(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 602 17 375 T2** 2007.10.18

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 434 880 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **602 17 375.2**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/KR02/01728**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 765 654.5**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2003/025226**
(86) PCT-Anmeldetag: **14.09.2002**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **27.03.2003**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **07.07.2004**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **03.01.2007**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **18.10.2007**

(51) Int Cl.[8]: ***C12Q 1/68*** (2006.01)
B01L 7/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

2001057040	**15.09.2001**	**KR**
2001066943	**30.10.2001**	**KR**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR

(73) Patentinhaber:
Ahram Biosystems Inc., Seoul/Soul, KR

(74) Vertreter:
Patent- und Rechtsanwälte Kraus & Weisert, 80539 München

(72) Erfinder:
HWANG, Hyun Jin, Gangnam-gu, Seoul 135-507, KR; KIM, Jeong Hee, Gangnam-gu, Seoul 135-507, KR; JEONG, Kyunghoon, 503-062 Gwangju, KR

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR AMPLIFIKATION VON NUKLEINSÄURESEQUENZEN MITTELS THERMISCHER KONVEKTION**

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

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

Beschreibung

Technisches Gebiet

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich Allgemein auf Verfahren und Vorrichtungen zur Amplifizierung von Nucleinsäuresequenzen. Sie bezieht sich insbesondere auf Verfahren und Vorrichtungen, die thermische Konvektion nutzen, wobei Temperatur-kontrollierte Amplifikationsverfahren einschließlich der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), und verwandte Verfahren ausgeführt werden können, um Zielnucleinsäuresequenzen von genetischen Proben, die DNA oder RNA enthalten, zu amplifizieren.

Stand der Technik

[0002] Nucleinsäuresequenz-Amplifikations-Technik hat eine breite Anwendung in Biowissenschaft, Gentechnik und medizinischer Wissenschaft für Forschung und Entwicklung und diagnostische Zwecke. Insbesondere wird die Nucleinsäuresequenz-Amplifikations-Technik, die PCR nutzt (hiernach bezeichnet als „PCR-Amplifikations-Technik"), meist in großem Umfang genutzt. Einzelheiten der PCR-Amplifikations-Technik sind in US-Patent Nrn. 4,863,202, 4,683,195, 4,800,159 und 4,965,188 offenbart.

[0003] Zum Beispiel bezieht sich US 5 270 183 A auf ein PCR-Verfahren, das die Injektion eines Reaktionsgemisches in einen Strom von Trägerfluid einschließt, wobei das Trägerfluid dann eine Vielzahl von Temperaturzonen passiert, in denen die Polymerase-Kettenreaktionen stattfinden.

[0004] WO 97/48818 A offenbart außerdem eine Vorrichtung für thermisches Cycling einer DNA-Probe, umfassend (i) einen Träger; (ii) eine Heizeinheit-Anordnung, die an besagten Träger montiert ist, wobei die Anordnung erste und zweite Heizelemente, die erste beziehungsweise zweite Heizkammern definieren, hat, wobei die Kammern angepasst sind, ein Kapillarröhrchen, das sich durch die zwei Heizkammern erstreckt, aufzunehmen und zu kontaktieren; (iii) Mittel zum Aufrechterhalten der Temperaturen der ersten und zweiten Kammer der Heizeinheit-Anordnung für die gewählte erste und zweite erhöhte Temperatur; und (iv) Mittel, um die Probe in dem Röhrchen sukzessive zwischen den zwei Kammern zu bewegen.

[0005] US 5 919 622 A beschreibt darüber hinaus ein System für die Temperatureinstellungsbehandlung von Flüssigkeiten, besonders während der Isolation und Amplifikation von Nucleinsäuren mit einem wiederverwendbaren Thermostatelement und einem Einweg-Heizelement, welches die Durchführung der Probenaufbereitung und Amplifikation in einem einzelnen Gefäß erleichtert.

[0006] Verschiedene Vorrichtungen und Verfahren, die automatisierte PCR-Amplifikationsverfahren einbauen, sind entwickelt und genutzt worden für schnelle und effiziente Amplifikation einer Vielzahl genetischer Proben. Das grundlegende Arbeitsprinzip einer solchen Technik ist wie folgt:
Bei der kommerzialisierten PCR-Amplifikations-Technik wird eine Probe vorbereitet, so dass sie eine zu amplifizierende Matrizen-DNA, ein Paar Oligonucleotidprimer, die zu einer spezifischen Sequenz jedes Einzelstranges der Matrizen-DNA komplementär sind, eine thermostabile DNA-Polymerase und Desoxynucleotidtriphosphate (dNTP) enthält. Ein spezifisches Stück der Nucleinsäuresequenz der Matrizen-DNA wird dann durch Wiederholen eines Temperaturzyklus, der sequentiell die Temperatur der Probe verändert, amplifiziert. Typischerweise besteht der Temperaturzyklus aus drei oder zwei Temperaturschritten und die Amplifikationsprozesse während des Temperaturzyklus ereignen sich auf die folgende Art.

[0007] Der erste Schritt ist ein Denaturierungsschritt, bei dem die Probe auf eine hohe Temperatur erhitzt wird und doppelsträngige DNAs zu einzelsträngigen DNAs aufgetrennt werden. Der zweite Schritt ist der Anlagerungsschritt, bei dem die Probe auf eine niedrige Temperatur gekühlt wird und die einzelsträngigen DNAs, gebildet im ersten Schritt, an die Primer, teilweise doppelsträngige DNA-Primerkomplexe ausbildend, binden. Der letzte Schritt ist der Polymerisationsschritt, bei dem die Probe bei einer geeigneten Temperatur gehalten wird und die Primer in den DNA-Primerkomplexen durch die Funktion der DNA-Polymerase verlängert werden, wobei neue einzelsträngige DNAs, die zu jeder der Matrizen-DNA-Stränge komplementär sind, gebildet werden. Die Zielnucleinsäuresequenzen, die durch die Sequenzen der beiden Primer ausgewählt werden, werden während jedes Zyklus, bestehend aus den obigen drei Schritten, repliziert. Typischerweise können mehrere Millionen oder eine größere Zahl von Kopien der Zielnucleinsäuresequenzen durch Wiederholen der Temperaturzyklen für ungefähr 20- bis 40-mal erzeugt werden.

[0008] Die Temperatur des Denaturierungsschrittes ist typischerweise 90 bis 94°C. Die Temperatur des Anlagerungsschrittes ist entsprechend kontrolliert in Übereinstimmung mit den Schmelztemperaturen (T_m) der

verwendeten Primer und sie liegt typischerweise im Bereich von 35 bis 65°C. Es ist typisch, die Temperatur des Polymerisationsschrittes auf 72°C zu setzen und einen dreistufigen Temperaturzyklus zu verwenden, da die am häufigsten verwendete Taq-DNA-Polymerase (eine thermostabile DNA-Polymerase, extrahiert aus Thermus aquaticus), die optimale Aktivität bei dieser Temperatur hat. Ein zweistufiger Temperaturzyklus, bei dem die Polymerisationstemperatur auf die gleiche wie die Anlagerungstemperatur bzw. Aufschmelztemperatur gesetzt ist, kann auch verwendet werden, da die Taq-DNA-Polymerase einen weiten Temperaturbereich der Polymeraseaktivität hat.

[0009] Bei dem am meisten verwendeten Verfahren wird ein Reaktionsgefäß, das die Probe enthält, mit einem festen Metallblock von hoher thermischer Leitfähigkeit in Kontakt gebracht und die Temperatur des festen Metallblocks wird verändert, indem er mit Heiz- und Kühlvorrichtung kombiniert wird, um das gewünschte Temperatur-Cycling der Probe zu erreichen. Die kommerziellen Produkte, die sich diesen Typ von Verfahren zu eigen machen, verwenden oft einen vergoldeten Silberblock, der eine sehr hohe thermische Leitfähigkeit hat, und/oder die Peltier-Kühlmethode, um schnelle Temperaturänderung zu erreichen. Kürzlich sind Verfahren, die ein Fluid, wie Gas oder Flüssigkeit, als Wärmequelle anstelle des festen Metallblocks verwenden, entwickelt worden, um schnelle Temperaturänderung zu erreichen, und Produkte, die solche Verfahren verwenden, sind kommerzialisiert worden. Bei diesem Typ von Verfahren wird ein Fluid, erhitzt auf eine geeignete Temperatur, um das Reaktionsgefäß zirkuliert auf eine Weise, dass ein effizienter thermischer Kontakt zwischen der Fluid-Wärmequelle und dem Reaktionsgefäß, das die Probe enthält, bereitgestellt werden kann.

[0010] Andere Typen von Verfahren sind auch entwickelt worden, um ein schnelles Temperatur-Cycling zu erreichen. Weitere Beispiele schließen ein Verfahren, bei dem das Reaktionsgefäß, das die Probe enthält, oder die Probe selbst sequentiell mit mehreren Wärmequellen, jede bei einer spezifischen Temperatur, kontaktiert wird, ein Verfahren, bei dem die Probe unmittelbar mit Infrarotstrahlung erhitzt wird, etc., ein.

[0011] Die früheren Nucleinsäuresequenz-Amplifikationsvorrichtungen haben eine Reihe von Nachteilen, da sie funktionieren, indem die Temperatur der gesamten Probe entsprechend des drei- oder zweistufigen Temperaturzyklus verändert wird.

[0012] Erstens, die früheren Nucleinsäuresequenz-Amplifikationsvorrichtungen des Typs des Temperatur-Cyclings sind komplex in ihrer Gestalt, da Prozesse zur Änderung der Probentemperatur notwendig sind. Um solche Temperaturänderungsprozesse durchzuführen, benötigt das Verfahren, das einen festen Metallblock oder ein Fluid als eine Wärmequelle einschließt, ein Mittel zur schnellen und gleichmäßigen Kontrolle und Änderung der Temperatur der Wärmequelle und ebenso ein Mittel zur Kontrolle des Zeitintervalls der Temperaturänderung. Ebenso benötigt das Verfahren, bei dem das Reaktionsgefäß oder die Probe sequentiell mit mehreren Wärmequellen, jede bei einer spezifischen Temperatur, in Kontakt gebracht wird, ein Mittel zur schnellen und präzisen Beförderung des Reaktionsgefäßes oder der Probe und auch ein Mittel zur Kontrolle der Beförderungszeit und des Intervalls.

[0013] Zweitens, es ist schwierig, die früheren Nucleinsäuresequenz-Amplifikationsvorrichtungen in eine komplexe Vorrichtung oder ein miniaturisiertes Gerät zu integrieren, und zwar wegen ihrer komplizierten Bauart. In letzter Zeit sind miniaturisierte komplexe Vorrichtungen im Biotechnologiebereich in der Entwicklung. Zum Beispiel ist Lab-on-a-chip entwickelt worden durch Integration von Kanälen für Probenpassage, Ventilen, Druckmessern, Reaktionsgefäßen, Detektionseinheiten, etc. als eine einzelne Einheit auf einer Glas-, Silikon- oder Polymerplatte unter Verwendung von Photolithographie. Es wird erwartet, dass solche miniaturisierte komplexe Vorrichtungen breite Anwendungen bei mehreren Forschungszwecken und medizinischen Zwecken haben werden. Im Falle, dass eine Nucleinsäuresequenz-Amplifikationsvorrichtung in einen solchen miniaturisierten Chip integriert werden muss, hat das frühere Verfahren einen Nachteil bei der Miniaturisierung, weil es eine komplexe Bauform zur Ermöglichung der Temperaturänderungsprozesse benötigt. Außerdem ist es schwierig, die früheren Vorrichtungen in eine komplexe Apparatur zu integrieren, in welcher schnelle Temperaturänderung nicht erwünscht ist.

