

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
B01L 7/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680011430.7

[43] 公开日 2008年4月2日

[11] 公开号 CN 101155641A

[22] 申请日 2006.4.3

[21] 申请号 200680011430.7

[30] 优先权

[32] 2005.4.4 [33] EP [31] 05007267.7

[86] 国际申请 PCT/EP2006/003003 2006.4.3

[87] 国际公布 WO2006/105919 英 2006.10.12

[85] 进入国家阶段日期 2007.10.8

[71] 申请人 霍夫曼-拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

[72] 发明人 T·施劳比茨 T·巴尔达克

P·费德勒 C·乔治 G·格鲁特

A·肖尔 G·滕兹勒

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘健 刘玥

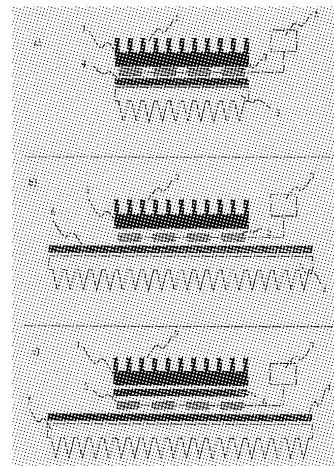
权利要求书 3 页 说明书 22 页 序列表 2 页
附图 7 页

[54] 发明名称

包含多个样品的模块的热循环

[57] 摘要

本发明涉及高通量样品分析的领域。特别地，本发明涉及用于多个样品的同时调温的设备、系统和方法。更特别地，本发明涉及多个样品的同时热循环来在微滴定平板格中进行 PCR。



1. 一种用于多个样品的同时热循环的设备，所述设备包括：
 - a) 包含所述多个样品的热模块 1，
 - b) 至少一个热泵 2，
 - c) 热基底 4，
 - d) 散热器 5，和
 - e) 控制单元 3，来控制所述多个样品的同时热循环，

其中所述热基底 4 与所述散热器 5 和所述至少一个热泵 2 热接触，所述至少一个热泵 2 与所述热模块 1 热接触。

2. 根据权利要求 1 的设备，其中所述热模块 1 包括被配置以接受所述多个样品的凹进部分 7。

3. 根据权利要求 1-2 的设备，其中所述至少一个热泵 2 是热电设备，优选半导体设备，更优选的 Peltier 元件。

4. 根据权利要求 1-3 的设备，其中所述热基底 4 是基本上平面的。

5. 根据权利要求 4 的设备，其中所述热基底 4 没有凹进部分。

6. 根据权利要求 4-5 的设备，其中所述热基底 4 的横截面比所述散热器 5 的横截面大低于 20% 或者比所述散热器 5 的横截面小低于 20%，其中所述热基底 4 的横截面大于所述热模块 1 的横截面，所述横截面与相应的接触区域平行。

7. 根据权利要求 1-6 的设备，其中所述热基底装备有控制装置 9 来改变所述热基底 4 的热传导性质。

8. 根据权利要求 1-7 的设备，其中所述控制单元 3 控制所述至少一个热泵 2 的性质。

9. 根据权利要求 8 的设备，其中所述控制单元 3 进一步控制所述控制装置 9 来改变所述热基底 4 的热传导性质。

10. 一种用于多个样品的同时热循环的设备，所述设备包括：

- a) 包含多个样品的热模块 1，
- b) 至少一个热泵 2，
- c) 第一热基底 4 和第二热基底 6，
- d) 散热器 5，和
- e) 控制单元 3，来控制所述多个样品的同时热循环。

11. 根据权利要求10的设备,其中所述第一热基底4是基本上平面的。

12. 根据权利要求10-11的设备,其中所述至少一个热泵2在所述两个热基底4、6之间,其中所述至少一个热泵2与两个热基底4、6都热接触。

13. 根据权利要求10-12的设备,其中所述第一热基底4的横截面比所述散热器5的横截面大低于20%或者比所述散热器5的横截面小低于20%,其中所述第一热基底4的横截面大于所述热模块1的横截面,其中所述第二热基底6是基本上平面的,并且其中所述第二热基底6与所述热模块1热接触,所述横截面与相应的接触区域平行。

