

(19)



LE GOUVERNEMENT
DU GRAND-DUCHÉ DE LUXEMBOURG
Ministère de l'Économie

(11)

N° de publication :

LU504853

(12)

BREVET D'INVENTION

B1

(21)

N° de dépôt: LU504853

(51)

Int. Cl.:

G01N 21/07, B01L 7/00, B01L 3/00

(22)

Date de dépôt: 03/08/2023

(30)

Priorité:

(43)

Date de mise à disposition du public: 03/02/2025

(47)

Date de délivrance: 03/02/2025

(73)

Titulaire(s):

DERMAGNOSTIX GMBH – 79110 Freiburg (Allemagne)

(72)

Inventeur(s):

SCHWEMMER Frank – Allemagne, PIONES Ludgere –
Allemagne, GROß-CZILWIK Gregor – Allemagne, VIRKS
Niklas – Allemagne

(74)

Mandataire(s):

AAP PATENTANWALTSKANZLEI GRABOVAC –
81243 München (Allemagne)

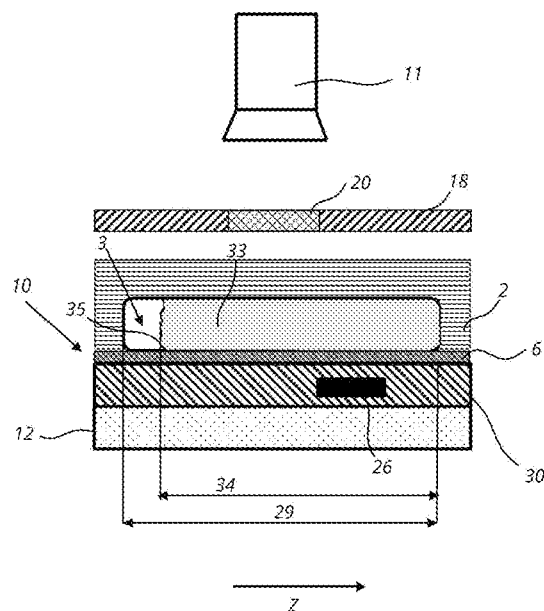
(54)

Probenträger zum Verwenden in einem rotationsbasierten Verfahren zur Vervielfältigung von DNA und/oder Bestimmung von Nukleinsäuren.

(57)

Die Erfindung betrifft einen Probenträger (1) zum Verwenden in einem rotationsbasierten Verfahren zur Vervielfältigung von DNA und/oder Bestimmung von Nukleinsäuren, mit einem Grundkörper (2) und wenigstens einer in dem Grundkörper (3) ausgebildeten Amplifikationskammer (3). Der Probenträger ist dadurch gekennzeichnet, dass die wenigstens eine Amplifikationskammer (3) eine Dicke (d) von kleiner als 1mm, insbesondere in einem Bereich zwischen 10 μ m und 0,9mm, vorzugsweise zwischen 10m und 0,5mm, aufweist.

Fig. 7



Probenträger zum Verwenden in einem rotationsbasierten Verfahren zur Vervielfältigung von DNA und/oder Bestimmung von Nukleinsäuren

Die Erfindung betrifft einen Probenträger zum Verwenden in einem rotationsbasierten Verfahren zur Vervielfältigung von DNA und/oder Bestimmung von Nukleinsäuren. Darüber hinaus betrifft die Erfindung ein System mit einem solchen Probenträger und ein Verfahren zum Betreiben einer Rotationsvorrichtung. Außerdem betrifft die Erfindung die Verwendung eines solchen Probenträgers zur Vervielfältigung von DNA und/oder Bestimmung von Nukleinsäuren.

Rotationsbasierte Verfahren werden beispielsweise im medizinischen Bereich angewendet. Meist kommen sie zum Einsatz, um Nukleinsäuren, wie beispielsweise DNA (Desoxyribonukleinsäure) oder RNA (Ribonukleinsäure) zu bestimmen. Darüber hinaus werden die Verfahren zum Vervielfältigen von DNA eingesetzt.

Zum Vervielfältigen von DNA wird üblicherweise die sogenannte Polymerase-Kettenreaktion (PCR) angewendet. Die PCR ist die Standardmethode zur spezifischen Vervielfältigung von DNA und ist für viele moderne biologische und biomedizinische in-vitro Prozesse unerlässlich. Besonders die Echtzeit-PCR, bei der die fortschreitende Vervielfältigung der Ziel-DNA kontinuierlich durch fluoreszierende Sonden ausgelesen wird, ist weit verbreitet, und kann zum Beispiel genutzt werden für die spezifische Identifikation von infektiösen Pathogenen aus Patientenproben. Die Miniaturisierung der PCR-Methode durch mikrofluidische Techniken bietet im Vergleich zu konventioneller, makroskopischer PCR einige Vorteile im Hinblick auf Kosten, Schnelligkeit, Transportfähigkeit und möglicher Komplettintegration und Automatisierung mehrerer aufeinanderfolgender Prozesse.

Essenziell für die PCR-Methode ist das thermische Zyklieren, bei dem zyklisch die Flüssigkeitstemperatur in der Amplifikationskammer mit den relevanten biologischen Komponenten an die für die biologischen Prozesse nötigen Temperaturen angepasst wird. Die Geschwindigkeit, mit der diese Temperaturveränderung durchgeführt werden kann, hat einen direkten Einfluss auf die Gesamteffektivität der PCR und auf die Dauer des Gesamtzyklus, wobei schnellere PCRs immer wichtiger werden, zum Beispiel für die Point-of-Care Diagnostik.

Darum gibt es eine Vielzahl von Techniken, die spezifisch darauf ausgerichtet sind die Temperaturveränderung zu beschleunigen. Beispiele hier sind unter anderem die shunting-microfluidic PCR, bei der die Flüssigkeit zwischen verschiedenen Heizzonen hin und her bewegt wird,

die continuous-flow PCR Technik, bei der die Flüssigkeit durch verschiedene Temperaturzonen fließt und Methoden die nicht auf Kontaktheizung basieren, wie, z.B. das Erhitzen durch Laser oder Mikrowellenstrahlung. Am weitesten verbreitet und für den kommerziellen Einsatz dominierend, ist immer noch die Temperaturregelung durch Kontaktheizung/-kühlung. Für die Schnelligkeit der Temperaturveränderung hierbei entscheidend ist das Volumen der Flüssigkeit, welches direkt proportional zur Dicke der Kammer ist, im Verhältnis zu dessen Auflagefläche mit der Kontaktheizung. Dabei kann für dünnere Kammern die Temperatur der PCR-Flüssigkeit schneller zwischen den relevanten Temperaturen angepasst werden als für Kammern mit einer größeren Dicke. Dies macht es erstrebenswert, PCR in sehr dünnen Kammern auszuführen.

10

Je kleiner die Größenskalen werden, desto größer sind jedoch die relativen Effekte von Oberflächenspannung und Benetzung. Mit abnehmender Kammergröße wird es deshalb zunehmend schwieriger Luftblasen aus einem Auslesebereich der Amplifikationskammer zu entfernen. Luftblasen können auf verschiedene Weisen entstehen, beispielsweise durch das wiederholte, zyklische Aufheizen auf Temperaturen nahe dem Siedepunkt von Wasser, kann es zur Entgasung von im Reaktionsvolumen gelösten Gasen kommen oder das Auflösen von Lyophilisaten kann Blasen erzeugen oder begünstigen. Blasen sind aber ein bekannter störender Faktor für die optische Auslese der Vervielfältigung von DNA und/oder der Detektion im Mikroliterbereich. Darüber hinaus lassen sich flache Amplifikationskammern nur schwer blasenfrei befüllen. Dazu müssen spezielle Geometrien eingesetzt werden, die den Herstellungsvorgang des Probenträgers verkomplizieren. Die bei sehr dünnen Kammern mit kleinem Flüssigkeitsvolumen entstehende Blasenbildung kann einen erheblichen Einfluss auf die korrekte Signaldetektion haben, insbesondere wenn sich Blasen im direkten Auslesepfad der optischen Auslesevorrichtung befinden.

25

Die Aufgabe der Erfindung besteht daher darin, einen Probenträger bereitzustellen, mittels der die Zeitdauer des PCR-Vorgangs reduziert wird.

30

Die Aufgabe wird gelöst durch einen Probenträger zum Verwenden in einem rotationsbasierten Verfahren zur Vervielfältigung von DNA und/oder Bestimmung von Nukleinsäuren, mit einem Grundkörper und wenigstens einer in dem Grundkörper ausgebildeten Amplifikationskammer, dadurch gekennzeichnet, dass die wenigstens eine Amplifikationskammer eine Dicke von kleiner als 1 mm (Millimeter), insbesondere in einem Bereich zwischen 10µm (Mikrometer) und 0,9 mm, vorzugsweise zwischen 10µm und 0,5mm, aufweist.

Darüber hinaus besteht eine Aufgabe der Erfindung darin, ein Verfahren bereitzustellen, mittels dem die Zeitdauer des PCR-Vorgangs reduziert wird.

Die Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zum Betreiben einer Rotationsvorrichtung mit einem
5 Trägerhalter, der wenigstens einen erfindungsgemäßen Probenträger trägt, wobei die Rotationsvorrichtung in einem Auslesebetrieb oder einem Entlüftungsbetrieb betrieben wird, wobei die Drehzahl der Rotationsvorrichtung im Auslesebetrieb geringer ist als im Entlüftungsbetrieb.

Der erfindungsgemäße Probenträger weist den Vorteil auf, dass die Effektivität des PCR-Gesamtzyklus
10 erhöht wird, weil die Zeitdauer des PCR-Gesamtzyklus reduziert wird. Dies ist möglich, weil aufgrund der gewählten Dicke der Amplifikationskammer die Temperaturveränderung der in der Amplifikationskammer befindlichen Flüssigkeit schnell erfolgt. Mit anderen Worten, die in der Amplifikationskammer befindliche Flüssigkeit kann sehr schnell auf die Zieltemperatur aufgeheizt oder abgekühlt werden. Dies ergibt sich, weil dünne Amplifikationskammern in kleinen absoluten
15 räumlichen Temperaturunterschieden und/oder kleinen Temperaturgradienten innerhalb der Flüssigkeit resultieren. Die resultierende gleichmäßigere Temperaturverteilung erlaubt homogene Reaktionsbedingungen in der Amplifikationskammer, was für die Verkürzung der Zeitdauer des PCR-Gesamtzyklus förderlich ist.

Der erfindungsgemäße Probenträger ermöglicht somit, dass die Zeitdauer des oben beschriebenen
20 PCR-Vorgangs reduziert wird. Gleichzeitig kann bei Drehen des Probenträgers durch die Rotationsvorrichtung die Amplifikationskammer durch die optische Auslesevorrichtung gut ausgelesen werden, ohne dass Gasblasen, insbesondere Luftblasen, den Auslesevorgang beeinträchtigen. Dies wird nachfolgend näher erläutert.

Im Sinne der Erfindung wird als „Dicke“ die Erstreckung der Amplifikationskammer in einer Richtung
25 verstanden, die parallel zur Rotationsachse ist und/oder normal zum Grundkörper steht. Die „Dicke“ kann einer „mittleren Dicke“ der Amplifikationskammer entsprechen.

Die mittlere Dicke ist dabei der Quotient zwischen, insbesondere beheiztem, Flüssigkeitsvolumen
30 innerhalb der Amplifikationskammer geteilt durch die beheizte Grundfläche oder die beheizten Grundflächen der Amplifikationskammer. Die wenigstens eine beheizte Grundfläche entspricht der Grundfläche der Amplifikationskammer, welche im PCR Betrieb mit Flüssigkeit benetzt ist. Durch die beheizte Grundfläche kann, insbesondere der wesentliche Anteil, der Wärme in die

Amplifikationskammer eingetragen oder aus der Amplifikationskammer ausgetragen werden. Die beheizte Grundfläche der Amplifikationskammer kann wenigstens einem Teil einer Bodenfläche der Amplifikationskammer entsprechen.