[0014] Drittens, die früheren Nucleinsäuresequenz-Amplifikationsvorrichtungen können nur thermostabile DNA-Polymerasen, wie Taq-DNA-Polymerase, verwenden. Dies ist bedingt, weil die früheren Vorrichtungen den Prozess des Erhitzens der gesamten Probe auf eine hohe Temperatur aufweisen.

[0015] Schließlich weisen die früheren Nucleinsäuresequenz-Amplifikationsvorrichtungen eine Grenze bei der Reduzierung der PCR-Reaktionszeit auf. Da die früheren Vorrichtungen die Prozesse zur Änderung der Temperatur der gesamten Probe benötigen, muss die PCR-Reaktionszeit mindestens mehr Zeit brauchen als die Zeit, die für die Temperaturänderung benötigt wird.

Offenbarung der Erfindung

[0016] Die vorliegende Erfindung wurde erfunden, um die obigen Probleme zu lösen. Es ist eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein neues Nucleinsäuresequenz-Amplifikationsverfahren und Vorrichtungen dafür, die auf thermischer Konvektion beruhen, bereitzustellen. Das neue Verfahren und die Vorrichtungen gemäß der vorliegenden Erfindung erreichen eine Amplifikation von Nucleinsäuresequenzen durch Bildung einer Vielzahl von spezifischen Regionen, die unterschiedliche Temperaturen innerhalb der Probe aufweisen und dadurch natürliche thermische Konvektion der Probe verursachen, die als Ergebnis von dem Temperaturgradienten zwischen den unterschiedlichen Regionen auftritt.

[0017] Es ist auch eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren und Vorrichtungen dafür bereitzustellen, die einfacher in ihrer Bauart sind und die keine komplexen Komponenten, wie ein Mittel zur Änderung der Temperatur auf eine kontrollierte Art und Weise und ein Mittel zur Kontrolle des Zeitintervalls der Temperaturänderung, wie sie in den früheren Verfahren und Vorrichtungen zum Temperatur-Cycling erforderlich sind, erfordern.

[0018] Deshalb ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Nucleinsäuresequenz-Amplifikationsverfahren und Vorrichtungen dafür bereitzustellen, die einfacher sind als die des Standes der Technik, so dass sie ohne Weiteres miniaturisiert und somit in komplexe miniaturisierte Vorrichtungen, wie Lab-on-a-chip, integriert werden können.

[0019] Es ist noch eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Nucleinsäuresequenz-Amplifikationsverfahren und Vorrichtungen dafür bereitzustellen, die auf der thermischen Konvektion basieren, bei welcher nicht nur die thermostabilen DNA-Polymerasen, sondern auch nicht-thermostabile DNA-Polymerasen verwendet werden können.

[0020] Es ist noch eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein effizienteres Nucleinsäuresequenz-Amplifikationsverfahren und Vorrichtungen dafür bereitzustellen, die nicht die Temperaturänderungsprozesse erfordern, die im Stand der Technik benötigt werden.

[0021] Weitere Aufgaben und Vorteile der Erfindung werden jenen, die in dem Fachgebiet erfahren sind, durch die folgende detaillierte Beschreibung, Ansprüche und Zeichnungen klar werden.

[0022] Um die obigen Aufgaben zu lösen, stellt die vorliegende Erfindung ein neues Nucleinsäuresequenz-Amplifikationsverfahren und Vorrichtungen dafür, basierend auf dem neuartigen Funktionsprinzip des Typs thermische Konvektion, nachfolgend beschrieben, bereit.

[0023] Um die obige Aufgabe zu lösen, stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Amplifikation einer Nucleinsäuresequenz, das PCR verwendet, bereit, wobei das Verfahren umfasst:
einen Schritt des Einspritzens einer Probe, die eine Matrizen-DNA, die zu amplifizierende Ziel-Nucleinsäuresequenzen hat, DNA-Polymerase, Desoxyadenosintriphosphate, Desoxycytidintriphosphat, Desoxyguanosintriphosphat, Desoxythymidintriphosphat und mindestens zwei Oligonucleotidprimer, die komplementär zu dem 3'-Terminus jeder der Ziel-Nucleinsäuresequenzen sind, enthält, in ein Reaktionsgefäß; und
einen Schritt des Aufrechterhaltens einer spezifischen räumlichen Temperaturverteilung in der Probe durch thermisches Kontaktieren einer Mehrzahl von Wärmequellen, die spezifischen Regionen der Probe Wärme zuführen oder entziehen, so dass eine Region der Probe relativ hoher Temperatur in niedrigerer Höhe als eine Region relativ niedriger Temperatur lokalisiert ist,
wobei die spezifische räumliche Temperaturverteilung spezifische räumliche Regionen umfasst, die jeweils eine Temperaturbedingung erfüllen, die geeignet ist für (i) einen Denaturierungsschritt, in dem doppelsträngige DNAs zu einzelsträngigen DNAs getrennt werden, (ii) einen Anlagerungsschritt, in dem die im dem Denaturierungsschritt gebildeten einzelsträngigen DNAs mit den Primer hybridisieren, um DNA-Primer-Komplexe zu bilden, oder (iii) einen Polymerisationsschritt, in dem die Primer in den DNA-Primer-Komplexen durch die Polymerisationsreaktion verlängert werden,
und wobei die spezifische räumliche Temperaturverteilung eine Temperaturverteilung ist, die Umwälzung der Probe durch thermische Konvektion induziert, so dass die Denaturierungs-, Anlagerungs- bzw. Aufschmelz- und Polymerisationsschritte sequentiell und wiederholt innerhalb der Probe auftreten.

[0024] Um die obigen Aufgaben zu lösen, stellt die vorliegende Erfindung eine Vorrichtung zur Amplifikation einer Nucleinsäuresequenz, die PCR verwendet, bereit, wobei die Vorrichtungen umfasst:
eine Mehrzahl von Wärmequellen, die einer Mehrzahl von spezifischen Regionen einer in einem Reaktionsge-

fäß enthaltenen Probe Wärme zuführen oder entziehen können,
wobei die Wärmequellen angeordnet sind, um eine spezifische räumliche Temperaturverteilung in der Probe aufrechtzuerhalten, so dass eine Region relativ hoher Temperatur in niedrigerer Höhe als eine Region relativ niedriger Temperatur lokalisiert ist,
wobei die spezifische räumliche Temperaturverteilung spezifische räumliche Regionen umfasst, die jeweils eine Temperaturbedingung erfüllen, die geeignet ist für (i) einen Denaturierungsschritt, in dem doppelsträngige DNAs zu einzelsträngigen DNAs getrennt werden, (ii) einen Anlagerungsschritt, in dem die im Denaturierungsschritt gebildeten einzelsträngigen DNAs mit den Primer hybridisieren, um DNA-Primer-Komplexe zu bilden, oder (iii) einen Polymerisationsschritt, in dem die Primer in den DNA-Primer-Komplexen durch die Polymerisationsreaktion verlängert werden, umfasst,
und wobei die spezifische räumliche Temperaturverteilung eine Temperaturverteilung ist, die Umwälzung der Probe durch thermische Konvektion induziert, so dass die Denaturierungs-, Anlagerungs- und Polymerisationsschritte sequentiell und wiederholt innerhalb jeder Probe erfolgen.

[0025] In der vorliegenden Erfindung sind räumliche Regionen innerhalb des Reaktionsgefäßes, das die Probe enthält, erzeugt, in welchen Regionen die Denaturierungs-, Anlagerungs- bzw. Aufschmelz- und Polymerisationsschritte sequentiell und wiederholt erfolgen können. Um dies zu erreichen, sind eine Vielzahl von Wärmequellen kombiniert, um Hitze zuzuführen zu oder Hitze abzuführen von den spezifischen Regionen der Probe, und außerdem ist eine Region relativ hoher Temperatur in niedrigerer Höhe als eine Region relativ niedriger Temperatur lokalisiert. Dies führt zu einer Erzeugung einer natürlichen thermischen Konvektion als Ergebnis des Temperaturgradienten zwischen den spezifischen Regionen, dabei Umwälzung der Probe zwischen den Temperaturregionen herbeiführend, somit können die Denaturierungs-, Anlagerungs- und Polymerisationsschritte sequentiell und wiederholt erfolgen, was zu einer Amplifikation von Nucleinsäuresequenzen führt.

[0026] Wie beschrieben, basieren die Nucleinsäuresequenz-Amplifikationsvorrichtungen der vorliegenden Erfindung auf dem Verfahren der thermischen Konvektion und sie haben die folgenden Merkmale in ihrer Bauart. Erstens benötigt die Vorrichtung der vorliegenden Erfindung eine Mehrzahl von Wärmequellen, die eine Mehrzahl von spezifischen Temperaturregionen in der Probe innerhalb des Reaktionsgefäßes bei den gewählten Temperaturen aufrechterhalten können. Zweitens sollte eine Region relativ hoher Temperatur niedriger in der Höhe positioniert sein als eine Region relativ niedriger Temperatur, um Umwälzung der Probe zwischen den spezifischen Temperaturregionen über thermische Konvektion zu induzieren. Etwas spezieller, die Probe in der Region hoher Temperatur hat eine geringere Dichte als die in der Region niedriger Temperatur. Somit wird Auftrieb erzeugt und dieser veranlasst die Probe, sich von der Region hoher Temperatur in der niedrigeren Position zu der Region niedriger Temperatur in der höheren Position zu bewegen, wobei die Schwerkraft die Probe dazu veranlasst, sich in die entgegen gesetzte Richtung zu bewegen. Eine natürliche thermische Konvektion ist somit durch den Temperaturunterschied erzeugt, was zu einer Umwälzung der Probe zwischen den spezifischen Temperaturregionen führt. Schließlich sollten die Temperaturen der spezifischen Temperaturregionen derart gewählt werden, dass räumliche Regionen, in denen die Denaturierungs-, Anlagerungs- bzw. Aufschmelz- und Polymerisationsschritte in jeder Region erfolgen können, in der Probe gebildet werden können. und auch die drei Schritte sequentiell und wiederholt durch thermische Konvektion induzierte Umwälzung der Probe zwischen den spezifischen Temperaturregionen bei einer angemessenen Geschwindigkeit durchgeführt werden können.

[0027] Die oben beschriebenen Aufgaben, Merkmale und Vorteile werden durch die folgende detaillierte Beschreibung offensichtlich, die in Verbindung mit den angefügten Zeichnungen zur Verfügung gestellt wird. Beim Beschreiben der vorliegenden Erfindung wird eine detaillierte Erläuterung des relevanten Stands der Technik weggelassen, wenn sie die Punkte der vorliegenden Erfindung unnötig mehrdeutig machen kann.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0028] Fig. 1 zeigt eine schematische Darstellung des Funktionsprinzips des Verfahrens zur Amplifikation einer Nucleinsäuresequenz, das auf thermischer Konvektion basiert.

