

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
10. Juni 2010 (10.06.2010)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2010/063683 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2009/066081

(22) Internationales Anmeldedatum:
30. November 2009 (30.11.2009)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2008 059 985.9
2. Dezember 2008 (02.12.2008) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): **DRITTE PATENTPORTFOLIO BETEILI-
GUNGSGESELLSCHAFT MBH & CO. KG** [DE/DE];
Berliner Strasse 1, 12529 Schönefeld / OT Waltersdorf
(DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **DANKER, Tanja**
[DE/DE]; Große Elbstraße 1, 22767 Hamburg (DE).

(74) Anwalt: **ZECH, Stefan M.**; Meissner, Bolte, Postfach 86
06 24, 81633 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN,
KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA,
MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG,
NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC,
SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT,
LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI,
SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz
3)

(54) Title: REAL TIME PCR THROUGH GIGAHERTZ OR TERAHERTZ SPECTROMETRY

(54) Bezeichnung : REAL-TIME-PCR MITTELS GIGAHERTZ- ODER TERAHERTZ-SPEKTROMETRIE

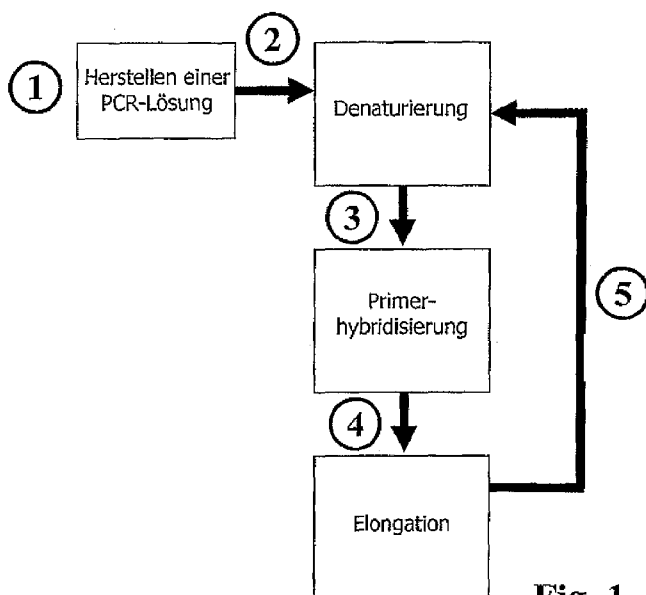


Fig. 1

- 1 Prepare a PCR solution
- 2 Denaturing
- 3 Primer hybridization

(57) Abstract: The invention relates to a method for spectroscopic real-time detection of nucleic acid molecules, in particular polynucleotide sequences, in a PCR amplification (PCR=polymerase chain reaction), wherein the PCR amplification comprises preparing the initial substances required for producing a PCR solution in a buffer and the repeating PCR reaction steps of denaturing, primer hybridization and elongation, and wherein electromagnetic radiation is irradiated into the PCR solution during the PCR amplification at defined time points from a radiation source in the gigahertz or terahertz regime in order to detect at least the presence or absence of a polynucleotide sequence using a detector in a real-time detection.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum spektroskopischen real-time Nachweis von Nukleinsäuremolekülen, insbesondere von Polynucleotidsequenzen, in einer PCR-Amplifikation (PCR=Polymerase-Kettenreaktion), wobei die PCR-Amplifikation das Bereitstellen der für die Herstellung einer PCR-Lösung notwendigen Ausgangssubstanzen in einem Puffer sowie die sich wiederholenden PCR-Reaktionsschritte der Denaturierung, der Primerhybridisierung und der Elongation umfasst, und wobei während der PCR-Amplifikation zu definierten Zeitpunkten aus einer Strahlungsquelle elektromagnetische Strahlung im Giga-Hertz-oder Tera-Hertz-Regime in die PCR-Lösung eingestrahlt wird, um mittels eines Detektors in einem real-time Nachweis wenigstens die

Anwesenheit oder Abwesenheit einer Polynucleotidsequenz nachzuweisen.

Real-Time-PCR mittels Gigahertz- oder Terahertz-Spektrometrie

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum spektroskopischen real-time Nachweis von Nukleinsäuremolekülen, insbesondere von Polynucleotidsequenzen, in einer PCR-Amplifikation, sowie eine entsprechende PCR-Anordnung (PCR=Polymerase-Kettenreaktion).

Derartige Verfahren sowie PCR-Anordnungen werden typischerweise zur quantitativen Analyse der Expression bestimmter Gensequenzen eingesetzt. PCR-Amplifikationen allgemein finden bei der Vervielfältigung und Untersuchung von DNS- bzw. RNS-Sequenzen, wie sie in vielen biologischen Systemen vorzufinden sind, häufige Verwendung, können jedoch auch im Prinzip mit künstlich hergestellten Polynucleotidsequenzen verwendet werden.

Das vorliegend beschriebene Verfahren bezieht sich auf einen spektroskopischen real-time Nachweis in einer PCR-Amplifikation. Damit wird sich sowohl auf Nachweise während des Ablaufs aller Reaktionsschritte einer PCR-Amplifikation bezogen, als auch auf zweckdienliche Nachweise davor und danach. So können beispielsweise in einleitenden Schritten vor der Ausführung der eigentlichen PCR-Reaktionsschritte zur Replikation von Polynucleotidsequenzen eingesetzte Substanzen mittels eines spektroskopischen Nachweises qualitativ wie quantitativ untersucht werden. Weiterhin können ebenso spektroskopische Untersuchungsschritte während der PCR-Amplifikation vorgenommen werden, und auch dann, wenn die PCR-Amplifikation an sich bereits beendet wurde.

PCR-Amplifikationen werden typischerweise dafür eingesetzt, im Vergleich zum menschlichen Genom relativ kurze und in ihrem Aufbau klar definierte Polynucleotidsequenzen zu vervielfältigen. Im Gegensatz zu lebenden Organismen vermag die PCR-Amplifikation lediglich die Vervielfältigung von Polynucleotidsequenzen mit wenigen tausend Basenpaaren pro Sequenz zu gewährleisten. Zur Durchführung einer PCR-Amplifikation bedarf es zunächst der Herstellung einer PCR-Lösung, welche neben einer Pufferlösung als geeignete chemische Umgebung eine Anzahl an weiteren, für den Ablauf einer PCR-Amplifikation notwendigen Ausgangssubstanzen aufweist. Diese Ausgangssubstanzen

umfassen typischerweise eine originale, zu vervielfältigende Polynucleotidsequenz, Primer zur Festlegung eines Anfangs- sowie eines Endabschnittes der zu vervielfältigenden Polynucleotidsequenz eine entsprechende Polymerase, um den durch die Primer definierten Abschnitt zu replizieren, sowie Desoxynukleosidtriphosphate, welche die Bausteine der replizierten Polynucleotidsequenz darstellen. Neben diesen Ausgangssubstanzen kann eine PCR-Lösung zudem eine Anzahl an weiteren funktionellen Komponenten enthalten, welche etwa erlauben, den Ablauf der PCR-Amplifikation in Bezug auf die Effektivität zu steigern oder zu optimieren.

Eine PCR-Amplifikation besteht aus einer sich wiederholenden Abfolge von PCR-Reaktionsschritten, wie sie etwa in laborüblichen Thermocyclern durchgeführt werden können. Jede Wiederholung umfasst hierbei die drei PCR-Reaktionsschritte der Denaturierung, der Primerhybridisierung und der Elongation. Bei der Denaturierung kommt es zunächst zu einem Aufschmelzen von doppelsträngigen Polynucleotidsequenzen, unter Erhitzen der PCR-Lösung auf eine Temperatur von etwa 95°C, um die Wasserstoffbrückenbindungen, die die beiden einzelsträngigen Polynucleotidsequenzen zusammenhalten, zu lösen. Das Temperaturniveau wird solange beibehalten, bis gewährleistet ist, dass in der PCR-Lösung nur noch einzelsträngige Polynucleotidsequenzen vorliegen. In dem PCR-Reaktionsschritt der Primerhybridisierung, wird die Temperatur typischerweise für einige Sekunden lang auf einem Niveau gehalten, welches eine spezifische Anlagerung des Primers an die Polynucleotidsequenz erlaubt. Das bezeichnete Temperaturniveau liegt dabei normalerweise um wenige °C unter dem Schmelzpunkt der durch die spezifische Anlagerung entstehenden Primersequenzen, und entspricht meist einer Temperatur zwischen 55°C bis 65°C. Ist die Anlagerung der Primer an die vorbestimmten Stellen der Polynucleotidsequenz abgeschlossen, erfolgt in dem PCR-Reaktionsschritt der Elongation das Auffüllen durch die fehlenden Stränge oder Bausteine an freien Nucleotiden unter Einwirkung der Polymerase. Hierbei bildet der Primer den Anfang eines neuen Einzelstrangs, welcher stückweise repliziert wird. Die während dieses PCR-Reaktionsschrittes einzustellende Temperatur hängt von dem Arbeitsoptimum der jeweils verwendeten Polymerase ab, liegt jedoch typischerweise um 10°C bis 15°C über dem Temperaturniveau der Primerhybridisierung. Nach Abschluss des PCR-Reaktionsschrittes der Elongation wiederholt sich die Reaktionsabfolge, und die gewünschten Polynucleotidsequenzen vermehren sich im besten Reaktionsfalle exponentiell, da in jedem weiteren Reaktionsschritt auch die zuvor synthetisierten Polynucleotidsequenzen als Matrizen für eine weiteren Strangsynthese dienen können.

In der Real-Time-quantitative PCR, einer aus dem Stande der Technik bekannten Weiterentwicklung der PCR-Amplifikation, wird eine PCR-Amplifikation zur Replikation von Polynucleotidsequenzen durchgeführt und gleichzeitig eine Möglichkeit der Quantifizierung der so gewonnenen Polynucleotidsequenzen bereit gestellt. Die Quantifizierung beruht hierbei auf der Ausführung von Fluoreszenzmessungen, die während des Ablaufes der PCR-Amplifikation vorgenommen werden. Das nachgewiesene Fluoreszenzsignal nimmt dabei proportional mit der Menge an replizierten Polynucleotidsequenzen zu. Dementsprechend erlaubt die Real-Time-quantitative PCR im Gegensatz zu den meisten herkömmlichen quantitativen Nachweismethoden, welche erst nach der PCR-Amplifikation angewendet werden können, eine quantitative Auswertung der in der PCR-Amplifikation replizierten Polynucleotidsequenzen noch während ihrer Vervielfältigung.

Hierbei soll darauf hingewiesen werden, dass hier und im Folgenden ein quantitativer Nachweis im Sinne der Quantifizierung in Verbindung mit einer Real-Time-quantitative PCR zu verstehen ist. Dieser können verschiedene bekannte Quantifizierungsmodelle zugrunde liegen. In einem einfachen Fall kann etwa die Tatsache benutzt werden, dass zwischen dem Logarithmus der eingesetzten Menge an der zu replizierenden Polynucleotidsequenz und dem CT (Threshold Cycle = "Schwellenwert-Zyklus", d.h. dem Zyklus, zu welchem die nachgewiesene Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz liegt) eine lineare, umgekehrt proportionale Beziehung besteht. Ist die eingesetzte Menge etwa zunächst bekannt, kann eine Standardkurve erzeugt werden, gegen deren Steigung jede unbekannte Menge an Polynucleotidsequenz verglichen und quantifiziert werden kann. Ist andererseits die Ausgangsmenge unbekannt, kann mitunter durch Bestimmung des CT auch auf die Ausgangsmenge zurückgeschlossen werden. Weitere Berechnungsmethoden sind dem Fachmann bekannt.