14. 根据权利要求13的设备,其中所述第一热基底4和所述第二热基底6都没有凹进部分。

15. 根据权利要求10-14的设备,其中所述第一热基底4和/或所述第二热基底6装备有控制装置9来改变所述热基底4、6的热传导性质。

16. 根据权利要求15的设备,其中所述控制单元3进一步控制所述控制装置9来改变所述热基底4、6的热传导性质。

17. 一种用于多个样品的同时热循环的方法,所述方法包括步骤

a) 提供具有多个凹进部分的热模块1、至少一个热泵2、第一热基底4、任选第二热基底6、散热器5和控制单元3,

b) 布置所述具有多个凹进部分的热模块1、所述至少一个热泵2、所述第一热基底4、任选所述第二热基底6和所述散热器5,其中

- 所述散热器5与所述第一热基底4热接触,

- 所述第一热基底4与所述至少一个热泵2热接触,和

- 所述至少一个热泵2或者与所述热模块1热接触或者任选与所述第二热基底6热接触,所述第二热基底6与所述热模块1热接触,

c) 将所述多个样品置于所述热模块1的凹进部分内,和

d) 使用所述控制单元3进行热循环方案。

18. 根据权利要求17的方法,其中所述第一热基底4是基本上平面的。

19. 根据权利要求18的方法,其中所述第一热基底4没有凹进部分。

20. 根据权利要求18-19的方法,其中所述第一热基底4的横截面

比所述散热器 5 的横截面大低于 20%或者比所述散热器 5 的横截面小低于 20%，其中所述热基底 5 的横截面大于所述热模块 1 的横截面，所述横截面与相应的接触区域平行。

21. 根据权利要求 18-20 的方法，其中所述任选的第二热基底 6 是基本上平面的。

22. 根据权利要求 21 的方法，其中所述任选的第二热基底 6 没有凹进部分。

23. 根据权利要求 17-22 的方法，其中所述热循环方案适合于进行所述多个样品中的核酸扩增。

24. 一种用于多个样品的同时热循环以进行多个核酸扩增反应的系统，所述包括

- a) 根据权利要求 1-16 的设备，和
- b) 进行所述多个核酸扩增反应所必需的试剂。

25. 根据权利要求 24 的系统，其中所述试剂包括缓冲溶液、洗涤剂、酶、核苷酸和引物。

包含多个样品的模块的热循环

发明领域

本发明涉及样品高通量分析领域。特别地，本发明涉及用于多个样品的同时调温的设备、系统和方法。

先有技术

用于以受控的方式调温样品的设备在几乎所有的化学或生物化学领域中使用，而基础科学或与工业发展或药物生产相同的方式受到影响。由于劳动时间以及试剂是昂贵的，开发倾向于提高生产和分析的通过量，而同时最小化必需的反应体积。

一般地，调温设备具有热模块(thermal block)，其与研究中的样品热接触。热模块被调温到期望的温度，也影响样品的温度。最简单的热模块是常见的锅板(boilerplate)。

为了实现有效的调温，设备应当具有加热和冷却样品的装置。为此，热模块可以与两个独立的装置或与能够进行加热和冷却的单个装置连接。这种单个的调温装置例如流通装置，在热模块之内或靠近热模块的管道系统流动着外部调温的液体，例如水或油，向所述热模块或从所述热模块转移热量。在两个独立的装置的情况下，一般地使用电阻加热结合消散性冷却。在医学和实验室设备领域关于热管理的很好的综述由 Robert Smythe (Medical Device & Diagnostic Industry Magazine, Jan. 1998, p. 151-157) 撰写，以下是这篇文章的摘录。

常见的消散性冷却设备是与风扇组合的散热器。一般地，散热器由铝制成，因为金属的相对高的导热性和低成本。将它们挤压、压印、粘合、浇铸或机械加工来得到最大化表面积的形状，促进通过周围的冷却空气的热吸收。大多数具有鳍片或针设计。当使用风扇时(强制对流)，散热器可以消散大量热量而保持目标元件高于环境温度 10-15°C。散热器是便宜的，提供了装配灵活性，但是不能冷却元件达到或低于环境温度。并且，散热器也不允许温度控制。

更为改进的装备利用热电设备(TEC)作为热泵用于加热和主动冷却热模块。热电设备是由半导体材料制成的固态的热泵，包括一系列夹

在陶瓷板之间的 p 型和 n 型半导体配对或结点。通过冷结点的电子吸收热量，此时它们从 p 型元件中的低能水平传递到 n-型元件中的更高能水平。在热结点处，能量被排出到例如散热器，此时电子从高能 n-型元件移动到低能 p-型元件。直流电源提供了能量来移动电子通过该系统。典型的 TEC 将含有多至 127 个结点，可以泵送多达 120 W 的热量。泵送的热量数量与通过 TEC 的电流数量成比例，因而紧密的温度控制是可能的。通过使电流反向，TEC 可以作为加热器或冷却器来工作，在变化的周围环境中或在不同温度的循环中控制目标物是有用的。大小从 2 到 62 mm，对于更大的冷却可以使用多个 TEC。由于相对大量的热量被泵送到小的区域上，TEC 一般需要散热器来将热量消散到周围环境中。公知类型的 TEC 是 Peltier 元件。