- 5 Als „Auslesebetrieb“ wird ein Betrieb der Rotationsvorrichtung verstanden, bei dem ein Auslesen der wenigstens einen Amplifikationskammer erfolgt. Als „Auslesen“ wird ein Vorgang verstanden, bei dem unter Verwendung der optischen Auslesevorrichtung erfasst wird, ob Nukleinsäuren in der Amplifikationskammer vorhanden ist. Eine Datenverarbeitungsvorrichtung der Rotationsvorrichtung kann auf Basis der ausgelesenen Daten bestimmen, ob Nukleinsäure in der Amplifikationskammer vorhanden ist. Alternativ oder zusätzlich kann die Datenverarbeitungsvorrichtung auf Basis der im Rahmen des Auslesevorgangs ermittelten Daten die Vervielfältigung der in der Amplifikationskammer befindlichen DNA bestimmen.
- 10

- Die elektrische oder elektronische Datenverarbeitungsvorrichtung kann wenigstens einen Prozessor aufweisen oder ein Prozessor sein. Die Datenverarbeitungsvorrichtung kann Bestandteil einer Leiterplatte sein. Darüber hinaus kann die Datenverarbeitungsvorrichtung in einem Innenraum der Rotationsvorrichtung angeordnet sein oder außerhalb von dem Innenraum der Rotationsvorrichtung angeordnet sein.
- 15

- Im Entlüftungsbetrieb wird der Probenträger mit wenigstens einer vorgegebenen Drehzahl gedreht. Dabei erfolgt im Entlüftungsbetrieb kein Auslesen der Amplifikationskammer durch die Auslesevorrichtung. Die Drehzahl im Entlüftungsbetrieb ist größer als im Auslesebetrieb. Alternativ kann die Drehzahl im Entlüftungsbetrieb gleich der Drehzahl im Auslesebetrieb sein. Dabei ist dem Entlüftungsbetrieb die Drehzahl des Trägerhalters so groß, dass Gasblasen aus der Amplifikationskammer verdrängt werden.
- 20
- 25

- Eine Rotationsvorrichtung kann in einem Rotationsbetrieb betrieben werden. Im Rotationsbetrieb wird der Probenträger mit wenigstens einer vorgegebenen Drehzahl gedreht. Dabei erfolgt im Rotationsbetrieb kein Auslesen der Amplifikationskammer durch die Auslesevorrichtung. Im Rotationsbetrieb erfolgt die Prozessierung der zugegebenen Probe, insbesondere biologischen Probe durch die in dem Probenträger befindlichen Reagenzien. Dabei kann die Drehzahl im Rotationsbetrieb größer sein als die Drehzahl im Auslesebetrieb. Dies ist notwendig, weil zum Prozessieren der Probe eine Mindestdrehzahl notwendig ist und die Geschwindigkeit des Detektors die maximale Drehzahl während der Auslese limitiert. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass im Rotationsbetrieb die
- 30

Drehzahl der Drehzahl im Auslesebetrieb entspricht oder kleiner als die Drehzahl im Auslesebetrieb ist.

5 Von besonderem Vorteil ist auch eine Rotationsvorrichtung mit wenigstens einem erfindungsgemäßen Proben­träger und einer Rotationsvorrichtung, die einen drehbaren Trägerhalter aufweist, der den Proben­träger hält. Die Rotationsvorrichtung weist den Vorteil auf, dass durch Drehen des Proben­trägers die störenden Gasblasen aus der Amplifikationskammer entfernt werden können. Dies ist möglich, weil durch die durch die Rotation auf die Luftblasen erzeugten Kräfte bewirken, dass die Gasblasen nicht mehr im optischen Pfad der Auslesevorrichtung angeordnet sind.

10

Genauer gesagt ermöglichen die Rotationskräfte eine konstante Entfernung von Gasblasen aus dem Ausleseabschnitt der Amplifikationskammer. Insbesondere wird die Verdrängung der Gasblasen realisiert durch eine höhere Drehzahl des Trägerhalters im Entlüftungsbetrieb als im Auslesebetrieb, durch welche die Flüssigkeit in der Amplifikationskammer radial nach außen gedrückt wird und damit 15 die leichteren Gasblasen radial nach innen verdrängt. Mit „radial innen“ oder „radial außen“ wird die Radialrichtung bezogen auf die Rotationsachse des Proben­trägers und/oder des Trägerhalters gemeint.

20 Der erfindungsgemäße Proben­träger ermöglicht eine zuverlässige real-time PCR für dünne Amplifikationskammern, insbesondere für Amplifikationskammern mit einer Dicke im Bereich 10µm und 0,5mm. Infolge der dünnen Ausbildung der Amplifikationskammer ist eine schnelle Anpassung der in der Amplifikationskammer befindlichen Flüssigkeit an eine Zieltemperatur möglich. Dies ermöglicht ein schnelles thermisches Zyklieren und somit schnelle, real-time PCR.

25 Die Bestimmung von Nukleinsäuren kann eine Detektion von Nukleinsäuren und/oder eine Quantifizierung von Nukleinsäuren umfassen. Dabei kann die Nukleinsäure in der gesamten Amplifikationskammer bestimmt werden, sofern die optische Auslesevorrichtung die gesamte Amplifikationskammer ausliest. Alternativ kann ein Ausleseabschnitt der Amplifikationskammer ausgelesen werden, wobei der Restabschnitt der Amplifikationskammer nicht ausgelesen wird.

30

Bei einer Ausführung kann eine Auslesevorrichtung zum Auslesen der Amplifikationskammer, vorhanden sein. Dabei kann der Teil der Amplifikationskammer ausgelesen werden, die mit Flüssigkeit gefüllt ist. Die Auslesevorrichtung kann zum Bestimmen von Nukleinsäuren, insbesondere von DNA und/oder RNA, geeignet sein. Die Auslesevorrichtung kann eingerichtet sein, die

- Amplifikationskammer optisch zu erfassen. So kann die Auslesevorrichtung ein Objektiv und wenigstens ein optisches Element, wie beispielsweise wenigstens einem Umlenkspiegel und/oder optische Filter, aufweisen. Dabei kann die Auslesevorrichtung ein Fluoreszenzdetektor sein. In diesem Fall ist die Auslesevorrichtung dazu konfiguriert, von der Amplifikationskammer ausgehende
- 5 Fluoreszenzsignale zu erfassen und/oder zu verarbeiten. Dazu können mittels der Auslesevorrichtung in der Amplifikationskammer befindliche fluoreszierende Sonden ausgelesen und daraus ein Rückschluss auf die Vervielfältigung der in der Amplifikationskammer befindlichen DNA getätigt werden.
- 10 Die wenigstens eine Amplifikationskammer des Probenträgers kann Abschnitte mit unterschiedlichen Dicken aufweisen. Dabei kann die wenigstens eine Amplifikationskammer zwei Abschnitte mit unterschiedlichen Dicken aufweist, wobei der tiefere der beiden Abschnitte auslesbar ist. Eine derartig ausgebildete Amplifikationskammer weist den Vorteil auf, dass ein gutes Auslesen sichergestellt ist. So kann die Auslesevorrichtung nicht die gesamte Amplifikationskammer auslesen, sondern nur einen
- 15 Ausleseabschnitt der Amplifikationskammer auslesen. Vorzugsweise wird, insbesondere nur, ein Ausleseabschnitt der Amplifikationskammer ausgelesen, wobei der Ausleseabschnitt tiefer ist als ein Restabschnitt der Amplifikationskammer. Eine tiefere Kammer erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass mehr Zielmaterial, wie DNA und/oder RNA, in dem Ausleseabschnitt der Amplifikationskammer angeordnet sind. Bei einer höheren Zielmaterialmenge im Ausleseabschnitt kann auch ein stärkeres
- 20 Signal durch die Auslesevorrichtung empfangen werden.

- Dabei kann mittels der Auslesevorrichtung das Zielmaterial, insbesondere die Nukleinsäure, direkt bestimmt werden. Alternativ ist es möglich, ein anderes Material zu bestimmen, aus dem dann das Zielmaterial, insbesondere die Nukleinsäure, bestimmt werden kann. So kann ein bei einer Reaktion
- 25 entstehendes Beiprodukt bestimmt und daraus die Menge an Nukleinsäure in der Amplifikationskammer bestimmt werden. Bei einer fluoreszierenden Messmethodik fluoresziert das Beiprodukt und kann durch die optische Auslesevorrichtung bestimmt werden.

- Der Ausleseabschnitt kann bezogen auf die Rotationsachse des Probenträgers radial zwischen
- 30 wenigstens zwei Restabschnitten der Amplifikationskammer angeordnet sein. Dies bedeutet, dass es einen ersten Restabschnitt geben kann, der radial näher zur Rotationsachse angeordnet ist als der Ausleseabschnitt. Darüber hinaus kann ein zweiter Restabschnitt existieren, der radial von der Rotationsachse weiter angeordnet ist als der Ausleseabschnitt. Das Auslesen im tieferen

Ausleseabschnitt bietet den Vorteil, dass mehr Material ausgelesen werden kann im Vergleich zu einem Auslesen im Restabschnitt. Dadurch verbessert sich das Signal zu Rauschverhältnis.

5 Dabei kann der Ausleseabschnitt der wenigstens einen Amplifikationskammer eine Dicke von wenigstens 1mm aufweisen. Insbesondere kann der Ausleseabschnitt eine Dicke in einem Bereich zwischen 1 mm bis 2mm aufweisen. Der Restabschnitt der Amplifikationskammer kann eine Dicke von kleiner als 1mm aufweisen. Insbesondere kann die Amplifikationskammer mit einer Dicke in einem Bereich zwischen 10µm und 0,9 mm, vorzugsweise zwischen 10µm und 0,5mm aufweisen.

10 Insbesondere kann der Probenträger eine Amplifikationskammer mit einem Ausleseabschnitt aufweisen, der eine mittlere Dicke von kleiner als 1mm aufweist. In einer derartigen Ausführung kann die Dicke in radialer und/oder azimuthaler Richtung variieren.

15 Ein weiterer Vorteil einer Amplifikationskammer mit unterschiedlich tiefen Abschnitten besteht darin, dass durch den tiefen Amplifikationskammerabschnitt, also den Amplifikationskammerabschnitt mit einer Dicke von wenigstens 1 mm, Flüssigkeit aus der Amplifikationskammer gepumpt werden kann. Der flache Amplifikationskammerabschnitt, also der Amplifikationskammerabschnitt mit einer Dicke von kleiner als 1 mm, hat einen hohen Widerstand, der einem schnellen und reproduzierbaren pumpen von Flüssigkeit aus der Amplifikationskammer entgegenwirkt.

20 Der Ausleseabschnitt kann wenigstens 10% der Amplifikationskammer, insbesondere einen Bereich zwischen 10-50% der Amplifikationskammer, aufweisen. Dabei beinhaltet der Ausleseabschnitt den Teil der Amplifikationskammer, die mit Flüssigkeit befüllt ist. Insbesondere beinhaltet der Ausleseabschnitt eine Bodenfläche der Amplifikationskammer, die mit Flüssigkeit benetzt ist.
25 Dagegen kann ein Abschnitt der Amplifikationskammer nicht ausgelesen werden, der keine Flüssigkeit enthält.

Ein derart ausgebildeter Ausleseabschnitt ermöglicht ein gutes Auslesen des Ausleseabschnitts und das Erkennen von in dem Ausleseabschnitt befindlichen Zielmaterials, insbesondere Fluorophors.
30 Gleichzeitig ist der Ausleseabschnitt nicht zu groß, sodass eine Temperaturänderung der in der Amplifikationskammer befindlichen Flüssigkeit schnell erfolgen kann. Durch die Rotation des Probenträgers ergibt sich eine thermische Konvektion die die Wärme schnell gleichmäßig in der Amplifikationskammer verteilt. Daher hat der tiefere Ausleseabschnitt keinen stark nachteiligen Effekt

auf die gleichmäßige und schnelle Temperaturveränderung der in der Amplifikationskammer befindlichen Flüssigkeit.

Bei einer besonderen Ausführung kann die mittlere Dicke, also der Quotient des Flüssigkeitsvolumens der in der Amplifikationskammer befindlichen Flüssigkeit geteilt durch eine mit der Flüssigkeit benetzte Grundfläche, insbesondere Bodenfläche, der Amplifikationskammer kleiner als 1 mm sein. Die mit Flüssigkeit benetzte Grundfläche der Amplifikationskammer kann der gesamten Grundfläche der Amplifikationskammer, insbesondere der gesamten Bodenfläche der Amplifikationskammer, entsprechen, durch die Wärme in die Amplifikationskammer eingebracht oder aus der Amplifikationskammer ausgebracht wird. Alternativ kann die mit Flüssigkeit benetzte Grundfläche der Amplifikationskammer kleiner sein als die gesamte Grundfläche des Probenträgers, insbesondere die gesamte Bodenfläche der Amplifikationskammer, durch die Wärme in die Amplifikationskammer eingebracht oder aus der Amplifikationskammer ausgebracht wird.