Die Real-Time-Quantitative PCR bedarf dabei Fluoreszenzfarbstoffe oder sogenannter Fluoreszenzmarker, welche chemisch oder physikalisch mit den replizierten Polynucleotidsequenzen in Wechselwirkung treten, und infolgedessen ihr eigenes Fluoreszenzverhalten ändern. Dementsprechend korreliert die Zunahme der Intensität eines nachgewiesenen Fluoreszenzsignals nach den sich wiederholenden PCR-Reaktionsschritten mit einer entsprechenden Zunahme an replizierten Polynucleotidsequenzen. Der Nachweis des Verlaufs einer PCR-Amplifikation über gemessene Fluoreszenzsignale, kann sich beispielsweise auf die Verwendung von einfachen Fluoreszenzfarbstoffen stützen, die sich relativ unspezifisch an die zu replizierende Polynucleotidsequenz binden. Solche Fluoreszenzfarbstoffe sind etwa SybrGreen, welches ein asymmetrisches Cyanin-Farbstoffmolekül ist und mit zu replizierenden DNA-Molekülen einen DNA-Fluoreszenzfarbstoff-

Komplex bildet, welcher blaues Licht bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\max} = 494$ nm absorbiert und grünes Licht bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\max} = 521$ nm emittiert. Ein weiterer häufig verwendeter Fluoreszenzfarbstoff ist Ethidiumbromid. In Ergänzung zu diesen Fluoreszenzfarbstoffen kommen auch noch Fluoreszenzmarker wie FRET-Sonden, Lightcycler-Sonden®, TaqMan-Sonden®, Molecular-beacons, Scorpionprimer oder auch Luxprimer® zum Einsatz, welche zwar eine spezifische Bindung an einzelne Stellen der Polynucleotidsequenz erlauben und folglich eng definierte Fluoreszenzeigenschaften aufweisen, aber vergleichsweise teurer sind. Folglich finden solche Fluoreszenzmarker nicht die breite Anwendung, wie sie etwa für die Fluoreszenzfarbstoffe typisch ist. Weiterhin stellen sich etwa Molecular-beacons als relativ komplexe Strukturen dar, die zusätzlich optimierter und damit teurerer Primer zur Durchführung der PCR-Amplifikation bedürfen. Weiterhin erschweren derartige komplexe Strukturen eine optimierte Einstellung der PCR-Reaktionsbedingungen und fördern so eine relativ ineffiziente Vervielfältigung der Polynucleotidsequenzen als auch die Darstellung vieler unerwünschter Nebenprodukte.

Zur Vermeidung dieser Nachteile der auf den Nachweis von Fluoreszenzsignalen beruhenden Real-Time-quantitative PCR schlägt die aus dem Stand der Technik bekannte WO 03/102238 A2 ein Verfahren zum Nachweis der Darstellung von zusammenhängenden Nukleinsäuremolekülen in einer PCR-Lösung vor, sowie eine Anordnung vor, um das besagte Verfahren auszuführen. Das Verfahren umfasst die Bereitstellung von PCR-Ausgangsstoffen in einer Kammer, sowie die Durchführung der sich wiederholenden PCR-Reaktionsschritte der Denaturierung, der Primerhybridisierung und der Elongation. Während der Ausführung dieser PCR-Reaktionsschritte wird die Darstellung zusammenhängender Nukleinsäuremoleküle durch die Einstrahlung von UV-Licht in die PCR-Lösung und dem darauf folgenden Nachweis der absorbierten Lichtintensität vorgenommen. Die PCR-Lösung wird hierbei von einer für die Durchführung einer PCR-Amplifikation angepassten Kammer aufgenommen, in welche die Lichtenergie der UV-Lichtquelle eingestrahlt wird.

Obwohl das in der WO 03/102238 A2 beschriebene Verfahren die Verwendung von Fluoreszenzmarkern unnötig werden lässt, zeigt sich diese Methode als sehr störanfällig in Bezug auf einzelne Komponenten der PCR-Lösung oder in Bezug auf verbliebene Überreste aus Reaktionsschritten von vorhergehenden Isolierungsreaktionen, z. B. Phenole. Ein weiterer Nachteil der quantitativen Bestimmung mittels UV-Absorption ist auch darin zu sehen, dass einzelsträngige von doppelsträngigen Nukleinsäuremolekülen nur begrenzt unterschieden werden können und folglich eine nur sehr unspezifische Nachweismöglichkeit für Polynucleotidsequenzen zur Verfügung steht.

WO 2008/109706 A1 beschreibt die Anwendung von Terahertz-Spektroskopie in verschiedenster Art. Dabei wird auch die Detektion doppelsträngiger und einzelsträngiger DNA beschrieben. Eine real-time Methode zum Nachweis des PCR-Produktes wird in dieser Druckschrift in keiner Weise beschrieben.

WO 2006/064192 A1 beschreibt einen Bandfilter im Terahertzbereich. Ein Verfahren bezüglich dem Nachweis von Nucleinsäuremolekülen wird in dieser Druckschrift nicht beschrieben.

Die US 2006/0216742 beschreibt ein Verfahren und ein System zum Nachweis biomolekularer Bindungsereignisse unter Verwendung von Gigahertz- oder Terahertzstrahlung.

Die WO 03/100396 A1 offenbart ein Verfahren zum Nachweis der Spezifität eines Liganden zu einer biologischen Probe.

Die DE 100 54 476 A1 beschreibt ein Verfahren zum Nachweis von Polynucleotidsequenzen, bei dem der Brechungsindex oder eine äquivalente Größe der mit dem Testmedium in Kontakt befindlichen Probe durch Wechselwirkung mit einfallender elektromagnetischer Strahlung bestimmt wird.

Die WO 2004/024949 A2 beschreibt ein Verfahren zum schnellen Nachweis von Mutationen und Nucleotidpolymorphismen unter Einsatz von Spektraldaten.

Eine spezifischere Methode zum Nachweis des Vorliegens einer biomolekularischen Bindung zwischen zwei Molekülen wird von der US 2006/0216742 A1 vorgeschlagen, welche eine Nachweismethode sowie eine entsprechende Vorrichtung betrifft. Gemäß der Offenbarung wird über Terahertzstrahlung das Vorliegen einer biomolekularischen Bindung zweier Moleküle nachweisen, indem aus einer Quelle Terahertzstrahlung ausgesendet wird und nach Durchstrahlung einer die Moleküle umfassenden Probe von einem Detektor nachgewiesen wird. Hierbei erlaubt die offenbarte Methode jedoch nicht die Quantifizierung eingesetzter Mengen der Moleküle, und ist folglich für eine Verwendung zum Real-Time-Nachweis in einer PCR-Amplifikation ungeeignet.

Es stellt sich demnach die Aufgabe dar, ein markerfreies Verfahren zum Real-Time-Nachweis von Polynucleotidsequenzen in einer PCR-Amplifikation vorzuschlagen, welches einen spezifischen und quantitativen Nachweis von Polynucleotidsequenzen, insbe-

sondere eine Unterscheidung zwischen einzel- und doppelsträngigen Polynucleotidsequenzen, ermöglicht, und von der Reinheit oder Qualität der Lösung weitgehend unbeeinflusst ist.

Gelöst wird diese Aufgabe durch ein Verfahren gemäß Patentanspruch 1 und 15 sowie eine PCR-Anordnung gemäß Patentanspruch 14.

Insbesondere wird die Aufgabe durch ein Verfahren zum auch quantitativen spektroskopischen real-time Nachweis von Nukleinsäuremolekülen, insbesondere von Polynucleotidsequenzen, in einer PCR-Amplifikation gelöst, wobei die PCR-Amplifikation das Bereitstellen der für die Herstellung einer PCR-Lösung notwendigen Ausgangssubstanzen in einer Pufferlösung sowie die sich wiederholenden PCR-Reaktionsschritte der Denaturierung, der Primerhybridisierung und der Elongation umfasst, und wobei während der PCR-Amplifikation zu definierten Zeitpunkten aus einer Strahlungsquelle elektromagnetische Strahlung im Giga-Hertz- oder Tera-Hertz-Regime in die PCR-Lösung eingestrahlt wird, um mittels eines Detektors in einem quantitativen real-time Nachweis wenigstens die Anwesenheit oder Abwesenheit einer Polynucleotidsequenz nachzuweisen.

Fernerhin wird die Aufgabe durch ein Verfahren zum auch quantitativen spektroskopischen real-time Nachweis von Nukleinsäuremolekülen, insbesondere von Polynucleotidsequenzen, in einer PCR-Amplifikation gelöst, wobei die PCR-Amplifikation das Bereitstellen der für die Herstellung einer PCR-Lösung notwendigen Ausgangssubstanzen in einer Pufferlösung sowie die sich wiederholenden PCR-Reaktionsschritte der Denaturierung, der Primerhybridisierung und der Elongation umfasst, und wobei während der PCR-Amplifikation zu definierten Zeitpunkten aus einer Strahlungsquelle elektromagnetische Strahlung im Giga-Hertz- oder Tera-Hertz-Regime in die PCR-Lösung eingestrahlt wird, um mittels eines Detektors in einem real-time Nachweis wenigstens die Anwesenheit oder Abwesenheit einer Polynucleotidsequenz nachzuweisen, und wobei der Reaktionsschritt der Denaturierung durch Tera-Hertz-Strahlung aus der Strahlungsquelle bewirkt wird.

Überdies wird die Aufgabe durch Eine PCR-Anordnung zum auch quantitativen spektroskopischen real-time Nachweis von Polynucleotidsequenzen in einer PCR-Amplifikation gelöst, wobei diese ein Substrat mit einem Aufnahmebereich für eine PCR-Lösung, bestehend aus den notwendigen Ausgangssubstanzen und einer Pufferlösung, Temperaturänderungsmittel, mittels derer die PCR-Lösung auf vorgegebene Temperaturen geheizt und/oder gekühlt werden kann, um die sich wiederholenden PCR-Reaktionsschritte der

Denaturierung, der Primerhybridisierung oder der Elongation zu ermöglichen, eine Strahlungsquelle, um elektromagnetische Strahlung im Giga-Hertz- oder Tera-Hertz-Regime in die PCR-Lösung einzustrahlen, und einen Detektor, um durch die PCR-Lösung transmittierte Strahlung auch quantitativ spektroskopisch nachzuweisen, umfasst.

