindung und die Konzentration der Magnet-Beads mit der DNA in der PCR-Kammer 120 durch steuerbare Magnetfelder beschrieben, worauf hier nicht mehr im Einzelnen eingegangen wird.

Aus den Figuren 8 bis 10 ergibt sich der Aufbau und die Struktur der ELISA-Reagenz-Kanäle 131 und 131' aus Figur 1. Es sind jeweils näpfchenförmige Vertiefungen 132 bis 132^{6'} vorhanden, die zur Aufnahme von vordosierten und vorportionierten Mengen an Reagenzien für den ELISA-Prozess entsprechend Figur 9 geeignet sind. Dies ist im Einzelnen in der eingangs bereits als Stand der Technik genannten WO 02/072262 A1 beschrieben, auf die im vorliegenden Zusammenhang ebenfalls ausdrücklich verwiesen wird ("Incorporation by Reference"). In Figur 10 sind die kreiszylindrischen Vertiefungen 132 bis 132^{6'} mit Trockenreagenzien 133 bis 133^{6'} befüllt dargestellt. Dabei realisiert ein erstes Reagenz ein Markierungsenzym und ein zweites Reagenz ein Enzymsubstrat, wie es bekanntermaßen bei der Hybridisierung der gegebenenfalls durch eine PCR aufbereiteten Probe mit spezifischen Fängersonden benötigt wird. Im nur schematisch angedeuteten Bereich 130 der Detektion können sich in einem Modul aus einem Edelmetall-/Plastik-Verbund unterschiedliche Sensoren zur Erfassung biochemischer Reaktionen befinden. Speziell bei elektrochemischen Messungen mit Halbleiterprozessierten Chips, d.h. insbesondere siliziumbasierten Sensoren, können die Signale

elektrisch erfasst und unmittelbar weiterverarbeitet werden. Neben elektrochemischen sind auch magnetische und/oder piezoelektrische Messmethoden mit diesbezüglichen Sensoren möglich.

5

In den Figuren 11 bis 23 ist jeweils die Cartridge 100 gemäß Figur 1 in der Draufsicht dargestellt, wobei der jeweils beim Analysevorgang aktive Bereich der Cartridge 100 markiert ist: Dazu wird die Cartridge 100 in ein Analysegerät, das in den
10 Figuren nicht im Einzelnen dargestellt ist und nicht Gegenstand vorliegender Patentanmeldung ist, eingeschoben.

Die Auswertung wird nachfolgend anhand elf konkreter Verfahrensteilschritte a) bis m) verdeutlicht, nachdem die Cartridge in ein Auswertegerät mit Mitteln zur Aufnahme der Cartridge
15 eingeschoben und das Auswertegerät bei darin fixierter Cartridge aktiviert ist. Unter Bezugnahme auf Figur 1 ergeben sich im Einzelnen folgende Teilschritte:

- 20 a) Es wird ca. 10 µl Blut als Messprobe eingefüllt. Über die Dosierkapillare 105 wird 1 µl automatisch dosiert.
- b) Das überschüssige Blut wird in den Leerraum 106 (Waste 1) gewaschen.
- c) Anschließend werden 1 µl Blutprobe mit Wasser verdünnt
25 und in den Zellaufschlusskanal 110 transferiert. Dort finden der Zellaufschluss (Lyse) der Blutzellen sowie das Binden der freigesetzten DNA an die Magnet-Beads statt.
- d) Anschließend werden die Magnet-Beads in die PCR-Kammer
30 transferiert und dort gesammelt. Es findet ein Waschvorgang statt, wobei die Waschlösung im Leerraum 107 (Waste 2) gesammelt wird.
- e) Nunmehr ist der Waschvorgang abgeschlossen.
- f) Anschließend werden die PCR-Kammerventile 122, 122' geschlossen und die PCR durchgeführt.
35
- g) Während der PCR wird gleichermaßen der ELISA-Reagenzkanal 131, der das Enzymsubstrat enthält, mit Wasser gefüllt.

- h) Gleichermaßen wird während der PCR der ELISA-Reagenzkanal 131', der das Label-Enzym enthält, mit Wasser gefüllt.
- 5 i) Nach der PCR werden die PCR-Kammerventile 122, 122' geöffnet und das PCR-Produkt wird über das Detektionsmodul 130 (in den Waste 3, Kanal 108) geleitet, wo die Hybridisierung mit den spezifischen Fängersonden erfolgt.
- 10 j) Der Enzym-Substrat-Kanal wird in den Abfallkanal 108 (Waste 3) entlüftet.
- k) Der Label-Enzym-Kanal wird in den Abfallkanal 108 (Waste 3) entlüftet.
- l) Die Label-Enzym-Lösung fließt über das Detektionsmodul 130 zum Labeln in den Abfallbereich 109 (Waste 4).
- 15 m) Die Enzym-Substrat-Lösung fließt über das Detektionsmodul 130 zur enzymatisch-elektrochemischen Detektion der Hybridisierung in den Abfallbereich 109 (Waste 4).

20 Damit ist das Analyseverfahren abgeschlossen. Insbesondere bei einer elektrochemischen Detektion können die anfallenden Signale elektrisch ausgelesen und prozessorgestützt gemäß vorgegebenem Programm ausgewertet werden.

25 Die anhand der Figur 1 im Einzelnen mit Kanälen und Kavitäten beschriebene Cartridge wird aus einem Polymermaterial, wie z.B. Polycarbonat, beispielsweise in Spritzgusstechnik, hergestellt. Dabei wird zunächst der Karten-Grundkörper 101 mit nach oben offenen Strukturen hergestellt und es werden die Reagenzien in die zunächst offenen Kanäle bzw. Kavitäten gespottet und anschließend getrocknet. Das Detektionsmodul wird 30 in geeigneter Weise in die Cartridge eingebracht, insbesondere eingeklebt. Zum Abschluss werden die Kanäle und die Kavitäten z.B. mit einer elastischen Folie als obere Abdeckung versehen und ist damit für den bestimmungsgemäßen Gebrauch 35 abgeschlossen.

Es ist auch möglich, dass auf den offenen Kartengrundkörper 101 vor dem abdeckseitigen Abschluss und Fertigstellung der

Cartridge bestimme Sondereinrichtungen, beispielsweise als Dichtungsmaterialien und/oder Entlüftungsmaterialien, aufgebracht werden.

