



(12) **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(43) Veröffentlichungstag:
07.08.2002 Patentblatt 2002/32

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

(21) Anmeldenummer: **01121967.2**

(22) Anmeldetag: **13.09.2001**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE TR**
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

(72) Erfinder: **Goemann-Thoss, Wolfgang, Dr.**
22359 Hamburg (DE)

(74) Vertreter: **Schaefer, Konrad, Dipl.-Phys.**
Schaefer & Emmel
Gehölzweg 20
22043 Hamburg (DE)

(30) Priorität: **05.02.2001 DE 10105127**

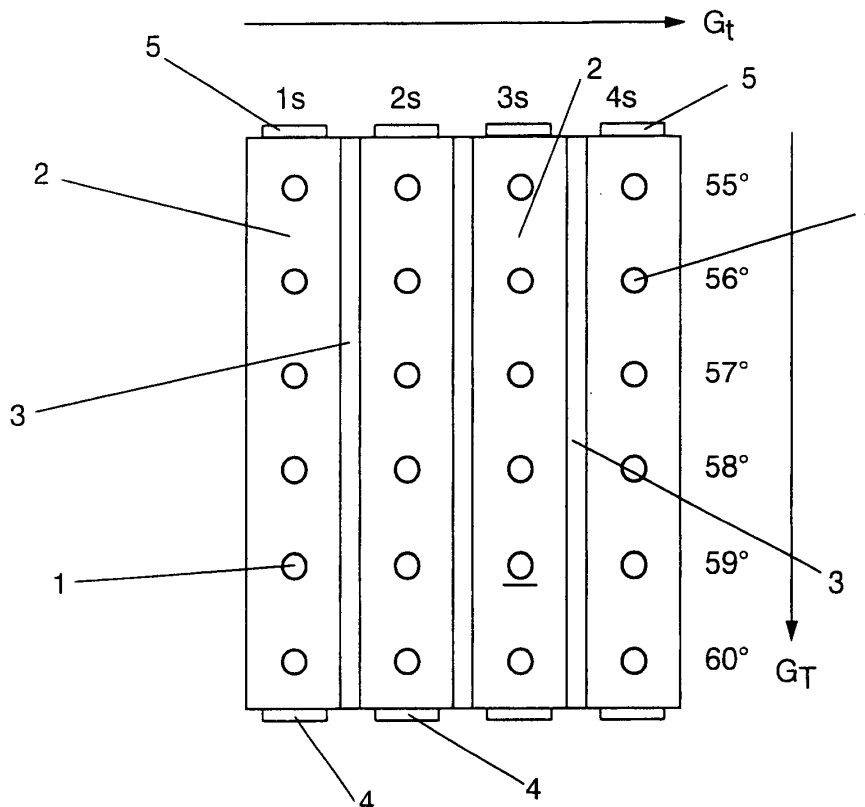
(71) Anmelder: **EPPENDORF AG**
22339 Hamburg (DE)

(54) **Vorrichtung zur Temperierung von Reaktionsproben**

(57) Eine Vorrichtung zur Temperierung von Reaktionsproben (1) in einem Durchlauf mit einem mehrfach aufeinanderfolgend wiederholten Zyklus mehrerer aufeinanderfolgend eingestellter Temperaturstufen

(7,9,11) ist dadurch gekennzeichnet, daß die Vorrichtung jeweils wenigstens eine Reaktionsprobe enthaltende Gruppen von Proben (1) auf wenigstens einer der Stufen für unterschiedlich lange Stufenzeiten hält.

Fig 1



Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung der im Oberbegriff des Anspruches 1 genannten Art.

[0002] Derartige Vorrichtungen dienen zur Durchführung chemischer Reaktionen in Reaktionsproben, die nacheinander unterschiedliche Temperaturstufen erfordern, welche in aufeinanderfolgend wiederholten Zyklen durchgeführt werden. Insbesondere werden solche Vorrichtungen zur Durchführung der PCR (Polymerase Chain Reaction) benötigt, mit der DNA-Abschnitte amplifiziert werden und zwar beispielsweise mit drei aufeinanderfolgenden Temperaturstufen, nämlich der Denaturierungsstufe, der Annealingstufe und der Elongationsstufe. Dabei hängen die Reaktionsergebnisse wie z.B. Ausbeute und Trennschärfe von den Reaktionsparametern wie z.B. Temperatur, Zeit etc. ab, welche in Versuchen optimiert werden müssen.