Ein Kerngedanke der vorliegenden Verfahren sowie der erfindungsgemäßen PCR-Anordnung liegt in der Ausführung einer PCR-Amplifikation sowie einem spektroskopischen Real-Time-Nachweis im Giga-Hertz- oder Tera-Hertz-Regime des elektromagnetischen Spektrums. Typischerweise in diesem Frequenzbereich verwendete Strahlungen liegen zwischen 100 Gigahertz und 20 Terahertz, insbesondere zwischen 300 Gigahertz und 10 Terahertz. Diese Strahlungsfrequenzen sind geeignet, bestimmte Anregungszustände (typischerweise vibratorische Schwingungsmoden) von einzelsträngigen und doppelsträngigen Polynucleotidsequenzen anzuregen. Anregungszustände einzelner funktioneller Gruppen dieser Polynucleotidsequenzen sind folglich mit einer vorbestimmten Frequenz der elektromagnetischen Strahlung korreliert, und können in Extinktionsmessungen nachgewiesen werden. Unter Extinktionsmessungen werden im Folgenden allgemein alle spektroskopischen Nachweise, auch quantitative, bezeichnet, welche Teile der in die PCR-Lösung eingestrahlten Lichtintensität mit Teilen der aus ihr austretenden und mit einem Detektor nachgewiesenen Lichtintensität in Beziehung setzt, um Rückschlüsse auf nachzuweisende Stoffe und Strukturen in der PCR-Lösung zu erlauben. Diese Anregungsmoden (Anregungsfrequenzen) sind überdies charakteristisch für die chemischen Bindungszustände dieser funktionellen Gruppen, und können infolge einer Veränderung des Bindungszustandes mit einer Veränderung der elektromagnetischen Anregungsfrequenz einhergehen. Insbesondere lassen sich Anregungsmoden nachweisen, deren Auftreten charakteristisch für das Vorliegen von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden einzelsträngigen Polynucleotidsequenz in einer doppelsträngigen Polynucleotidsequenz ist. Dementsprechend können durch Extinktionsmessungen in diesem bezeichneten Frequenzbereich quantitative Aussagen darüber gewonnen werden, ob in einer PCR-Lösung ein Gemisch von einzel- oder doppelsträngigen Polynucleotidsequenzen vorliegt.

Der Nachweis vorbestimmter Anregungszustände von Polynucleotidsequenzen in einer PCR-Lösung mittels spektroskopischer Extinktionsmessungen erfordert im Vergleich zum bisher herkömmlichen Verfahren des Nachweises mittels Fluoreszenzmessungen keinerlei Fluoreszenzmarker, welche einer PCR-Lösung zugegeben werden müssen. Damit gestaltet sich einerseits die Herstellung einer PCR-Lösung als weniger komplex und kostengünstiger. Andererseits kann auf den Einsatz von für die PCR-Lösung mitunter schädlichen UV-Lichts verzichtet werden. Gerade durch UV-Licht, welches elektronische An-

regungen in biologischen Makromolekülen bewirkt, sind die möglichen Fehlerquellen durch chemische Nebenreaktionen, welche durch die Einstrahlung von UV-Licht mitunter initiiert werden, sehr problematisch. Elektromagnetische Strahlung im Giga-Hertz- sowie Tera-Hertz-Regime vermögen jedoch typischerweise nur vibratorische Anregungen hervorzurufen und stören somit die chemische Reaktionsumgebung in einer PCR-Lösung in praktischer Hinsicht kaum. Überdies ist die Strahlungsfrequenz von Giga-Hertz- und Tera-Hertz-Strahlung geeignet, um Hybridisierungszustände von zusammen hängenden Nucleinsäuremolekülen bzw. von Polynucleotidsequenzen nachzuweisen. Anders als in einem Real-Time-Quantitative PCR-Verfahren mittels Fluoreszenzmessung im UV-Regime können folglich Nachweise entsprechend des erfindungsgemäßen Verfahrens das Vorliegen einzelner Hybridisierungszustände, insbesondere das Vorliegen von einzelsträngigen und doppelsträngigen Polynucleotidsequenzen, nachweisen. Dieser für die Durchführung einer PCR-Amplifikation mitunter entscheidende, auch quantitative Nachweis erlaubt Schlüsse auf den Fortschritt sowie die Qualität der in der PCR-Lösung stattfindenden Reaktionsschritte und damit eine Erhöhung der Effizienz der PCR-Amplifikation allgemein.

Ein weiterer Kerngedanke des erfindungsgemäßen Verfahrens liegt fernerhin darin, dass die zum spektroskopischen Real-Time-Nachweis eingesetzte Strahlungsquelle auch dafür eingesetzt werden kann, den Reaktionsschritt der Denaturierung in der PCR-Amplifikation durch elektromagnetische Strahlung herbeizuführen. Der eingestrahlte Frequenzbereich ist nämlich durchaus geeignet, die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden Einzelsträngen in einer doppelsträngigen Polynucleotidsequenz aufzuschmelzen, ohne dass dem gesamten System der PCR-Lösung direkt thermische Energie hinzugefügt werden muss. Folglich bedarf es in dem Reaktionsschritt der Denaturierung nicht einer Temperaturerhöhung einer PCR-Lösung um das Aufschmelzen der chemischen Verbindungen zwischen einzelnen Strängen einer Polynucleotidsequenz zu bewirken. Vielmehr bewirkt die Strahlungsquelle durch Einstrahlen elektromagnetischer Strahlung einer vorbestimmten Frequenz im Giga-Hertz- sowie Tera-Hertz-Regime in die PCR-Lösung ein Aufschmelzen doppelsträngigen Polynucleotidsequenzen ohne dass die PCR-Lösung selbst eine starke Temperaturänderung erfahren muss. Ein derartiges Verfahren verkürzt somit die für die sich wiederholenden PCR-Reaktionsschritte nötigen Aufheiz- und Abkühlphasen der PCR-Lösung und ermöglicht eine zeitlich schnellere Darstellung einer gewünschten Menge an zu vervielfältigenden Polynucleotidsequenzen.

In einer ersten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist vorgesehen, dass die für die Herstellung einer PCR-Lösung notwendigen Ausgangssubstanzen in einer Puf-

ferlösung keine chemischen oder physikalischen Nachweismarker, insbesondere keine Fluoreszenzmarker, umfassen. Hierbei handelt es sich um Marker, welche für die Herstellung einer weiter oben beschriebenen PCR-Lösung als nicht notwendige Ausgangssubstanzen zugesetzt werden, um in einem Messverfahren, das aus dem Stande der Technik bekannt ist, die Darstellung von Polynucleotidsequenzen nachweisen zu können. Die für das ausführungsgemäße Verfahren bereitgestellte PCR-Lösung, kann folglich auf die notwendigen Ausgangssubstanzen beschränkt werden, wie sie etwa für eine gewöhnliche PCR-Amplifikation ohne Real-Time-Nachweis notwendig sind. Damit werden einerseits mögliche Störeinflüsse chemischer sowie physikalischer Natur in dem Verfahren der PCR-Amplifikation vermindert, und gleichzeitig die Kontrollierbarkeit der Reaktionsbedingungen erhöht.

In einer weiteren Ausführungsform kann vorgesehen sein, dass die Intensität der eingestrahlten elektromagnetischen Strahlung im Giga-Hertz- oder Tera-Hertz-Regime so ausgewählt wird, dass sie eine vorbestimmte Schichtdicke der PCR-Lösung durchdringt. Die Schichtdicke kann sich hierbei entweder auf den gesamten Probenquerschnitt, welcher von der eingestrahlten elektromagnetischen Strahlung durchdrungen wird, oder aber auch nur auf einen Teilbereich des Probenquerschnittes beziehen. Die Schichtdicke ist geeignet, bei Einstrahlung einer vorgegebenen Strahlungsintensität und Vorliegen einer Anzahl an Polynucleotidsequenzen oberhalb einer bestimmten Detektionsschwelle ein Extinktionssignal nachzuweisen. Das Extinktionssignal, welches aus einer Abschwächung der elektromagnetischen Strahlungsintensität resultiert, kann etwa aus Absorption, Streuung, Beugung sowie Reflexion resultieren. Ist die durchstrahlte Schichtdicke konstant, sowie die eingestrahlte elektromagnetische Strahlung in ihrer Intensität unveränderlich, kann auf die Menge an dargestellten Polynucleotidsequenzen etwa bei bekanntem Extinktionsquerschnitt der Polynucleotidsequenzen rückgeschlossen werden.

In einer weiterführenden Ausführungsform des Verfahrens ist vorgesehen, dass die Frequenz der eingestrahlten elektromagnetischen Strahlung im Giga-Hertz- oder Tera-Hertz-Regime zwischen 100 GHz und 20 THz, insbesondere zwischen 300 GHz und 10 THz liegt. Diese Frequenzbereiche decken die spektroskopisch leicht nachweisbaren Anregungsfrequenzen der meisten Polynucleotidsequenzen ab und erlauben somit die Anregungsschwingungen spektroskopisch, insbesondere spektroskopisch quantitativ, nachzuweisen.

In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, dass die Pufferlösung der PCR-Lösung in Bezug auf eine Frequenz der eingestrahlten elektromag-

netischen Strahlung im Giga-Hertz- oder Tera-Hertz-Regime so ausgewählt wird, dass die Strahlungsintensität nach Transmission einer vorbestimmten Schichtdicke der PCR-Lösung mit dem Detektor weitgehend ungeschwächt nachgewiesen werden kann. Die Pufferlösung selbst wird somit in Bezug auf die eingesetzten elektromagnetischen Strahlungsfrequenzen so ausgewählt, dass die eingestrahlte elektromagnetische Strahlung vorbestimmter Frequenzbereiche eine möglichst große Transmission erfährt. Überlappen diese Frequenzbereiche mit nachzuweisenden Anregungszuständen der Polynucleotidsequenzen, ist gewährleistet, dass eine Verringerung der elektromagnetischen Strahlungsintensität nach Wechselwirkung mit der PCR-Lösung nicht auf dem Extinktionsverhalten der Pufferlösung selbst, sondern lediglich auf das der Ausgangssubstanzen sowie mit den dargestellten Molekülen beruht. Kann weiterhin eine Extinktion durch Nebenprodukte der PCR-Amplifikation ausgeschlossen werden, beruht die Abschwächung der elektromagnetischen Strahlungsintensität in den Bereichen der Anregungszuständen der Polynucleotidsequenzen weitgehend allein auf der Wechselwirkung der elektromagnetischen Strahlung mit den Polynucleotidsequenzen. Das Verhältnis von Nutzsignal und unerwünschter Abschwächung der elektromagnetischen Strahlung wird infolge erhöht und die Qualität des auch quantitativen spektroskopischen Real-Time-Nachweises verbessert.