Es sind Ausführungen möglich, bei denen die Flüssigkeit nicht die gesamte Bodenfläche der Amplifikationskammer benetzt. In diesen Ausführungen unterscheidet sich die mit Flüssigkeit benetzte Bodenfläche der Amplifikationskammer von der Auflagefläche des Probenträgers über den Wärme in die Amplifikationskammer eingebracht oder aus der Amplifikationskammer ausgebracht wird.

Dabei kann sich die Amplifikationskammer, insbesondere Hauptamplifikationskammer, in radialer Richtung in einem Bereich zwischen 1mm und 10mm, insbesondere 5mm, erstrecken und/oder kann sich in azimuthaler Richtung in einem Bereich zwischen 1mm und 6mm, insbesondere 4mm, erstrecken. Eine derart ausgebildete Amplifikationskammer weist ein ausreichend großes Volumen auf, sodass mit hoher Wahrscheinlichkeit eine hohe Zielmaterialmenge in der Amplifikationskammer angeordnet ist. Gleichzeitig ist die Amplifikationskammer nicht zu groß, sodass eine Temperaturänderung der in der Amplifikationskammer befindlichen Flüssigkeit schnell erfolgen kann. Eine Voramplifikationskammer kann von der Hauptamplifikationskammer unterschiedliche ausgebildet sein. Insbesondere kann sich die Voramplifikationskammer in radialer Richtung 20 mm und/oder in azimuthaler Richtung 20 mm erstrecken.

Die Amplifikationskammer kann eine Hauptamplifikationskammer oder eine Voramplifikationskammer sein. Dabei kann der Probenträger eine oder mehrere Hauptamplifikationskammern aufweisen. Außerdem kann der Probenträger eine oder mehrere

Voramplifikationskammern aufweisen. Der Proben­träger kann auch wenigstens eine Hauptamplifikationskammer und wenigstens eine Voramplifikationskammer aufweisen. Dabei kann die in den Proben­träger eingebrachte Probe, insbesondere biologische Probe, zuerst in der Voramplifikationskammer prozessiert werden, bevor eine Prozessierung in der Hauptamplifikationskammer erfolgt.

Durch Vorsehen von wenigstens einer Voramplifikationskammer kann die Menge an Zielmaterial, wie beispielsweise Nukleinsäure, das in die Hauptamplifikationskammer gelangt um einen Faktor 100 oder mehr erhöht werden. Dadurch kann sichergestellt werden, dass genug Zielmaterial in der Hauptamplifikationskammer vorhanden ist, damit das Zielmaterial von der Auslesevorrichtung ermittelt wird. Somit wird das Problem vermieden, dass in der Hauptamplifikationskammer kein Zielmaterial vorhanden ist. Dieses Problem stellt sich, weil die Hauptamplifikationskammer flach ist.

Darüber hinaus hat das Vorsehen wenigstens einer Voramplifikationskammer den Vorteil, dass eine hohe Robustheit gegenüber Inhibitoren erreicht wird. In einer PCR-Voramplifikation mit 5-20 Zyklen werden typischerweise nicht vergleichbare Mengen an DNA Kopien im Vergleich zu einer 1-Schritt PCR mit 30-50 Zyklen hergestellt. Dadurch sind Biomoleküle, wie beispielsweise Primer oder Polymerase, meist nicht limitiert und Anforderungen an deren Prozessivität und Aktivität in Reaktionsumgebungen sind weniger kritisch. Ferner sind typische Inhibitionsmechanismen einer realtime PCR, bei welcher eine Fluoreszenzgeneration gestört wird, für die Voramplifikation nicht gegeben. Die Störungen spielen erst ab der zweiten Amplifikation in der Hauptamplifikationskammer eine Rolle, wobei dort dann aber ein Verdünnungsfaktor von typischerweise 5-40 vorliegt.

Ein Proben­träger kann derart ausgebildet sein, dass bei eine Voramplifikation der Nukleinsäure in der Voramplifikationskammer durchgeführt wird, bevor die Nukleinsäure in der Hauptamplifikationskammer amplifiziert wird. Die Voramplifikation und Hauptamplifikation erfolgen, nachdem der Proben­träger in die Rotationsvorrichtung eingesetzt wird. Insbesondere erfolgen die Voramplifikation und Hauptamplifikation aufgrund der Rotation des Proben­trägers durch den Trägerhalter.

Als Hauptamplifikationskammer wird die Kammer verstanden, in der die DNA vervielfältigt wird und/oder bei der die Nukleinsäure, insbesondere DNA und/oder RNA, bestimmt wird. Die Auslesevorrichtung ist derart ausgebildet und angeordnet, dass sie die Hauptamplifikationskammer ausliest.

Bei einer besonderen Ausführung kann die Hauptamplifikationskammer wenigstens einen Abschnitt mit einer Dicke, insbesondere einer mittleren Dicke, von kleiner als 1mm aufweisen. Sofern die Ausführung eine Voramplifikationskammer aufweist, kann die Voramplifikationskammer eine Dicke, insbesondere eine mittlere Dicke, von kleiner als 1 mm oder von wenigstens 1 mm aufweisen. Dabei ist es vorteilhaft, dass die Voramplifikationskammer eine Dicke von kleiner als 1 mm aufweist, damit der Amplifikationsvorgang schnell durchgeführt werden kann.

Bei einer Ausführung kann der Grundkörper scheibenförmig und/oder kreissegmentförmig ausgebildet sein und/oder eine mikrofluidische Kanal- und/oder Kammerstruktur kann im Grundkörper vorhanden sein. Die Amplifikationskammer ist Bestandteil der mikrofluidischen Kanal- und/oder Kammerstruktur. Als „mikrofluidische Kanalstruktur“ wird eine Kanalstrukturen verstanden, deren Abmessungen in wenigstens einer Raumrichtung, insbesondere in Tiefenrichtung und/oder Tangentialrichtung, in einem Bereich zwischen 30 bis 700 µm (Mikrometer) liegen können.

Der drehbare Trägerhalter der Rotationsvorrichtung kann derart ausgebildet sein, dass er einen oder mehrere Probenräger aufnimmt. Für den Fall, dass der Probenräger kreissegmentförmig ausgebildet ist, kann der drehbare Trägerhalter wenigstens zwei Probenräger aufnehmen. Die Probenräger können gleichzeitig durch den Trägerhalter gedreht werden.

Der Probenräger kann derart ausgebildet und dazu konfiguriert sein, sodass wenigstens einer der nachfolgenden Verfahrensschritte unter Verwendung des Probenrägers realisiert werden kann. So kann der Probenräger eine Zugangsleitung aufweisen, in die die zu prozessierende Probe eingegeben wird. Darüber hinaus kann eine thermische und/oder chemische und/oder mechanische Lyse durchgeführt werden. Außerdem kann die Probe mit einem Voramplifikationspuffer gemischt werden. Das Gemisch kann mit einem ersten Lyophilisat, welches Enzyme für eine Amplifikationsreaktion enthält, gemischt werden. Es kann eine Voramplifikation, z.B. als PCR in 50-500 µl mit 5-20 Zyklen durchgeführt werden. Ein Teil des Voramplifikats kann abgemessen und mit Hauptamplifikationspuffer und Lyophilisat, welches Enzyme, wie z.B. Polymerase, für die Hauptamplifikation enthält, gemischt werden. Das Gemisch aus Hauptamplifikationspuffer, Lyophilisat und Voramplifikat kann in einer oder mehrere Hauptamplifikationskammern aufgeteilt werden.

Der Probenträger kann ein Folienelement aufweisen, das an dem Grundkörper angebracht ist und/oder einen Boden der Amplifikationskammer bildet. Die Amplifikationskammer kann somit durch das Folienelement und Grundkörperwände begrenzt sein. Insbesondere kann das Folienelement, insbesondere direkt, an eine Grundkörperseite angebracht sein und/oder derart an

5 den Grundkörper angebracht sein, dass der Grundkörper versiegelt ist. Das Folienelement kann elastisch ausgeführt sein. Insbesondere kann das Folienelement ein kleineres Elastizitätsmodul aufweisen als der Grundkörper. Dabei kann die Folie eine Dicke in einem Bereich zwischen 30 μm und 200 μm , insbesondere 90 μm , aufweisen. Das Folienelement kann auf dem Trägerhalter, insbesondere

10 direkt aufliegen. Dabei kann ein Wärmeeintrag durch den Trägerhalter durch das Folienelement in die Amplifikationskammer erfolgen, um die in der Amplifikationskammer befindliche Flüssigkeit zu erwärmen. Dabei kann ein nahezu ausschließlich konduktiver Wärmeeintrag vom Trägerhalter in das Folienelement erfolgen. Vom Folienelement kann ein konvektiver Wärmeeintrag in die Amplifikationskammer erfolgen. Alternativ kann ein konvektiver Wärmeaustrag von der Amplifikationskammer in das Folienelement erfolgen.

15 Bei einer Ausführung kann der Grundkörper einen Einlass zum Einlassen von Flüssigkeit in die Amplifikationskammer aufweisen. Die Flüssigkeit kann die Nukleinsäure beinhalten. Dabei kann eine in der Amplifikationskammer befindliche Gasblase durch den Einlass aus der Amplifikationskammer ausgebracht werden, wenn die Rotationsvorrichtung in dem Rotationsbetrieb ist. Dies bedeutet, dass

20 die Gasblase durch denselben Einlass aus der Amplifikationskammer ausbringbar durch den die Flüssigkeit in die Amplifikationskammer eingebracht wurde. Somit müssen keine Gasblasenkammern in der Amplifikationskammer vorgesehen werden, wodurch sich die Ausbildung der Amplifikationskammer vereinfacht.

25 Bei einer Ausführung können die Auslesevorrichtung und/oder der Probenträger derart ausgebildet sein, dass die Amplifikationskammer in einem Auslesebetrieb der Rotationsvorrichtung ausgelesen wird. Die Auslesevorrichtung und der drehbare Trägerhalter können sich bezüglich des Probenträgers gegenüberliegen. Insbesondere kann die von dem Folienelement abgewandte Seite des Probenträgers zur Auslesevorrichtung weisen.

30 Die Rotationsvorrichtung kann eine Vorrichtung zum Heizen oder Kühlen der Amplifikationskammer aufweist. Die Vorrichtung kann ein Peltierelement und/oder Widerstandsheizdraht sein und/oder derart angeordnet sein, dass sie den Trägerhalter aufwärmt oder abkühlt. Die Vorrichtung wird genutzt, um die Temperatur der in der Amplifikationskammer befindlichen Temperatur einzustellen.

Der Probenträger kann derart auf dem Trägerhalter angeordnet sein, dass die Temperaturänderung der Flüssigkeit, insbesondere ausschließlich, durch den Trägerhalter erfolgt. Insbesondere kann der Probenträger, vorzugsweise direkt, auf dem Trägerhalter angeordnet sein, sodass die Amplifikationskammer von dem Trägerhalter erhitzt oder gekühlt wird. Mit anderen Worten, der Wärmeeintrag in die Amplifikationsvorrichtung erfolgt nur von einer Seite des Probenträgers. Dadurch ist ein einfacher Aufbau der Rotationsvorrichtung möglich, weil es nicht notwendig ist, Vorrichtungen zum Heizen oder Kühlen an unterschiedlichen Stellen der Rotationsvorrichtung vorzusehen. Alternativ können mehrere Vorrichtungen zum Heizen oder Kühlen der in der Amplifikationskammer vorhandenen Flüssigkeit vorgesehen sein.

10

Die Rotationsvorrichtung kann eine Unterdruckeinrichtung zum Anlegen eines Unterdrucks auf den Probenträger, insbesondere das Folienelement, aufweisen. Als Unterdruck wird ein Druck verstanden, der geringer ist als der Atmosphärendruck. Durch Anlegen von einem Unterdruck wird das Folienelement und dem der Grundkörper an dem Trägerhalter festgehalten. Dies bedeutet, dass bei angelegtem Unterdruck der Trägerhalter und der Probenträger nicht relativ zueinander bewegt werden können. Ein weiterer Vorteil im Anlegen des Unterdrucks besteht darin, dass das Folienelement gestrafft wird. Die Straffung ist notwendig, weil das Folienelement ansonsten aufgrund der elastischen Ausbildung gewellt ist und dadurch das Volumen der Amplifikationskammer schwankt und/oder undefiniert ist, was ein Auslesen der Amplifikationskammer erschwert. Dabei besteht ein Bedürfnis ein möglichst dünnes Folienelement zu verwenden, um einen möglichst schnelle Temperaturänderung in der Amplifikationskammer zu bewirken. Dabei hängt die schnelle der Temperaturänderung von der Dicke des Folienelements ab.