[0029] Fig. 2a und Fig. 2b zeigen schematische Darstellungen der Fälle, die mehr als drei spezifische Temperaturregionen in der Probe aufweisen.

[0030] Fig. 3a und Fig. 3b zeigen eine Querschnittsdarstellung bzw. eine perspektivische Darstellung der Vorrichtung zur Amplifikation einer Nucleinsäuresequenz gemäß der vorliegenden Erfindung.

[0031] Fig. 4 zeigt die Temperaturverteilung der Probe bei verschiedenen Höhen in dem Reaktionsgefäß.

[0032] Fig. 5 ist eine Photographie des Elektrophoreseergebnisses, das die Ergebnisse von Beispiel 1 bei unterschiedlichen Reaktionszeiten darstellt.

[0033] Fig. 6 ist eine Photographie des Elektrophoreseergebnisses, das die Ergebnisse von Beispiel 2 für jedes der Primerpaare darstellt

[0034] Fig. 7 ist eine Photographie des Elektrophoreseergebnisses, das die Ergebnisse von Beispiel 3 bei unterschiedlichen Reaktionszeiten darstellt.

[0035] Erklärung der Bezugszeichen der wichtigen Teile in den Zeichnungen:

Bezugszeichenliste

1,1'	Region hoher Temperatur
2,2'	Region niedriger Temperatur
3, 4, 3',4'	Wärmequelle
5	Konvektionsregion
6	Reaktionsgefäß
101	Erster Leitungsblock
102	Zweiter Leitungsblock
103	Reaktionsgefäß
104	Heizvorrichtung
105	Einlass von Temperaturkontrollfluid
106	Auslass von Temperaturkontrollfluid
107	Isolator
112, 117	Durchgangsloch
111	Öffnung

Beste Art zur Durchführung der Erfindung

[0036] Nachfolgend sind die bevorzugten Ausführungsformen entsprechend der vorliegenden Erfindung detailliert unter Bezugnahme auf die beigefügten Zeichnungen erklärt.

[0037] Fig. 1 zeigt ein schematisches Schaubild des Funktionsprinzips des Nucleinsäuresequenz-Amplifikationsverfahrens, das auf thermische Konvektion beruht. Die in Fig. 1 gezeigte Ausführungsform zeigt beispielhaft den Fall, in dem ein gerades Rohr mit seinem einen Ende geschlossen als Reaktionsgefäß verwendet wird und zwei spezifische Temperaturregionen **1** und **2** erzeugt werden. Wie jedoch in den Ausführungsformen, die in **Fig.** 2 dargestellt sind, gezeigt ist, können Reaktionsgefäße, die modifizierte Formen haben, genutzt werden und drei oder mehr spezifische Temperaturregionen können erzeugt werden. Es sollte den Fachleuten ersichtlich sein, dass verschiedene Modifikationen einschließlich dieser wie oben beschrieben, die auf dem thermischen Konvektions-Funktionsprinzip des Nucleinsäuresequenz-Amplifikationsverfahrens entsprechend der vorliegenden Erfindung beruhen, in Betracht gezogen werden können.

[0038] In einer Ausführungsform, wie in Fig. 1 gezeigt, ist das Reaktionsgefäß in thermischem Kontakt mit zwei Wärmequellen **3** und **4**, die Hitze zuführen zu oder Hitze entfernen von den spezifischen Regionen **1** und **2** in der Probe, direkt oder indirekt durch die Wand des Reaktionsgefäßes, wobei eine räumliche Temperaturverteilung in der Probe erzeugt wird. Die somit gebildete Temperaturverteilung erlaubt drei Schritte, die Denaturierungs-, Anlagerungs- und Polymerisationsschritte, die zum Stattfinden der PCR erforderlich sind. Unter den zwei Regionen **1** und **2** mit unterschiedlichen Temperaturen ist die Region **1** relativ hoher Temperatur in niedrigerer Höhe als die Region **2** relativ niedriger Temperatur positioniert. Der Temperaturunterschied erzeugt einen Dichteunterschied in der Probe. Der Auftrieb, der auf die Probe niedriger Dichte in der Region **1** hoher Temperatur wirkt, und die Schwerkraft, die auf die Probe hoher Dichte in der Region **2** niedriger Temperatur wirkt, erzeugen eine thermische Konvektion der Probe. Somit zirkuliert die Probe natürlich zwischen den unterschiedlichen räumlichen Regionen, in denen jeweils die Denaturierungs-, Anlagerungs- bzw. Aufschmelz- und Polymerisationsschritte erfolgen können. Diese Bauart macht, dass die drei PCR-Schritte sequentiell und wiederholt erfolgen, um dabei Amplifikation von DNA-Nucleinsäuresequenzen durch den PCR-Prozess zu erreichen. Eine detailliertere Arbeitsweise ist nachstehend beispielhaft beschrieben.

[0039] Die Region **1** hoher Temperatur, die in einem niedrigeren Bereich der Probe lokalisiert ist, kann z.B. bei einer Temperatur zwischen 90 bis 94°C, bei welcher Temperatur doppelsträngige DNAs in einzelsträngige

DNAs getrennt werden können, gehalten werden. Solch eine Einstellung bewirkt, dass der Denaturierungsschritt vorwiegend in der Region **1** erfolgt. Die Region **2** niedriger Temperatur kann bei der Anlagerungstemperatur zwischen 35 bis 65°C gehalten werden, so dass sich die DNAs, die in der Region hoher Temperatur in niedrigerem Bereich denaturierten, zu der Region niedrigerer Temperatur im oberen Bereich durch thermische Konvektion bewegen, und infolgedessen die einzelsträngigen DNAs an die Primer, die komplementär zu den einzelsträngigen DNAs sind, anlagern können und DNA-Primer-Komplexe bilden. Bei dieser Einstellung kann, wenn Taq-DNA-Polymerase, die für ihre optimale Aktivität bei 72°C und für einen breiten Temperaturbereich der Aktivität sogar bis niedriger Temperatur bekannt ist, für die Polymerisation verwendet wird, der Polymerisationsschritt, wo die DNA-Polymerase an den DNA-Primer-Komplex bindet und der Primer verlängert wird, in der Region **2** niedriger Temperatur und im oberen Bereich der Konvektionsregion **5** erfolgen. Folglich erfolgt der Denaturierungsschritt erst in der Region **1** hoher Temperatur und die denaturierten DNAs bewegen sich durch thermische Konvektion zu der Region **2** niedriger Temperatur. Der Anlagerungsschritt erfolgt folglich in der Region niedriger Temperatur in der Gegenwart der Primer. Der Polymerisationsschritt erfolgt schließlich in Gegenwart der DNA-Polymerase während der Zeitspanne, in der die im Anlagerungsschritt gebildeten DNA-Primer-Komplexe durch thermische Konvektion durch die Region **2** niedriger Temperatur und die Konvektionsregion **5** wandern. Folglich können die Denaturierungs-, Anlagerungs- und Polymerisationsschritte sequentiell und wiederholt erfolgen, wobei auf diese Weise die Zielsequenzen der Proben-DNA effizient amplifiziert werden.

[0040] In anderen Ausführungsformen, wie in **Fig.** 2 gezeigt, ist beabsichtigt, dass drei spezifische Regionen des Reaktionsgefäßes mit einer Vielzahl von Wärmequellen in thermischem Kontakt stehen. Fig. 2a zeigt eine schematische Darstellung, die eine Ausführungsform veranschaulicht, in der eine Vielzahl von Wärmequellen **3**, **3'** und **4** angeordnet sind, um zwei Regionen **1** und **1'** hoher Temperatur und eine Region **2** niedriger Temperatur zu bilden. Fig. 2b zeigt eine schematische Darstellung, die eine andere Ausführungsform veranschaulicht, in der eine Vielzahl von Wärmequellen **3**, **4** und **4'** angeordnet sind, um eine Region **1** hoher Temperatur und zwei Regionen **2** und **2'** niedriger Temperatur zu bilden. Die Vielzahl der hierin verwendeten Wärmequellen kann für jede Temperaturregion separat angeordnet sein oder eine gleiche Wärmequelle kann für mehr als eine Temperaturregion verwendet werden. In der Ausführungsform, die in Fig. 2a veranschaulicht ist, sollte, wenn die zwei Regionen **1** und **1'** hoher Temperatur für die Denaturierungs- bzw. Polymerisationsschritte entworfen sind, jede Region mit einer Wärmequelle, die die Temperatur von der Region aufrechterhalten kann, die für jeden Schritt geeignet ist, in Kontakt stehen. In der Ausführungsform, die in Fig. 2b veranschaulicht ist, ist es, wenn beide der zwei Regionen **2** und **2'** niedriger Temperatur für den Anlagerungsschritt konzipiert sind, vorzuziehen, eine Wärmequelle als Ersatz der zwei Wärmequellen **4** und **4'** zu verwenden. Außerdem zeigt Fig. 2b, dass es entsprechend der vorliegenden Erfindung möglich ist, ein Reaktionsgefäß zu konstruieren, das einen separaten Probeneinlass und -auslass hat.

[0041] Um die Effizienz der vorliegenden Erfindung zu verbessern, ist es wichtig, die Geschwindigkeit der thermischen Konvektion zu kontrollieren, so dass die Reaktion bei jedem Schritt ausreichend erfolgen kann und gleichzeitig die gesamte Reaktionszeit reduziert werden kann. Dies kann erreicht werden durch (a) Kontrolle des Temperaturgradienten zwischen den spezifischen Temperaturregionen, (b) Kontrolle des Durchmessers des Reaktionsgefäßes oder (c) Änderung des Materials des Reaktionsgefäßes. Wenn der Temperaturgradient kontrolliert wird, um die Geschwindigkeit der thermischen Konvektion einzustellen, ist es am zweckmäßigsten, die Temperatur zwischen den spezifischen Temperaturregionen zu variieren. Dies hat jedoch eine Grenze, da jede der spezifischen Temperaturregionen ihre eigene Funktion für die PCR, die von der Temperatur abhängig ist, hat. Folglich kann der Abstand zwischen der Region hoher Temperatur (**1** und **1'**) und der Region niedriger Temperatur (**2** und **2'**) variiert werden, um den gleichen Effekt zu erhalten. Zum Beispiel wird der Temperaturgradient kleiner, ebenso wie der Abstand zwischen den zwei Temperaturregionen größer wird, wenn die Temperaturdifferenz die gleiche bleibt und somit die Geschwindigkeit der thermischen Konvektion reduziert wird. Da die Adhäsionskraft zwischen der Wand des Reaktionsgefäßes und der Probe ein Faktor ist, der die thermische Konvektion inhibiert, kann die Geschwindigkeit der thermischen Konvektion durch die Einstellung des Durchmessers des Reaktionsgefäßes kontrolliert werden. Wie das Verhältnis von der Oberfläche des Reaktionsgefäßes, das in Kontakt mit der Probe ist, relativ zu dem Volumen der Probe größer wird, nimmt die Adhäsionskraft zu und die Geschwindigkeit der thermischen Konvektion ab. Folglich kann die Geschwindigkeit der thermischen Konvektion durch Einstellung des Durchmessers des Reaktionsgefäßes kontrolliert werden, wodurch die Oberfläche des Reaktionsgefäßes, die mit der Probe in Kontakt steht, kontrolliert wird. Die Adhäsionskraft zwischen der Probe und der Wand des Reaktionsgefäßes hat auch eine enge Beziehung zu dem Material des Reaktionsgefäßes. Weil der PCR-Prozess normalerweise in wässriger Lösung durchgeführt wird, verursachen hydrophobe Materialien, wie Polyethylen und Polypropylen, die eine schwächere Adhäsionskraft mit Wasser haben, höhere Geschwindigkeiten der Konvektion verglichen mit hydrophilen Materialien wie Glas. Daher kann die Effizienz der vorliegenden Erfindung ferner durch Gestaltung des Reaktionsge-

fäßes, das für die PCR-Reaktionskinetik geeignet ist, basierend auf den oben beschriebenen Grundsätzen, verbessert werden.