热量的消散对于有效的冷却是必需的。如果热量不能在它的起源被消散，所述热量可以使用热管转移到另一个地方。热管是具有内部灯芯结构的密封的真空容器，通过内部的工作液体的蒸发和凝结来转移热量。一般使用氨、水、丙酮或甲醇，而特殊的液体被用于低温和高温应用。当热量在热管的一侧被吸收时，工作液体被汽化，产生热管内部的压力梯度。蒸气被迫流向管的冷却端，在此它凝结，放出它的潜热到灯芯结构中，然后通过例如散热器进入周围环境。经由重力或内部灯芯结构内的毛细管作用，凝结的工作液体回到蒸发器。由于热管利用了工作液体的潜热效应，它们可以被设计以保持元件接近环境条件。虽然当冷凝的液体利用重力工作时它们是最有效的，热管不能在任何取向上工作。热管一般是小的和高度可靠的，但是它们不能将目的物冷却低于环境温度。

热模块可以用两个热管调温，一个热管将热量从热源转移到所述热模块，而另一个热管将热量转移出所述热模块。在 WO 01/51209 中公开了具有两个热管的热模块。在 US 4,950,608 中使用了多个热管来实现温度调节容器。在 US 4,387,762 中公开了具有可控制的热传导的热管。

除了热管之外，具有液-气平衡的蒸发的固态外壳处于管道的形式，这些固态外壳也已知处于平板样形式，由 Thermacore (Lancaster, USA) 公司生产，称为 Therma-Base™。这些 Therma-Base™具有基本上平面的形状，例如用于计算机中来散发集成电路产生的热量 (US 6,256,199)。在 US 5,161,609 中公开了用于元件的温度调节的设备，与外壳内部的液

体-蒸气平衡中含有的液体热接触。US 5,819,842 描述了一种温度控制单元，包含用于紧密靠近的多个样品的单独控制的散布器平板。

因而，本发明的目的是提供一种设备，用于样品的同时调温。在本发明一个方面中，本发明涉及多个样品的同时热循环来在微量滴定板格中进行 PCR。

发明简述

本发明涉及一种设备，来以并行方式调温多个单独的样品。更确切地，本发明涉及一种设备，适合于进行多个样品中多个同时 PCR 扩增。

本发明的一个主题是一种设备，用于多个样品的同时热循环，所述设备包括：

- a) 包含多个样品的热模块 1，
- b) 至少一个热泵 2，
- c) 热基底 4，
- d) 散热器 5 和
- e) 控制单元 3，来控制所述多个样品的同时热循环，

其中所述热基底 4 与所述散热器 5 和所述至少一个热泵 2 热接触，所述至少一个热泵 2 与所述热模块 1 热接触。

本发明的另一个主题是一种设备，用于多个样品的同时热循环，所述设备包括：

- a) 包含多个样品的热模块 1，
- b) 至少一个热泵 2，
- c) 第一热基底 4 和第二热基底 6，
- d) 散热器 5，和
- e) 控制单元 3，来控制所述多个样品的同时热循环。

在整个本发明中，多个样品的同时热循环包括多个样品的所有类型的调温。同时热循环概况了所述多个样品的温度的周期性变化，其中在一个循环开始时的温度与所述循环的结束时的温度相同。一个温度循环包括加热、冷却的阶段以及恒温的阶段。随着时间的温度变化由热循环方案来概述。

用于多个样品包括任何数量的样品，而所述多个样品可以按几种方式排列。排列多个样品的一种方式是使用微量滴定板。做为选

择，多个反应容器可以排列在容纳装置中。在本发明的范围内，所述多个样品是液体样品。所述多个样品的每一个都包括溶剂和要分析的一种或多种溶解的目标物。

热模块 1 是配置为具有良好热传导性的固态设备。存在着本领域技术人员已知的、具有良好热传导性的多种材料，而不受理论的限制，大多数具有良好导电性的材料也是良好的导热体。因此，例如铜、铝、银或石墨的材料适合于所述热模块。另一方面，塑料和陶瓷也可能具有足够的热传导性来用作所述热模块的材料。

热泵 2 是能够转运热量的有源设备。一般地，热泵是由需要电力来工作的半导体材料制成的所谓的热电设备（TEC）。直流电源提供用于加热和冷却的能量，而反转电流就反转热量泵送的方向。公知类型的 TEC 是 Peltier 元件。

热基底 4 是用于转移和散发热量的蒸气室设备。在整个本发明中，热基底是一种特殊的热管，而所述热基底具有基本上为平面形状的区域。术语热管是具有内部灯芯结构的密封的真空容器的设立的名称，其通过内部的工作液体的蒸发和凝结来转移热量。当热量在热管的一侧被吸收时，工作液体被汽化，产生所述热管内部的压力梯度。所述蒸气被迫流向热管的冷却端，在此它凝结，向周围环境释放它的潜热。经由重力或内部灯芯结构内的毛细管作用，凝结的工作液体回到蒸发器。热基底一般是无源设备，但它也可以被设计为有源设备，如果所述热基底装有控制装置。通过调节外壳内的流速，或外壳的体积来影响容器内的真空度，所述控制装置修改热基底的热传导性。