In einer weiterführenden Ausführungsform des Verfahrens zeichnet sich dieses dadurch aus, dass die PCR-Lösung auf einem Substrat, insbesondere in einem vorbestimmten Aufnahmebereich des Substrats aufgebracht ist, welches für die eingestrahlte elektromagnetische Strahlung im Giga-Hertz- oder Tera-Hertz-Regime weitgehend transparent ist. Ein derartiger Aufnahmebereich kann durch ein begrenztes Volumen ausgebildet sein, oder aber lediglich auch als Fläche zum Auftrag einer PCR-Lösung. Das Substrat selbst kann ein mineralisches Substrat, beispielsweise Glas, oder aber auch ein Kunststoffsubstrat sein. Ist das Substrat selbst für die eingestrahlte elektromagnetische Strahlung weitgehend transparent, verursacht es lediglich einen geringen Anteil des in dem spektroskopischen Real-Time-Nachweisverfahren nachgewiesenen Extinktionssignals. Die nachgewiesene Extinktion beruht damit weitgehend auf der Wechselwirkung der elektromagnetischen Strahlung und der PCR-Lösung, bzw. der darin enthaltenen Stoffe, falls die Pufferlösung der PCR-Lösung selbst ebenfalls in dem Frequenzbereich der eingestrahlten elektromagnetischen Strahlung keine oder nur geringe Schwächung der Strahlungsintensität verursacht. Weiterhin kann das Substrat, falls es ein Kunststoff ist, durch die Auswahl eines geeigneten Kunststoffes an den Nutzfrequenzbereich der eingestrahlten elektromagnetischen Strahlung angepasst werden, um eine möglichst geringe Abschwächung der Strahlungsintensität zu bewirken.

In einer weiteren Ausführungsform des Verfahrens umfasst das Substrat wenigstens einen Wellenleiter für elektromagnetische Strahlung im Giga-Hertz- oder Tera-Hertz-Regime. Dieser Wellenleiter kann einerseits als Strahlungsführungsmittel als auch gleichzeitig als Substrat mit einem möglichen Aufnahmebereich für die PCR-Lösung dienen. Dementsprechend kann die Einstrahlung von elektromagnetischer Strahlung in die PCR-Lösung örtlich in gut kontrollierbarer Weise erfolgen. Zudem kann die Streustrahlung bzw. Verluststrahlung, wie sie in gewöhnlichen Kollimations- und Fokussierverfahren auftritt, verringert und der spektroskopische Real-Time-Nachweis verbessert werden. Besonders vorteilhaft lässt sich ein Wellenleiter einsetzen, wenn der vorbestimmte Aufnahmebereich für die PCR-Lösung sich in einem Bereich befindet, welcher von dem evaneszenten Strahlungsfeld des Wellenleiters durchdrungen wird. Ein Nachweis der Polynucleotidsequenzen findet folglich mit elektromagnetischer Strahlung statt, welche einerseits durch den Wellenleiter geführt wird, andererseits jedoch mit Bereichen der Oberfläche außerhalb des Wellenleiters kommuniziert.

In einer weiterführenden Ausführungsform des Verfahrens zum spektroskopischen Real-Time-Nachweis sind fernerhin Temperaturänderungsmittel bereitgestellt, mittels derer die PCR-Lösung auf vorgegebene Temperaturen geheizt und/oder gekühlt werden kann. Derartige Temperaturänderungsmittel können entweder direkt oder indirekt die PCR-Lösung heizen oder kühlen. Eine direkte Temperaturerhöhung kann beispielsweise auf einer direkten Strahlungsheizung oder einer Widerstandsheizung beruhen. Eine Kühlung kann etwa durch geeignet angeordnete Peltierelemente oder aber auch durch ein Kühlmedium, beispielsweise Luft, bewirkt werden, welches mit einem Wärmeaustauscher in Verbindung steht. Die Temperaturänderungsmittel gewährleisten dabei, dass ein möglichst schnelles und genaues Wechseln der für die einzelnen PCR-Reaktionsschritte notwendigen Temperaturen ermöglicht wird.

In einer weiterführenden Ausführungsform des Verfahrens ist vorgesehen, dass die Temperaturänderungsmittel ein Wärmemedium heizen und/oder kühlen, welches über das Substrat die PCR-Lösung indirekt heizt und/oder kühlt. Ferner ist zu berücksichtigen, dass die Wärmekapazität des Substrats selbst gering und die Wärmeleitfähigkeit möglichst groß ist. Ausführungsgemäß kann das Wärmemedium flächig in Wechselwirkung stehen, oder aber auch dieses in dafür vorgesehenen Führungsmitteln, beispielsweise in Kanälen, durchdringen. Mittels der Heizung oder Kühlung des Substrats wird bei geeignetem Kontakt der PCR-Lösung mit dem Substrat die Temperatur der PCR-Lösung entsprechend verändert. Folglich können die für den Ablauf der PCR-Reaktionsschritte notwendigen Temperaturbedingungen gewährleistet werden.

In einer vorteilhaften Ausführung des Verfahrens ist vorgesehen, dass elektromagnetische Strahlung im Giga-Hertz- oder Tera-Hertz-Regime aus der Strahlungsquelle in die PCR-Lösung vor und/oder nach einem Schritt der Denaturierung, und/oder der Primerhybridisierung und/oder der Elongation eingestrahlt wird. Dementsprechend können die Ausgangsbedingungen sowie Reaktionserfolge nach jeder der in der PCR-Amplifikation stattfindenden Reaktionsschritte mittels eines spektroskopischen Nachweises überprüft werden. Sollte sich etwa durch den Nachweis herausstellen, dass die Ausgangsvoraussetzungen für einen nachfolgenden PCR-Reaktionsschritt ungünstig sind, können entsprechende Veränderungen der Reaktionsbedingungen, beispielsweise in der Temperaturwahl, vorgenommen werden, um einen verbesserten Erfolg herbeizuführen. In einer alternativen Ausgestaltung kann auch die elektromagnetische Strahlung im Giga-Hertz- oder Tera-Hertz-Regime während der PCR-Amplifikation stattfindenden Reaktionsschritte der Denaturierung, der Primerhybridisierung oder der Elongation eingestrahlt werden, um beispielsweise Rückschlüsse auf das zeitliche Bindungsverhalten einzelner molekularer Bausteine zu gewinnen.

In einer besonders vorteilhaften Ausführungsform des Verfahrens wird die Frequenz der elektromagnetischen Strahlung ausgewählt, um definierte vibratorische Anregungsmoden von einzel- und/oder doppelsträngigen Polynucleotidsequenzen zu erregen, um diese, insbesondere die für das Vorliegen von Hybridisierungszuständen von doppelsträngigen Polynucleotidsequenzen charakteristischen Moden, nachzuweisen. Folglich kann während der PCR-Amplifikation das Vorliegen bestimmter molekularer Strukturen der Polynucleotidsequenzen nachgewiesen werden, mittels derer die Qualität des Ablaufs der PCR-Amplifikation überprüft und nachgewiesen werden kann. Weiterhin kann auch nach erfolgtem Nachweis der Polynucleotidsequenzen ein Abbruch der PCR-Amplifikation eingeleitet werden. Insbesondere kann auch über den Nachweis der Verschiebung der Anregungsfrequenz definierter Anregungsmoden ein Rückschluss auf die Struktur der Polynucleotidsequenzen, insbesondere auf deren Hybridisierungszustand, gewonnen werden.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung werden während der PCR-Amplifikation zeitlich vorausgehende Nachweise mittels der elektromagnetischen Strahlung im Giga-Hertz- oder Tera-Hertz-Regime als Untergrund für zeitlich nachfolgende Nachweise in der Analyse der Nachweise berücksichtigt. Die zeitlich vorausgehenden Nachweise können für die Untergrundsubtraktion, welche in Extinktionsmessungen unerlässlich sind, entweder in direkter, gemittelter, oder in gefilterter Weise von nachfolgenden Nachweisen abgezogen werden. Dieser für den Erhalt von quantitativen Ergebnissen

notwendige Schritt der Untergrundsubtraktion bedarf somit keiner weiteren Vorkenntnisse über das konkrete Extinktionsverhalten der PCR-Anordnung, sondern erlaubt eine gute Untergrundbestimmung in zeitlich naher Weise.

In einer weiteren Ausführungsform des Verfahrens zum spektroskopischen Real-Time-Nachweis von Polynucleotidsequenzen wird elektromagnetische Strahlung im Giga-Hertz- oder Tera-Hertz-Regime aus der Strahlungsquelle vor Durchführen einer PCR-Amplifikation in eine Lösung von in der PCR-Amplifikation zu verwendenden Ausgangssubstanzen eingestrahlt, um chemische oder physikalische Eigenschaften einzelner Ausgangssubstanzen, insbesondere deren Qualität, Spezifität und deren Bindungsverhalten, mittels spektroskopischer Nachweise zu bestimmen. Hierbei ist anzuführen, dass typischerweise vor dem Durchführen einer Real-Time-quantitative PCR die meisten Anwender von PCR-Amplifikationen die Qualität bzw. Spezifität und deren Bindungsverhalten (Qualität der Polynucleotidsequenzen, Primerbindung, Primerspezifität, Amplifikationsmengen) aus Kostengründen in einer PCR-Vorrichtung, welche nicht die Möglichkeit eines spektroskopischen Real-Time-Nachweises unter Einsatz von Fluoreszenzmessungen bereit hält, testen. Gemäß einer Durchführung des ausführungsgemäßen Verfahrens kann folglich diese separate Überprüfung entfallen, und die physikalischen und chemischen Eigenschaften einzelner Ausgangssubstanzen mittels einer erfindungsgemäßen PCR-Anordnung direkt bestimmt werden. Weiterhin sind die in PCR-Amplifikationen typischerweise verwendete Primer für die Verwendung in gewöhnlichen PCR-Anordnungen ohne spektroskopischen Real-Time-Nachweis ausgelegt, und erfordern in der Verwendung in einer PCR-Anordnung mit spektroskopischem Real-Time-Nachweis auf der Grundlage des Einsatzes von Fluoreszenzmarkern eine neuerliche Optimierung der Reaktionsbedingungen für die die Primer enthaltenden PCR-Lösung mit Fluoreszenzmarkern. Diese erneute Optimierung wird meist deswegen notwendig, weil der Zusatz von Fluoreszenzmarkern die Schmelzpunkte der Polynucleotidsequenzen und damit die Primerbindung beeinflusst. Kann die Primerbindung bzw. Primerspezifität vorab in einer PCR-Anordnung bestimmt werden, in welcher zu einem späteren Zeitpunkt auch die spektroskopischen Real-Time-Nachweise von Polynucleotidsequenzen mit Giga-Hertz oder Tera-Hertz Strahlung durchgeführt werden, entfallen folglich aufwändige Optimierungsanstrengungen.

Weiterhin sei auch darauf hingewiesen, dass die in Fluoreszenzmessungen im UV-Regime eingesetzten Reaktionsgefäße aufgrund von Verschmutzungen, wie beispielsweise Fingerabdrücken, leicht Anlass zu Fehlmessungen sein können und daraus mitunter falsche Absorptionswerte resultieren können. Elektromagnetische Strahlung im Giga-Hertz oder Te-

ra-Hertz Regime ist aufgrund der größeren Wellenlänge weitaus unempfindlicher gegenüber derartiger Verunreinigungen der Reaktionsgefäße sowie auch der Pufferlösungsbestandteile. Zudem entfällt entsprechend der vorliegenden Verfahrens die Verwendung von verdorbenen oder ungenau angesetzten Fluoreszenzfarbstoffen als mögliche Fehlerquelle für den spektroskopischen Nachweis.

Weitere Ausführungsformen der Erfindung ergeben sich aus den Unteransprüchen.

Nachfolgend wird die Erfindung anhand von Ausführungsbeispielen beschrieben, die anhand der Abbildungen näher erläutert werden.