[0042] **Fig.** 3 zeigt ein Querschnittsbild (Fig. 3a) und eine perspektivische Ansicht (Fig. 3b) der Vorrichtung zur Amplifikation einer Nucleinsäuresequenz, entsprechend einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung. Der in **Fig.** 3 gezeigte Vorrichtung umfasst eine Vielzahl von Wärmequellen, als Mittel zur Aufrechterhaltung der Temperatur, welche eine Heizeinheit, eine Kühleinheit oder eine Kombination von Heizeinheit und Kühleinheit einschließen. Vorzugsweise kann ein Isoliermittel zwischen den Wärmequellen enthalten sein, um die Wärmequellen thermisch zu isolieren. In dieser bestimmten Ausführungsform umfasst die Vorrichtung eine erste und zweite Wärmequelle, die in thermischem Kontakt mit spezifischen Regionen der Probe stehen. Die erste Wärmequelle besteht aus einem ersten wärmeleitfähigen Block **101** und einer elektrischen Heizeinheit **104**, die dem ersten wärmeleitfähigen Block Wärme zuführt. Der erste wärmeleitfähige Block ist in thermischem Kontakt mit einem niedrigeren Bereich des Reaktionsgefäßes, um eine Region hoher Temperatur in einem niedrigeren Bereich der Probe zu bilden. Die zweite Wärmequelle umfasst einen zweiten wärmeleitfähigen Block **102** bzw. ein Umwälz-Wasserbad, das Wasser einer bestimmten Temperatur durch das Innere des zweiten wärmeleitfähigen Blocks umwälzt, um die Temperatur des zweiten wärmeleitfähigen Blocks bei einer geeigneten Temperatur aufrechtzuerhalten. Der zweite wärmeleitfähige Block **102** ist mit einem oberen Bereich des Reaktionsgefäßes in thermischem Kontakt, um eine Region niedrigerer Temperatur in einem oberen Bereich der Probe zu bilden. Der zweite thermische Leitungsblock **102** umfasst einen Einlass **105**, durch den Wasser aus dem Wasserbad einfließt, einen Auslass **106**, durch den das Wasser ausfließt, und einen Fluidzirkulationskanal für die Umwälzung des Wassers innerhalb des zweiten wärmeleitfähigen Blocks. Obwohl der Fluidumwälzkanal in dem zweiten wärmeleitfähigen Block nicht in **Fig.** 3 dargestellt ist, kann die auf dem Fachgebiet erfahrene Person verstehen, dass der Fluidumwälzungskanal konzipiert ist, um Wärme gleichmäßig zu dem zweiten wärmeleitfähigen Block **102** zu transferieren. Als Material wurde für die wärmeleitfähigen Blöcke **101** und **102** Kupfer ausgewählt, das eine hohe thermische Leitfähigkeit hat, und ein Isolator **107** ist zwischen den zwei Blöcken eingefügt, um direkten Wärmetransfer zu verhindern. Die ersten und zweiten wärmeleitfähigen Blöcke **101** und **102** haben Aufnahmeöffnungen zur Einführung der Reaktionsgefäße. Die Aufnahmeöffnung umfasst eine Öffnung **111** mit einem geschlossenen Ende nahe des ersten wärmeleitfähigen Blocks **101**, ein Durchgangsloch **112** in dem zweiten wärmeleitfähigen Block und ein weiteres Durchgangsloch **117** in dem Isolator.

[0043] In den später beschriebenen Beispielen 1, 2 und 3 wird die Region hoher Temperatur in einem niedrigeren Bereich der Probe bei 94°C durch Kontrolle der elektrischen Heizeinheit **104** und die Region niedriger Temperatur in dem oberen Bereich der Probe bei 45°C durch Kontrolle der Temperatur des Wassers in dem Umwälz-Wasserbad gehalten.

[0044] Die vorliegende Erfindung ist nicht auf die Nucleinsäuresequenz-Amplifikationsvorrichtung, die in **Fig.** 3 gezeigt ist, beschränkt. Die folgenden Modifikationen sind möglich.

[0045] Erstens können die Strukturen der wärmeleitfähigen Blöcke **101** und **102** modifiziert werden. Zum Beispiel kann der erste wärmeleitfähige Block **101** mit einem niedrigeren Bereich des Reaktionsgefäß kontaktiert werden und der zweite wärmeleitfähige Block **102** mit einem höheren Bereich des Reaktionsgefäßes, während ein dazwischen liegender Bereich des Reaktionsgefäßes mit Luft oder einem dritten wärmeleitfähigen Block kontaktiert werden kann. Außerdem können, unterschiedlich von der Ausführungsform, die in **Fig.** 3 gezeigt ist, bei der Wärme von den Blöcken zu den spezifischen Regionen der Probe durch die Wand des Reaktionsgefäßes transferiert wird, die wärmeleitfähigen Blöcke in unmittelbarem Kontakt mit der Probe stehen.

[0046] Zweitens kann das Material der wärmeleitfähigen Blöcke modifiziert werden. In der Ausführungsform, die in **Fig.** 3 gezeigt ist, werden die wärmeleitfähigen Blöcke **101** und **102**, die aus Kupfer gemacht sind, verwendet, aber das Material ist nicht auf Kupfer beschränkt. Nahezu jedes Material, das Wärme zu dem Reaktionsgefäß transferieren kann, kann verwendet werden. Zum Beispiel kann ein anderer wärmeleitfähiger Feststoff oder ein wärmeleitfähiges Fluid, wie Flüssigkeit oder Gas, anstelle der wärmeleitfähigen Blöcke, die oben verwendet werden, verwendet werden. In manchem Beispiel können Infrarotstrahlung oder andere Mittel als Ergänzung für einige oder alle der wärmeleitfähigen Blöcke **101** und **102** verwendet werden.

[0047] Drittens sind die Mittel zur Aufrechterhaltung der Temperaturen der ersten und zweiten wärmeleitfähigen Blöcke nicht auf ein Umwälz-Wasserbad oder eine elektrische Heizeinheit beschränkt. Nahezu jede Einheit, die Hitze zuführen zu, Hitze abführen von der Probe kann, kann verwendet werden.

[0048] Viertens kann nahezu jedes Mittel, wie Feststoff, Flüssigkeit oder Gas, als Ersatz für den Isolator **107**,

der in **Fig.** 3 gezeigt ist, verwendet werden, soweit es geeignet ist, Wärmetransfer zwischen den leitenden Materialien zu isolieren. Es ist auch möglich, einen Aufbau zu verwenden, der keinen Isolator einschließt.

[0049] Wenn schließlich ein modifiziertes Reaktionsgefäß (zum Beispiel diese, die in Fig. 2a oder Fig. 2b gezeigt sind) anstelle des Reaktionsgefäßes, das in Fig. 1 dargestellt ist, zur Erleichterung der thermischen Konvektion verwendet wird, kann man eine Vielzahl von Wärmequellen, die wärmeleitfähigen Blöcke und ihre Modifikationen, die, basierend auf dem Prinzip der folgenden Erfindung, geeignet modifiziert sind, verwenden.

[0050] Der erste, zweite und dritte oben beschriebene Fall sind Beispiele, in denen ein Teil der Wärmequellen, insbesondere der wärmeleitfähige Block, modifiziert ist. Wie hierin verwendet, bezieht sich die Wärmequelle auf jedes Mittel, das zur Aufrechterhaltung der Temperatur der Probe bei einem spezifischen Wert verwendet werden kann. Deshalb kann zusätzlich zu den oben beschriebenen Modifikationsbeispielen der Wärmequellen jede Einrichtung als Wärmequelle in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, soweit sie zum Halten einer spezifischen Region der Probe bei einer gewählten Temperatur verwendet werden kann. Die vorliegende Erfindung schließt nahezu jede Vorrichtung ein, die eine Funktion zum Halten spezifischer Regionen der Probe bei gewählten Temperaturen hat. Das ist, weil die vorliegende Erfindung nicht durch eine besondere Bauart der Wärmequellen charakterisiert ist, sondern durch die spezielle Anordnung der Wärmequellen, die dazu bestimmt sind, eine spezifische Temperaturverteilung innerhalb der Probe zu erzeugen, die es ermöglicht, dass der PCR-Prozess sequentiell und wiederholt erfolgt.

[0051] Detailliertere Konzepte der oben beschriebenen Modifikationsbeispiele können, abhängig von der Entwicklung von Industrietechnologien, variiert werden. Daher sind detaillierte Erklärungen ausgelassen.

[0052] Fig. 4 zeigt eine Temperaturverteilung, die in verschiedenen Höhen ab dem Boden des Reaktionsgefäßes gemessen wurden, was das Prinzip des PCR-Prozesses, basierend auf thermischer Konvektion, veranschaulicht. Die thermische Konvektion ist ein Phänomen, bei dem eine Bewegung eines Fluids durch einen Dichteunterschied, der durch Unterschiede in der Temperatur erzeugt ist, induziert wird. Diese Art von Konvektion ist auf eine natürliche Konvektion zurückzuführen, die sich von einer erzwungenen Konvektion, wo ein Fluid durch eine Pumpe oder einen Propeller zur Bewegung gezwungen wird, unterscheidet. Der Begriff Konvektion, wie er in der vorliegenden Erfindung verwendet wird, bezieht sich immer auf natürliche Konvektion. Damit eine natürliche Konvektion in dem Reaktionsgefäß auftritt, sollte ein niedrigerer Teil der Probe in dem Reaktionsgefäß eine höhere Temperatur haben als ein oberer Teil.

[0053] Wie in Fig. 4 gesehen werden kann, wird, wenn der erste wärmeleitfähige Block **101** in Kontakt mit einem niedrigeren Bereich des Reaktionsgefäßes bei 96°C gehalten wird, und der zweite wärmeleitfähige Block **102** in Kontakt mit einem oberen Bereich bei 45°C gehalten wird, die Region hoher Temperatur (die Region mit der Temperatur höher als oder gleich 90°C in Fig. 4), die Region niedriger Temperatur (die Region mit der Temperatur nahe 50°C) und die Konvektionsregion (die Region, die einen Temperaturgradienten aufweist) gebildet. Die Probe wird dem Denaturierungsschritt in der Region hoher Temperatur unterzogen. Die denaturierte Probe bewegt sich dann zu der Region niedriger Temperatur mitten durch die Konvektionsregion, in welcher die Probe dem Anlagerungsschritt unterzogen wird. Während des Aufenthalts in der Region niedriger Temperatur und der Bewegung zurück durch die Konvektionsregion aus der Region niedriger Temperatur wird die Probe dem Polymerisationsschritt unterzogen. Thermische Konvektion verursacht eine sequentielle und wiederholte Umwälzung der Probe durch die drei Regionen, dabei zu Amplifikation von Nucleinsäuresequenzen durch PCR führend.