5 Das konkrete Messverfahren wurde anhand der Figuren 11 bis 23 für einen spezifischen Fall der DNA-Analyse einer Probe aus Vollblut erläutert. Allgemein ist vorgesehen, die beschriebene Cartridge für die DNA-Analyse einerseits und/oder die Proteinanalyse andererseits einzusetzen, wobei - wie vorstehend
10 bereits erwähnt - ein entsprechendes Auslesegerät und zugehörige Auswertelgorithmen zu Hilfe genommen werden. Damit ergeben sich definierte Betriebsverfahren, welche die anhand der Beispiele beschriebene Cartridge erst praxistauglich zum dezentralen Einsatz im Rahmen einer medizinischen "Point of
15 Care"-Anwendung machen.

Abschließend wird speziell für die DNA-Analyse nochmals das integrierte Betriebsverfahren der oben im Einzelnen beschriebenen Cartridge als Kombination bzw. in der Abfolge
20 der einzelnen Teilschritte zusammengefasst:

- Aufgeben der Probe in Cartridge
- Einschieben der Cartridge in Auslesegerät
- Starten des vollautomatischen Assays
- 25 - Proben-Dosierung über Dosierstrecke
- Waschen der Dosierstrecke
- Verdünnen der Probe und Einbringen in Lyse-Kanal
- Verweilen im Lyse-Kanal
- Sammeln des DNA-Bead-Komplexes durch Beadsammler in
30 der PCR-Kammer
- Waschen des DNA-Bead-Komplexes mit Wasser
- Verschließen der PCR-Kammer
- Durchführung der PCR
- Während der PCR: Füllen der beiden ELISA-Reagenzkanäle
35 mit Wasser
- Öffnen der PCR-Kammer
- Transport des PCR-Produkts in Detektionskammer
- Hybridisierung in der Detektionskammer

- Entlüften der beiden ELISA-Reagenzkanäle
- Füllen und Spülen der Detektionskammer mit ELISA Reagenz 1
- 5 - Füllen und Spülen der Detektionskammer mit ELISA-Reagenz 2
- Durchführung der elektrochemischen Messungen.

Bei den elektrochemischen Messungen erfolgt zunächst das Durchspülen der Detektionskammer mit einer ein Enzymlabel tragenden Antikörperlösung (ELISA-Reagenz 1). Dann erfolgt
10 das Durchspülen der Detektionskammer mit Enzymsubstrat (ELISA-Reagenz 2). Die elektrochemischen Messungen werden in an sich bekannter Weise bei vorgebbaren, unterschiedlichen Temperaturen und änderbarer Fließgeschwindigkeiten der Enzym-
15 substrat-Lösung durchgeführt.

Für die Protein-Analyse werden entsprechende Vorgehensweisen angewandt, wobei in diesem Fall die PCR nicht zum Tragen kommt.

Patentansprüche

1. Anordnung zur integrierten und automatisierten DNA- oder Protein-Analyse einer Messprobe in einer mit Trockenreagenzien befüllten einmal verwendbaren Cartridge (Karte), mit folgenden Merkmalen zur automatischen Durchführung aller für die Prozessanalytik aus einzelnen Teilprozessen in der Cartridge notwendigen Maßnahmen:
- 5 - in der Cartridge (100) ist ein System von Mikrokanälen und/oder Mikrokavitäten (101 bis 131) für eine mikrofluidische Prozesstechnik vorhanden,
 - 10 - die Mikrokanäle bzw. die Mikrokavitäten (101 bis 131) weisen vorgegebene geometrische Strukturen auf, um Reagenzien aufzunehmen, wobei
 - 15 - die Reagenzien an bestimmten Stellen in den Mikrokanälen bzw. die Mikrokavitäten (101 bis 131) der Cartridge (100) in einer lagerstabilen Form bevorratet sind,
 - es sind Mittel vorhanden, um die trockengelagerten Reagenzien für den jeweiligen Teilprozess in geeigneter Form, 20 insbesondere als flüssiges Reagenz, bereit zu stellen.
2. Anordnung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Strukturen zur Aufnahme der trockenen, lagerstabilen Reagenzien die Reagenzien Vertiefungen (112, 132) aufweisen.
- 25 3. Anordnung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Vertiefungen mindestens eine Stufe mit Stufenhöhen von 10 bis 500 μm aufweisen.
- 30 4. Anordnung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Vertiefungen eine Ausdehnung von ca. 1 mm und eine Tiefe von etwa 100 μm haben.
- 35 5. Anordnung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Vertiefungen Zylindrisch sind, wobei die Ausdehnung den

Durchmesser darstellt.

6. Anordnung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die in den Mikrokanälen bzw. in den Mikro-
5 kavitäten (101 bis 131) eingebrachte Reagenzien folgende Eigenschaften aufweisen:

- Es sind trockenbare Substanzen mit vernachlässigbarem Dampfdruck, die bei Raumtemperatur stabil sind, so dass die Eigenschaften für einen Zellaufschluss bzw. eine PCR bzw.
10 zur Detektion biochemischer Größen erhalten bleiben.

7. Anordnung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Gemische aus der jeweiligen Substanz mit Hilfsstoffen dünne Filme bilden, die an den Wandungen haften.
15

8. Anordnung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet dass in Teile der Mikrokanäle bzw. Mikro-
20 kavitäten (101 bis 131) eingebrachten Substanzen bzw. Gemische mit dünnen Paraffin-schichten wasserdicht abgedeckt sind.

9. Anordnung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die in Teile der Mikrokanäle bzw. Mikro-
25 kavitäten (101 bis 131) eingebrachten Substanzen DNA- oder Protein-bindende Eigenschaften aufweisen.

10. Anordnung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, da-
30 durch gekennzeichnet, dass die in Teile der Mikrokanäle bzw. Mikro-
kavitäten (101 bis 131) eingebrachten Substanzen Magnet-Beads mit spezifischen Bindungseigenschaften sind.

11. Anordnung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Magnet-Beads mit Antikörpern beschichtet sind.

12. Anordnung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Magnet-Beads mit DNA-bindende Substanzen beschichtet
35 sind.