Hierbei zeigen:

- Fig. 1 ein Flussdiagramm zur Veranschaulichung der zeitlichen Abfolge einzelner Schritte in einem Verfahren zum spektroskopischen Real-Time-Nachweis von Polynucleotidsequenzen in einer PCR-Amplifikation gemäß einer ersten Ausführungsform der Erfindung;
- Fig. 2 eine schematische Darstellung des Extinktionsverhaltens einer PCR-Lösung im Verlauf einer PCR-Amplifikation bei Strahlungsfrequenzen, welche mit Anregungszuständen vorbestimmter Polynucleotidsequenzen in einer PCR-Lösung übereinstimmen;
- Fig. 3 eine Teilansicht einer schematischen Darstellung einer zweiten Ausführungsform der erfindungsgemäßen PCR-Anordnung;
- Fig. 4 eine Teilansicht einer dritten Ausführungsform einer erfindungsgemäßen PCR-Anordnung;
- Fig. 5 eine Teilansicht einer vierten Ausführungsform einer erfindungsgemäßen PCR-Anordnung;
- Fig. 6 eine Teilansicht einer fünften Ausführungsform einer erfindungsgemäßen PCR-Anordnung;
- Fig. 7 eine sechsten Ausführungsform einer erfindungsgemäßen PCR-Anordnung, welche auf der in Fig. 5 gezeigten Teilansicht der vierten Ausführungsform beruht;

Fig. 8 eine schematische Darstellung des Extinktionsverhaltens einer zur Herstellung einer PCR-Lösung verwendeten Pufferlösung sowie einer Polynucleotidsequenz im Frequenzregime der Giga-Hertz- und/oder Tera-Hertz-Regime.

Fig. 1 zeigt ein schematisches Flussdiagramm des typischen Ablaufes einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zum spektroskopischen Real-Time-Nachweis von Polynucleotidsequenzen 10 in einer PCR-Amplifikation. In einem solchen Verfahren bedarf es zunächst der Bereitstellung einer Pufferlösung 13 in welcher die für die Herstellung einer PCR-Lösung notwendigen Ausgangssubstanzen aufgenommen oder gelöst werden. Notwendige Ausgangssubstanzen 12 sind die zu replizierende Polynucleotidsequenz 10, geeignete Primer, eine Polymerase sowie Desoxynukleosidtriphosphate zur Synthesisierung von Polynucleotidsequenzen. Bereits vor der Herstellung der PCR-Lösung 11 kann die Qualität, Spezifität und das Bildungsverhalten einzelner Ausgangssubstanzen 12 in einem spektroskopischen Real-Time-Nachweis bestimmt werden. Dieser Nachweis findet zu einem in der Fig. 1 mit 1 dargestellten Zeitpunkt statt. Nach Herstellung der PCR-Lösung 11 können erneut weitere spektroskopische Real-Time-Nachweise der PCR-Lösung 11 vorgenommen werden (Zeitpunkt 2). Erst dann findet durch die Wiederholung der PCR-Reaktionsschritte der Denaturierung, Primerhybridisierung, und Elongation eine Vervielfältigung der zu replizierenden Polynucleotidsequenzen statt, wobei nach jedem erfolgten PCR-Reaktionsschritt spektroskopische Real-Time-Nachweise durchgeführt werden können (Zeitpunkte 3, 4 und 5). Hierbei werden bevorzugt Anregungszustände der einsträngigen Polynucleotidsequenzen nach dem PCR-Reaktionsschritt der Denaturierung gemessen (Zeitpunkt 3), wobei Anregungszustände von doppelsträngigen Polynucleotidsequenzen in geeigneter Weise nach dem PCR-Reaktionsschritt der Elongation (Zeitpunkt 5) gemessen werden. Mittels des ausführungsgemäßen Verfahrens können somit spektroskopische Real-Time-Nachweise während der gesamten Abfolge der PCR-Amplifikation ausgeführt werden, und der zeitliche Verlauf der in der PCR-Amplifikation auftretenden Polynucleotidsequenzen auch quantitativ charakterisiert werden. Ferner ist es natürlich auch möglich, noch nach Ablauf der PCR-Amplifikation spektroskopische Nachweismessung durchzuführen.

Sollte gemäß einem erfindungsgemäßen Aspekt des vorliegenden Verfahrens der PCR-Reaktionsschritt der Denaturierung durch Einstrahlung von elektromagnetischer Strahlung im Tera-Hertz-Regime bewirkt werden, so würde dieses Verfahren eine Einstrahlung von entsprechender elektromagnetischer Strahlung zum Zeitpunkt des Ablaufes der Denaturierung erfolgen.

Fig. 2 zeigt eine schematische Darstellung des Extinktionsverlaufes in einer PCR-Lösung, welcher nach einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung mit elektromagnetischer Strahlung im Giga-Hertz- oder Tera-Hertz-Regime spektroskopisch bestimmt werden kann. Die Frequenz der eingestrahlten elektromagnetischen Strahlung ist dabei so gewählt, dass diese mit der Frequenz von vorbestimmten Anregungszuständen einzelner Polynucleotidsequenzen übereinstimmt und nach entsprechender Einstrahlung in die PCR-Lösung von diesen abgeschwächt wird. Da in einer PCR-Amplifikation typischerweise die Anzahl an zu replizierenden Polynucleotidsequenzen zeitlich exponentiell zunehmend ist, liegen die Messpunkte spektroskopischer Real-Time-Nachweise zur Extinktion auf einer Kurve mit exponentiellem Verlauf. Vorliegend sind die einzelnen Nachweise der Extinktion der PCR-Lösung durch Kreuze veranschaulicht. Der Zeitverlauf bestimmt sich dabei nach physikalischen wie nach chemischen Größen, welche die Effizienz bzw. Geschwindigkeit der PCR-Amplifikation beeinflussen können. Aus den Extinktionsmessungen kann nachfolgend mittels rechnerischer Methode die Menge an spezifischen Polynucleotidsequenzen bestimmt werden.

In der praktischen Durchführung von spektroskopischen Real-Time-Nachweisen von Polynucleotidsequenzen während der PCR-Amplifikation findet man, dass nur solche Nachweise oberhalb einer vorbestimmten Detektionsschwelle D_1 eindeutige Nachweisergebnisse liefern, welche auch zur weiteren Auswertung verwendet werden können. Nachweiswerte unterhalb dieser Detektionsschwelle D_1 sind lediglich theoretischer Natur, da das Signal-zu-Rauschverhältnisse keine eindeutige Extinktionsbestimmungen erlauben. Der früheste Zeitpunkt T_1 für einen eindeutigen spektroskopischen Real-Time-Nachweis tritt folglich dann auf, wenn die gemessene Extinktion über der Detektionsschwelle D_1 liegt. Durch eine entsprechende Frequenzwahl der eingestrahlten elektromagnetischen Strahlung kann erreicht werden, dass eine Detektionsschwelle D_2 möglichst gering ist und unter der der Detektionsschwelle D_1 für elektromagnetische Strahlung anderer Frequenzen liegt. Folglich müssen weniger PCR-Reaktionsschritte durchlaufen werden als in herkömmlichen Real-Time-quantitative PCR-Verfahren. Ferner ist auch der früheste Zeitpunkt T_2 möglichst gering, insbesondere kürzer als T_1 für elektromagnetische Strahlung der anderen Frequenzen.

Fig. 3 zeigt eine Teilansicht einer schematischen Darstellung einer Ausführungsform einer erfindungsgemäßen PCR-Anordnung zum spektroskopischen Real-Time-Nachweis von Polynucleotidsequenzen in einer PCR-Amplifikation. Gemäß dieser Ausführungsform emittiert eine Strahlungsquelle 20 elektromagnetische Strahlung im Giga-Hertz- und/oder

Tera-Hertz-Regime in eine PCR-Lösung 11. Die PCR-Lösung 11 befindet sich in dem Aufnahmebereich 23 eines Substrats 24, welches durch seine Formung die Schichtdicke S der PCR-Lösung definiert, durch welche die elektromagnetische Strahlung 21 hindurchstrahlt. Ein derartiger Aufnahmebereich 23 ist vorliegend durch ein wenigstens teilweise begrenztes Volumen, wie einem Behälter ausgebildet. Die Frequenz der Strahlung ist dabei derart eingestellt, dass sie mit der Frequenz vorbestimmter Anregungszustände sich in der PCR-Lösung 11 befindender Polynucleotidsequenzen 10 übereinstimmt. Nach Transmission der eingestrahnten elektromagnetischen Strahlung 21 durch den Querschnitt des Aufnahmebereichs 23 wird die entsprechend geschwächte Intensität der elektromagnetischen Strahlung 21 von einem Detektor 22 nachgewiesen.

Vorliegend wurde verzichtet, die im optischen Aufbau typischen weiteren optischen Elemente wie Fokussierelemente, Kollimationselemente, Strahlführungselemente und Filter anzugeben. Das zusätzliche Vorsehen solcher herkömmlicher optischer Elemente zur Strahlkonditionierung stellen sich für einen Fachmann als offensichtlich dar.

Fig. 4 zeigt eine weitere Teilansicht einer Ausführungsform einer PCR-Anordnung zum spektroskopischen Real-Time-Nachweis von Polynucleotidsequenzen in einer PCR-Amplifikation. Im Gegensatz zum Aufnahmebereich 23 der ersten Ausführungsform gemäß Fig. 3, sieht die zweite Ausführungsform gemäß Fig. 4 keinen doppelwandigen Aufnahmebereich 23 vor, sondern lediglich einen einwandigen, an welchen die PCR-Lösung 11 aufgenommen ist. Hierbei kann es sich beispielsweise um einen Filmauftrag einer PCR-Lösung auf den Aufnahmebereich 23 des Substrats handeln. Weiterhin kann auch die Anordnung der PCR-Lösung 11 auf dem Aufnahmebereich 23 des Substrats 24 im Feld der Erdanziehung so orientiert sein, dass während des spektroskopischen Real-Time-Nachweises eine gleichbleibende Schichtdicke S gewährleistet werden kann. Zudem kann der Aufnahmebereich 23 des Substrats 24 noch konstruktive Anordnungen enthalten, welche die Adhäsion zwischen PCR-Lösung 11 und dem Aufnahmebereich 23 des Substrats 24 erhöhen. Solche Anordnungen sind beispielsweise feine Oberflächenstrukturen, welche ein Festhaften der PCR-Lösung 11 auf dem Substrat 24 unterstützen.

Fig. 5 zeigt eine Teilansicht einer vierten Ausführungsform der erfindungsgemäßen PCR-Anordnung zum spektroskopischen Real-Time-Nachweis von Polynucleotidsequenzen in einer PCR-Amplifikation. Bei dieser ist die Richtung der aus der Strahlungsquelle 20 emittierten elektromagnetischen Strahlung 21 und die Richtung der von dem Detektor 22 nachgewiesenen Strahlung nicht in Verlängerung zueinander angeordnet. Vielmehr wird die elektromagnetische Strahlung 21 von der PCR-Lösung 11 und/oder dem Substrat des

Aufnahmebereichs 23 derart umgelenkt, dass kein geradliniger Strahlengang erfolgt. Ein derartiger Strahlengang ist etwa bei Streuungsmessungen vorteilhaft. Eine derartige relative Anordnung von Strahlungsquelle 20 und Detektor 22 kann zudem zu einer verbesserten räumlichen Anordnung verschiedener Komponenten beitragen, welche zur Verringerung der Gesamtgröße der ausführungsgemäßen PCR-Anordnung beiträgt.