散热器 5 是消散热量的设备。一般地，散热器由类似于之前阐述的热模块的热传导材料制成。因此，散热器主要由金属制成，优选的从铝或铜制成。用于散热器的另一种适合的材料是石墨。做为选择，散热器也可以由塑料和陶瓷形成，只要实现了良好的热传导性。为了实现最大的热量消散，配置散热器来提供大的表面积-体积比。这通过排列在基板上的鳍片的组合来实现。大的表面积-体积比降低了散热器和外界空气之间的热转移抗性。

控制单元 3 是控制所述多个样品的同时热循环的设备。在本发明中，所述控制单元调节所述热泵的电源供应，修改转移到或从所述热模块转移的热量的数量。另外，所述控制单元可以操作热基底的任意的控

制装置。

本发明的又一个方面是用于多个样品的同时热循环的方法，所述方法包括步骤

- a) 提供具有多个凹进部分的热模块 1、至少一个热泵 2、一个热基底 4、任选的第二热基底 6、散热器 5 和控制单元 3，
- b) 布置所述具有多个凹进部分的热模块 1、所述至少一个热泵 2、所述第一热基底 4、任选的所述第二热基底 6 和所述散热器 5，其中
 - 所述散热器 5 与所述第一热基底 4 热接触，
 - 所述第一热基底 4 与所述至少一个热泵 2 热接触，和
 - 所述至少一个热泵 2 或者与所述热模块 1 热接触或者任选的与所述第二热基底 6 热接触，所述第二热基底 6 与所述热模块 1 热接触，
- c) 将所述多个样品置于所述热模块 1 的凹进部分内，和
- d) 使用所述控制单元 3 进行热循环方案。

本发明的再一个方面是用于多个样品的同时热循环以进行多个核酸扩增反应的系统，所述系统包括

- a) 根据本发明的设备，和
- b) 进行所述多个核酸扩增反应所必需的试剂。

发明详述

本发明的一个主题是一种设备，用于多个样品的同时热循环，所述设备包括：

- a) 包含多个样品的热模块 1，
- b) 至少一个热泵 2，
- c) 热基底 4，
- d) 散热器 5，和
- e) 控制单元 3，来控制所述多个样品的同时热循环，

其中所述热基底 4 与所述散热器 5 和所述至少一个热泵 2 热接触，所述至少一个热泵 2 与所述热模块 1 热接触。

存在着本领域技术人员已知的、能够以循环方式调温样品的大量设备。用语热循环概况了样品的温度的周期性变化，其中在一个循环开始时的温度与所述循环的结束时的温度相同。一个温度循环包括加热、冷却(温度斜坡)的阶段以及恒温的阶段。随着时间的温度变化由用语“热循环方案”来概述。

如果设备能够同时调温多个样品的组合，例如微量滴定板的反应孔，多个样品的实验的结果应当是可比较的，人们必需确保在所述组件的中心以及在所述组合的边缘的样品的热循环是优选的相同的。此外，希望的是进行尽可能快的热循环方案的温度斜坡，但当达到恒温阶段时不过调所述多个样品的温度。

在根据本发明的设备的优选的实施方案中，所述热模块 1 由热传导材料制成。

热传导材料是具有良好的导热性和低热容量的材料。在热量转移分析中，导热性和热容量的比值也被定义为热扩散率。

$$\alpha = k / (\rho \cdot c_p)$$

其中 k 是热传导率，计量为 $W / (m \cdot K)$ ， $\rho \cdot c_p$ 是体积热容量，计量为 $J / (m^3 \cdot K)$ 。热扩散率的国际标准单位是 m^2/s 。

具有高热扩散率的物质快速地调节它们的温度到它们周围的温度，因为与它们的热量容量相比它们快速地传导热量。热扩散材料是具有良好的热传导性的材料，不受理论的限制，大多数具有良好的导电性的材料也具有良好的热扩散率。

另一方面，虽然它们具有小得多的热扩散率，还存在着一些塑料、陶瓷和聚合物，其具有用于本发明的足够的热性质。塑料具有最多达 $\alpha = 0.2 \times 10^{-6} m^2/s$ 的热扩散率，陶瓷最多达 $0.4 \times 10^{-6} m^2/s$ 。例如聚合材料可以具有最多达 $k = 10 Wm^{-1}K^{-1}$ 的热传导率。