[0003] Solche Vorrichtungen können zur Untersuchung einzelner Reaktionsproben verwendet werden, wobei die Reaktionsparameter der PCR noch unbekannt sind und ermittelt werden sollen. Sie können insbesondere auch zur gleichzeitigen Behandlung einer größeren Zahl von Reaktionsproben vorgesehen sein, wozu jedoch zuvor die Reaktionsparameter in Vorversuchen optimiert werden müssen.

[0004] Die Stufentemperaturen können äußerst kritisch sein. Um die für eine Stufe optimale Temperatur zeitsparend ermitteln zu können, ist eine gattungsgemäße Vorrichtung aus der DE 196 46 155 C2 bekannt, bei der in einem Durchlauf die Proben auf einer oder mehreren Stufen mit unterschiedlichen Temperaturen im Bereich der Stufentemperatur behandelt werden können. Bei anschließender Auswertung der sich für die unterschiedlichen Temperaturen innerhalb einer Temperaturstufe ergebenden Reaktionsergebnisse kann die optimale Stufentemperatur ermittelt werden. Dazu ist mit solchen Vorrichtungen nur ein Durchlauf erforderlich.

[0005] Aus der WO 97/46707 ist eine Vorrichtung bekannt, die es ermöglicht, mit unterschiedlichen, insbesondere sehr kurzen Zykluszeiten zu arbeiten. Damit werden auch die Stufenzeiten, also die Verweilzeiten der Proben auf bestimmten Stufen variiert. Alle Proben werden hierbei stets gleich behandelt. Soll mit dieser Konstruktion eine optimale Stufenzeit ermittelt werden, so sind hierzu sind mehrere Durchläufe, also ein erheblicher Aufwand an Zeit und Proben erforderlich.

[0006] Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, eine Vorrichtung der gattungsgemäßen Art zu schaffen, die eine verbesserte Optimierung der Stufenzeiten ermöglicht.

[0007] Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß mit den Merkmalen des Anspruches 1 gelöst.

[0008] Die erfindungsgemäße Vorrichtung behandelt in einem Durchlauf die Proben unterschiedlicher Gruppen, denen jeweils eine oder mehrere Reaktionsproben angehören, mit unterschiedlichen Stufenzeiten und er-

möglicht somit die Ermittlung der optimalen Stufenzeit einer oder ggf. auch mehrerer Temperaturstufen. Es hat sich herausgestellt, daß auch die Stufenzeit ein wesentlicher Reaktionsparameter bei bestimmten Stufentemperaturen sein kann, der in erheblichem Maße die Reaktionsergebnisse beeinflusst. Im Gegensatz zu der vorgenannten bekannten Konstruktion, die die Zykluszeiten aller Proben gleich verändert und zur Optimierung der Stufenzeit mehrere Durchläufe benötigt, kann die optimale Stufenzeit mit der Erfindung in einem einzigen Durchlauf, also wesentlich rationeller hinsichtlich Laborzeit und Probenverbrauch ermittelt werden. Die Vorrichtung kann selbstverständlich auch unter Einstellung gleicher Stufenzeiten für alle Gruppen auf eine vorermittelte optimale Stufenzeit zur Massenverarbeitung verwendet werden. Es können die Stufenzeiten bei nur einer Stufe verändert werden oder auch bei allen Stufen.

[0009] Werden die Stufenzeiten bei einer oder mehreren Stufen variiert, so ergeben sich zwischen den Gruppen von Proben unterschiedliche Zykluszeiten, so daß bei mehrfacher Zykluswiederholung in einem Durchlauf die Proben der unterschiedlichen Gruppen immer weiter auseinanderlaufend asynchron sind. Dies kann Nachteile mit sich bringen insbesondere hinsichtlich dann auftretender sehr großer Temperaturunterschiede zwischen den Gruppen. Vorteilhaft sind daher die Merkmale des Anspruches 2 vorgesehen. Hiermit kann die Änderung der Stufenzeit bei einer Stufe durch entsprechende Änderung der Stufenzeit bei einer anderen Stufe ausgeglichen werden, so daß die Zykluszeit konstant bleibt, also alle Proben der unterschiedlichen Gruppen in synchronem Zyklus laufen. Temperaturabweichungen zwischen den Gruppen treten dann nur kurzzeitig auf und insbesondere in allen Zyklen immer wieder zur selben Zeit, so daß sich über die Dauer des Durchlaufes konstante Bedingungen einstellen. Dadurch werden die Ergebnisse eindeutig auswertbar. Die andere in der Verweilzeit zu variiierende Stufe ist vorzugsweise eine Stufe, die keine wesentliche Zeitabhängigkeit aufweist.