[0054] Fig. 7 zeigt die Ergebnisse, die durch DNA-Polymerase, die auf der festen Oberfläche immobilisiert ist, erhalten wurden. Der Begriff „immobilisierte DNA-Polymerase", wie er hierin verwendet wird, meint eine DNA-Polymerase, die auf einem festen Träger immobilisiert ist, wobei ihre Polymeraseaktivität erhalten bleibt. Verschiedene Verfahren können verwendet werden, um die immobilisierte DNA-Polymerase zu präparieren, aber es sollte eine immobilisierte DNA-Polymerase bereitgestellt werden, die eine ausreichend hohe Polymeraseaktivität hat, so dass sie eine Detektion von Nucleinsäuresequenzen, die durch PCR der Matrizen-DNAs amplifiziert wurden, ermöglicht. Die immobilisierte DNA-Polymerase, die in den Beispielen der vorliegenden Erfindung verwendet wurde, wurde präpariert, um eine hohe Polymeraseaktivität unter Verwendung eines Verfahrens, bei dem die aktive Stelle der DNA-Polymerase durch ein DNA-Substrat maskiert war und auf einer Au-Oberfläche durch covalente Bindung immobilisiert war, zu erhalten. Das detaillierte Vorgehen des Immobilisierungsverfahrens ist in dem Beispiel beschrieben. Die Polymeraseaktivität des durch dieses Verfahren präparierten immobilisierten Enzyms war hoch genug (ungefähr 60 bis 80% im Vergleich zu der in der Lösungsphase-DNA-Polymerase), um sie zur PCR zu verwenden. Die immobilisierte DNA-Polymerase, die mit der vorliegenden Erfindung verwendet werden kann, ist jedoch nicht auf solche beschränkt, die durch das Verfahren,

das in dem Beispiel der vorliegenden Erfindung verwendet wurde, präpariert wurden, sondern schließt solche ein, die durch andere Verfahren präpariert wurden.

[0055] In dem Verfahren zur Amplifikation einer Nucleinsäuresequenz des Typs der thermischen Konvektion entsprechend zu der vorliegenden Erfindung können DNA-Polymerasen, die nicht thermostabil sind, wie Klenow-Fragment und T7-DNA-Polymerase, zusätzlich zu den thermostabilen Polymerasen, wie Taq-DNA-Polymerase, verwendet werden. Dies ist durch die folgende Tatsache bedingt. Aufgrund der Merkmale der vorliegenden Erfindung ändert sich die Temperatur der gesamten Probe nicht wiederholt von einer hohen Temperatur zu einer niedrigen Temperatur oder umgekehrt, sondern die spezifischen Regionen in der Probe werden bei konstanten Temperaturen gehalten. Zum Beispiel kann ein oberer Teil der Probe bei einer niedrigen Temperatur gehalten werden, wohingegen ein niedrigerer Teil der Probe bei einer hohen Temperatur gehalten werden kann. Es ist möglich, DNA-Polymerase, die nicht thermostabil ist, zu verwenden, durch Lokalisierung der immobilisierten DNA-Polymerase in der Region niedriger Temperatur oder in dem oberen Bereich der Konvektionsregion nahe der Region niedriger Temperatur.

[0056] Die unten beschriebenen Beispiele 1, 2 und 3 bestätigen, dass die Aufgaben der vorliegenden Erfindung unter Verwendung einer Vorrichtung zur Amplifikation einer Nucleinsäuresequenz der vorliegenden Erfindung gelöst werden können.

Beispiel 1.

1. Verfahren

1.1. Reaktionsgefäß

[0057] Ein Glasröhrchen mit einem geschlossenen Ende wurde als Reaktionsgefäß verwendet. Das Glasröhrchen hat eine Länge von 55 ~ 60 mm, einen Innendurchmesser von 2 mm, einen Außendurchmesser von 8 mm und eine Dicke von 3 mm am bodenseitigen geschlossenen Ende. Die innere Wand des Glasröhrchens war mit Polytetrafluorethylen unter Verwendung eines Beschichtungsmaterials vom Spraytyp beschichtet worden und thermisch gehärtet.

1.2. Probe

[0058] pBluescript II KS(+) wurde als Matrizen-DNA verwendet. Die in der PCR verwendete Probe enthielt 40 ng der Matrizen-DNA, jeweils 40 pmol T3-Primer (5'-ATTAACCCTCACTAAAG-3')(SEQ ID NO: 1) und T7-Primer (5'-AATACGACTCACTATAG-3')(SEQ ID NO: 2), 4 nmol dNTP, 1 pmol (5 U) Tag-DNA-Polymerase und 250 nmol $MgCl_2$ in 100 µl 10 mM Tris-Puffer mit pH 8,3, der 50 mM KCl enthält.

1.3. Reaktionstemperatur und Reaktionszeit

[0059] Erstens, der erste wärmeleitfähige Block **101** wurde mit einer elektrischen Heizeinheit geheizt und bei 96°C gehalten und der zweite wärmeleitfähige Block **102** wurde bei 45°C unter Verwendung eines Umwälz-Wasserbades gehalten. Die oben vorbereitete Probe wurde in das Reaktionsgefäß eingespritzt und das Reaktionsgefäß wurde dann in die Aufnahmeöffnung **111**, **117** und **112** eingesetzt. Die Probe wurde für eine geeignete Zeit reagieren gelassen. Während der Reaktion wurde das Reaktionsgefäß mit ungefähr 1,2 atm durch Zuführung von Stickstoffgas unter Druck gesetzt, um ein Sieden der Probenlösung zu verhindern.

1.4. Messung der Temperaturverteilung in der Probe

[0060] Die Temperatur in jeder Region der Probe wurde unter den obigen Reaktionsbedingungen gemessen. Die Spitze des Doppeltherinoelements wurde alle 2,5 mm von dem Boden des Reaktionsgefäßes platziert und die Temperatur wurde gemessen und nach ausreichender Zeit aufgezeichnet. Ein Beispiel der Temperaturverteilung der Probe in dem Reaktionsgefäß ist in **Fig. 4** gezeigt.

2. Ergebnisse

[0061] Erstens, die gemessene Temperatur in jeder Region der Probe in dem Reaktionsgefäß unter den obigen Reaktionsbedingungen (siehe **Fig. 4**) bestätigte, dass eine Region hoher Temperatur oberhalb 90°C für Denaturierung, eine Temperatur niedriger Temperatur um die 50°C für Anlagerung und eine Konvektionsregion, die einen Temperaturgradienten aufweist, für Induktion der thermalen Konvektion, gebildet wurden. Es wur-

de erwartet, dass Polymerisation in der Region niedriger Temperatur und dem oberen Bereich der Konvektionsregion auftritt.

[0062] Nachdem die Probe für eine gegebene Reaktionszeit unter den obigen Reaktionsbedingungen inkubiert worden war, wurde das Reaktionsgefäß herausgenommen und gekühlt. Die Reaktionsprodukte wurden durch Elektrophorese unter Verwendung eines 1,0% Agarosegels analysiert. Fig. 5 ist eine Photographie der Elektrophoreseergebnisse, die bei den Reaktionszeiten bis zu 4 Stunden für Zeitintervalle von je 30 min erhalten wurden. Das Reaktionsprodukt ist eine 164 Basenpaare-doppelsträngige DNA. Wie in Fig. 5 gesehen werden kann, erreicht die PCR-Reaktion eine Sättigung vor 90 min.

Beispiel 2.

1. Verfahren

[0063] Zusätzlich zu de T3/T7-Primerpaar wurden auch KS/U-, KS/Pvu II- und KS/Nae I-Primerpaare in den Experimenten untersucht. Die Reaktionszeit wurde auf 150 min gesetzt und die anderen Reaktionsbedingungen waren die gleichen wie in Beispiel 1. Die Sequenzen der T3- und T7-Primer wurden in Beispiel 1 beschrieben und die Sequenzen der anderen Primer sind angegeben wie folgt:
KS-Primer: 5'-CGAGGTCGACGGTATCG-3' (SEQ ID NO: 3)
U-Primer: 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3' (SEQ ID NO: 4)
Pvu II-Primer: 5'-TGGCGAAAGGGGGATGT-3' (SEQ ID NO: 5)
Nae I-Primer: 5'-GGCGAACGTGGCGAGAA-3' (SEQ ID NO: 6)

2. Ergebnisse

[0064] Wie in Beispiel 1 wurden die Reaktionsprodukte durch Elektrophorese analysiert.

[0065] Fig. 6 ist eine Photographie der Elektrophoreseergebnisse von Beispiel 2, wo die Bahnen **1**, **2**, **3** und **4** die Ergebnisse sind, die mit den Primerpaaren T3/T7, KS/U, KS/Pvu II bzw. KS/Nae I erhalten wurden. Es kann gesehen werden, dass die vier Primerpaare doppelsträngige DNAs mit richtigen Größen von entsprechend 164 bp, 144 bp, 213 bp bzw. 413 bp produzierten.

Beispiel 3.

1. Verfahren

[0066] Anstelle der Zugabe von Taq-DNA-Polymerase zu der Probe wurde Taq-DNA-Polymerase auf der Oberfläche eines Au-Drahtes immobilisiert und sie wurde in der Region niedriger Temperatur lokalisiert. Die anderen experimentellen Bedingungen waren die gleichen wie in Beispiel 1.

[0067] Das Verfahren, das zur Immobilisierung der DNA-Polymerase verwendet wurde, ist nachstehend beschrieben.

[0068] Die 65 Basen-Einzelstrang-DNA und der KS-Primer, die nachstehend gezeigt sind, wurden im Molverhältnis 1:1 in einem pH 8,3-Phosphatpuffer gemischt. Die erhaltene Lösung wurde bei 94°C für 10 min inkubiert und dann langsam unter 35°C abgekühlt. Während dieses Vorganges lagerten sich die 65 Basen-Einzelstrang-DNA und der KS-Primer aneinander, um eine teilweise doppelsträngige DNA zu bilden. Dann wurde eine angemessene Molzahl von Taq-DNA-Polymerase (Ampli Taq Gold), bezogen von Perkin Elmer (USA) zu dieser Lösung zugegeben und die resultierende Mischung wurde in einem Trockenbad bei 72°C für 10 min inkubiert. Dann wurde die Mischung zu einem Trockenbad mit 50°C überführt und für 20 min inkubiert, um die Präparation einer maskierten DNA-Polymerase, bei welcher die teilweise doppelsträngige DNA an die aktive Stelle der DNA-Polymerase gebunden ist, abzuschließen.
KS-Primer: 5'-CGAGGTCGACGGTATCG-3' (SEQ ID NO: 1)
65-mer:
3'-CCAGCTGCCATAGCTATTTTCTTTTCTTTCTTAAGTTCTTTTCTTTTCCTAGGTGAT-CAAGATCT-5' (SEQ ID NO: 7)

[0069] Um eine maximale Menge von immobilisierter DNA-Polymerase von 0,26 pmol zu haben, wurde ein Au-Draht, der äußeren äußeren Durchmesser von 0,1 mm und eine Länge von 4,7 cm hat, präpariert und verwendet, nachdem er zu einer Spule, die einen äußeren Durchmesser von 1,5 mm und eine Länge von ungefähr

4 mm hat, verarbeitet worden war. Um die Sauberkeit der Oberfläche des Au-Drahtes sicherzustellen, wurde er mit Piranha-Lösung für 10 ~ 15 Minuten bei 60 ~ 70°C gewaschen und mit deionisiertem Wasser und nachfolgend mit absolutem Alkohol kurz vor der Verwendung gespült.