13. Anordnung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei

gleichermaßen Lyse-Reagenzien und Magnet-Beads vorhanden sind, dadurch gekennzeichnet, dass die Lyse-Reagenzien und die Magnet-Beads in einer einzigen Trockenmatrix enthalten sind.

5

14. Anordnung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass ein so genannter DNA-ELISA-Assay oder Protein-ELISA-Assay (130, 131) durchführbar ist, wobei als Reagenzien für das ELISA-Assay (130, 131) ein Label-Enzym (Reagenz 1) und ein Enzymsubstrat (Reagenz 2) vorhanden sind.

10

15. Anordnung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass ein Detektionsmodul (130) zur elektrischen Detektion der Hybridisierungsvorgänge vorhanden ist.

15

16. Anordnung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass das Detektionsmodul (130) aus einem Edelmetall/Plastik-Verbund besteht.

20

17. Anordnung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass das Detektionsmodul aus einem halbleiterprozessierten Siliziumchip mit Edelmetallelektroden besteht.

25

18. Anordnung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass als Mittel für die elektrische Detektion elektrochemische, magnetische und/oder piezoelektrische Messmethoden eingesetzt werden.

30

19. Anordnung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Cartridge (100) einen Eingabeport (102) für eine Vollblutprobe hat.

20. Anordnung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Mittel (103 bis 103''') zur Zu

35

fuhr von Wasser, insbes. ein Zuflussport, vorhanden ist.

21. Anordnung nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass ein Zuflussport zum Anschluss an eine externe Wasserzufuhr
5 vorhanden ist.

22. Anordnung nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass der Zuflussport an ein integriertes Wasser-Reservoir ange-
schlossen ist.
10

23. Anordnung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, da-
durch gekennzeichnet, dass die Mikrokanäle bzw. Mikrokavitä-
ten (101 bis 131) mit trockenen Puffersubstanzen definierter
Ionenstärke nach Wasserzufuhr gefüllt sind.
15

24. Anordnung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, da-
durch gekennzeichnet, dass Mittel zum Mischen von Vollblut-
proben und Wasser bzw. der Pufferlösung vorhanden sind.

20 25. Anordnung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, da-
durch gekennzeichnet, dass Mittel zum Durchströmen des mit
Lyse-Bead-Reagenz beschichteten Mikrokanals bzw. der Mikroka-
vität mit Blut oder mit Blut-Wasser- bzw. Blut-Puffer-Gemisch
vorhanden sind.
25

26. Anordnung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, da-
durch gekennzeichnet, dass Mittel zum Generieren eines Mag-
netfeldes zwecks Fixierung des DNA-/Magnet-Bead- oder Prote-
in-Magnet-Bead Komplexes vorhanden sind.
30

27. Anordnung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, da-
durch gekennzeichnet, dass Mittel zum Generieren eines Mag-
netfeldes zwecks Fixierung des DNA/Magnet-Bead-Komplexes in
einer PCR-Kavität vorhanden sind.
35

28. Anordnung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass
Mittel zum Verschließen der PCR-Kavität vorhanden

sind.

29. Anordnung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Mittel zur Thermozyklisierung der Probe vorhanden sind.

30. Anordnung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass in der Cartridge (Karte) Mittel zum Lagern von verbrauchtem Probenmaterial und/oder verbrauchten Reagenzien vorhanden sind.

31. Anordnung nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, dass die Mittel zum Lagern von verbrauchtem Probenmaterial und/oder verbrauchten Reagenzien Abfallreservoirs bilden.

32. Anordnung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Mittel zum keimdichten, partikel- bzw. zellfreien Entlüften der Abfall-Reservoirs vorhanden sind.

33. Anordnung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Mittel zur Fixierung der Cartridge in einem Auslesegerät vorhanden sind.

34. Verfahren zur Herstellung einer bei der Anordnung gemäß Anspruch 1 oder einem der Ansprüche 2 bis 33 verwendeten Cartridge, mit folgenden Verfahrensschritten:

- Ein Cartridge-Grundkörper mit Kanälen und/oder Kavitäten wird aus Polymer gefertigt,
- in die offenen Kanäle werden Reagenzien gespottet und dort getrocknet,
- die Kanäle und/oder Kavitäten werden durch eine Folie verschlossen.

35. Herstellungsverfahren nach Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, dass der Karten-Grundkörper durch Spritzgusstech-

nik hergestellt wird.

36. Herstellungsverfahren nach Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, dass Sondermaterialien, wie beispielsweise Dichtungsmembranen, Entlüftungsmembranen od. dgl., auf den Kartenkörper aufgebracht werden.

37. Herstellungsverfahren nach Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, dass vor dem Abdichten des Kartenkörpers ein Detektionsmodul mit Messmitteln eingebracht, insbesondere eingeklebt, wird.

38. Betriebsverfahren für eine DNA-Analyse in einer Anordnung gemäß Anspruch 1 oder einem der Ansprüche 2 bis 33, mit folgenden Maßnahmen:

- Aufgeben der Probe in die Cartridge,
- Einschieben der Cartridge in das Auslesegerät,
- Starten des vollautomatischen Assays.

39. Betriebsverfahren nach Anspruch 38, mit folgenden Schritten beim Betrieb des vollautomatischen Assays:

- Über eine Dosierstrecke erfolgt eine Probendosierung,
- die Dosierstrecke wird gewaschen,
- die Messprobe wird verdünnt und in den Lysekanal eingebracht,
- durch Verweilen im Lysekanal erfolgt ein Zellaufschluss,
- der gebildete DNA-Bead-Komplex wird durch einen Flüssigkeitsstrom in die PCR-Kammer gebracht und durch einen Bead-Sammler in die PCR-Kammer gehalten
- es erfolgt ein Waschen des DNA-Bead-Komplexes mit Wasser,
- die PCR-Kammer wird verschlossen,
- die PCR wird durchgeführt,
- nach Beendigung der PCR wird das PCR-Produkt in die Detektionskammer transportiert
- in der Detektionskammer finden Hybridisierungsvorgänge mit spezifischen Fängersonden statt,
- es erfolgt das Durchspülen der Detektionskammer mit Markierungsenzym

- es erfolgt das Durchspülen der Detektionskammer mit Enzymsubstrat
- es erfolgt die Durchführung der elektrochemischen Messungen
- die elektrochemischen Messungen werden bei verschiedenen
- 5 Temperaturen und verschiedenen Fließgeschwindigkeiten der Enzymsubstrat-Lösung durchgeführt.