在根据本发明的设备的更优选的实施方案中，所述热模块 1 由金属制成，优选的由铝或银制成。

存在着本领域技术人员已知的、具有良好的热传导性并且适合于所述热模块的多种金属材料，例如铜、铝或银。例如，铜具有约 $\alpha = 107 \times 10^{-6} m^2/s$ 的热扩散率，银约 $\alpha = 166 \times 10^{-6} m^2/s$ ，而铝具有约 $\alpha = 93 \times 10^{-6} m^2/s$ （都在 300 K）。尽管如此，铝是优选的材料，因为它是便宜的和易于加工的。注意到，在大多数情况下，金属材料不是纯的而是合金，所述材料的热传导性将取决于所述合金的组成。

一般地，本发明的热模块 1 是立方体，具有顶视图横截面 A，长度 l 、宽度 w 和高度 h ，具有 $l = 5-200 mm$ 、 $w = 5-200 mm$ 和 $h = 3-100 mm$ 的优选的尺寸。

在根据本发明的设备的另一个优选的实施方案中，所述热模块 1 包

括被配置以接受所述多个样品的凹进部分7。

在根据本发明的设备的这个实施方案中，所述热模块1具有多个凹进部分7，所述凹进部分7布置在上部延伸到所述热模块1的内部。优选的是所述凹进部分具有全部相同的大小。所述凹进部分7可以通过在均质的热模块1中钻孔来获得。做为选择，所述的在均质的热模块1中钻孔可以以这样的方式进行，从而凹进部分7形成穿过热模块1的整个高度的孔。除了在均质的热模块1中钻孔的方法之外，其他的方法如模压、电铸、深拉或电火花加工可以用于制造具有凹进部分的热模块。

在根据本发明的设备的进一步优选的实施方案中，所述多个样品直接置于热模块1的所述凹进部分7中，或通过各自包含所述多个样品之一的反应容器置于其中。

凹进部分7被配置以接受所述多个样品，在本发明的范围内一些可能性是可用的。在一个实施方案中，所述多个样品直接经由例如移液步骤置于所述凹进部分7中。如有必要，凹进部分7可以被有对于样品是惰性的以及可清洁以重复利用所述热模块1用于进一步使用的材料。在另一个实施方案中，所述多个样品经由反应容器置于所述凹进部分7中，所述反应容器被对齐到所述凹进部分7中。重要的是，反应容器和凹进部分7是对齐的，因为在两个部件之间另外的空气可能作为隔热层阻碍热接触。

在根据本发明的设备的同样优选的实施方案中，所述反应容器是连接的以形成一个或多个组，优选的所述反应容器是连接的以形成多孔平板。

所述多个凹进部分7的每一个可以接受独立的反应容器，或者一组或多组连接的反应容器可以置于所述多个凹进部分7中。适合于本发明的公知的单独反应容器是例如 Eppendorf 杯，而适合的连接的反应容器组是例如 Eppendorf 杯条带，或具有例如 96、384 或 1536 个独立的反应孔的微量滴定板。

在根据本发明的设备的又一个优选的实施方案中，所述至少一个热泵2是热电设备，优选的半导体设备，更优选的 Peltier 元件。

热泵2是有源元件，其需要电力来产生和/或转运热量，在文献中也称为热电设备(TEC)。一般地，TEC热泵是由半导体材料制成的固态的热泵，包括一系列夹在陶瓷板之间的p型和n型半导体配对或结点。

直流电源提供了能量来移动电子通过该系统从而转移热量。典型的 TEC 将含有多达 127 个结点，并可以泵送多达 120 W 的热量，而泵送的热量的数量与通过 TEC 的电流成比例。因此，TEC 提供了紧密的温度控制。通过使电流反向，TEC 可以作为加热器或冷却器来工作，在变化的周围环境中或在不同温度的循环中控制目标物是有用的。公知类型的 TEC 是 Peltier 元件。这种 Peltier 元件是商业上可获得的，关于性能、形状和材料有几种不同的版本。TEC 是矩形的或圆形的，它们可能具有中心孔用于固定并以不同的高度存在。特殊的 TEC 被优化以经历工作模式之间的扩大的切换，并且适合于高达 150°C。一般地，半导体设备夹在陶瓷板之间。这些陶瓷板可以装备有裂缝以降低热应力。为了对抗双金属效应，陶瓷板可以用金属材料（例如铜）部分地覆盖。

在根据本发明的设备的另一个优选的变体中，所述热基底 4 是在固态外壳之内包含液体-蒸气平衡的热传导设备。

如前所提及的，在本发明的范围内的热基底 4 基本上类似于本领域技术人员已知的热管，差别是与热管的管道样结构相比，热基底 4 具有至少部分的类片状结构。一般地，热管以及热基底是具有内部灯芯结构的固态外壳，通过内部的工作液体的蒸发和凝结来转移热量。换句话说，在所述密封的容器内存在着内部工作液体的液体-蒸气平衡，而局部平衡取决于局部温度。更详细地，如果热量在热管的一侧被吸收时，工作液体被汽化，产生所述热管内部的压力梯度。所述蒸气被迫流向热管的冷却端，在此它凝结，向周围环境释放它的潜热。经由重力或内部灯芯结构内的毛细管作用，凝结的工作液体回到蒸发器。一般使用氨、水、丙酮或甲醇作为工作液体，而特殊的液体被用于低温和高温应用。