[0070] Um Reaktionsgruppen für die Immobilisierung auf der Au-Oberfläche einzuführen, wurde eine Molekularschicht von Thiolmolekülen auf der Au-Oberfläche unter Verwendung der Au-S-Bindungs-Bildungsreaktion, gebildet, d.h. unter Verwendung der Thiolat-Bildungsreaktion zwischen einem Linkermolekül, das eine Thiolgruppe besitzt, und Au, um ein Trägermaterial herzustellen. In dieser Reaktion wurde eine gemischte Lösung, die zwei Arten von Thiolmolekülen, die eine Immobilisierungsreaktionsgruppe und eine nicht-reaktive Gruppe aufweisen, enthält, verwendet. Die Molfraktion des Thiolmoleküls, das die Immobilisierungsreaktionsgruppe aufweist, bezogen auf die Gesamt-Mole der zwei Thiolmoleküle, wurde als 5% ausgewählt. Um eine Carboxyl-Immobilisierungsreaktionsgruppe einzuführen, wurde 12-Mercaptododecansäure, die eine relativ lange Alkylkette aufweist, als Linkermolekül verwendet. Als ein Thiolmolekül, das eine nicht-reaktive Gruppe aufweist, wurde 6-Mercapto-1-hexanol oder 1-Heptanthiol als ein Matrixmolekül verwendet. Die Carboxyl-Immobilisierungsreaktionsgruppe wurde auf die Oberfläche des Au-Drahtes eingeführt, indem er in 100 µl einer 2 mM-gemischten Thiollösung in Ethanol für 2 Stunden bei Raumtemperatur gelegt wurde und mit absolutem Ethanol gewaschen wurde.

[0071] Der Au-Draht, an dem die Carboxyl-Immobilisierungsreaktionsgruppen eingeführt worden waren, wurde in 120 µl einer Ethanollösung, die 10 mM 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und 5 mM N-Hydroxysuccinimid (NHS) enthält, für 2 Stunden bei Raumtemperatur gelegt. Die Carboxylgruppe wurde durch Reaktion mit NHS in der Gegenwart von EDC aktiviert und bildete somit NHS-Ester.

[0072] Nach der Aktivierung der Carboxylgruppen der Thiol-Monoschicht wurde der Au-Draht in die Enzymlösung, die DNA-Polymerase mit maskierter aktiver Stelle enthält, überführt. In diesem Schritt reagierte das aktivierte Carboxyl (NHS-Ester) der Thiol-Monoschicht mit dem primären Amin des Proteins, wobei eine Amidbindung (-CO-NH-) ausgebildet wurde. Als Ergebnis davon wurde die Taq-DNA-Polymerase auf dem Trägermaterial immobilisiert.

2. Ergebnisse

[0073] Wie in Beispiel 1 wurden die Reaktionsprodukte durch Elektrophorese analysiert. Fig. 7 ist eine Photographie der Elektrophoreseergebnisse, die bei den Reaktionszeiten bis zu 4 Stunden für Zeitintervalle mit je 30 min erhalten wurden. Wie in Fig. 7 gesehen werden kann, erreicht die PCR-Reaktion eine Sättigung vor 150 Minuten.

[0074] Aus den Ergebnissen der Beispiele 1, 2 und 3 können folgende Punkte gesehen werden.

[0075] Erstens, die erfindungsgemäße Vorrichtung zur Amplifikation einer Nucleinsäuresequenz, die auf der thermischen Konvektion beruht, arbeitet effizient.

[0076] Zweitens wurde bestätigt, dass der PCR-Prozess durch Lokalisierung der auf einer festen Oberfläche immobilisierten DNA-Polymerase in der Region niedriger Temperatur oder in dem oberen Bereich der Konvektionsregion unter Verwendung der Vorrichtung zur Amplifikation einer Nucleinsäuresequenz, die auf der thermischen Konvektion entsprechend der vorliegenden Erfindung beruht, ausgeführt werden kann. Es wurde somit bestätigt, dass DNA-Polymerasen, die bei hoher Temperatur nicht stabil sind, auch verwendet werden können.

[0077] Es sollte den Fachleuten offensichtlich sein, dass die vorliegende, oben beschriebene Erfindung nicht auf die obigen Ausführungsformen und die angefügten Zeichnungen beschränkt ist.

[0078] Folglich sind die obigen Ausführungsformen und Modifikationen nur zur Illustration und sollten nicht für die vorliegende Erfindung als beschränkend interpretiert werden. Der tatsächliche Rahmen der vorliegenden Erfindung sollte durch die folgenden Ansprüche bestimmt werden und wird in keiner Weise durch die Patentbeschreibung beschränkt.

[0079] Wie oben beschrieben, werden in der vorliegenden Erfindung eine Vielzahl spezifischer Regionen der Probe bei spezifischen Temperaturen gehalten, und thermische Konvektion zwischen den spezifischen Regionen veranlasst die Probe, innerhalb des Reaktionsgefäßes zu zirkulieren. Somit können die Denaturierungs-, Anlagerungs- und Polymerisationsschritte sequentiell und wiederholt ausgeführt werden. Folglich können die

folgenden Effekte vermerkt werden.

[0080] Erstens, die Vorrichtung zur Amplifikation einer Nucleinsäuresequenz kann mit einer einfachen Zusammensetzung entwickelt werden. Die vorliegende Erfindung erfordert keinen Prozess zur Änderung der Temperatur der Probe. Somit kann die Bauart entsprechend der vorliegenden Erfindung einfacher gemacht werden, weil komplexe Bausteine, die in den früheren Vorrichtungen zur Änderung und Kontrolle der Probentemperatur enthalten sind, nicht erforderlich sind.

[0081] Zweitens kann die Vorrichtung entsprechend der vorliegenden Erfindung einfach miniaturisiert oder in eine komplexe Vorrichtung, wie Lab-on-a-chip, integriert werden, um den PCR-Nucleinsäuresequenz-Amplifikationsprozess auszuführen. Sie kann auch in Vorrichtungen, in welchen eine Temperaturänderung nicht erwünscht ist, integriert werden.

[0082] Drittens können die DNA-Polymerasen, die nicht thermostabil sind, auch verwendet werden. Denn immobilisierte DNA-Polymerasen können in der vorliegenden Erfindung durch ihre Lokalisierung in einer spezifischen Region innerhalb des Reaktionsgefäßes, welche Region bei einer für die Polymeraseaktivität geeigneten Temperatur gehalten wird, verwendet werden. Entsprechend der vorliegenden Erfindung kann, wenn eine immobilisierte DNA-Polymerase verwendet wird, eine PCR mit der immobilisierten DNA-Polymerase, die bei der Temperatur, bei der die Polymerase aktiv ist, gehalten wird, ausgeführt werden. Somit können entsprechend der vorliegenden Erfindung Enzyme, die ihre optimalen Aktivitäten bei niedriger Temperatur haben, wie Klenow-Fragment oder T7-DNA-Polymerase, auch für den PCR-Prozess verwendet werden.

[0083] Schließlich kann die Reaktionszeit für die PCR verringert werden. In der vorliegenden Erfindung gibt es keine Notwendigkeit, die Temperatur der gesamten Probe zu ändern. Somit kann die Zeit, die für die Änderung und Kontrolle der Temperatur der gesamten Probe benötigt wird, eingespart werden.

Sequence Listing

<110> AHRAM BIOSYSTEMS INC.
HWANG, HYUN JIN
KIM, JEONG HEE
JEONG, KYUNGHOON

<120> METHOD AND APPARATUS FOR AMPLIFICATION OF NUCLEIC ACID SEQUENCES BY USING THERMAL CONVECTION

<130> apa21_kr_pct

<150> KR-10-2001-0057040
<151> 2001-09-15

<150> KR-10-2001-0066943
<151> 2001-10-30

<160> 7

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic sequence

<400> 1
attaaccctc actaaag 17

<210> 2
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic sequence

<400> 2
aatacgactc actatag 17

<210> 3
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic sequence

<400> 3
cgaggtcgac ggtatcg 17

<210> 4
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic sequence

<400> 4
gtaaaacgac ggccagt 17

<210> 5
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic sequence

<400> 5
tggcgaaagg gggatgt 17

<210> 6
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Syntheic sequence

<400> 6
ggcgaacgtg gcgagaa 17

<210> 7
<211> 65
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic sequence

<400> 7
tctagaacta gtggatcctt ttcttttctt gaattctttc ttttctttta tcgataccgt 60

cgacc 65

Patentansprüche

1. Verfahren zur Amplifikation einer Nucleinsäuresequenz, das Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet, wobei das Verfahren umfasst:
einen Schritt des Einspritzens einer Probe, die eine Matrizen-DNA bzw. Template-DNA, die zu amplifizierende Ziel-Nucleinsäuresequenzen hat, DNA-Polymerase, Desoxyadenosintriphosphat, Desoxycytidintriphosphat, Desoxyguanosintriphosphat, Desoxythymidintriphosphat und mindestens zwei Oligonucleotidprimer, die komplementär zum 3'-Terminus jeder der Ziel-Nucleotidsequenzen sind, enthält, in ein Reaktionsgefäß; und
einen Schritt des Aufrechterhaltens einer spezifischen räumlichen Temperaturverteilung in der Probe durch thermisches Kontaktieren einer Mehrzahl von Wärmequellen, die spezifischen Regionen der Probe Wärme zuführen oder entziehen, mit der Probe, so dass eine Region relativ hoher Temperatur in niedrigerer Höhe als eine Region relativ niedriger Temperatur lokalisiert ist,
wobei die spezifische räumliche Temperaturverteilung spezifische räumliche Regionen umfasst, die jeweils eine Temperaturbedingung erfüllen, die geeignet ist für (i) einen Denaturierungsschritt, in dem doppelsträngige DNAs zu einzelsträngigen DNAs getrennt werden, (ii) einen Anlagerungsschritt, in dem die im Denaturierungsschritt gebildeten einzelsträngigen DNAs mit den Primern hybridisieren, um DNA-Primer-Komplexe zu bilden, oder (iii) einen Polymerisationsschritt, in dem die Primer in den DNA-Primer-Komplexen durch die Polymerisationsreaktion verlängert werden,
und wobei die spezifische räumliche Temperaturverteilung eine Temperaturverteilung ist, die Umwälzung der Probe durch thermische Konvektion induziert, so dass die Denaturierungs-, Anlagerungs- und Polymerisationsschritte sequentiell und wiederholt innerhalb der Probe auftreten.