[0010] Vorteilhaft sind die Merkmale des Anspruches 3 vorgesehen. Hiermit ist es möglich, in einem Durchlauf nicht nur die optimale Stufenzeit sondern auch die optimale Stufentemperatur zu ermitteln. Da zwischen den Gruppen die Zeiten und innerhalb der Gruppen die Temperaturen geändert werden, die beiden Parameter Zeit und Temperatur also unabhängig von einander geändert werden, können bei Ermittlung einer Probe mit optimalem Ergebnis durch deren Zuordnung in eine der Gruppen die optimale Zeit und durch Ermittlung ihrer Lage in der Gruppe die optimale Temperatur bestimmt werden. Dabei werden vorteilhaft gemäß Anspruch 4 Zeit und Temperatur bei derselben Stufe variiert, z.B. bei der Annealingstufe, um diese hinsichtlich beider Parameter zu optimieren. Bei den anderen Stufen können für alle Proben gleiche Temperaturen und konstante Zeiten gewählt werden.

[0011] Durch die unterschiedlichen Verweilzeiten der verschiedenen Gruppen kann es zu erheblichen Temperaturunterschieden zwischen diesen kommen. Befindet sich beispielsweise die eine Gruppe bereits auf der Annealingtemperatur von etwa 55°, so kann eine benachbarte Gruppe noch in der Mitte der Rampe zwischen Denaturierungstemperatur und Annealingtemperatur sein, also bei z.B. 70°. Vorteilhaft sind daher die Merkmale des Anspruches 5 vorgesehen, womit störende thermische Beeinflussungen zwischen den Gruppen vermieden werden.

[0012] Vorteilhaft sind die Merkmale des Anspruches 6 vorgesehen. Es sind in Spalten (oder Zeilen) angeordnete Proben jeweils auf einer Temperiereinrichtung vorgesehen, die über die Spalte hinweg einen Temperaturgradienten erzeugt. Die Spalten sind gegeneinander thermisch isoliert und werden mit unterschiedlichen Zeiten gefahren. Eine solche Vorrichtung zeichnet sich durch große technische Einfachheit aus und kann im wesentlichen von aus dem Stand der Technik bekannten Konstruktionsprinzipien Gebrauch machen.

[0013] Die erfindungsgemäße Vorrichtung kann vorteilhaft gemäß Anspruch 7 mit Einzelheizung gegeneinander thermisch isolierter Proben ausgebildet sein. Dann lassen sich die Gruppenzuordnungen der Proben beliebig legen. Die Proben einer Gruppe müssen nicht zusammenhängend nebeneinander angeordnet sein. Auch größere Temperaturunterschiede zwischen benachbarten Proben lassen sich problemlos einstellen.

[0014] In der Zeichnung ist die Erfindung beispielsweise und schematisch dargestellt. Es zeigen:

Figur 1 in Draufsicht eine erfindungsgemäße Vorrichtung gemäß Anspruch 6 und

Figur 2 in einem Temperatur-/Zeitdiagramm einen mit der Vorrichtung der Figur 1 erzeugbaren Zyklus.