热基底具有多达 $2 \times 10^5 \text{ Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$ 的非常高的类导热性，因而，热量跨越热基底的整个横截面区域的散布是非常有效的。这在一方面，在加热过程期间提高了同质性，另一方面，降低了冷却过程所需的时间，因为散热器的传热阻将被进一步降低。

根据本发明的设备的优选的变体包括基本上平面的热基底 4。

在根据本发明的设备的更优选的实施方案中，所述热基底 4 没有凹进部分。

在本发明的范围内，优选的是所述热基底 4 基本上是平面的，而基本上平面的概况了具有顶视图横截面 A、长度 l、宽度 w 和高度 h 的立

方体的热基底4，具有优选的尺寸 $l=10-500\text{ mm}$ 、 $w=10-500\text{ mm}$ 和 $h=3-15\text{ mm}$ 。

在整个本发明中，用语“没有凹进部分”被用于强调在本发明的某些优选的实施方案中所述热基底具有连续的顶视图横截面A，其不被凹进部分打断。换句话说，没有凹进部分的热基底至少在与邻近设备部件热接触的区域中具有平面的表面。

在本发明的范围内，用语两个元件之间的“热接触”被用于强调两个元件之间的物理接触必须针对高热传导性来优化。换句话说，在整个本发明中，“热接触”是优化的“物理接触”以改善两个元件之间的热传导。由于空气是不良的导热体，人们必须确保热接触的两个元件之间空气的数量尽可能的小。存在着几种可能性来最小化两个固态材料的接触区中的空气，这些可能性可以分为两组，即直接热接触和间接热接触。

间接热接触的一种变体利用了具有高热传导性的糊状物作为两个元件之间的连接物，例如，热油脂。在间接热接触的另一变体中，优选的软的、热传导性薄片，例如石墨箔被用作两个元件之间的接合材料。这种石墨薄片甚至可以是元件的一定粗糙性，降低由于热膨胀的机械应力。

另一方面，优选的是施加机械力，使得直接热接触是充分的，在两个元件之间不需要其他结合材料。还优选的是，两个接触区域尽可能的平以最小化元件之间的空气隙。注意到，有利的是，甚至对于间接热接触的实施方案也施加机械力来将两个元件压在一起，因为这可以进一步改善热传导。

在根据本发明的设备的更优选的变体中，所述热基底4与所述散热器5热接触，并经由石墨薄片与所述至少一个热泵2热接触，所述至少一个热泵2也经由石墨薄片与所述热模块1热接触。如果希望，热油脂可以用作热基底4和所述散热器5之间的其他接合材料。

在根据本发明的设备的又一个优选的变体中，所述至少一个热泵2被用于产生热量和转移所述热量到所述热模块1。

在根据本发明的设备的更优选的实施方案中，所述至少一个热泵2被进一步用于主动转移热量从所述热模块1到所述热基底4。

通过将电流反向，TEC可以作为加热器或冷却器起作用。在一个操

作模式中，TEC 产生热量并且所述热量被转移到设备的两个陶瓷板之一上。在另一种操作模式中，TEC 将热量从设备的一个陶瓷板转移到另一个陶瓷板，主动地冷却一个陶瓷板。换句话说，当 TEC 的一个面被冷却时，TEC 的另一面被加热。

在根据本发明的设备的同样优选的实施方案中，其中所述热基底 4 的横截面比所述散热器 5 的横截面大低于 20% 或者比所述散热器 5 的横截面小低于 20%，所述热基底 4 的横截面大于所述热模块 1 的横截面，所述横截面与相应的接触区域平行。

在冷却热模块期间，大量的热量在短时间内被消散。如果需要消散的热量变得更大，初看起来这可以通过简单的使用提供了更大消散表面积更大的散热器 5 来解决。这种假定仅在一定程度上是正确的，因为使用具有受限的导热性的普通金属散热器 5，仅仅靠近热源的表面区域的某些部分参与消散过程。因此，单独的扩大普通金属散热器 5 的横截面不是处理大量热量的消散的合适的途径。在本发明中，横截面总是在顶面上设备元件的横截面。注意到，附图 1 中的设备的几个实施方案的示意图说明了元件的侧面视图。

使用根据本发明的热基底 4 与散热器 5 组合，改善了热量消散，因为热基底 4 的巨大的热传导性保证了即使比热源大得多的散热器 5 也将参与消散性过程。消散过程的优化有助于降低热循环方案中冷却步骤所需的时间。