2. Verfahren zur Amplifikation einer Nucleinsäuresequenz nach Anspruch 1, wobei mindestens eine der Wärmequellen einen wärmeleitfähigen Feststoff in thermischem Kontakt mit einer spezifischen Region des Reaktionsgefäßes oder der Probe und eine Heizeinheit, die dem wärmeleitfähigen Feststoff Wärme zuführt, eine Kühleinheit, die Wärme aus dem wärmeleitfähigen Feststoff abführt, oder eine Kombination der Heizeinheit und der Kühleinheit umfasst.

3. Verfahren zur Amplifikation einer Nucleinsäuresequenz nach Anspruch 1, wobei mindestens eine der Wärmequellen eine Flüssigkeit in thermischem Kontakt mit einer spezifischen Region des Reaktionsgefäßes; einen Rezeptor, in dem die Flüssigkeit aufzunehmen ist und eine Heizeinheit, die der Flüssigkeit Wärme zuführt, eine Kühleinheit, die Wärme aus der Flüssigkeit abführt, oder eine Kombination der Heizeinheit und der Kühleinheit umfasst.

4. Verfahren zur Amplifikation einer Nucleinsäuresequenz nach Anspruch 3, wobei mindestens eine der Wärmequellen weiterhin eine Umwälzeinheit umfasst, die die Flüssigkeit um das Reaktionsgefäß herum umwälzt.

5. Verfahren zur Amplifikation einer Nucleinsäuresequenz nach Anspruch 1, wobei mindestens eine der Wärmequellen ein Gas in thermischem Kontakt mit einer spezifischen Region des Reaktionsgefäßes; eine Heizeinheit, die dem Gas Wärme zuführt, eine Kühleinheit, die Wärme aus dem Gas abführt, oder eine Kombination der Heizeinheit und der Kühleinheit; und eine Umwälzeinheit, die das Gas um das Reaktionsgefäß herum umwälzt, umfasst.

6. Verfahren zur Amplifikation einer Nucleinsäuresequenz nach Anspruch 1, wobei mindestens eine der Wärmequellen eine infrarote Strahlung entwickelnde Einheit ist, die der Probe direkt Wärme zuführt.

7. Verfahren zur Amplifikation einer Nucleinsäuresequenz nach Anspruch 1, wobei das Verfahren ein Mittel zum Isolieren des Wärmeübergangs zwischen den Heizquellen umfasst.

8. Vorrichtung zur Amplifikation einer Nucleinsäuresequenz, die PCR verwendet, wobei die Vorrichtung umfasst:
eine Mehrzahl von Wärmequellen, die einer Mehrzahl von Regionen einer in einem Reaktionsgefäß enthaltenen Probe Wärme zuführen oder entziehen können,
wobei die Wärmequellen angeordnet sind, um eine spezifische räumliche Temperaturverteilung in der Probe aufrechtzuerhalten, so dass eine Region relativ hoher Temperatur in niedrigerer Höhe als eine Region relativ niedriger Temperatur lokalisiert ist,
wobei die spezifische räumliche Temperaturverteilung spezifische räumliche Regionen umfasst, die jeweils eine Temperaturbedingung erfüllen, die geeignet ist für (i) einen Denaturierungsschritt, in dem doppelsträngige DNAs zu einzelsträngigen DNAs getrennt werden, (ii) einen Anlagerungsschritt, in dem die im Denaturierungsschritt gebildeten einzelsträngigen DNAs mit den Primern hybridisieren, um DNA-Primer-Komplexe zu bilden, oder (iii) einen Polymerisationsschritt, in dem die Primer in den DNA-Primer-Komplexen durch die Polymerisationsreaktion verlängert werden,
und wobei die spezifische räumliche Temperaturverteilung eine Temperaturverteilung ist, die Umwälzung der Probe durch thermische Konvektion induziert, so dass die Denaturierungs-, Anlagerungs- und Polymerisationsschritte sequentiell und wiederholt innerhalb der Probe auftreten.

9. Vorrichtung zur Amplifikation einer Nucleinsäuresequenz nach Anspruch 8, wobei mindestens eine der Wärmequellen einen wärmeleitfähigen Feststoff in Kontakt mit einer spezifischen Region des Reaktionsgefäßes oder der Probe und eine Heizeinheit, die dem wärmeleitfähigen Feststoff Wärme zuführt, eine Kühleinheit, die Wärme aus dem wärmeleitfähigen Feststoff abführt, oder eine Kombination der Heizeinheit und der Kühleinheit umfasst.

10. Vorrichtung zur Amplifikation einer Nucleinsäuresequenz nach Anspruch 8, wobei mindestens eine der Wärmequellen eine Flüssigkeit im thermischem Kontakt mit einer spezifischen Region des Reaktionsgefäßes; einen Rezeptor, in dem die Flüssigkeit aufzunehmen ist und eine Heizeinheit, die der Flüssigkeit Wärme zuführt, eine Kühleinheit, die Wärme aus der Flüssigkeit abführt, oder eine Kombination der Heizeinheit und der Kühleinheit umfasst.

11. Vorrichtung zur Amplifikation einer Nucleinsäuresequenz nach Anspruch 8, wobei mindestens eine der Wärmequellen weiterhin eine Umwälzeinheit umfasst, die die Flüssigkeit um das Reaktionsgefäß herum umwälzt.

12. Vorrichtung zur Amplifikation einer Nucleinsäuresequenz nach Anspruch 8, wobei mindestens eine der Wärmequellen ein Gas in thermischem Kontakt mit einer spezifischen Region des Reaktionsgefäßes; eine Heizeinheit, die dem Gas Wärme zuführt, eine Kühleinheit, die Wärme aus dem Gas abführt, oder eine Kombination der Heizeinheit und der Kühleinheit; und eine Umwälzeinheit, die das Gas um das Reaktionsgefäß herum umwälzt, umfasst.

13. Vorrichtung zur Amplifikation einer Nucleinsäuresequenz nach Anspruch 8, wobei mindestens eine der Wärmequellen eine infrarote Strahlung entwickelnde Einheit ist, die der Probe direkt Wärme zuführt.

14. Vorrichtung zur Amplifikation einer Nucleinsäuresequenz nach Anspruch 8, wobei das Verfahren ein Mittel zum Isolieren des Wärmeübergangs zwischen den Heizquellen umfasst.

15. Verfahren zur Amplifikation einer Nucleinsäuresequenz nach Anspruch 1, wobei die Mehrzahl der Wärmequellen einen ersten wärmeleitfähigen Feststoff, der in thermischem Kontakt mit einem unteren Teil des Reaktionsgefäßes ist und einen zweiten wärmeleitfähigen Feststoff, der in thermischem Kontakt mit einem oberen Teil des Reaktionsgefäßes ist, umfasst.

16. Verfahren zur Amplifikation einer Nucleinsäuresequenz nach Anspruch 15, wobei die Mehrzahl der Wärmequellen einen dritten wärmeleitfähigen Feststoff umfasst, der in thermischem Kontakt mit einem dazwischenliegenden Teil des Reaktionsgefäßes zwischen den oberen und unteren Teilen ist.

17. Vorrichtung zur Amplifikation einer Nucleinsäuresequenz nach Anspruch 8, wobei die Mehrzahl der Wärmequellen einen ersten wärmeleitfähigen Feststoff, der in thermischem Kontakt mit einem unteren Teil des Reaktionsgefäßes ist und einen zweiten wärmeleitfähigen Feststoff, der in thermischem Kontakt mit einem oberen Teil des Reaktionsgefäßes ist, umfasst.

18. Vorrichtung zur Amplifikation einer Nucleinsäuresequenz nach Anspruch 17, wobei die Mehrzahl der Wärmequellen weiterhin einen dritten wärmeleitfähigen Feststoff, der in thermischem Kontakt mit einem dazwischenliegenden Teil des Reaktionsgefäßes zwischen den oberen und unteren Teilen ist, umfasst.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Fig. 1