[0015] Figur 1 zeigt eine erfindungsgemäße Temperiereinrichtung mit insgesamt 24 Proben 1, die als Kreise angedeutet sind. Es kann sich hierbei um mit Flüssigkeit gefüllte Vertiefungen in der Vorrichtung handeln oder um in entsprechenden Vertiefungen der Vorrichtung wärmeleitend aufgenommene Gefäße, die die Reaktionsproben enthalten. Die Proben sind in vier Spalten und sechs Zeilen in einem rechtwinkligen Gitter angeordnet. Die Vorrichtung ist spaltenweise in vier Gruppen in Form von Blöcken 2 unterteilt, die gegeneinander mit Isolierschichten 3 thermisch isoliert sind. Die Gruppen können auch anders als spaltenweise angeordnet sein, beispielsweise in rechteckigen, jeweils mehrere Reaktionsproben enthaltenden Blöcken oder dergleichen. Auch die Anzahl der Reaktionsproben pro Zeile und Spalte kann in weitem Umfang variiert werden.

[0016] An den Spaltenenden, also an den Längsenden der Blöcke 2, sind jeweils Heizeinrichtung 4 und 5 in wärmeleitendem Kontakt angeordnet, die in jedem

der aus thermisch leitfähigem Material ausgebildeten Blöcke 2 einen Temperaturgradienten G_T erzeugen, der neben der Abbildung als Pfeil und mit Temperaturangaben für die einzelnen Zeilen von Reaktionsproben 1 dargestellt ist.

[0017] Die Heizeinrichtungen 4, 5 sind in nicht dargestellter Weise von der Temperiereinrichtung zeitlich und hinsichtlich der einzustellenden Temperaturen derart gesteuert, daß die Proben einen Zyklus durchlaufen, der in einem Beispiel in Figur 2 dargestellt ist.

[0018] Zunächst sind alle Heizeinrichtungen 4, 5 heizend derart gesteuert, daß alle Proben mit gleicher Temperatur auf einer Rampe 6 bis auf die Denaturierungsstufe 7 bei etwa 90° geheizt und bei dieser für einige Sekunden gehalten werden. Sodann werden sie durch entsprechende Steuerung der Heizeinrichtungen 4, 5 entlang einer Rampe 8 abgekühlt bis auf die Annealingstufe 9 bei etwa 55°, die wiederum für einige Sekunden gehalten wird. Anschließend geht es über eine Rampe 10 auf die Elongationsstufe 11 von 70°, die für einige Zeit gehalten wird. Dann folgt wieder die Rampe 6 und der Zyklus wird von neuem durchlaufen.

[0019] Bei der vorstehenden Beschreibung wurde in Figur 2 auf die durchgezogene Linie Bezug genommen. Der dargestellte Zyklus sieht für alle Proben 1 stets dieselben Temperaturen und Verweilzeiten auf den Stufen vor. Es handelt sich hierbei um den Modus der Temperiereinrichtung für die Massenverarbeitung vieler Proben, wobei alle Proben gleich behandelt werden.

[0020] Soll bei der Annealingstufe 9 die optimale Verweilzeit ermittelt werden, so werden die Proben, wie in den Figuren 1 und 2 dargestellt, in vier Gruppen auf der Annealingstufe für unterschiedliche Zeiten von einer Sekunde, zwei Sekunden, drei Sekunden gehalten. Dazu werden, wie Figur 1 zeigt, die vier Blöcke 2 für unterschiedliche Zeit auf der Temperatur der Annealingstufe gehalten und zwar durch entsprechende zeitliche Ansteuerung der Heizeinrichtungen 4, 5.

[0021] Würde man nur die Verweilzeit bei auf der Annealingstufe 9 ändern und dabei die Rampen 6, 8, 10 und die Verweilzeiten bei der Denaturierungsstufe 7 und der Elongationsstufe 11 beibehalten, so würden sich für die vier Gruppen von Proben 1 in den vier Blöcken 2 unterschiedliche Zykluszeiten ergeben. Um dies zu vermeiden, werden die Verweilzeiten im dargestellten Ausführungsbeispiel bei der Denaturierungsstufe 7 entsprechend angepaßt, so daß die Zykluszeit konstant bleibt. Dies ist in Figur 2 dargestellt.

[0022] Wie Figur 2 zeigt, sind zu der Rampe 8 drei parallele Rampen (gestrichelt) dargestellt. Diese entsprechen um jeweils denselben Zeitraum verlängerten Verweilzeiten auf der Denaturierungsstufe 7 und entsprechend verkürzten Verweilzeiten auf der Annealingstufe 9. Ersichtlich bleibt dabei die Zykluszeit konstant, so daß bei dem immer wieder durchlaufenden Zyklus stets dieselben Verhältnisse herrschen und die unterschiedlichen Gruppen (Blöcke 2) nicht immer weiter hinsichtlich ihrer Temperaturbehandlung auseinanderlau-

fen.