40. Betriebsverfahren nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, dass während der PCR die ELISA-Reagenzkanäle mit Wasser
10 gefüllt werden.

41. Betriebsverfahren nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, dass nach der Hybridisierung die beiden ELISA-Kanäle entlüftet werden, dass anschließend die Detektionskammer zu-
15 nächst mit dem ersten ELISA-Reagenz gasblasenfrei gespült und anschließend mit dem zweiten ELISA-Reagenz gasblasenfrei gespült wird, und dass anschließend die elektrochemische Messung durchgeführt wird.

20 42. Betriebsverfahren für eine Protein-Analyse in einer Anordnung gemäß Anspruch 1 oder einem der Ansprüche 2 bis 33, mit folgenden Maßnahmen:

- Aufgeben der Probe in die Cartridge,
- Einschieben der Cartridge in das Auslesegerät,
- 25 - Starten des vollautomatischen Assays.

43. Betriebsverfahren nach Anspruch 42, mit folgenden Schritten beim Betrieb des vollautomatischen Assays:

- Über eine Dosierstrecke erfolgt eine Probendosierung,
- 30 - die Dosierstrecke wird gewaschen,
- die Messprobe wird verdünnt und durch einen Flüssigkeitsstrom in die Detektionskammer transportiert
- in der Detektionskammer finden Bindungsvorgänge zwischen den Proteinen der Messprobe und spezifischen Fängerantikörpern bzw. Fängerproteinen statt,
- 35 - es erfolgt das Durchspülen der Detektionskammer mit ei

- ner ein Enzymlabel tragenden Antikörperlösung (ELISA-Reagenz 1),
- - es erfolgt das Durchspülen der Detektionskammer mit Enzymsubstrat (ELISA-Reagenz 2)
- 5 - es erfolgt die Durchführung der elektrochemischen Messungen.

44. Betriebsverfahren nach Anspruch 43, dadurch gekennzeichnet, dass nach der Hybridisierung die beiden ELISA-Kanäle
10 entlüftet werden, dass anschließend die Detektionskammer zunächst mit dem ersten ELISA-Reagenz gasblasenfrei gespült und anschließend mit dem zweiten ELISA-Reagenz gasblasenfrei gespült wird, und dass anschließend die elektrochemische Messung durchgeführt wird.