20

25

Bei einer besonderen Ausführung kann die Datenverarbeitungsvorrichtung und einen Drehantrieb zum Antreiben des Trägerhalters aufweisen. Die Datenverarbeitungsvorrichtung kann mit dem Drehantrieb datentechnisch verbunden sein. Als datentechnische Verbindung wird elektrische Verbindung verstanden, mittels der Daten zwischen Komponenten ausgetauscht werden können. Dabei kann die Datenverarbeitungsvorrichtung den Drehantrieb derart steuern, dass die Rotationsvorrichtung, insbesondere wahlweise, in einem Rotationsbetrieb oder einem Auslesebetrieb betrieben wird. Dazu kann ein entsprechender Steuerbefehl von der Datenverarbeitungsvorrichtung an den Drehantrieb übermittelt werden.

30

Im Entlüftungsbetrieb ist die Drehzahl des Trägerhalters ausreichend hoch, dass die auf die Gasblasen und die Flüssigkeit wirkenden Kräfte ausreichend hoch sind, dass die Gasblasen radial nach innen

gedrängt werden, also sich in Richtung zur Rotationsachse bewegen. Die Rotationsachse steht normal auf dem Grundkörper. Die Gasblasen können über den Einlass aus der Amplifikationskammer ausgebracht werden.

- 5 Die Drehzahl der Rotationsvorrichtung im Auslesebetrieb kann geringer sein als im Entlüftungsbetrieb. Die Datenverarbeitungsvorrichtung kann veranlassen, dass der Entlüftungsbetrieb vor einem Auslesebetrieb durchgeführt wird. Dies bietet den Vorteil, dass sichergestellt ist, dass ein Großteil oder alle Gasblasen aus der Amplifikationskammer entfernt sind, bevor die Auslesevorrichtung die Amplifikationskammer im Auslesebetrieb optisch ausliest.

10

Dabei kann die Datenverarbeitungsvorrichtung veranlassen, dass die Rotationsvorrichtung zum Betriebsbeginn in dem Entlüftungsbetrieb betrieben wird und anschließend die Rotationsvorrichtung nur im Auslesebetrieb oder Rotationsbetrieb betrieben wird. Dadurch wird ausgenutzt, dass die meisten Gasblasen beim Einfüllen der Flüssigkeit in den Probenräger entstehen und während des

- 15 Rotationsbetriebs keine oder nahezu keine Gasblasen entstehen. Insbesondere werden im Auslesebetrieb keine Gasblasen erzeugt, weil die Temperatur der Flüssigkeit in der Amplifikationskammer im Auslesebetrieb geringer ist als im Rotationsbetrieb.

Die Datenverarbeitungsvorrichtung kann derart konfiguriert sein, dass die Rotationsvorrichtung
20 wahlweise im Entlüftungsbetrieb oder im Rotationsbetrieb oder im Auslesebetrieb betrieben wird.

Die Drehzahl des Probenrägers im Auslesebetrieb kann zwischen 1 Hz bis 20 Hz, insbesondere 2 Hz bis 5 Hz, betragen. Dagegen kann die Drehzahl im Rotationsbetrieb zwischen 2 Hz bis 120 Hz betragen. Dabei kann eine Auslesezeit zwischen 1 Sekunde bis 6 Sekunden betragen. Als Auslesezeit wird die
25 Zeit verstanden, in der die Amplifikationskammer ausgelesen wird. Insbesondere kann die Auslesezeit 1 bis 2 Sekunden betragen, wenn der Probenräger mit einer Drehzahl von 5 Hz gedreht wird. Alternativ kann die Auslesezeit 4 bis 6 Sekunden betragen, wenn der Probenräger mit einer Drehzahl von 2 Hz gedreht wird.

- 30 Im Entlüftungsbetrieb kann die Drehzahl zwischen 16 Hz und 120 Hz betragen. Dabei kann die Rotationsvorrichtung im Entlüftungsbetrieb für eine Zeitdauer von höchstens 2 Minuten, insbesondere eine Zeitdauer zwischen 1 Minute bis 2 Minuten betrieben werden. Dabei kann der Entlüftungsbetrieb nach Einschalten der Rotationsvorrichtung zuerst durchgeführt werden. Insbesondere kann der Entlüftungsbetrieb für eine vorgegebene Zeitdauer durchgeführt werden.

Nach dem Entlüftungsbetrieb kann die Rotationsvorrichtung für wenigstens einen Zyklus, insbesondere für alle Zyklen, im Auslesebetrieb oder im Rotationsbetrieb betrieben werden. Dabei kann die Drehzahl des Trägerhalters im Auslesebetrieb und/oder im Rotationsbetrieb kleiner sein als im Entlüftungsbetrieb.

5

Bei einer besonderen Ausführung kann die die Amplifikationskammer abwechselnd aufgeheizt und abgekühlt werden. Insbesondere kann die Temperatur der Flüssigkeit in der Amplifikationskammer zyklisch zwischen mindestens zwei Temperaturen gewechselt wird. Dabei umfasst eine Zyklus die Vielzahl der Heiz- oder Kühlvorgänge, in denen die Flüssigkeit auf die unterschiedlichen Temperaturen gebracht wird. Es können mehrere Zyklen, die jeweils das Wechseln der Flüssigkeitstemperatur auf wenigstens zwei Temperaturen aufweisen, durchgeführt werden. Die Zyklen können eine vorgegebene Zeitdauer dauern und/oder können in vorgegebenen Zeitabständen wiederholt werden. Die einzelnen Zyklen können sich in ihrer Zeitdauer und/oder der in den Zyklen zu realisierenden Temperaturen voneinander unterscheiden.

10
15

Der Probenträger kann drehfest mit der Rotationsvorrichtung verbunden sein. Dabei kann ein Wärmeeintrag in die Amplifikationskammer mittels der Vorrichtung zum Heizen oder Kühlen oder ein Wärmeaustrag aus der Amplifikationskammer mittels der Vorrichtung zum Heizen oder Kühlen durch denselben Probenträgerabschnitt, insbesondere Folienelementabschnitt, erfolgen. Dadurch wird ein einfach aufgebauter Probenträger und/oder eine einfach aufgebaute Rotationsvorrichtung ermöglicht.

20

Von besonderem Vorteil ist, wenn ein erfindungsgemäßer Probenträger zur Vervielfältigung von DNA und/oder Bestimmung von Nukleinsäuren verwendet wird.

25

In den Figuren ist der Erfindungsgegenstand schematisch dargestellt, wobei gleiche oder gleichwirkende Elemente zumeist mit denselben Bezugszeichen versehen sind. Dabei zeigt:

30

Fig. 1 eine Darstellung eines Grundkörpers mit Amplifikationskammern eines erfindungsgemäßen Probenträgers.

Fig. 2 eine Explosionsdarstellung eines erfindungsgemäßen Probenträgers.

Fig. 3 eine Draufsicht auf einen drehbaren Trägerhalter einer Rotationsvorrichtung.

Fig. 4 eine Seitenansicht des Trägerhalters.

Fig. 5 eine Draufsicht des Trägerhalters auf dem der Grundkörper des erfindungsgemäßen

Probenträgers angebracht ist.

Fig. 6 eine Draufsicht des Trägerhalters auf dem der erfindungsgemäße Probenträger angebracht ist.

5 Fig. 7 eine Seitenschnittansicht auf einen Abschnitt des Probenträgers gemäß einer ersten Ausführung mit einer Amplifikationskammer.

Fig. 8 eine Seitenschnittansicht auf einen Abschnitt des Probenträgers gemäß einer zweiten Ausführung mit einer Amplifikationskammer.

Fig. 9 eine Seitenschnittansicht auf einen Abschnitt des Probenträgers gemäß einer dritten Ausführung mit einer Amplifikationskammer.

10 Fig. 10a eine Schnittansicht von oben auf einen Grundkörperabschnitt zu einem Zustand, bei dem sich der Trägerhalter nicht dreht.

Fig. 10b eine Schnittansicht von oben auf einen Grundkörperabschnitt zu einem Zustand, bei dem sich der Trägerhalter dreht.

Fig. 11 eine schematische Darstellung der Rotationsvorrichtung.

15

Fig. 1 zeigt eine vereinfachte Darstellung eines Grundkörpers 2 eines in Figur 2 dargestellten Probenträgers 1, der in einem rotationsbasierten Verfahren zur Vervielfältigung von DNA und/oder Bestimmung, insbesondere zur Detektion und/oder Quantifizierung, von Nukleinsäuren verwendet wird. Bei dem in Figur 1 dargestellten Grundkörper 2 sind im Vergleich zu dem in Figur 2 gezeigten

20 Grundkörper 2 eine Vielzahl von in dem Grundkörper 2 ausgebildeten Kanälen und/oder Kammern weggelassen. So sind in Figur 1 lediglich mehrere Amplifikationskammern 3 beispielhaft dargestellt, die im Grundkörper 3 ausgebildet sind. Insbesondere sind zwei Voramplifikationskammern 3b und fünf Hauptamplifikationskammern 3a dargestellt. Es sind jedoch Probenträger 1 denkbar, die eine unterschiedliche Anzahl von Voramplifikationskammern 3b und Hauptamplifikationskammern 3a aufweisen. Der Grundkörper 2 ist scheibenförmig und kreissegmentförmig ausgebildet.

25

Die Amplifikationskammer 3, insbesondere die Hauptamplifikationskammer 3a weist eine Dicke d von kleiner als 1mm (Millimeter), insbesondere in einem Bereich zwischen 10µm (Mikrometer) und 0,9 mm, vorzugsweise zwischen 10µm und 0,5mm, auf. Die Hauptamplifikationskammern 3a und die

30 Voramplifikationskammern 3b sind fluidisch miteinander verbunden. Die Amplifikationskammern 3 sind Bestandteil einer in Figur 2 dargestellten mikrofluidischen Kanal- und Kammerstruktur.

Fig. 2 zeigt eine Explosionsdarstellung eines erfindungsgemäßen Probenträgers 1. Die Kanal- und Kammerstruktur 8, die in dem Grundkörper 2 ausgebildet ist, weist eine Vielzahl von Kanälen und

Kammern auf, die untereinander fluidisch verbunden sind. Im in Figur 2 dargestellten Zustand ist eine Seite der Kanal- und Kammerstruktur 8 offen ausgeführt.

Der Proben­träger 1 weist ein Folien­element 6 auf, mittels dem die offene Seite der Kanal- und Kammerstruktur 4 verdeckt wird. Das Folien­element 6 fungiert als Boden für die im Grundkörper 2 offen ausgebildeten Kanäle und Kammern, wenn der Proben­träger 1 auf dem in Fig. 3 dargestellten Trägerhalter 10 angeordnet ist. Dabei wird das Folien­element 6 auf eine Grundkörperseite direkt angebracht. So wird das Folien­element 6 auf den Grundkörper 2 heißgesiegelt. Wie nachfolgend näher ausgeführt ist, wird über das Folien­element 6 Wärme in die Kanal- und Kammerstruktur 4 eingebracht oder aus dieser abgeführt.

Der Grundkörper 2 weist an seiner Sehnenseite einen vom Grundkörper 2 in radialer Richtung vorstehenden Zugangsabschnitt 17 einer in Figur 5 dargestellten Zugangsleitung 32 auf, die mit der Kanal- und Kammerstruktur 4 fluidisch verbunden ist. Eine Probe, insbesondere biologische Probe kann in die Zugangsleitung eingebracht und von dort in einzelnen Kammern des Proben­trägers prozessiert werden. Der Zugangsabschnitt 17 ist reversibel mittels einer Kapsel 31 verschließbar, um die Einbringung der Probe und ein nachfolgendes Wiederverschließen zu ermöglichen. Der Zugangsabschnitt 17 und die Zugangsleitung 32 sind derart ausgebildet, dass ein in den Figuren nicht dargestellter Tupfer, an dem sich die zu prozessierende Probe befindet, in die Zugangsleitung eingebracht werden kann.