[0023] Soll z.B. die Auswirkung der Verweilzeit auf der Elongationsstufe 11 auf das Reaktionsergebnis ermittelt werden, so kann entsprechend wie vorstehend für die Annealingstufe 9 erläutert, mit unterschiedlichen Zeiten bei der Elongationsstufe 11 gearbeitet werden. Dabei würde für alle Reaktionsproben 1 die Verweilzeit bei der Annealingstufe 9 gleich sein und es könnte wiederum z.B. bei der Denaturierungsstufe 7 die Zeitverschiebung ausgeglichen werden.

[0024] Zusätzlich zur Behandlung der Proben mit unterschiedlichen Verweilzeiten, können die Proben auch mit unterschiedlichen Temperaturen im Bereich einer der Stufentemperaturen behandelt werden, um nicht nur die Zeitabhängigkeit sondern auch die Temperaturabhängigkeit des Reaktionsergebnisses für eine Stufe ermitteln zu können.

[0025] Dazu dient der in Figur 1 dargestellte Temperaturgradient G_T , der neben dem angelegten Zeitgradienten G_t , und zwar im dargestellten Fall bei der Annealingstufe 9, angelegt ist. Auch dies ist in Figur 2 gestrichelt dargestellt. Man erkennt, daß (gestrichelt) sechs unterschiedliche Temperaturen für die Annealingstufe 9 möglich sind, wie sie sich aus dem Temperaturgradienten in Figur 1 in den sechs Zeilen ergeben. Wie Figur 2 ferner zeigt, sind alle Kombinationen unterschiedlicher Verweilzeiten und unterschiedlicher Temperaturen möglich.

[0026] Wird bei Auswertung der Reaktionsergebnisse aller Proben z.B. gefunden, daß die in Figur 1 mit einem Unterstrich markierte Probe in der dritten Spalte und der fünften Zeile ein optimales Ergebnis liefert, so steht fest, daß sich daraus im dargestellten Beispiel für die Annealingstufe 9 eine Verweilzeit von drei Sekunden und eine Temperatur von 59° als Optimum ergibt.

[0027] Anders als in Figur 1 dargestellt, können die Proben 1 beispielsweise auch mit Einzelheizung und gegenseitiger thermischer Isolierung ausgebildet sein. Sie können dann in beliebiger Anordnung unterschiedlich temperiert und mit unterschiedlichen Verweilzeiten betrieben werden.

[0028] In dem in Figur 2 dargestellten Zyklusbeispiel wird mit drei Temperaturstufen gearbeitet. Bei anderen Reaktionen kann auch z.B. mit nur zwei Stufen oder mit mehr als drei Stufen gearbeitet werden. Die in Figur 2 dargestellten Stufentemperaturen sind nur beispielhaft angegeben. Je nach Reaktion können die Stufentemperaturen sehr unterschiedlich gewählt werden. Auch die dargestellten Stufenzeiten im Bereich weniger Sekunden können in einem sehr weiten Rahmen, je nach Gegebenheit, geändert werden.

Patentansprüche

1. Vorrichtung zur Temperierung von Reaktionsproben (1) in einem Durchlauf mit einem mehrfach aufeinanderfolgend wiederholten Zyklus mehrerer auf-

einanderfolgend eingestellter Temperaturstufen (7, 9, 11), **dadurch gekennzeichnet, daß** die Vorrichtung jeweils wenigstens eine Reaktionsprobe enthaltende Gruppen (Blöcke 2) von Proben (1) auf wenigstens einer der Stufen (Annealingstufe 9) für unterschiedlich lange Stufenzeiten hält.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, daß** die Stufenzeiten einer anderen Stufe (Denaturierungsstufe 7) für jede Gruppe (Blöcke 2) derart gewählt ist, daß die Zykluszeit für alle Gruppen gleich ist.

3. Vorrichtung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, daß** die Vorrichtung die Proben (1) innerhalb einer Gruppe (Blöcke 2) bei einer der Stufen (Annealingstufe 9) auf unterschiedliche Temperaturen im Bereich der Stufentemperatur bringt.