15

FIG 1

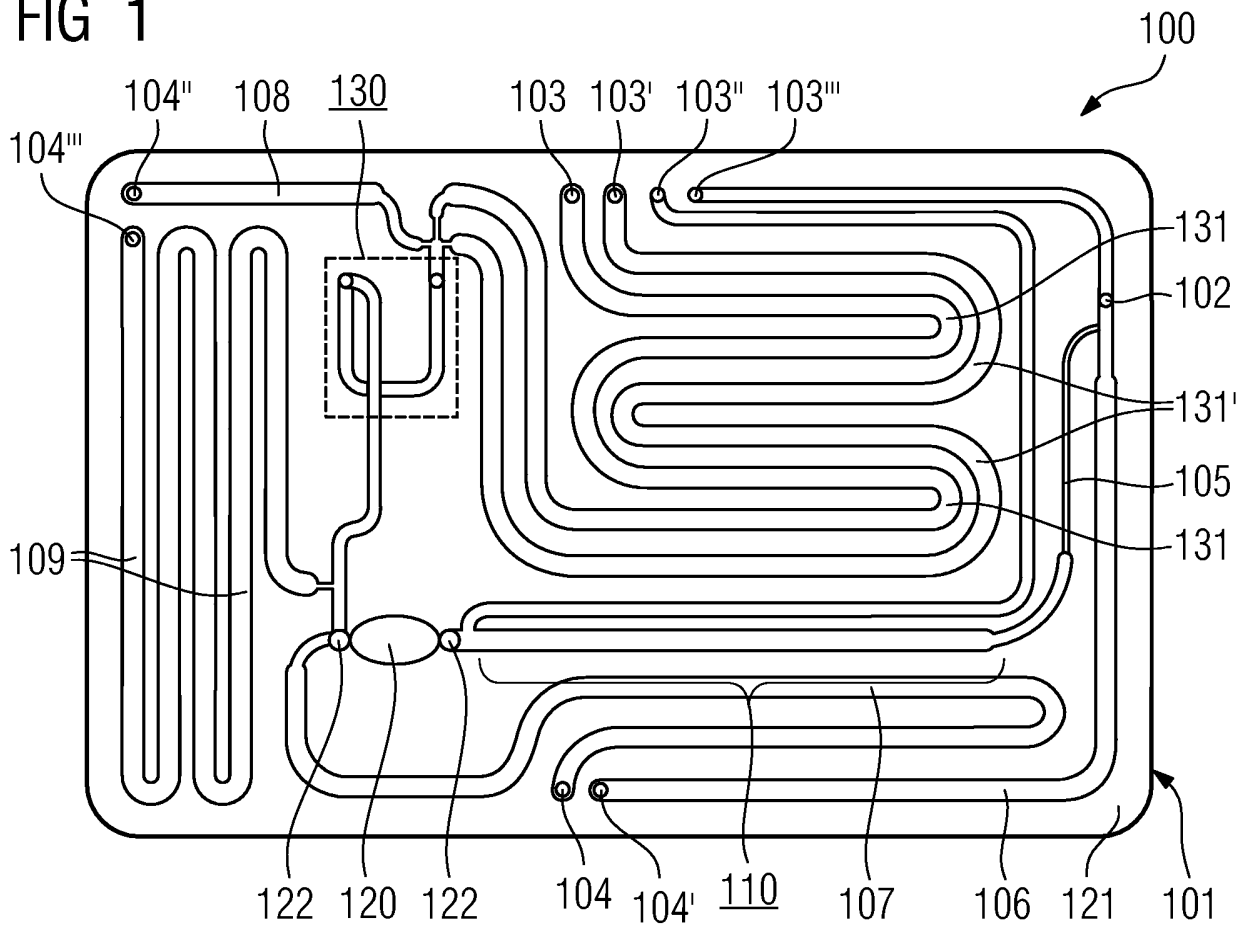


FIG 2

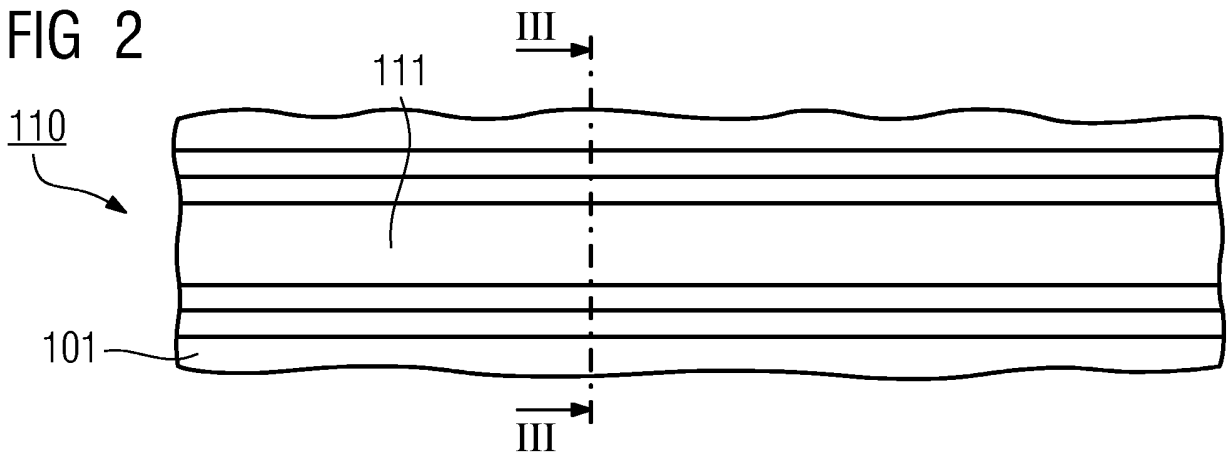


FIG 3

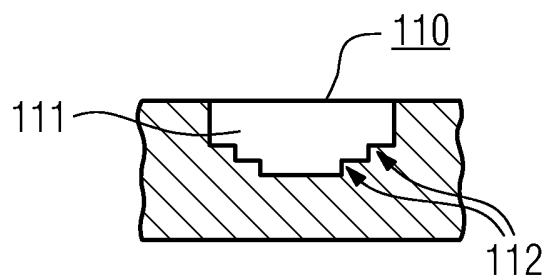


FIG 4A



FIG 4B

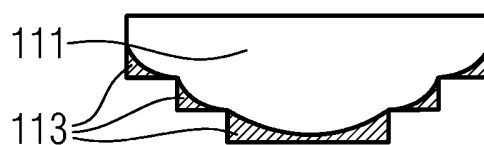


FIG 5

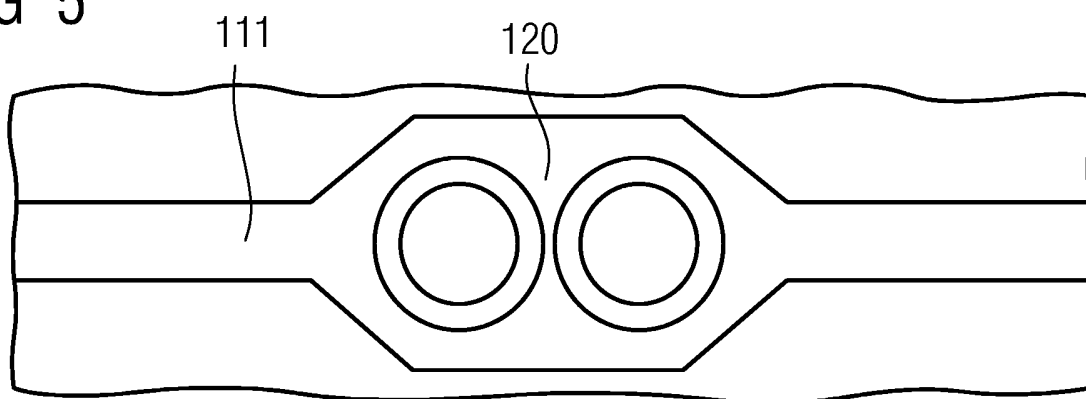