Der Proben­träger 1 enthält in einem Anfangszustand, d.h. in einem Zustand, in dem noch keine Probe in den Zugang 10 eingebracht ist, mehrere vorgelagerte Flüssigreagenzien in diversen Kammern. Darüber hinaus sind Primer in den Voramplifikationskammern 3b vorgelagert. Weitere Primer und Sonden, die in der Form von Poly- oder Oligonukleotiden vorliegen, sind den Hauptamplifikationskammern 3a vorgelagert. Die Primerpaare in den Voramplifikationskammern 3b sind, je nach konkretem Ziel des Analyseverfahrens und/oder des spezifischen Ablaufs, identisch oder unterschiedlich. So sind die Primer in den Hauptamplifikationskammern 3a zu den Primern in den Voramplifikationskammern 3b paarweise identisch oder beispielsweise für eine im Stand der Technik bekannte „nested PCR“ („verschachtelte“ oder „geschachtelte“ PCR) vorgesehen und somit unterschiedlich ausgeführt.

In weiteren Kammern sind Lyophilisate vorgelagert, die beispielsweise Enzyme, Polymerase, dNTPs (desoxyNukleosidTriPhosphate), Salze und/oder weitere vorgelagerte Reagenzien (z. B. PCR-Additive, Nuklease Inhibitoren, Co-Faktoren der beteiligten Enzyme etc.) enthalten. In der Zugangsleitung kann eine Lyse und Mittel zur Prozesskontrolle, z.B. Sporen, Pilze, Phagen oder künstlich hergestellte
5 Targets enthalten sein. Eine mit der Zugangsleitung in Verbindung stehende Lysekammer enthält ein Lysepellet sowie einen Magneten und ein Mahlmedium. Bei letzterem handelt es sich z.B. um Glas- und/oder Zirkoniapartikel.

Der Probenkörper 1 weist außerdem einen Abdeckkörper 18 auf, der an dessen Rand an die von dem
10 Folienelement 6 abgewandte Seite des Grundkörpers 1 angebracht wird. Der Abdeckkörper 18 liegt mit Ausnahme des Randes nicht direkt an dem Grundkörper 2 an, sondern es befindet sich eine Luftschicht zwischen dem Abdeckkörper 18 und dem Grundkörper 2. Dies ist in den Figuren 7 bis 9 ersichtlich. Dabei kann der Abdeckkörper 18 mittels Rasthakens in korrespondierende Aussparungen
15 19 des Grundkörpers 2 an diesem fixiert werden. Der Abdeckkörper 18 weist ein Auslesefenster 20 auf. Das Auslesefenster 20 ist transparent und derart angeordnet, dass der Inhalt der Hauptamplifikationskammern 3a durch das Auslesefenster 20 ausgelesen werden kann. Darüber hinaus weist der Abdeckkörper 18 eine Ausnehmung 21 auf, die zum Aufnehmen der an dem Grundkörper 2 angebrachten Zugangsleitung dient.

20 Der Grundkörper 2 weist mehrere Durchbrüche 22 auf, die zur eindeutigen Ausrichtung und Positionierung des Probenträgers auf einem in Figur 3 dargestellten Trägerhalter 10 der Rotationsvorrichtung 9 dienen. In diese Durchbrüche 22 greifen zur Positionierung und Fixierung in einer Drehebene, die parallel zur Oberfläche des Trägerhalters 10 liegt, Positionsstifte 23 des Trägerhalters 10 ein.

25 Fig. 3 zeigt eine Draufsicht auf einen drehbaren Trägerhalter 10 und Fig. 4 zeigt eine Seitenansicht des Trägerhalters 10. Der Trägerhalter 10 ist kreisförmig ausgebildet und dient zur Drehung des Probenträgers 1 um eine Rotationsachse R. Die Rotationsachse R steht senkrecht auf den scheibenförmig ausgebildeten Grundkörper 2. Der Trägerhalter 10 ist derart ausgebildet, dass er zwei
30 in Figur 1 und 2 dargestellte Grundkörper 2 tragen kann.

Der Trägerhalter 10 weist mehrere Heizabschnitte 30 auf. Dabei ist eine Vorrichtung 12 zum Heizen oder Kühlen des Probenträgers 1 entlang der Rotationsachse R gesehen unterhalb des Heizabschnitts 30 angeordnet, was in den Figuren 6 und 7 gezeigt ist. Die Vorrichtungen 12 können jeweils ein

Peltierelement oder Widerstandsheizplatten sein. Die Heizabschnitte 30 sind versetzt zueinander angeordnet und können als Platten ausgeführt sein, die die Vorrichtung 12 bedecken. Darüber hinaus weist der Trägerhalter 10 einen Trägerboden 32 auf. Die Heizabschnitte 30 und Vorrichtungen 12 sind in Aussparungen des Trägerbodens 32 angeordnet.

5

Darüber hinaus weist der Trägerhalter 10 eine Dichtung 24 auf, die eine oder mehrere der Heizabschnitte 30 vollständig umschließt. In den Dichtungen 24 sind jeweils mehrere nicht dargestellte Bohrungen vorhanden, die entlang der Dichtung 24 versetzt zueinander angeordnet sind. Zum Fixieren des Probenträgers 1 auf dem Trägerhalter 10 kann mittels einer in Figur 10 dargestellten Unterdruckeinrichtung 13 ein Unterdruck an die Bohrungen angelegt werden. Im fixierten Zustand liegt der Probenträger 1, insbesondere das Folienelement 6, an den Dichtungen 24 an.

10

Fig. 5 zeigt eine Draufsicht des Trägerhalters 10 auf dem der Grundkörper 2 des erfindungsgemäßen Probenträgers 1 angebracht ist. Dabei ist ein Tupfer mit der zu prozessierenden Probe in der Zugangsleitung 32 angeordnet. Der Grundkörper 2 liegt auf dem Trägerhalter 10 auf und ist drehfest mit dem Trägerhalter 10 verbunden. Wie aus Figur 5 ersichtlich ist, bedeckt der Grundkörper 2 nur die Hälfte des Trägerhalters 10. Ein weiterer in den Figuren nicht dargestellter anderer Grundkörper 2 kann auf den verbleibenden Abschnitt des Trägerhalters 10 angeordnet werden. Bei der in Figur 5 dargestellten Ausführung ist der Probenträger 1 ohne Abdeckkörper 18 dargestellt. Dagegen ist in Figur 6 der Probenträger 1 mit Abdeckkörper 18 dargestellt.

15

20

Fig. 7 zeigt eine Seitenschnittansicht auf eine Amplifikationskammer 3 gemäß einer ersten Ausführung. Insbesondere zeigt Figur 7 eine Seitenschnittansicht eines Abschnitts eines Grundkörpers 2, in dem die Amplifikationskammer 3 angeordnet ist und eines Teils des Trägerhalters 10, insbesondere des Heizabschnitts 30 und der Vorrichtung 12. Die Amplifikationskammer 3 ist im vorliegenden Ausführungsbeispiel die Hauptamplifikationskammer 3a. Dabei ist die Hauptamplifikationskammer 3a im dargestellten Beispiel nur teilweise mit Flüssigkeit 33 gefüllt. Dabei ist in Figur 7 eine Grenzfläche 35 zwischen einem Luftabschnitt und einem Flüssigkeitsabschnitt in der Amplifikationskammer 3 eingezeichnet. In einem nicht dargestellten Ausführungsbeispiel kann die Amplifikationskammer 3 zusätzlich oder alternativ die Voramplifikationskammer 3b sein.

25

30

Aus Figur 7 ist ersichtlich, dass das Folienelement 6 auf dem Trägerhalter 10 aufliegt. Der Trägerhalter 10 weist die Vorrichtung 12 zum Heizen oder Kühlen des Probenträgers 1 auf, die unterhalb des Heizabschnitts 30 angeordnet ist. Durch die Vorrichtung 12 kann die in der Amplifikationskammer 3

befindliche Flüssigkeit auf unterschiedliche Temperaturwerte gebracht werden.

Die Amplifikationskammer 3 weist eine Dicke d auf. Dabei wird die Amplifikationskammer 3 durch das Folienelement 6 und durch Wände des Grundkörpers 2 begrenzt. Die Rotationsvorrichtung 9 weist
5 außerdem eine Auslesevorrichtung 11 auf, die entlang der Rotationsachse R oberhalb der Amplifikationskammer 3 angeordnet ist. Die Auslesevorrichtung 11 kann die Amplifikationskammer 3 optisch auslesen und somit Nukleinsäuren, insbesondere DNA, in der Amplifikationskammer 3 bestimmen. Eine mit der Auslesevorrichtung 11 datentechnisch verbundenen Datenverarbeitungsvorrichtung 14 kann auf der Basis der empfangenen Daten bestimmen, wie sich
10 die DNA in der Amplifikationskammer 3 vervielfältigt hat.

Der Trägerhalter 10 weist einen Temperatursensor 26 auf. Der Temperatursensor 26 misst die Temperatur des Heizabschnitts 30. Da das Folienelement 6 dünn ist, weist die Temperatur der Flüssigkeit innerhalb der Amplifikationskammer 3 nahezu die gleiche Temperatur auf wie der
15 Heizabschnitt 30.

In Figur 7 ist eine Grundfläche der Amplifikationskammer 29 eingezeichnet, mittels der Wärme von dem Folienelement 6 in die Amplifikationskammer 3 eingebracht wird. Die Grundfläche der Amplifikationskammer 3 entspricht einer Bodenfläche der Amplifikationskammer 3. In Figur 7 benetzt
20 die Flüssigkeit 33 nur einen Teil der Grundfläche der Amplifikationskammer 29, wobei der durch die Flüssigkeit benetzte Teil der Grundfläche im folgenden als beheizte Grundfläche 34 bezeichnet wird. Eine mittlere Dicke der Amplifikationskammer 3 entspricht dem Quotienten des Volumens der in der Amplifikationskammer 3 befindlichen Flüssigkeit 33 geteilt durch die beheizte Grundfläche 34, also den Teil der Bodenfläche der Amplifikationskammer 3, der mit Flüssigkeit 33 benetzt ist. Dabei ist
25 vorteilhaft, dass die mittlere Dicke der Amplifikationskammer 3 kleiner als 1mm, insbesondere zwischen 10 μm und 0,9 mm, ist.

Fig. 8 zeigt eine Seitenschnittansicht auf eine Amplifikationskammer 3 gemäß einer zweiten Ausführung. Die zweite Ausführung unterscheidet sich von der in Figur 7 dargestellten Ausführung in
30 der Ausbildung der Amplifikationskammer 3. Die in Figur 8 dargestellte Amplifikationskammer 3 weist zwei Abschnitte mit unterschiedlichen Dicken auf. So weist die Amplifikationskammer 3 einen Ausleseabschnitt 4 auf, der von der Auslesevorrichtung 11 im Auslesebetrieb der Rotationsvorrichtung 9 ausgelesen wird. Darüber hinaus weist die Amplifikationskammer 3 einen Restabschnitt 5 auf, der von der Auslesevorrichtung 11 nicht ausgelesen wird. Der Ausleseabschnitt 4

ist dicker als der Restabschnitt 5. Dabei ist der Restabschnitt 5 in radialer Richtung gesehen näher zu einer in Figur 8 nicht dargestellten Rotationsachse angeordnet als der Ausleseabschnitt 4.

Der Ausleseabschnitt 5 kann dicker sein als der Restabschnitt 4 der Amplifikationskammer 3. Der Ausleseabschnitt 5 kann eine Dicke von wenigstens 1 mm aufweisen. Um die Vorteile der Erfindung zu erhalten, sollte die mittlere Dicke des Ausleseabschnitts kleiner als 1mm, idealerweise zwischen 10 µm und 0,9 mm, betragen. Der Ausleseabschnitt 5 ist am Rand der Amplifikationskammer 4 gezeichnet, kann sich aber in Ausführungen an einer beliebigen Stelle innerhalb der Amplifikationskammer 3 befinden.

10

Fig. 9 zeigt eine Seitenschnittansicht auf einen Abschnitt des Probenträgers gemäß einer dritten Ausführung mit einer Amplifikationskammer 3. Die dritte Ausführung unterscheidet sich von der in Figur 8 gezeigten zweiten Ausführung in der Ausbildung der Amplifikationskammer 3. So wird der Restabschnitt 5 mittels einer Schräge 36 in den Ausleseabschnitt 4 überführt.