Im Vergleich zu den Ausführungsformen des freien Strahlenganges der elektromagnetischen Strahlung 21 in den Darstellungen gemäß Fig. 3 bis Fig. 5 wird in der Teilansicht der Ausführungsform gemäß Fig. 6 die elektromagnetische Strahlung 21 in einem für den Frequenzbereich der Strahlung geeigneten Wellenleiter W geführt. Hierbei kann die elektromagnetische Strahlung 21 direkt an der Strahlungsquelle 20 in den Wellenleiter W eingekoppelt werden oder jedoch erst nach geeigneter Konditionierung. Entsprechend kann der Wellenleiter W mit dem Detektor 22 direkt in Verbindung stehen oder die Strahlung erst für den Nachweis mittels des Detektors 22 konditioniert werden. Der Wellenleiter W ist dazu ausgebildet, in dem Aufnahmebereich 23 elektromagnetische Strahlung 21 als evaneszentes Strahlungsfeld abzugeben, welches folglich durch die Wechselwirkung mit einer auf dem Wellenleiter W äußerlich aufgetragenen PCR-Lösung eine Extinktion der elektromagnetischen Strahlung 21 hervorrufen kann. Die Ausführungsformen des Wellenleiters W können isolierte Wellenleiterstrukturen umfassen, oder jedoch auch in weitere Aufnahmevorrichtungen integrierte Wellenleiterabschnitte. In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Wellenleiter W in einer Chipkonstruktion integriert.

Fig. 7 zeigt eine auf der Teilansicht der vierten Ausführungsform in Fig. 5 beruhenden Ausführungsform einer PCR-Anordnung zum spektroskopischen Real-Time-Nachweis von Polynucleotidsequenzen in einer PCR-Amplifikation, welche als weiteres Element die Temperaturänderungsmittel 25 darstellt, die mit dem Substrat 24 des Aufnahmebereichs 23 wechselwirkt. Die Temperaturänderungsmittel 25 sind dafür ausgebildet, das Substrat 24 auf der Seite zu heizen und/oder zu kühlen, welche der Seite des Aufnahmebereichs 23 zur Aufnahme der PCR-Lösung 11 gegenüberliegt. Durch die Veränderung der Temperatur des Substrats 24 erfolgt durch entsprechende Wärmeleitung eine Temperaturänderung der PCR-Lösung 11. Ist der Wärmewiderstand des Substrates 24 gering, sowie die Wärme- und/oder Kühlleistung der Temperaturänderungsmittel 25 im Vergleich zur Wärmekapazität der aufgetragenen PCR-Lösung 11 groß, erfolgt eine relativ schnelle Temperaturänderung der PCR-Lösung 11, und eine rasche Abfolge der sich wiederholenden PCR-Reaktionsschritte kann gewährleistet werden. Zur verbesserten Wärmeleitung kann zwischen den Temperaturänderungsmitteln 25 sowie dem Substrat 24 Mittel vorgesehen sein, die eine Wärmeleitung unterstützen. In einer Ausführungsform der erfin-

zungsgemäßen PCR-Anordnung können die Temperaturänderungsmittel 25 einen Luftstrom heizen und/oder kühlen, welcher direkt auf das Substrat 24 geleitet wird, und nach entsprechender Wärmeleitung durch das Substrat 24 die Temperatur der PCR-Lösung 11 entsprechend ändert.

Fig. 8 zeigt das Extinktionsverhalten 13' der zur Herstellung der PCR-Lösung 11 notwendigen Pufferlösung 13 sowie das Extinktionsverhalten 10' vorbestimmter Anregungszustände der nachzuweisenden Polynucleotidsequenz 10 in einem Frequenzbereich des Giga-Hertz- bzw. Tera-Hertz-Regimes. Aufgrund ihres Brechungsverhaltens variiert die Extinktion der Pufferlösung 13 über einen vorbestimmten Frequenzbereich nachweisbar. Viele laborübliche Pufferlösungen 13 weisen ein derartiges Extinktionsverhalten auf. Für den möglichst rauscharmen Nachweis eines Anregungszustandes einer Polynucleotidsequenz 10 kann es erforderlich sein, eine Pufferlösung 13 zu wählen, welche in dem Frequenzbereich des bezeichneten Anregungszustandes der Polynucleotidsequenz 10 ein Minimum ihres Extinktionsverhaltens aufweist. Dementsprechend ist die Extinktion der in die PCR-Lösung 11 eingestrahlten elektromagnetischen Strahlung 21 durch die Pufferlösung 13 im Vergleich zur Extinktion durch die Polynucleotidsequenzen 10 in der PCR-Lösung 11 gering, und der Extinktionsnachweis des Anregungszustandes der Polynucleotidsequenz 10 erfolgt mit nur geringer Störung durch die Pufferlösung 13. Durch entsprechende Wahl oder Einstellung der Pufferlösung 13 auf die nachzuweisende Polynucleotidsequenz 10 und deren Anregungsfrequenz kann ein vorteilhaftes Signal zu Rauschverhältnis erreicht werden.

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass alle oben beschriebenen Teile für sich allein gesehen und in jeder Kombination, insbesondere den in Zeichnungen dargestellten Details als erfindungswesentlich beansprucht werden. Änderungen hiervon sind dem Fachmann geläufig.

Bezugszeichen:

- 10 Polynucleotidsequenz
- 10' Extinktion des Anregungszustandes einer Polynucleotidsequenz
- 11 PCR-Lösung
- 12 Ausgangssubstanz
- 13 Pufferlösung
- 13' Extinktion der Pufferlösung

14	Marker
20	Strahlungsquelle
21	Elektromagnetische Strahlung
22	Detektor
23	Aufnahmebereich
24	Substrat
25	Temperaturänderungsmittel
26	Wärmemedium
S	Schichtdicke
W	Wellenleiter
D ₁	Detektionsschwelle
D ₂	Detektionsschwelle
T	Frühester Zeitpunkt für die Detektion

Ansprüche

1. Ein Verfahren zum spektroskopischen real-time Nachweis von Nukleinsäuremolekülen, in einer PCR-Amplifikation, wobei die PCR-Amplifikation das Bereitstellen der für die Herstellung einer PCR-Lösung (11) notwendigen Ausgangssubstanzen (12) in einer Pufferlösung (13) sowie die sich wiederholenden PCR-Reaktionsschritte der Denaturierung, der Primerhybridisierung und der Elongation umfasst, und wobei während der PCR-Amplifikation zu definierten Zeitpunkten aus einer Strahlungsquelle (20) elektromagnetische Strahlung (21) im Giga-Hertz- oder Tera-Hertz-Regime in die PCR-Lösung (11) eingestrahlt wird, um mittels eines Detektors (22) in einem real-time Nachweis wenigstens die Anwesenheit oder Abwesenheit einer Polynucleotidsequenz (10) nachzuweisen.
2. Ein Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Nukleinsäuremolekülen um Polynucleotidsequenzen handelt.
3. Ein Verfahren zum spektroskopischen real-time Nachweis von Nukleinsäuremolekülen in einer PCR-Amplifikation nach Anspruch 1 oder 2
dadurch gekennzeichnet, dass
dass die für die Herstellung der PCR-Lösung (11) notwendigen Ausgangssubstanzen (12) in einer Pufferlösung (13) keine chemischen oder physikalischen Nachweismarker (14), insbesondere keine Fluoreszenzmarker, umfassen.
4. Ein Verfahren zum spektroskopischen real-time Nachweis von Nukleinsäuremolekülen in einer PCR-Amplifikation nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass
dass die Intensität der eingestrahlten elektromagnetischen Strahlung (21) im Giga-Hertz- oder Tera-Hertz-Regime so ausgewählt wird, dass sie eine vorbestimmte Schichtdicke (S) der PCR-Lösung (11) durchdringt.

5. Ein Verfahren zum spektroskopischen real-time Nachweis von Nukleinsäuremolekülen in einer PCR-Amplifikation nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** dass die Frequenz der eingestrahlten elektromagnetischen Strahlung (21) im Giga-Hertz- oder Tera-Hertz-Regime zwischen 100 GHz und 20 THz, insbesondere zwischen 300 GHz und 10 THz liegt.
6. Ein Verfahren zum spektroskopischen real-time Nachweis von Nukleinsäuremolekülen in einer PCR-Amplifikation nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** dass die Pufferlösung (13) der PCR-Lösung (11) in Bezug auf eine Frequenz der eingestrahlten elektromagnetischen Strahlung (21) im Giga-Hertz- oder Tera-Hertz-Regime so ausgewählt wird, dass die Strahlungsintensität nach Transmission einer vorbestimmten Schichtdicke (S) der PCR-Lösung mit dem Detektor (22) weitgehend ungeschwächt nachgewiesen werden kann.
7. Ein Verfahren zum spektroskopischen real-time Nachweis von Nukleinsäuremolekülen in einer PCR-Amplifikation nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** dass die PCR-Lösung (11) auf einem Substrat (24), insbesondere in einem vorbestimmten Aufnahmebereich (23) des Substrats (24) aufgebracht ist, welches für die eingestrahlte elektromagnetische Strahlung (21) im Giga-Hertz- oder Tera-Hertz-Regime weitgehend transparent ist.
8. Ein Verfahren zum spektroskopischen real-time Nachweis von Nukleinsäuremolekülen in einer PCR-Amplifikation nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet, dass** dass das Substrat (24) wenigstens einen Wellenleiter (W) für elektromagnetische Strahlung im Giga-Hertz- oder Tera-Hertz-Regime umfasst.
9. Ein Verfahren zum spektroskopischen real-time Nachweis von Nukleinsäuremolekülen in einer PCR-Amplifikation nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** ferner Temperaturänderungsmittel (24) bereit gestellt werden, mittels derer die PCR-Lösung (11) auf vorgegebene Temperaturen geheizt und/oder gekühlt werden kann.