FIG 6

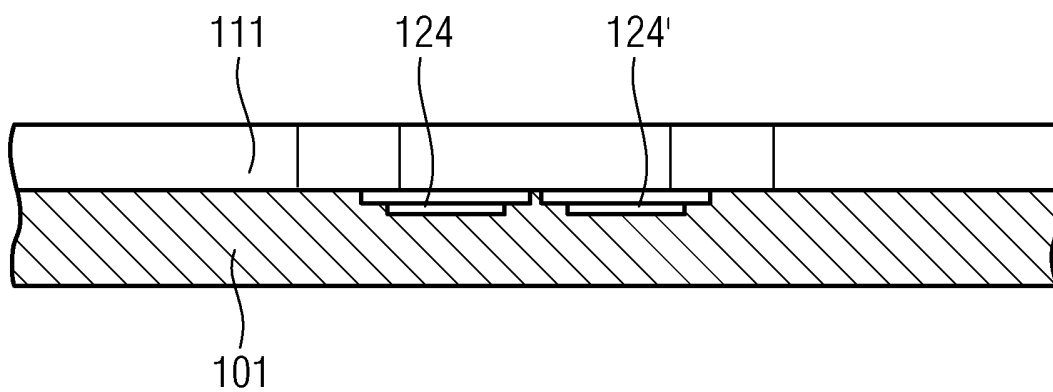


FIG 7

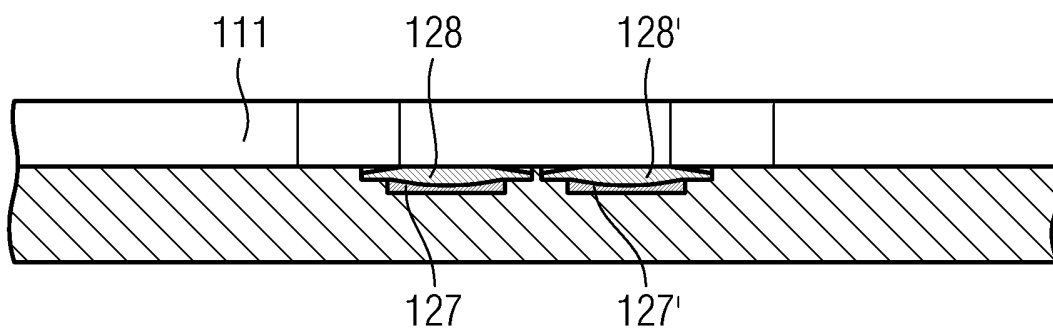


FIG 8

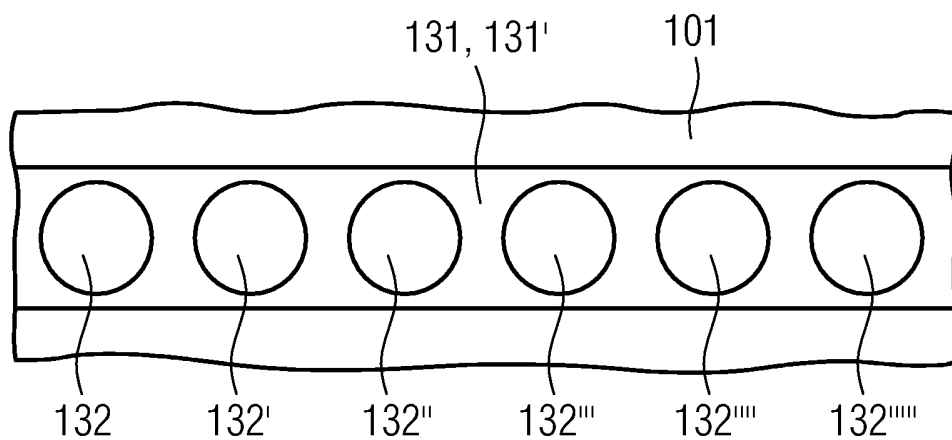


FIG 9

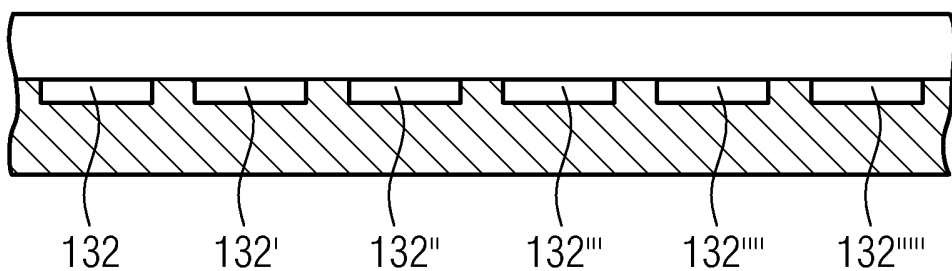
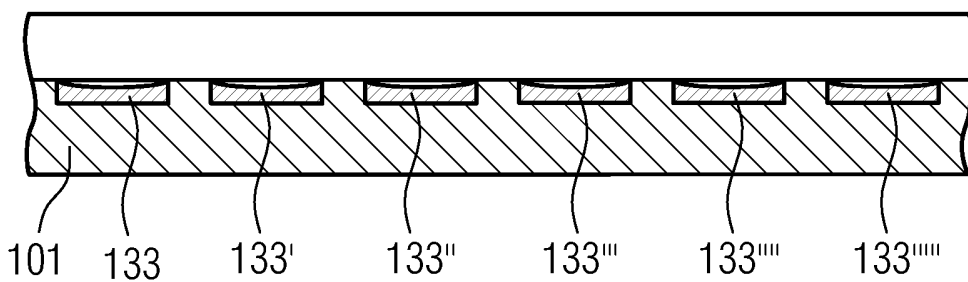