15

Fig. 10a zeigt eine Schnittansicht von oben auf einen Abschnitt des Grundkörpers 2, in dem die Amplifikationskammer 3 ausgebildet ist, zu einem Zustand, bei dem sich der Trägerhalter 10 nicht dreht. Der Trägerhalter 10 ist in Figur 10a nicht dargestellt. In dem dargestellten Zustand sind Gasblasen 27 in der Amplifikationskammer 3 angeordnet. Darüber hinaus ist in der Amplifikationskammer 3 Flüssigkeit angeordnet, wobei, die Amplifikationskammer 3 nur teilweise mit Flüssigkeit befüllt. Insbesondere ist die Amplifikationskammer 3 zu 90% mit Flüssigkeit befüllt.

20

Fig. 10b zeigt eine Schnittansicht von oben auf den in Fig. 10a gezeigten Grundkörperabschnitt zu einem Zustand, bei dem sich der nicht dargestellte Trägerhalter 10 dreht. Insbesondere wird die Rotationsvorrichtung 9 in einem Entlüftungsbetrieb betrieben. In dem Entlüftungsbetrieb dreht sich der Trägerhalter 10 um die Rotationsachse R und wird der Trägerhalter 10 mit einer Drehzahl betrieben, bei der die auf die Flüssigkeit und die Gasblasen wirkenden Kräfte dazu führen, dass die Gasblasen nach radial innen verdrängt werden. Die auf die Flüssigkeit und die Gasblasen Kraftrichtung Z ist in Figur 10b eingezeichnet. Die Gasblasen können durch einen Einlass 28 aus der Amplifikationskammer 3 geführt werden. Der Einlass 28 dient außerdem zum Einbringen von Flüssigkeit in die Amplifikationskammer 3.

25

30

Fig. 11 zeigt eine schematische Darstellung der Rotationsvorrichtung 9. Die Rotationsvorrichtung 9 weist einen Drehantrieb 16 zum Antreiben der Trägerhalter 10 auf. Der Drehantrieb 16 ist

triebstechnisch mit dem Trägerhalter 10 gekoppelt und/oder weist einen nicht dargestellten Antriebsmotor auf. Der Probenträger 1 ist auf dem Trägerhalter 10 angeordnet. Die Auslesevorrichtung 11 ist entlang der Rotationsachse R gesehen oberhalb vom Probenträger 1 angeordnet.

5

Die Rotationsvorrichtung 9 weist außerdem die Datenverarbeitungsvorrichtung 14 auf. Die Datenverarbeitungsvorrichtung 14 ist datentechnisch mit der Auslesevorrichtung 11, einer Unterdruckvorrichtung 13 und dem Drehantrieb 16 verbunden. Die Datenverarbeitungsvorrichtung 14 kann Steuerbefehle an den Drehantrieb 16 übermitteln, damit die Rotationsvorrichtung 9 im Rotationsbetrieb oder im Auslesebetrieb betrieben wird.

10

Die Unterdruckvorrichtung 13 kann eine Pumpe sein, die einen Unterdruck in den Bohrungen bewirkt, um den Probenträger 1 an dem Trägerhalter 10 fixieren. Die datentechnische Verbindung ist in Figur 11 gestrichelt dargestellt. Die Rotationsvorrichtung 9 weist ein Gehäuse 15 auf, das einen Innenraum umschließt. Die oben genannten Komponenten sind innerhalb des Gehäuses 15 angeordnet.

15

Bezugszeichenliste

	1	Probenträger
	2	Grundkörper
5	3	Amplifikationskammer
	3a	Hauptamplifikationskammer
	3b	Voramplifikationskammer
	4	Ausleseabschnitt
	5	Restabschnitt
10	6	Folienelement
	8	Kanal- und Kammerstruktur
	9	Rotationsvorrichtung
	10	Trägerhalter
	11	Auslesevorrichtung
15	12	Vorrichtung zum Heizen oder Kühlen
	13	Unterdruckeinrichtung
	14	Datenverarbeitungsvorrichtung
	15	Gehäuse
	16	Drehantrieb
20	17	Zugangsabschnitt
	18	Abdeckkörper
	19	Aussparung
	20	Auslesefenster
	21	Ausnehmung
25	22	Durchbruch
	23	Positionsstift
	24	Dichtung
	26	Temperatursensor
	27	Gasblasen
30	28	Einlass
	29	Probenträgerabschnitt
	30	Heizabschnitt
	31	Kapsel
	32	Trägerboden
35	33	Flüssigkeit
	34	Boden der Amplifikationskammer
	35	Grenzfläche
	36	Schräge
40	R	Rotationsachse
	Z	Kraftrichtung

Patentansprüche

1. Proben­träger (1) zum Verwenden in einem rotationsbasierten Verfahren zur Vervielfältigung von DNA und/oder Bestimmung von Nukleinsäuren, mit einem Grundkörper (2) und wenigstens einer
5 in dem Grundkörper (3) ausgebildeten Amplifikationskammer (3), dadurch gekennzeichnet, dass die wenigstens eine Amplifikationskammer (3) eine Dicke (d) von kleiner als 1 mm, insbesondere in einem Bereich zwischen 10 µm und 0,9 mm, vorzugsweise zwischen 10 µm und 0,5 mm, aufweist.
2. Proben­träger (1) nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass
10 a. die wenigstens eine Amplifikationskammer (3) Abschnitte mit unterschiedlichen Dicken aufweist oder dass
b. die wenigstens eine Amplifikationskammer (3) zwei Abschnitte mit unterschiedlichen Dicken aufweist, wobei der tiefere der beiden Abschnitte durch eine Auslesevorrichtung (11) auslesbar ist.
15
3. Proben­träger (1) nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass
a. ein Ausleseabschnitt (4) der wenigstens einen Amplifikationskammer (3) eine Dicke (d) von wenigstens 1 mm, insbesondere in einem Bereich zwischen 1 mm bis 2 mm, aufweist und/oder ein Restabschnitt der Amplifikationskammer (3) eine Dicke von
20 kleiner als 1 mm, insbesondere in einem Bereich zwischen 10 µm und 0,9 mm, vorzugsweise zwischen 10 µm und 0,5 mm, aufweist und/oder dass
b. die Dicke (d) eine mittlere Dicke der Amplifikationskammer (3) ist.
4. Proben­träger (1) nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Ausleseabschnitt (4)
25 wenigstens 10% der Amplifikationskammer (3), insbesondere einen Bereich zwischen 10-50% der Amplifikationskammer (3), aufweist.
5. Proben­träger nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass sich die Amplifikationskammer, insbesondere Hauptamplifikationskammer, in radialer Richtung in einem
30 Bereich zwischen 1 mm und 10 mm, insbesondere 5 mm, erstreckt und/oder in azimuthaler Richtung in einem Bereich zwischen 1 mm und 6 mm, insbesondere 4 mm, erstreckt.

6. Probenträger (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikationskammer (3) eine Hauptamplifikationskammer (3a) oder eine Voramplifikationskammer (3b) ist.
- 5 7. Probenträger (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass
- a. der Grundkörper (2) scheibenförmig und/oder kreissegmentförmig ausgebildet ist und/oder dass
 - b. eine mikrofluidische Kanal- und/oder Kammerstruktur im Grundkörper (2) vorhanden ist.
- 10 8. Probenträger (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Probenträger (1) ein Folienelement (6) aufweist, das an dem Grundkörper (2) angebracht ist und/oder einen Boden der Amplifikationskammer (3) bildet.
- 15 9. Probenträger nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass der Grundkörper (2) einen Einlass (28) zum Einlassen von Flüssigkeit in die Amplifikationskammer (3) aufweist, wobei eine in der Amplifikationskammer (3) befindliche Gasblase (27) durch den Einlass (28) aus der Amplifikationskammer (3) ausbringbar ist.
- 20 10. Rotationsvorrichtung (9) mit wenigstens einem Probenträger (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 9 und einem drehbaren Trägerhalter (10), der den Probenträger (1) hält.
11. Rotationsvorrichtung (9) nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Rotationsvorrichtung (9) eine Auslesevorrichtung (11) zum Auslesen der Amplifikationskammer (3),
- 25 insbesondere des Ausleseabschnitts (4), aufweist.
12. Rotationsvorrichtung (9) nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Auslesevorrichtung (11) und/oder der Probenträger (1) derart ausgebildet ist, dass die Amplifikationskammer (3) in einem Auslesebetrieb der Rotationsvorrichtung (9) auslesbar ist.
- 30 13. Rotationsvorrichtung (9) nach einem der Ansprüche 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Rotationsvorrichtung (9) eine Vorrichtung (12) zum Heizen oder Kühlen der Amplifikationskammer (3) aufweist.

14. Rotationsvorrichtung (9) nach einem der Ansprüche 10 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Rotationsvorrichtung (9) eine Unterdruckeinrichtung (13) zum Anlegen eines Unterdrucks auf den Probenträger (1), insbesondere das Folienelement (6), aufweist.
- 5 15. Rotationsvorrichtung (9) nach einem der Ansprüche 10 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Rotationsvorrichtung (9) eine Datenverarbeitungsvorrichtung (14) aufweist, die mit der Auslesevorrichtung (11) und/oder einem Drehantrieb (16) für den Trägerhalter (10) datentechnisch verbunden ist.
- 10 16. Rotationsvorrichtung (9) nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Datenverarbeitungsvorrichtung (14) veranlasst, dass die Rotationsvorrichtung (9) in einem Auslesebetrieb oder einen Entlüftungsbetrieb betrieben wird, wobei die Drehzahl des Trägerhalters (10) im Auslesebetrieb geringer ist als im Entlüftungsbetrieb.
- 15 17. Rotationsvorrichtung (9) nach Anspruch 10 oder 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Datenverarbeitungsvorrichtung (14) veranlasst, dass ein Entlüftungsbetrieb vor einem Auslesebetrieb durchgeführt wird.
- 20 18. Rotationsvorrichtung (9) nach einem der Ansprüche 10 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass
a. die Drehzahl des Trägerhalters (10) im Auslesebetrieb zwischen 1 Hz bis 6 Hz, insbesondere 2 Hz bis 5 Hz, beträgt und/oder dass
b. die Drehzahl des Trägerhalters (10) im Entlüftungsbetrieb zwischen 16 Hz bis 120 Hz beträgt.
- 25 19. Rotationsvorrichtung (9) nach einem der Ansprüche 10 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass eine Auslesezeit zwischen 1 Sekunde bis 6 Sekunden beträgt.
- 30 20. Rotationsvorrichtung (9) nach einem der Ansprüche 15 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass der Probenträger (1) drehfest mit dem Trägerhalter (10) verbunden ist, wobei ein Wärmeeintrag in die Amplifikationskammer (3) mittels der Vorrichtung (12) zum Heizen oder Kühlen oder ein Wärmeaustrag aus der Amplifikationskammer (3) mittels der Vorrichtung (12) zum Heizen oder Kühlen durch denselben Probenträgerabschnitt (29), insbesondere Folienelementabschnitt, erfolgt.

21. Verfahren zum Betreiben einer Rotationsvorrichtung (9), insbesondere nach einem der Ansprüche 10 bis 20, mit einem Trägerhalter (10), der wenigstens einen Probenträger (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 9 trägt, wobei die Rotationsvorrichtung (9) in einem Auslesebetrieb oder einen Entlüftungsbetrieb betrieben wird, wobei die Drehzahl der Rotationsvorrichtung (9) im Auslesebetrieb
5 geringer ist als im Entlüftungsbetrieb.
22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass der Rotationsbetrieb vor dem Auslesebetrieb durchgeführt wird.
- 10 23. Verfahren nach Anspruch 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet dass
- a. die Drehzahl des Probenträgers (1) im Auslesebetrieb zwischen 1 Hz bis 6 Hz beträgt und/oder dass
 - b. die Drehzahl des Probenträgers (1) im Rotationsbetrieb zwischen 16 Hz bis 120 Hz beträgt.
- 15
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 21 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass
- a. die Amplifikationskammer (3) abwechselnd aufgeheizt und abgekühlt wird und/oder dass
 - b. die Temperatur der Amplifikationskammer (3) zyklisch zwischen wenigstens zwei
20 Temperaturen gewechselt wird.
25. Verfahren nach einem der Ansprüche 21 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass eine Voramplifikation der Nukleinsäure in einer Voramplifikationskammer (3b) durchgeführt wird, bevor die Nukleinsäure in der Hauptamplifikationskammer (3a) amplifiziert wird.
- 25
25. Verwendung eines Probenträger (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 9 zur Vervielfältigung von DNA und/oder Bestimmung von Nukleinsäuren.