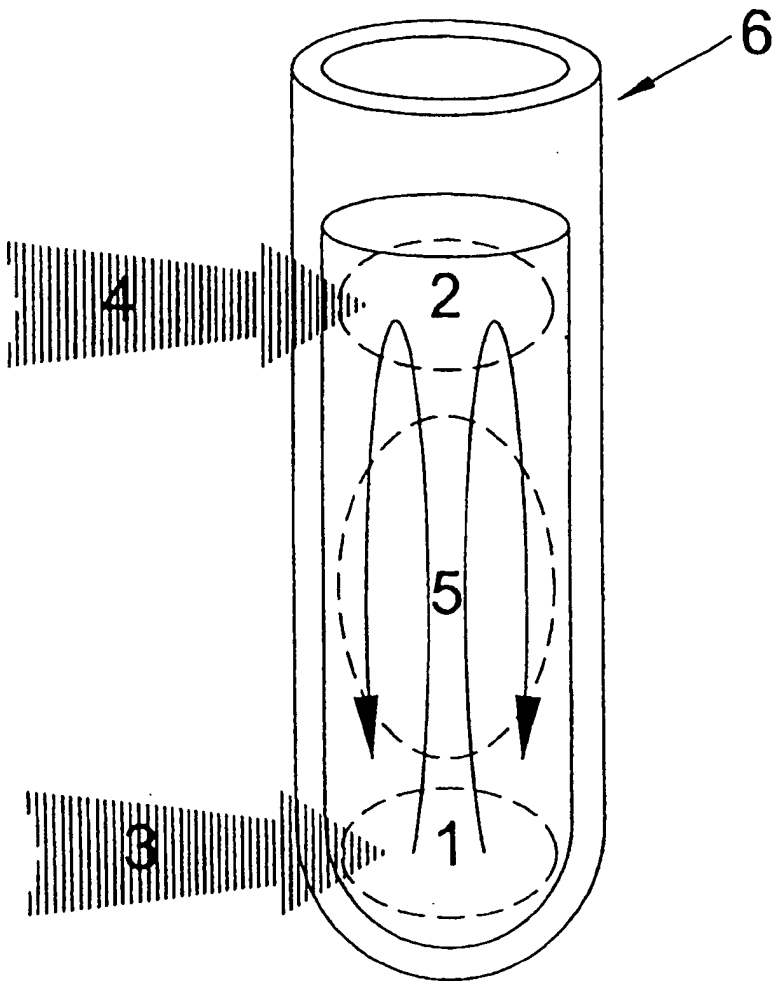

Fig. 2a

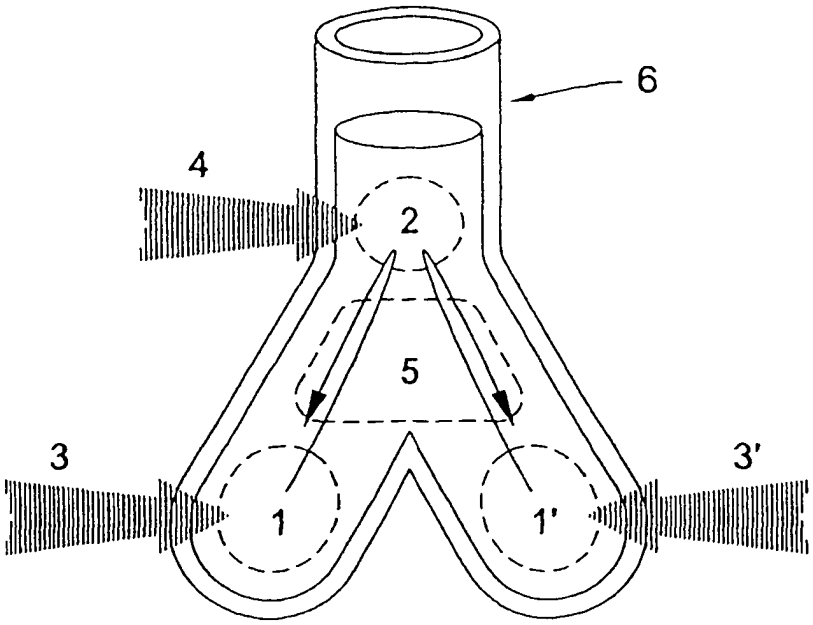

Fig. 2b

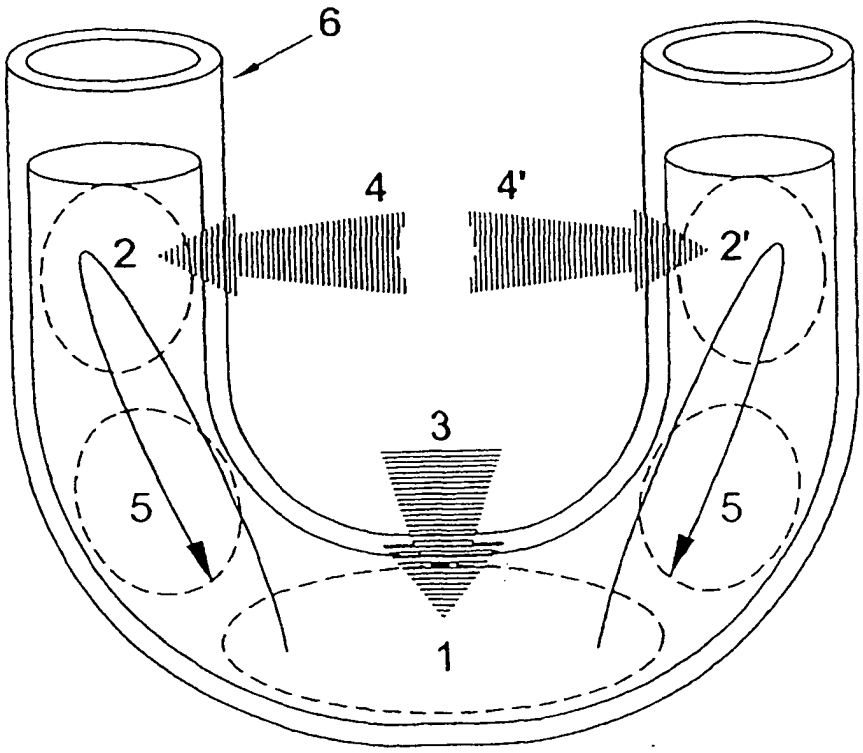

Fig. 3a

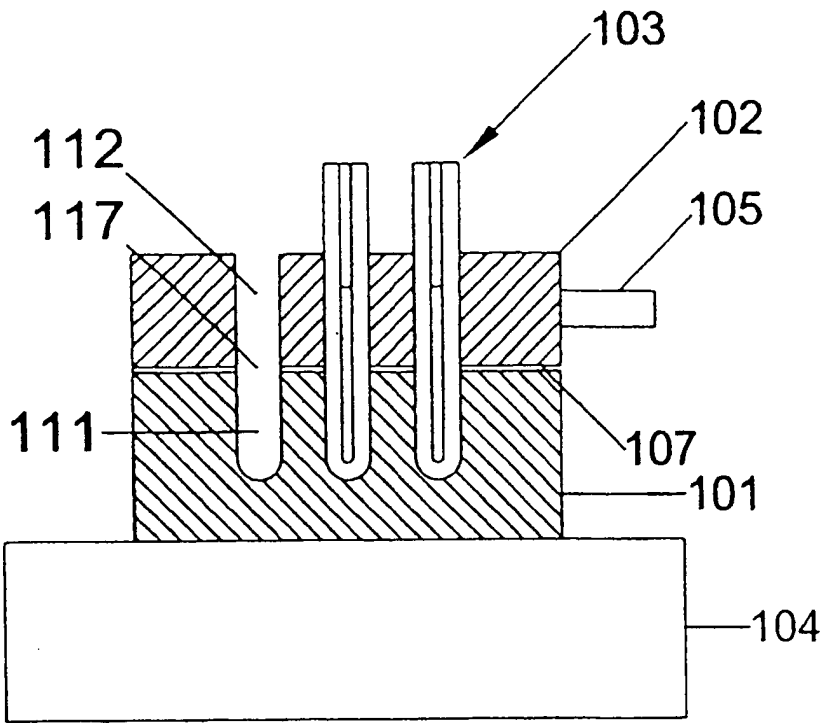

Fig. 3b

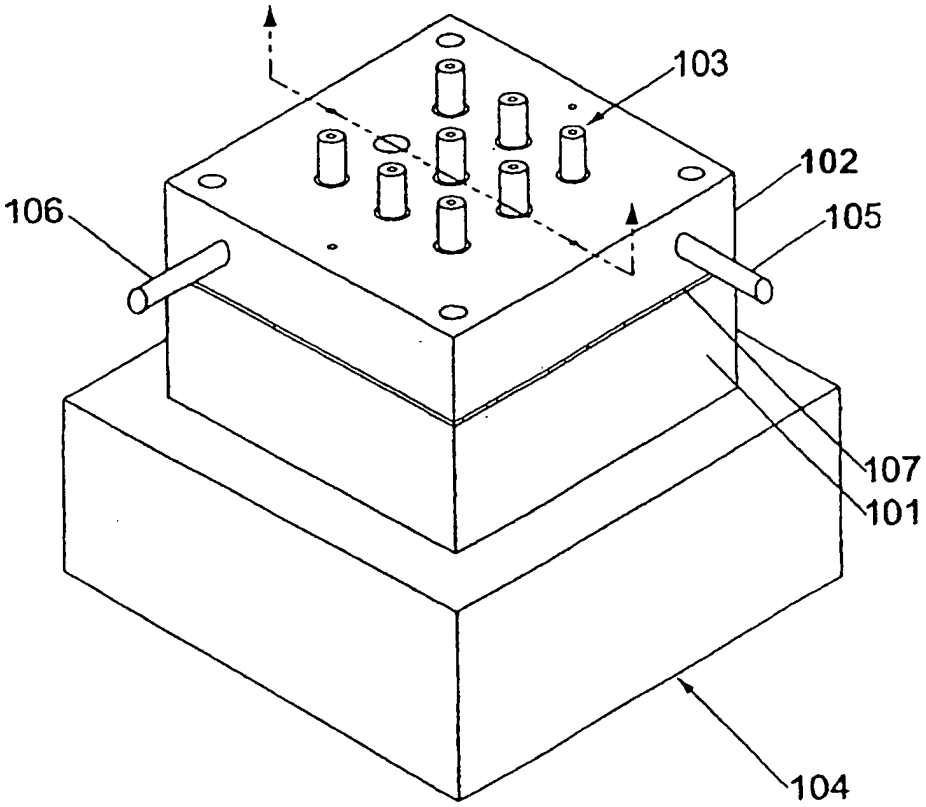
103
102
106
105
107
101
104

Fig. 4

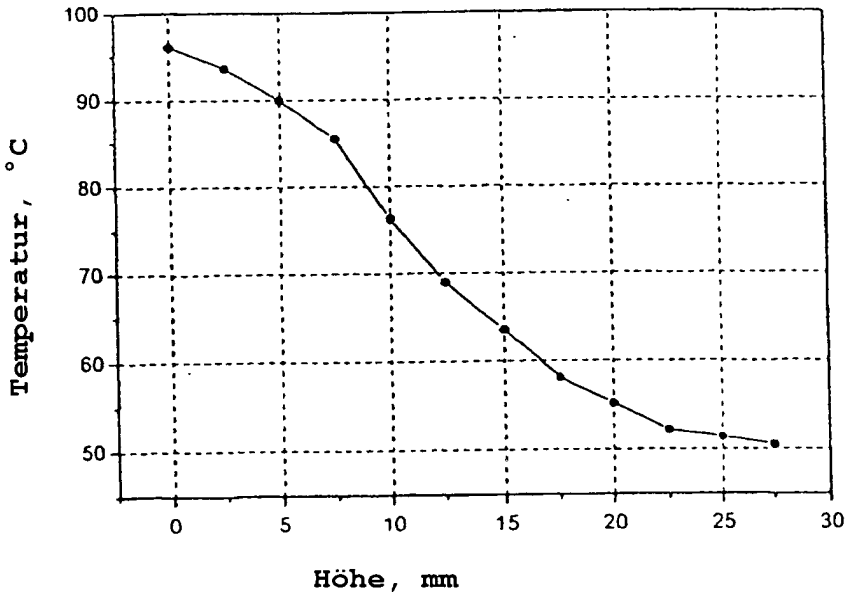
100
90
80
70
60
50
Temperatur, °C
0
5
10
15
20
25
30
Höhe, mm

Fig. 5

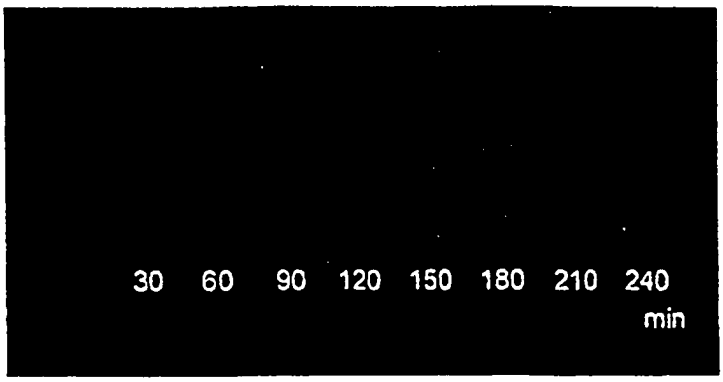

Fig. 6

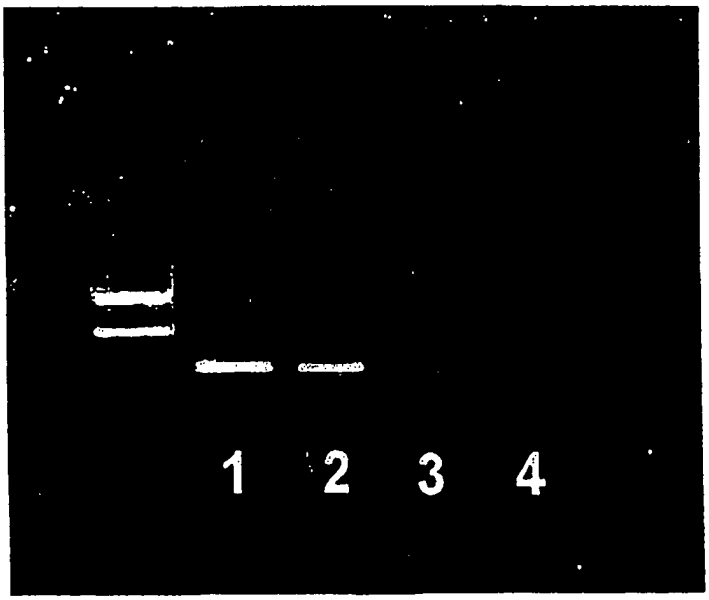

Fig.7