4. Vorrichtung nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet, daß** Temperatur und Stufenzeit bei derselben Stufe (Annealingstufe 9) variiert werden.

5. Vorrichtung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, daß** die die Gruppen temperierenden Teile (Blöcke 2) der Vorrichtung voneinander thermisch isoliert (Isolierschichten 3) angeordnet sind.

6. Vorrichtung nach den Ansprüchen 4 und 5, **dadurch gekennzeichnet, daß** die Gruppen als Spalten einer flächigen Gitteranordnung von Proben (1) ausgebildet sind, wobei die Vorrichtung spaltenweise angeordnete thermisch leitfähige Temperiereinrichtungen (Blöcke 2) aufweist, die von einander thermisch isoliert (Isolierschicht 3) angeordnet und von den Spaltenenden her mit unterschiedlich temperierten Heizeinrichtungen (4, 5) zur Erzeugung von Temperaturgradienten (G_T) über die Länge der Spalten beaufschlagt sind.

7. Vorrichtung nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet, daß** die Reaktionsproben einzeln unterschiedlich temperierbar sind.

Fig 1

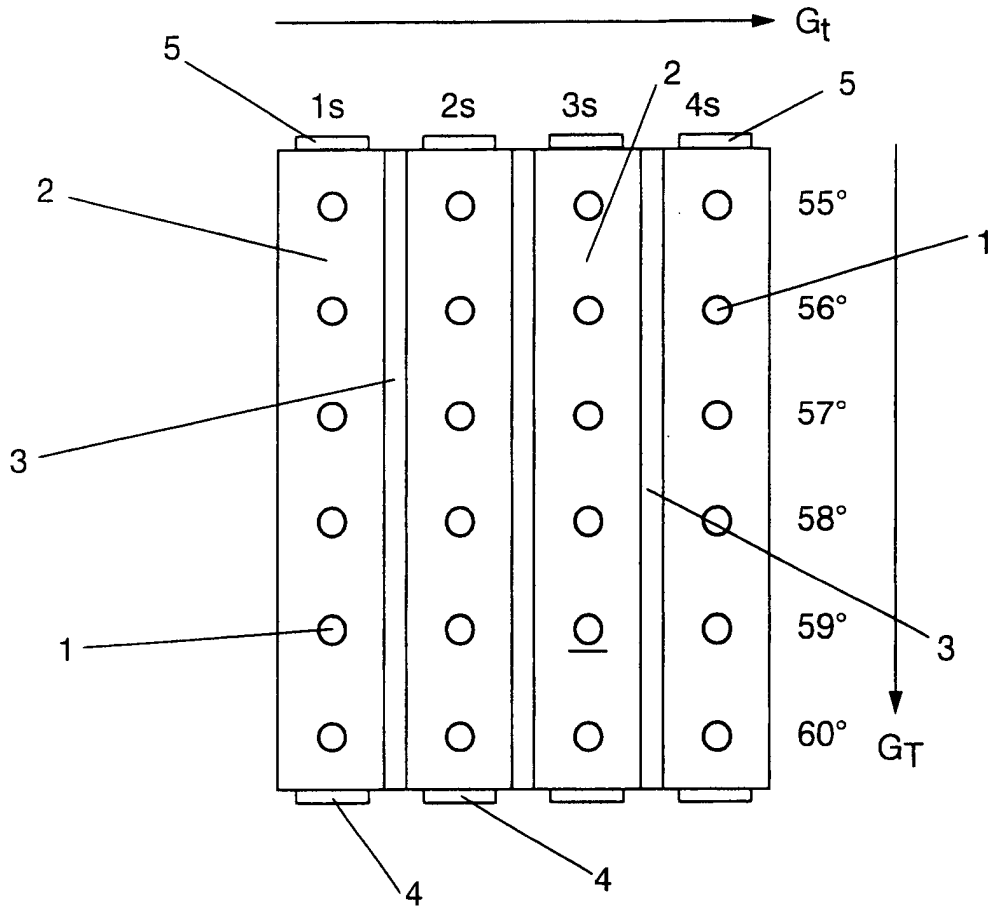


Fig 2