Fig. 1

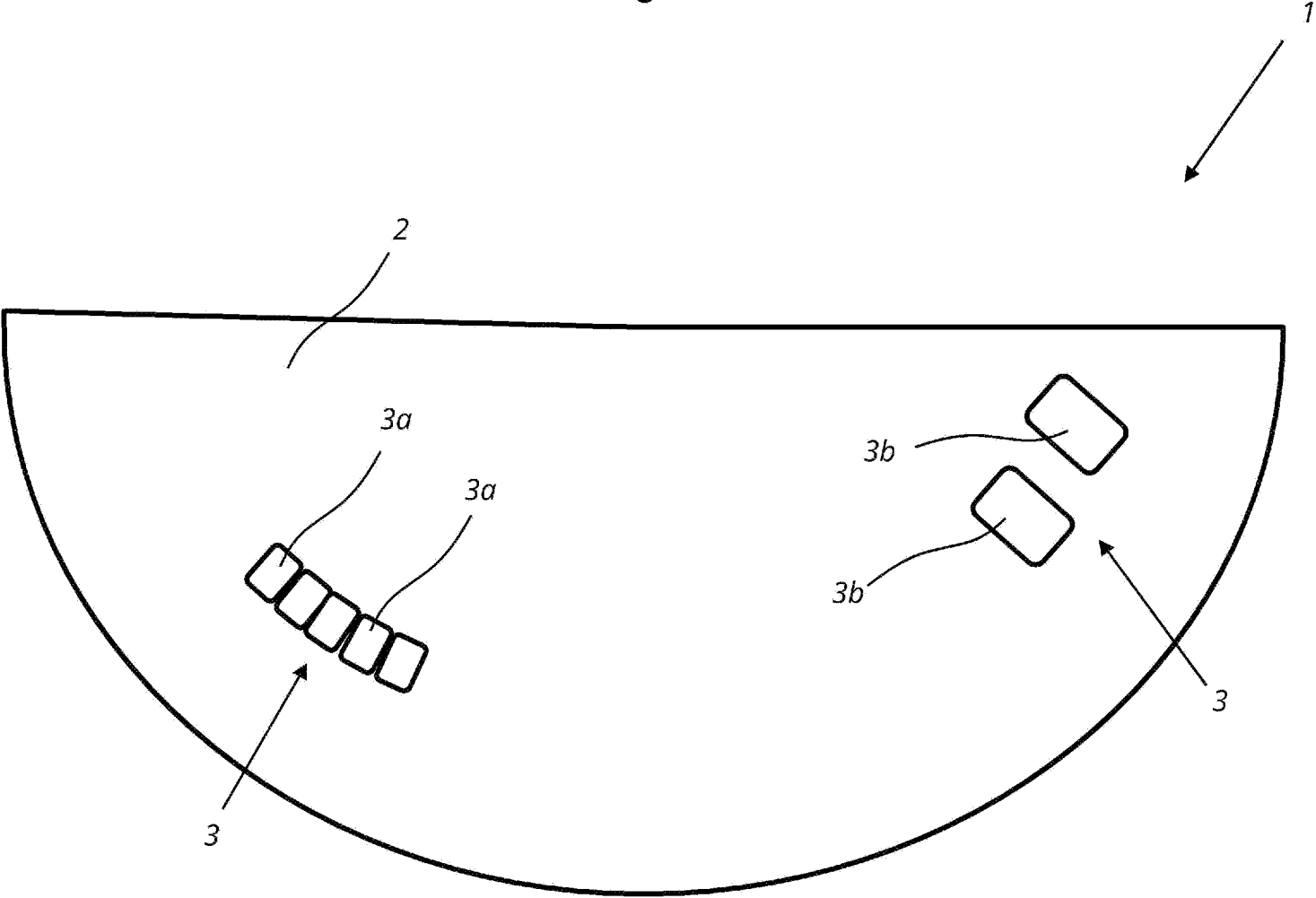


Fig. 2

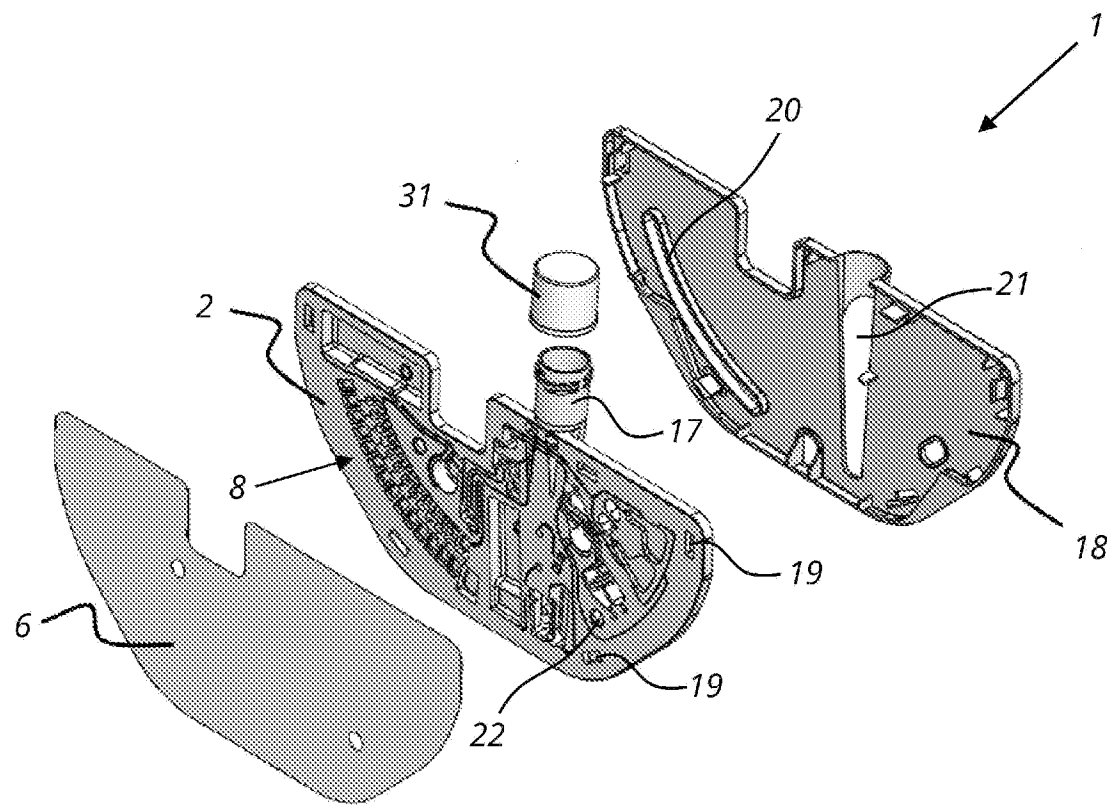


Fig. 3

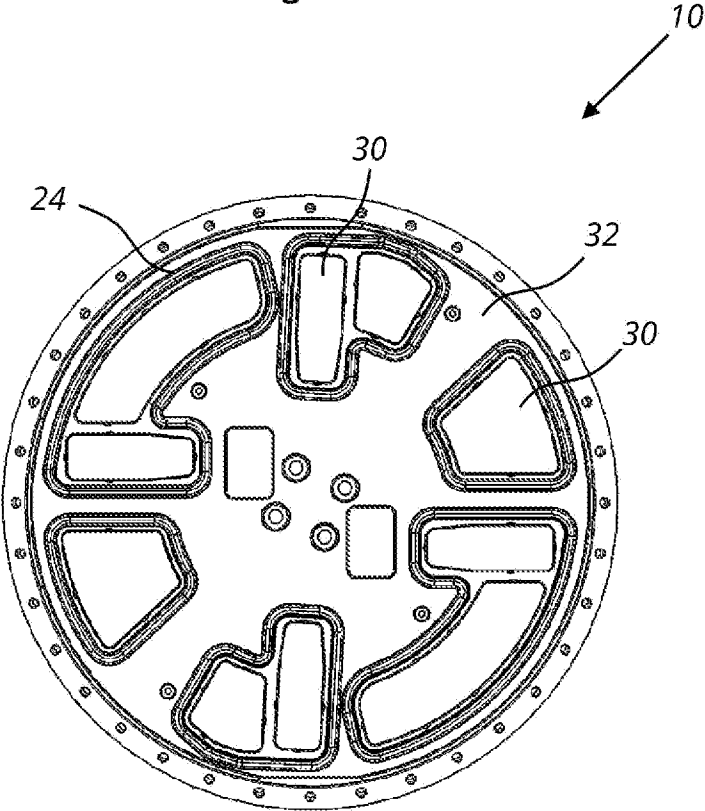


Fig. 4

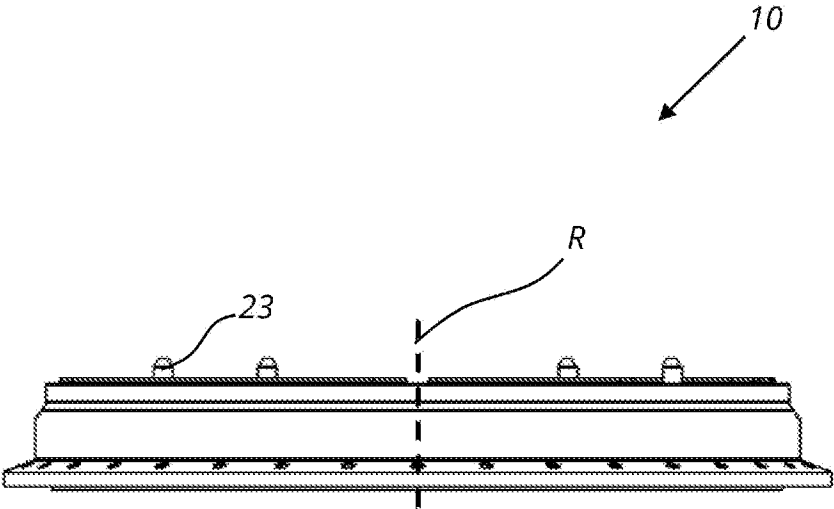


Fig. 5

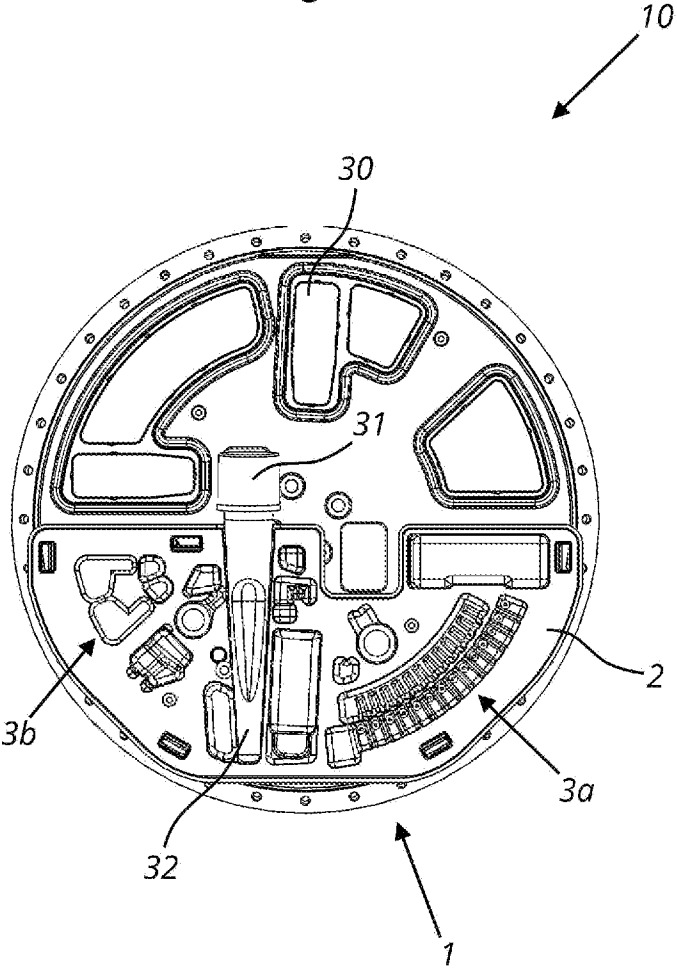


Fig. 6

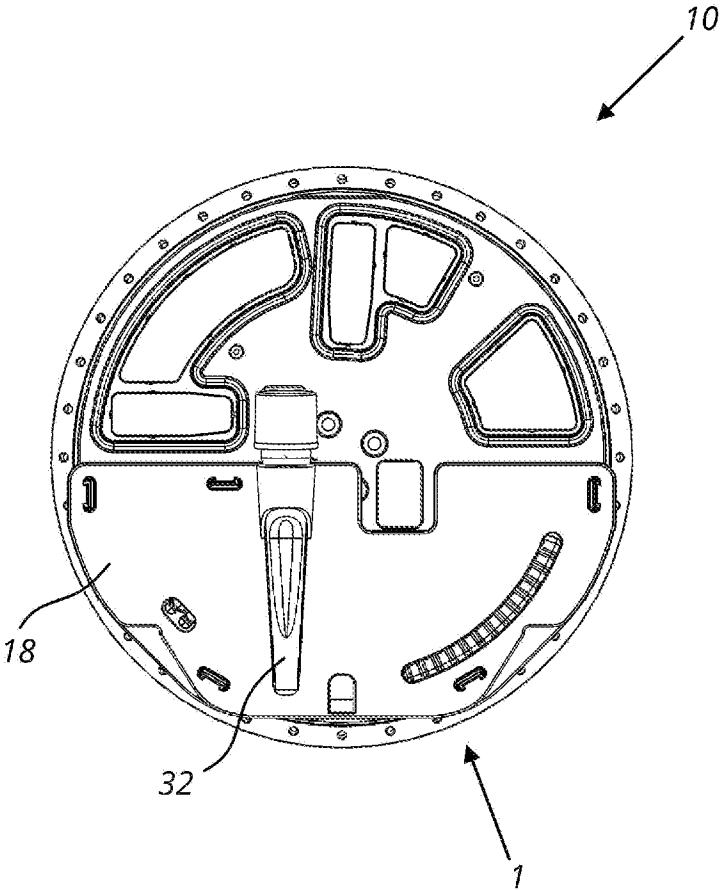


Fig. 7