FIG 10



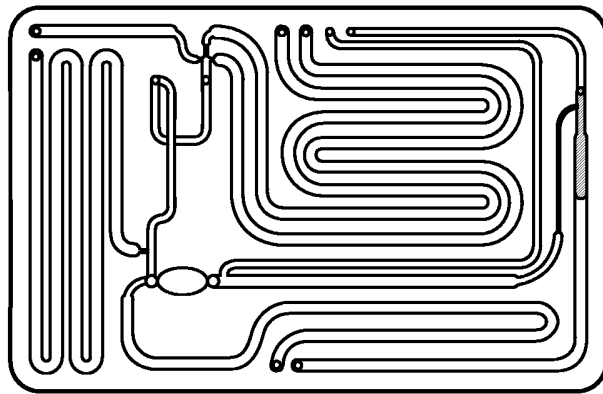


FIG 11

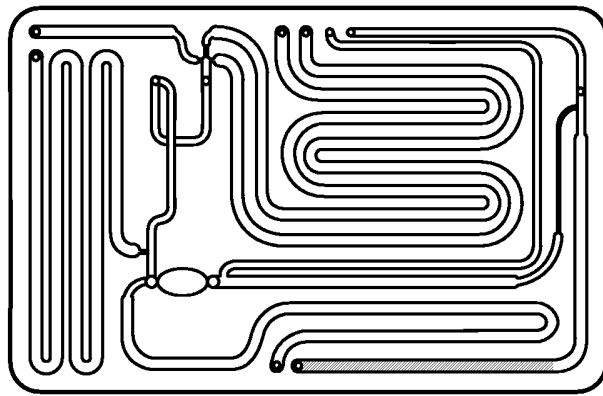


FIG 12

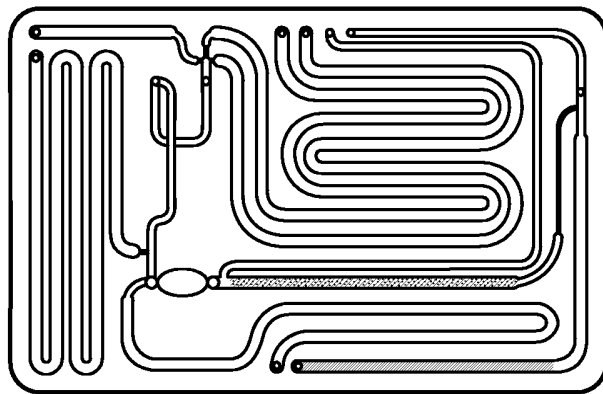


FIG 13

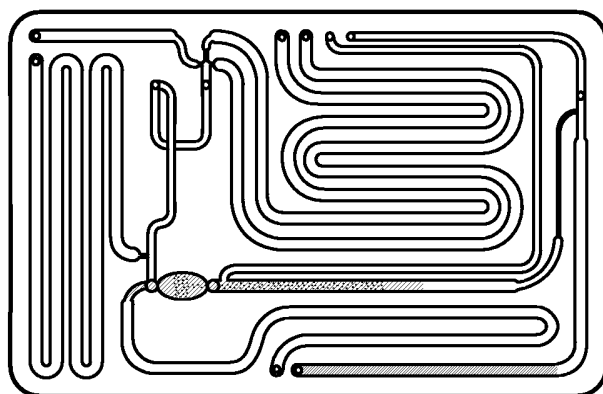


FIG 14

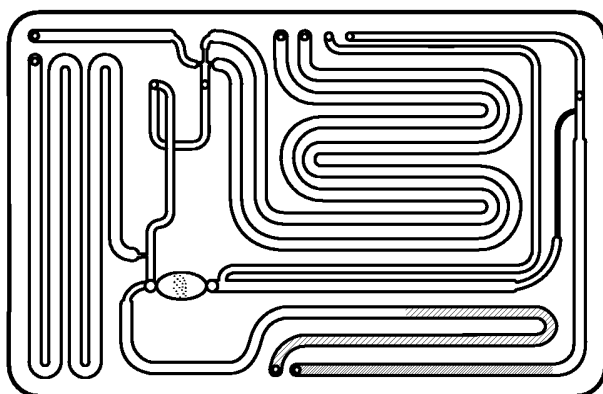


FIG 15

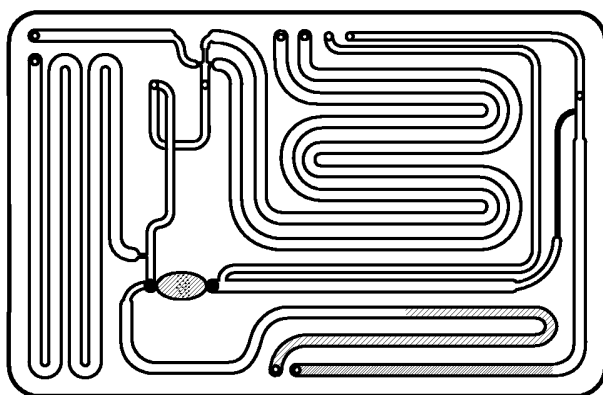


FIG 16

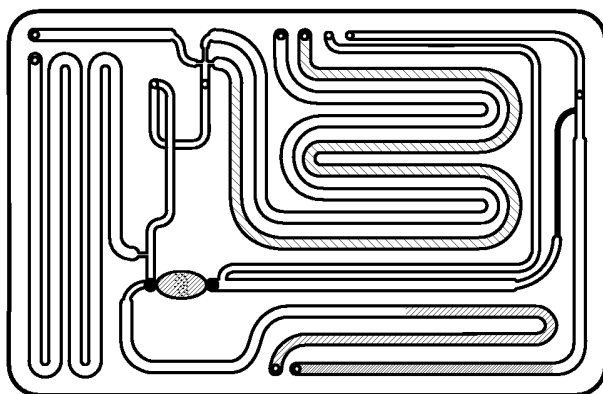


FIG 17

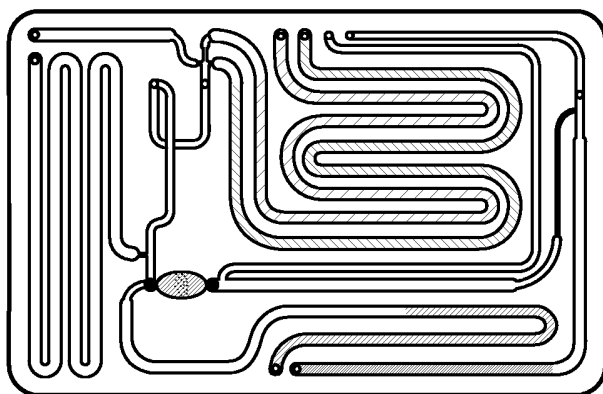


FIG 18

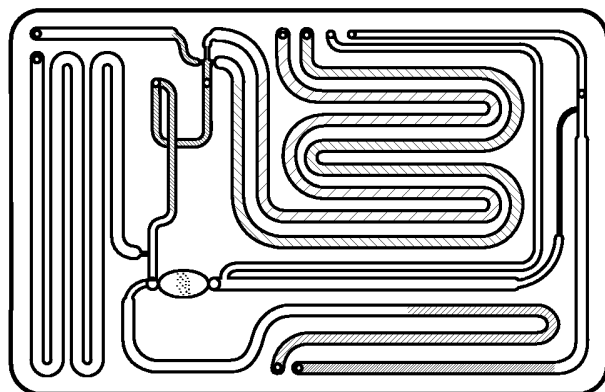


FIG 19

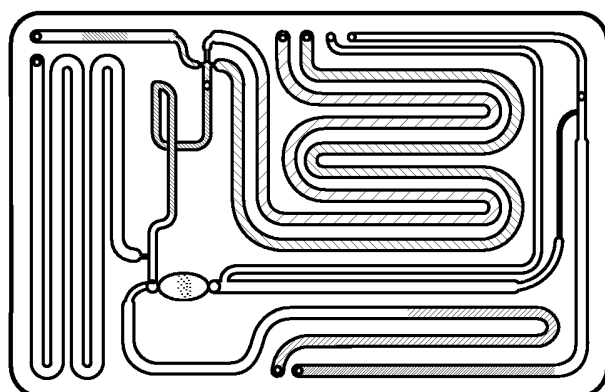


FIG 20

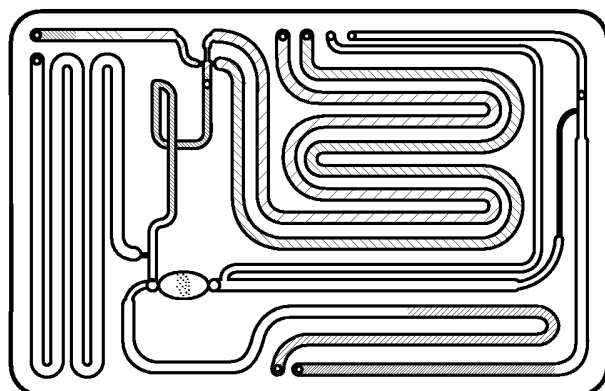


FIG 21

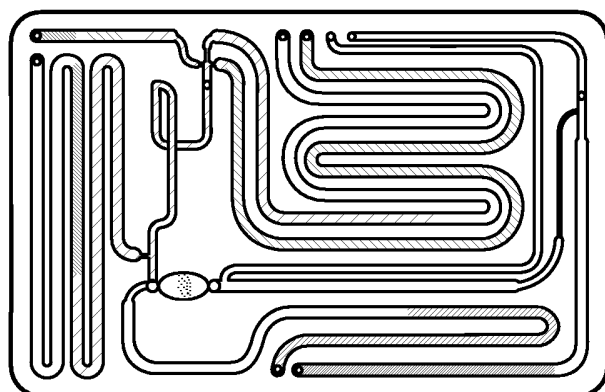


FIG 22

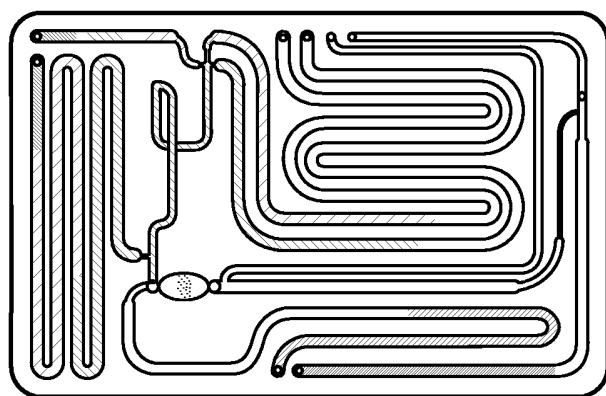


FIG 23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/055303

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER B01L3/00	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
B. FIELDS SEARCHED	
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) B01L G01N	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, PAJ, WPI Data	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages
	Relevant to claim No.
A	WO 02/072262 A (SIEMENS AKTIENGESELLSCHAFT; GUMBRECHT, WALTER; STANZEL, MANFRED) 19 September 2002 (2002-09-19) cited in the application the whole document
A	EP 1 203 959 A (ASAHI KASEI KABUSHIKI KAISHA) 8 May 2002 (2002-05-08) paragraphs '0076! - '0107!; figures 1,2
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.	<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
° Special categories of cited documents :	
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 19 December 2005	Date of mailing of the international search report 12/01/2006
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Tragoustis, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No PCT/EP2005/055303

Patent document cited in search report	A	Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 02072262	A	19-09-2002		CA 2439924 A1	19-09-2002
				DE 10111457 A1	19-09-2002
				EP 1381466 A1	21-01-2004
				JP 2004532395 T	21-10-2004
				US 2004115094 A1	17-06-2004
EP 1203959	A	08-05-2002		AU 6321700 A	13-03-2001
				CN 1370278 A	18-09-2002
				WO 0113127 A1	22-02-2001
				TW 517154 B	11-01-2003

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2005/055303

<p>A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES B01L3/00</p> <p>Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK</p>											
<p>B. RECHERCHIERTE GEBIETE</p> <p>Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) B01L GO1N</p> <p>Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen</p> <p>Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, PAJ, WPI Data</p>											