10. Ein Verfahren zum spektroskopischen real-time Nachweis von Nukleinsäuremolekülen in einer PCR-Amplifikation nach einem der Ansprüche 9,
dadurch gekennzeichnet, dass
die Temperaturänderungsmittel (24) ein Wärmemedium (26) heizen und/oder kühlen, welches über das Substrat die PCR-Lösung (11) direkt oder indirekt heizt und/oder kühlt.
11. Ein Verfahren zum spektroskopischen real-time Nachweis von Nukleinsäuremolekülen in einer PCR-Amplifikation nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass
die elektromagnetische Strahlung (21) im Giga-Hertz- oder Tera-Hertz-Regime aus der Strahlungsquelle (20) in die PCR-Lösung (11) vor und/oder nach einem Schritt der Denaturierung, und/oder der Primerhybridisierung und/oder der Elongation eingestrahlt wird.
12. Ein Verfahren zum spektroskopischen real-time Nachweis von Nukleinsäuremolekülen in einer PCR-Amplifikation nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass
die Frequenz der elektromagnetischen Strahlung ausgewählt wird, um definierte vibratorische Anregungsmoden von einzel- und/oder doppelsträngigen Polynucleotidsequenzen (10) zu erregen, um diese, insbesondere die für das Vorliegen von Hybridisierungszuständen von doppelsträngigen Polynucleotidsequenzen (10) charakteristischen Moden, nachzuweisen.
13. Ein Verfahren zum spektroskopischen real-time Nachweis von Nukleinsäuremolekülen in einer PCR-Amplifikation nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass
dass während der PCR-Amplifikation zeitlich vorausgehende Nachweise mittels der elektromagnetischen Strahlung (21) im Giga-Hertz- oder Tera-Hertz-Regime als Untergrund für zeitlich nachfolgende Nachweise in einer Analyse der Nachweise berücksichtigt werden.
14. Ein Verfahren zum spektroskopischen real-time Nachweis von Nukleinsäuremolekülen in einer PCR-Amplifikation nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass
dass elektromagnetische Strahlung (21) im Giga-Hertz- oder Tera-Hertz-Regime aus der Strahlungsquelle (20) vor Durchführen einer PCR-Amplifikation in eine Lösung

von in der PCR-Amplifikation zu verwendenden Ausgangssubstanzen (12) eingestrahlt wird, um chemische oder physikalische Eigenschaften einzelner Ausgangssubstanzen (12), insbesondere deren Qualität, Spezifität und deren Bindungsverhalten, mittels spektroskopischen Nachweises zu bestimmen.

15. Eine PCR-Anordnung zum spektroskopischen real-time Nachweis von Polynucleotidsequenzen in einer PCR-Amplifikation, wobei diese
 - Ein Substrat (24) mit einem Aufnahmebereich (23) für eine PCR-Lösung (11), bestehend aus den notwendigen Ausgangssubstanzen (12) und einer Pufferlösung (13),
 - Temperaturänderungsmittel (24), mittels derer die PCR-Lösung (11) auf vorgegebene Temperaturen geheizt und/oder gekühlt werden kann, um die sich wiederholenden PCR-Reaktionsschritte der Denaturierung, der Primerhybridisierung oder der Elongation zu ermöglichen,
 - eine Strahlungsquelle (20), um elektromagnetische Strahlung (13) im Giga-Hertz- oder Tera-Hertz-Regime in die PCR-Lösung (11) einzustrahlen,
 - und einen Detektor (22), um durch die PCR-Lösung (11) transmittierte Strahlung spektroskopisch nachzuweisen,umfasst.
16. Ein Verfahren zum spektroskopischen real-time Nachweis von Nukleinsäuremolekülen in einer PCR-Amplifikation, wobei die PCR-Amplifikation das Bereitstellen der für die Herstellung einer PCR-Lösung (11) notwendigen Ausgangssubstanzen (12) in einer Pufferlösung (13) sowie die sich wiederholenden PCR-Reaktionsschritte der Denaturierung, der Primerhybridisierung und der Elongation umfasst, und wobei während der PCR-Amplifikation zu definierten Zeitpunkten aus einer Strahlungsquelle (20) elektromagnetische Strahlung (21) im Giga-Hertz- oder Tera-Hertz-Regime in die PCR-Lösung (11) eingestrahlt wird, um mittels eines Detektors (22) in einem spektroskopischen real-time Nachweis wenigstens die Anwesenheit oder Abwesenheit einer Polynucleotidsequenz (10) nachzuweisen, und wobei der Reaktionsschritt der Denaturierung durch Tera-Hertz-Strahlung aus der Strahlungsquelle (20) bewirkt wird.
17. Verfahren gemäß Anspruch 16, wobei es sich bei den Nukleinsäuremolekülen um Polynucleotidsequenzen handelt.