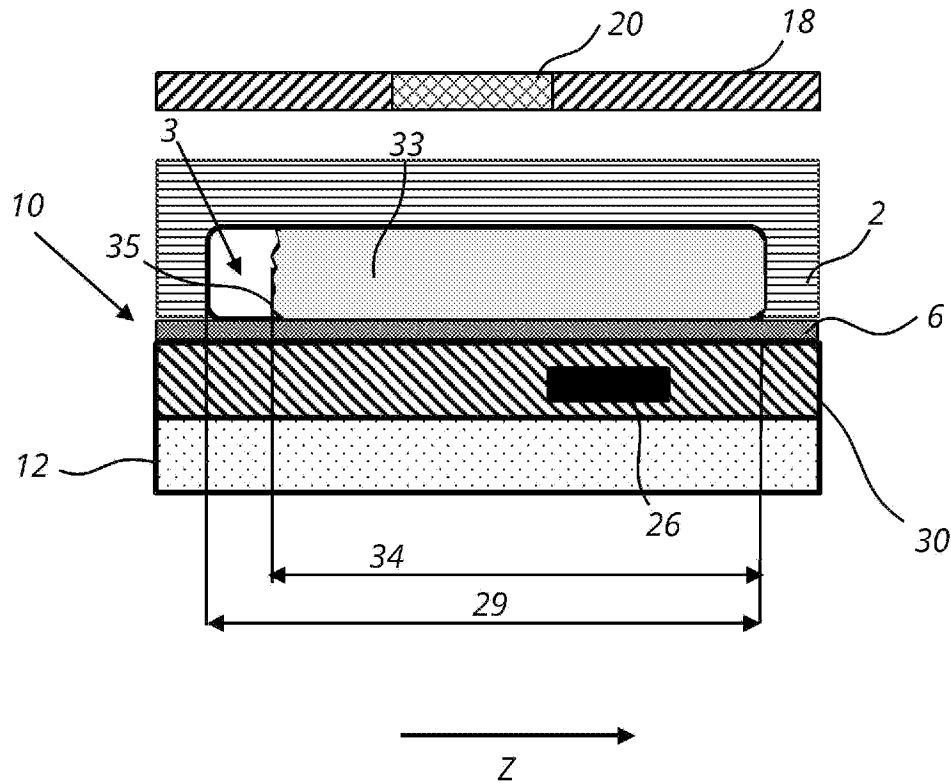
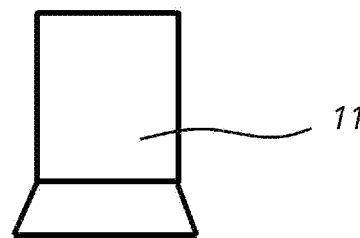


Fig. 8

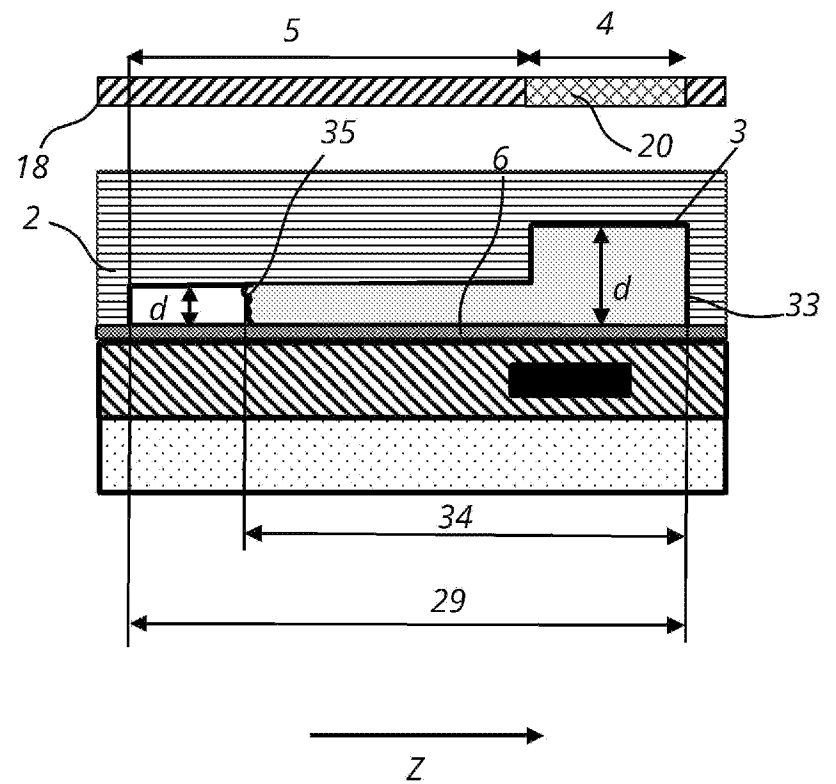
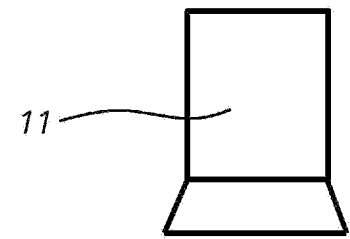


Fig. 9

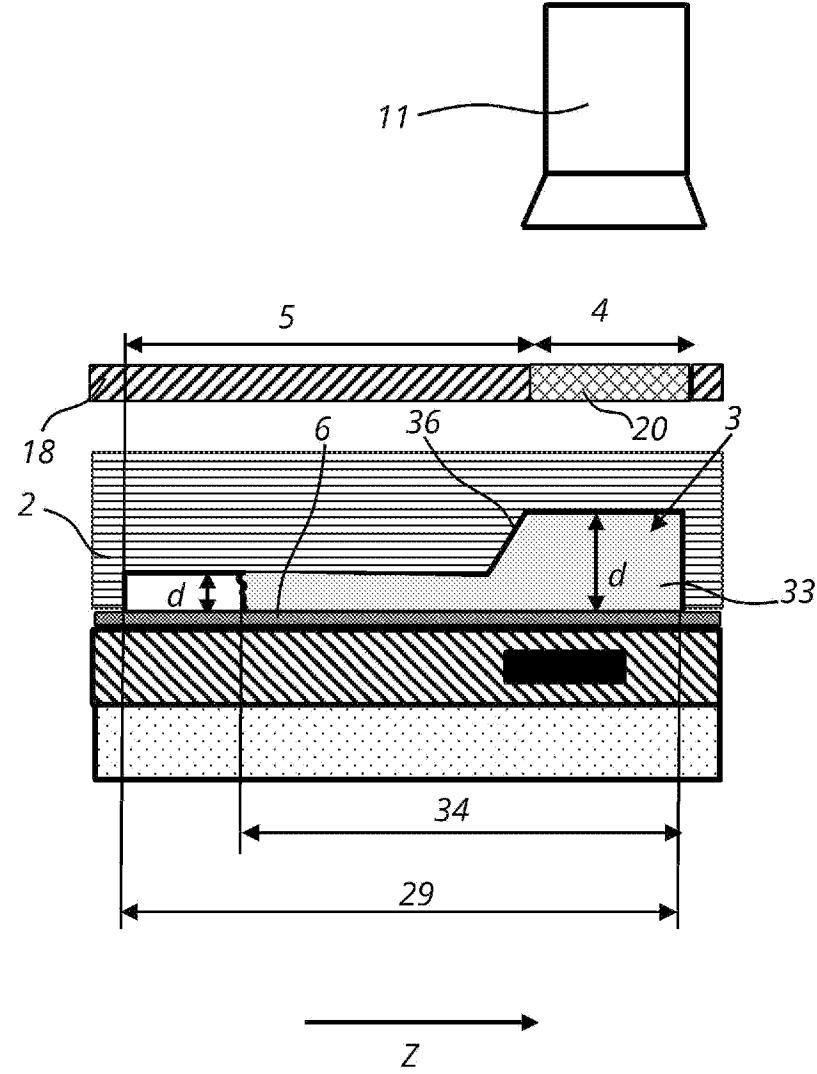


Fig. 10a

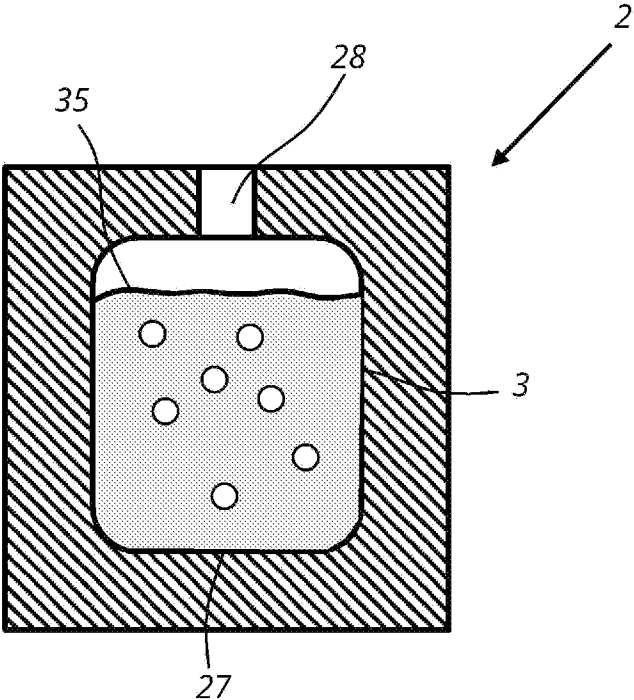


Fig. 10b

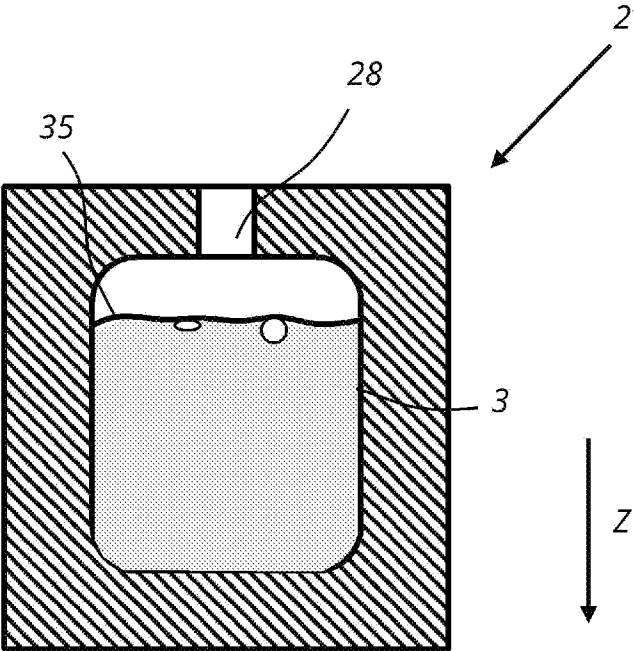


Fig. 11