<p>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Kategorie°</th> <th>Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile</th> <th>Betr. Anspruch Nr.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>WO 02/072262 A (SIEMENS AKTIENGESELLSCHAFT; GUMBRECHT, WALTER; STANZEL, MANFRED) 19. September 2002 (2002-09-19) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</td> <td>1,6, 30-33,38</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>EP 1 203 959 A (ASAHI KASEI KABUSHIKI KAISHA) 8. Mai 2002 (2002-05-08) Absätze '0076! - '0107!; Abbildungen 1,2</td> <td>1,34,38</td> </tr> </tbody> </table>			Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.	A	WO 02/072262 A (SIEMENS AKTIENGESELLSCHAFT; GUMBRECHT, WALTER; STANZEL, MANFRED) 19. September 2002 (2002-09-19) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1,6, 30-33,38	A	EP 1 203 959 A (ASAHI KASEI KABUSHIKI KAISHA) 8. Mai 2002 (2002-05-08) Absätze '0076! - '0107!; Abbildungen 1,2	1,34,38
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.									
A	WO 02/072262 A (SIEMENS AKTIENGESELLSCHAFT; GUMBRECHT, WALTER; STANZEL, MANFRED) 19. September 2002 (2002-09-19) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1,6, 30-33,38									
A	EP 1 203 959 A (ASAHI KASEI KABUSHIKI KAISHA) 8. Mai 2002 (2002-05-08) Absätze '0076! - '0107!; Abbildungen 1,2	1,34,38									
<p><input type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie</p>											
<p>° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>*A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>*E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>*L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>*O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>*P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>*T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>*X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>*Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>*Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>											
<p>Datum des Abschlusses der internationalen Recherche</p> <p>19. Dezember 2005</p>		<p>Absenddatum des internationalen Recherchenberichts</p> <p>12/01/2006</p>									
<p>Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde</p> <p>Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016</p>		<p>Bevollmächtigter Bediensteter</p> <p>Tragoustis, M</p>									

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/055303

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 02072262	A 19-09-2002	CA 2439924 A1	19-09-2002
		DE 10111457 A1	19-09-2002
		EP 1381466 A1	21-01-2004
		JP 2004532395 T	21-10-2004
		US 2004115094 A1	17-06-2004
EP 1203959	A 08-05-2002	AU 6321700 A	13-03-2001
		CN 1370278 A	18-09-2002
		WO 0113127 A1	22-02-2001
		TW 517154 B	11-01-2003