在根据本发明的设备的另一个更优选的变体中，所述热基底 4 的所述横截面比所述热模块 1 的横截面大至少 1.5 倍，优选大至少 4 倍，并且所述热基底 4 具有与所述散热器 2 相同的横截面，所述横截面与相应的接触区域是平行的。

所述热基底 4 的横截面与所述热模块 1 的横截面的最大合理比例取决于热基底 4 的热传导性。对于散热器 5 和热基底 4 的横截面比例也是如此。提供具有比所述热基底 4 的横截面大得多的横截面的散热器 5 不能进一步改善热消散。

在根据本发明的设备的另一个更优选的变体中，所述热基底装备有控制装置 9 来改变所述热基底 4 的热传导性质。

优选的是提供具有控制装置 9 的热基底，因为如果所述热基底的热传导性质可以改变，所述热基底的作用可以如不同的热循环方案的步骤

所希望的切换“开”和“关”。例如，对于热循环方案的加热步骤，希望的是最小化热基底4的热传导性质。如果热基底4在加热步骤期间不能被切换“关”，在至少一个热泵2处产生的很大部分的热量将立即在散热器5消散。

存在着几种方式来控制热基底的热传导性质（参见，例如，US 5,417,686）。一般地，热基底的热传导性质取决于受容器真空度影响的内部工作液体的液体-蒸气平衡，以及取决于密封的容器内气体和液体的转移。

根据本发明的更优选的实施方案是一种设备，其中所述控制装置9通过改变所述热基底内的容积来改变热基底的热传导性质。

根据本发明的另一种更优选的实施方案是一种设备，其中所述控制装置9通过改变所述热基底内的流速来改变热基底的热传导性质。

热基底内的内部工作液体的液体-蒸气平衡可以通过改变热基底的容积来修改。这可以通过提供通过开口连接到所述热基底的其他容器来做到，而所述其他容器的容积是可调整的。所述其他容器可以是例如注射器或风箱。做为选择，所述热基底内的真空度可以直接通过使用连接到所述容器的开口的真空泵来调节。此外，热基底的热传导性质可以通过影响所述容器内的流速来修改。在此，节流阀是适合的，其可以从外部操作而不影响将热基底分隔成区室的容器内的真空度。

在根据本发明的设备的优选的变体中，所述散热器5由热传导材料制成。

在根据本发明的设备的更优选的变体中，所述散热器5由金属、优选的由铝、铜、银或石墨制成。

关于散热器5的热传导材料，如之前对于热模块1所提出的相同的陈述是有效的。

在根据本发明的设备的又一个优选的变体中，所述散热器5被配置来提供最大化的表面积-体积比。

不受理论的限制，可以由所述散热器5消散的热量的数量与它的表面积成正比。因此，希望的是提供具有优化的表面积-体积比的散热器，由于本发明的设备内的有限空间量。

在根据本发明的设备的更优选的变体中，通过布置在基板上的鳍片的组合来提供所述大的表面积-体积比。

还优选的是根据本发明的设备，其中所述散热器 5 通过空气或通过水流冷却。

鳍片的间隙组合提供了大的表面积，而实心的基板代表了与热基底 4 的热接触区域。散热器 5 将热量消散到周围。由于这种消散过程对于在周围空气和散热器 5 之间的大温差是最有效的，可取的是主动冷却周围环境。这可以通过由风扇产生的空气流或通过例如蠕动泵产生的液体流来进行。

在根据本发明的设备的又一个优选的变体中，所述控制单元 3 控制所述至少一个热泵 2 的性质。

在根据本发明的设备的更优选的变体中，所述控制单元 3 进一步控制所述控制装置 9 来改变所述热基底 4 的热传导性质。

根据本发明的设备装有控制单元 3。所述控制单元 3 是电力设备，例如计算机，其控制所述至少一个热泵 2 的电源供应，因而调节它们的加热或冷却性质。另外，所述控制单元 3 可以操作控制装置 9 的热基底。

根据本发明的另一个优选的实施方案是一种设备，其中进行所述热循环来实现所述多个样品内的核酸扩增。

根据本发明的更优选的实施方案是一种设备，进一步包括一种装置来实时监控所述核酸扩增。

在本发明的范围内，本领域技术人员已知的所有核酸扩增都是适用的，例如聚合酶链式反应（PCR）、连接酶链式反应（LCR）、聚合酶连接酶链式反应、Gap-LCR、修复链式反应、3SR、链置换扩增（SDA）、转录介导的扩增（TMA）或 Q β -扩增。

一般地，使用本领域技术人员已知的荧光染料实时监控核酸扩增。为了测量荧光信号，在本发明的范围内各种光学装置是适合的。优选的是 CCD 照相机或光度计，其可以与或不与其他的光学部件如透镜、光学滤镜或折叠式反射镜一起使用。