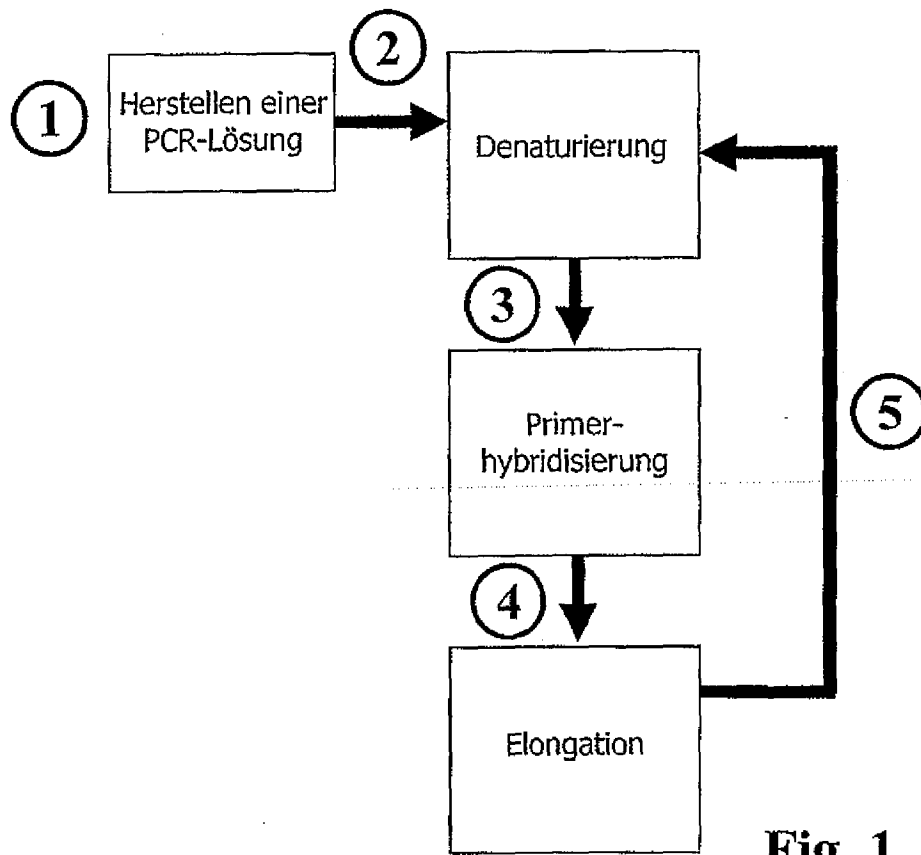


Fig. 1

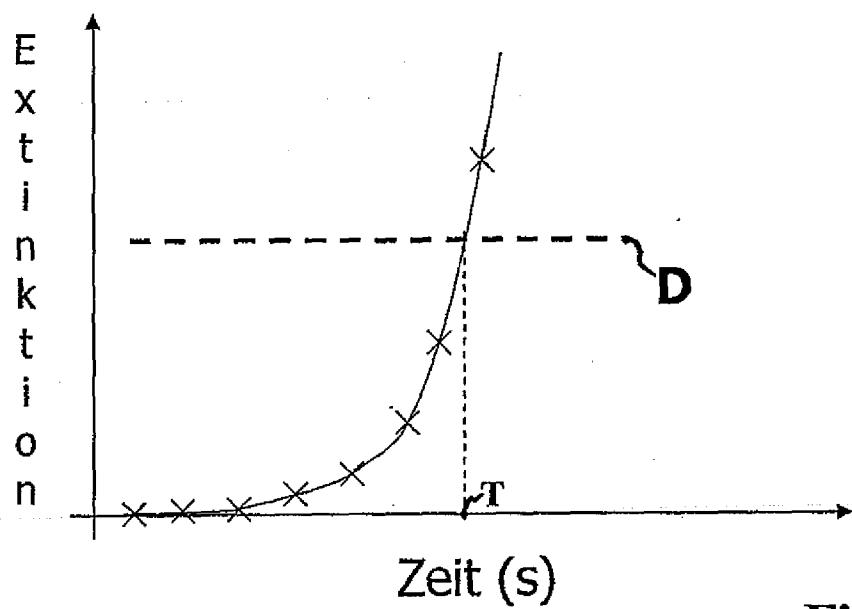


Fig. 2

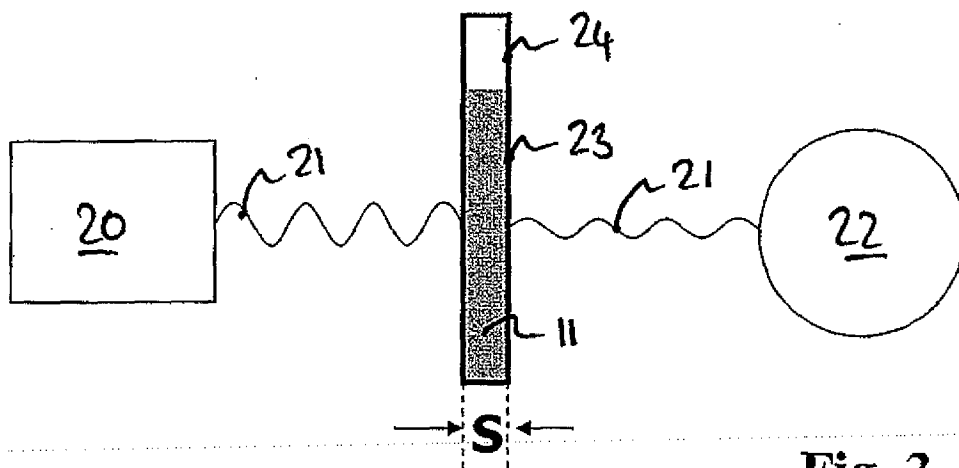


Fig. 3

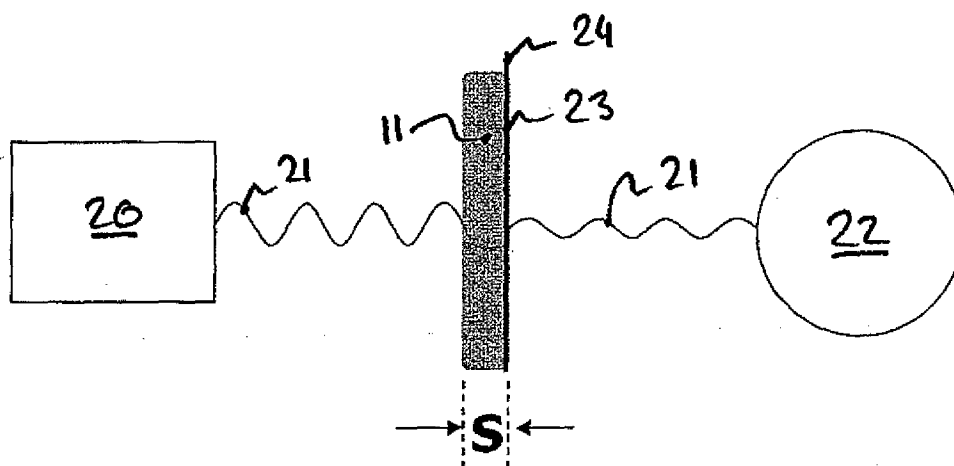


Fig. 4

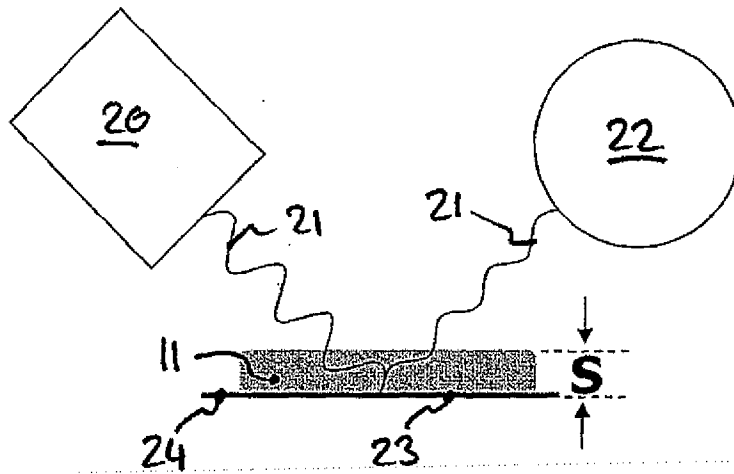


Fig. 5

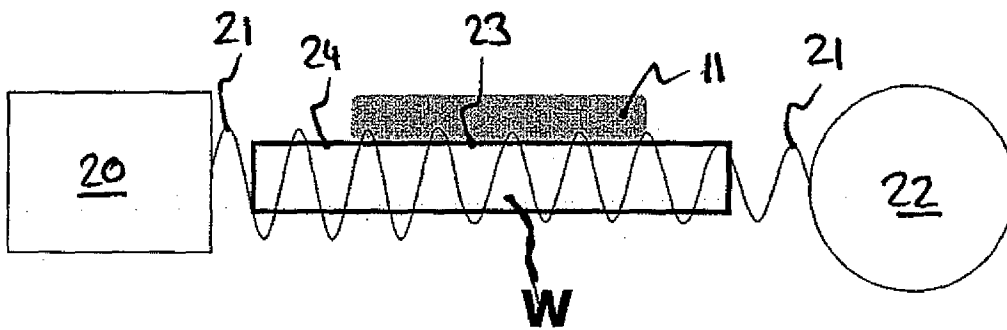


Fig. 6

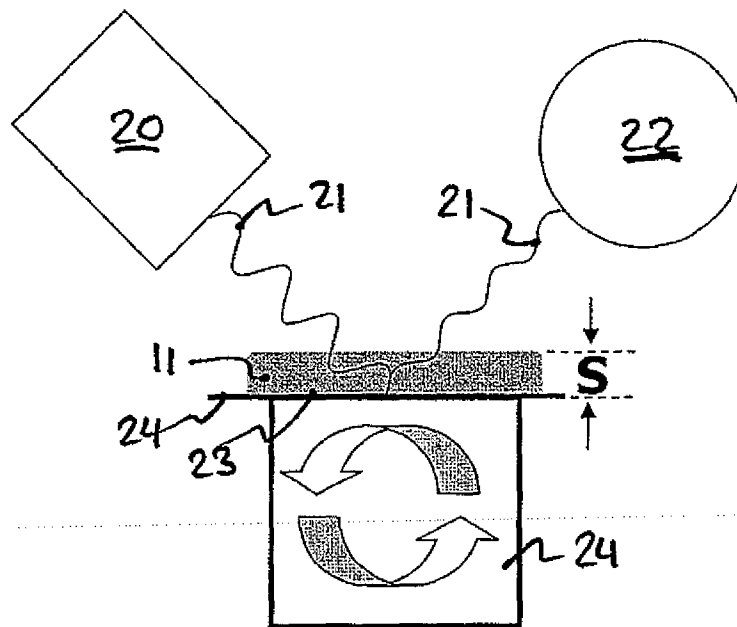


Fig. 7

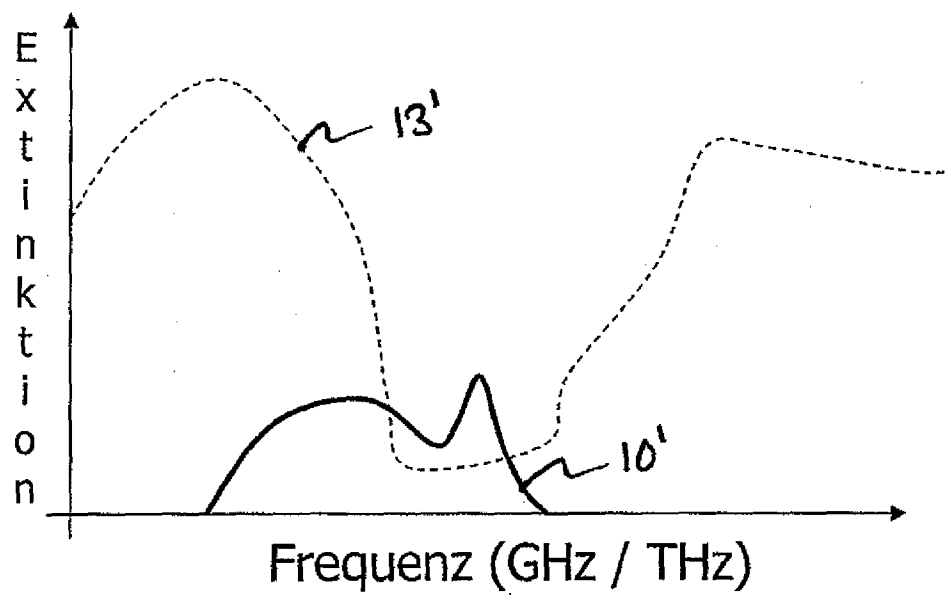


Fig. 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2009/066081

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 840 226 A1 (CEM CORP [US]) 3 October 2007 (2007-10-03) the whole document	1-17
Y	DE 199 07 470 A1 (LURZ THOMAS [DE]) 17 August 2000 (2000-08-17) column 4; claims 1-3	1-17
Y	BRUCHERSEIFER, NAGEL, BOLIVAR, KURZ: "Label-free probing of the binding state of DNA by time-domain terahertz sensing" APPLIED PHYSICS LETTERS, vol. 77, no. 24, 11 December 2000 (2000-12-11), pages 4049-4051, XP002566668 the whole document	1-17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 February 2010

Date of mailing of the international search report

12/02/2010

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Franz, Cerstin

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2009/066081

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2006/045807 A1 (ZHANG XI-CHENG [US] ET AL ZHANG XI-CHENG [US] ET AL) 2 March 2006 (2006-03-02) claims 1, 4, 15 -----	1-17
Y	WO 03/102238 A2 (DELTADOT LTD [GB]; HASSARD STUART [GB]) 11 December 2003 (2003-12-11) the whole document -----	1-17
A	ORRLING KRISTINA ET AL: "An efficient method to perform milliliter-scale PCR utilizing highly controlled microwave thermocycling" CHEMICAL COMMUNICATIONS - CHEMCOM, ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, GB, no. 7, 7 April 2004 (2004-04-07), pages 790-791, XP002436822 ISSN: 1359-7345 the whole document -----	1-17
A	FERMER C ET AL: "Microwave-assisted high-speed PCR" EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 18, no. 2, 1 February 2003 (2003-02-01), pages 129-132, XP002436821 ISSN: 0928-0987 the whole document -----	1-17
A	MICKAN S P ET AL: "LABEL-FREE BIOAFFINITY DETECTION USING TERAHERTZ TECHNOLOGY" PHYSICS IN MEDICINE AND BIOLOGY, TAYLOR AND FRANCIS LTD. LONDON, GB, vol. 47, no. 21, 1 November 2002 (2002-11-01), pages 3789-3795, XP001164115 ISSN: 0031-9155 the whole document -----	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2009/066081

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1840226	A1	03-10-2007	CA 2582857 A1 30-09-2007 JP 2007267738 A 18-10-2007 US 2007231798 A1 04-10-2007
DE 19907470	A1	17-08-2000	AT 224950 T 15-10-2002 AU 3416500 A 29-08-2000 WO 0047732 A1 17-08-2000 DK 1165769 T3 16-12-2002 EP 1165769 A1 02-01-2002
US 2006045807	A1	02-03-2006	NONE
WO 03102238	A2	11-12-2003	AU 2003244764 A1 19-12-2003 CA 2485411 A1 11-12-2003 EP 1509620 A2 02-03-2005 JP 2005528120 T 22-09-2005 US 2005250099 A1 10-11-2005

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2009/066081

A. KLASSTIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

INV. C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
C12Q

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 1 840 226 A1 (CEM CORP [US]) 3. Oktober 2007 (2007-10-03) das ganze Dokument	1-17
Y	DE 199 07 470 A1 (LURZ THOMAS [DE]) 17. August 2000 (2000-08-17) Spalte 4; Ansprüche 1-3	1-17
Y	BRUCHERSEIFER, NAGEL, BOLIVAR, KURZ: "Label-free probing of the binding state of DNA by time-domain terahertz sensing" APPLIED PHYSICS LETTERS, Bd. 77, Nr. 24, 11. Dezember 2000 (2000-12-11), Seiten 4049-4051, XP002566668 das ganze Dokument	1-17

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen ☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

3. Februar 2010

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

12/02/2010

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Franz, Cerstin

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2009/066081

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	US 2006/045807 A1 (ZHANG XI-CHENG [US] ET AL ZHANG XI-CHENG [US] ET AL) 2. März 2006 (2006-03-02) Ansprüche 1, 4, 15 -----	1-17
Y	WO 03/102238 A2 (DELTADOT LTD [GB]; HASSARD STUART [GB]) 11. Dezember 2003 (2003-12-11) das ganze Dokument -----	1-17
A	ORRLING KRISTINA ET AL: "An efficient method to perform milliliter-scale PCR utilizing highly controlled microwave thermocycling" CHEMICAL COMMUNICATIONS - CHEMCOM, ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, GB, Nr. 7, 7. April 2004 (2004-04-07), Seiten 790-791, XP002436822 ISSN: 1359-7345 das ganze Dokument -----	1-17
A	FERMER C ET AL: "Microwave-assisted high-speed PCR" EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, Bd. 18, Nr. 2, 1. Februar 2003 (2003-02-01), Seiten 129-132, XP002436821 ISSN: 0928-0987 das ganze Dokument -----	1-17
A	MICKAN S P ET AL: "LABEL-FREE BIOAFFINITY DETECTION USING TERAHERTZ TECHNOLOGY" PHYSICS IN MEDICINE AND BIOLOGY, TAYLOR AND FRANCIS LTD. LONDON, GB, Bd. 47, Nr. 21, 1. November 2002 (2002-11-01), Seiten 3789-3795, XP001164115 ISSN: 0031-9155 das ganze Dokument -----	1-17

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2009/066081

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 1840226 A1	03-10-2007	CA 2582857 A1	30-09-2007
		JP 2007267738 A	18-10-2007
		US 2007231798 A1	04-10-2007
DE 19907470 A1	17-08-2000	AT 224950 T	15-10-2002
		AU 3416500 A	29-08-2000
		WO 0047732 A1	17-08-2000
		DK 1165769 T3	16-12-2002
		EP 1165769 A1	02-01-2002
US 2006045807 A1	02-03-2006	KEINE	
WO 03102238 A2	11-12-2003	AU 2003244764 A1	19-12-2003
		CA 2485411 A1	11-12-2003
		EP 1509620 A2	02-03-2005
		JP 2005528120 T	22-09-2005
		US 2005250099 A1	10-11-2005