如果某些应用需要光学装置必需定位在热模块 1 下方，例如，来通过所述热模块 1 的底孔监视多个样品的荧光强度，可能的是将散热器 5、第一热基底 4、热泵 2 和任选的第二热基底 6 的中的元件布置在所述热模块 1 的侧面。为了过程热模块 1 的均质的热循环，可能的是在所述热模块 1 的四边的每一边布置所述元件之一。做为选择，单个元件可以围绕所述热模块 1 布置。

本发明的另一个方面是一种用于多个样品的同时热循环的设备，所述设备包括：

- a) 包含所述多个样品的热模块 1，
- b) 至少一个热泵 2，
- c) 第一热基底 4 和第二热基底 6，
- d) 散热器 5，和
- e) 控制单元 3，来控制所述多个样品的同时热循环。

在本发明的这个实施方案中，使用了两个独立的热基底 4、6。第一个热基底 4 通过将要消散的热量均匀地散发通过整个散热器 5 来改善热循环方案中的冷却步骤。第二个热基底 6 通过将在至少一个热泵 2 产生的热量均匀地散发通过完整的热模块 1 来改善热循环方案中的加热步骤。

在根据本发明的设备的又一个优选的变体中，所述第一热基底 4 是基本上平面的。

在根据本发明的设备的更优选的变体中，所述第一热基底 4 是基本上平面的，与所述散热器 5 热接触。

如以上提及的，基本上平面的概况了具有顶视图横截面 A、长度 l、宽度 w 和高度 h 的立方体的热基底，所述第一热基底 4 具有优选的尺寸 $l=10-500\text{ mm}$ 、 $w=10-500\text{ mm}$ 和 $h=3-15\text{ mm}$ 。对于热接触，之前提及的所有可能性也适合于这个优选的变体。

在根据本发明的设备的同样优选的变体中，所述至少一个热泵 2 在所述两个热基底 4、6 之间，所述至少一个热泵 2 与两个热基底 4、6 都热接触。

所述至少一个热泵 2 处于所述两个热基底 4、6 之间时，热泵 2 能够在加热步骤期间将热量转移到第二热基底 6，以及在冷却步骤期间将热量从第二热基底 6 转移到第一热基底 4。在本发明的优选的实施方案中，所述至少一个热泵 2 是 TEC。

优选的是，在所述热泵 2 和所述第一热基底 4 以及所述第二热基底 6 之间存在其他接合材料。在两种情况下，优选的接合材料是如前所述的石墨薄片。

在根据本发明的设备的更优选的变体中，所述第一热基底 4 的横截面比所述散热器 5 的横截面大低于 20% 或者比所述散热器 5 的横截面小

低于 20%，所述第一热基底 4 的横截面大于所述热模块 1 的横截面，所述第二热基底 6 是基本上平面的，所述第二热基底 6 与所述热模块 1 热接触，所述横截面与相应的接触区域平行。

在根据本发明的设备的另一个更优选的变体中，所述第一热基底 4 的横截面比所述散热器 5 的横截面大低于 20% 或者比所述散热器 5 的横截面小低于 20%，所述第一热基底 4 的横截面大于所述热模块 1 的横截面，所述第二热基底 6 具有封闭所述热模块 1 的部分或所述热模块 1 的整体的复杂形状，所述第二热基底 6 与所述热模块 1 热接触，所述横截面与相应的接触区域平行。

之前详细讨论了具有与热模块 1 更大的横截面的散热器 5 以及第一热基底 4 的积极效果。简言之，使用第一热基底 4 与散热器 5 组合，改善了热量消散，因为热基底 4 的巨大的热传导性保证了即使比热源大得多的散热器 5 也将参与消散性过程。

所述第二热基底 6 和所述热模块 1 的热接触优选的包含其他的接合材料，例如热油脂或石墨薄片。

如果仅需要热模块的均匀加热而不需优化的热消散，有益的是提供仅具有第二热基底 6 而没有第一热基底 4 的设备。根据本发明的设备的这种变体可以对具有本申请中描述的第一和第二热基底的所有实施方案使用。

在根据本发明的设备的再更优选的变体中，所述第一热基底 4 的横截面比所述热模块 1 的横截面大至少 1.5 倍，优选大至少 4 倍，所述第一热基底 4 具有与所述散热器 2 相同的横截面，所述横截面与相应的接触区域平行。

所述第一热基底 4 与所述热模块 1 以及所述第一热基底 4 与所述散热器 2 的合理横截面比例取决于热基底 4 的热传导性。

关于所述第二热基底 6 和所述热模块 1 的横截面比例，之前所列的相同数据是有效的，优选的是所述第二热基底 6 和所述热模块 1 具有大约相同的横截面，优选的所述第二热基底 6 的横截面比所述热模块 1 的横截面大低于 20% 或者比所述热模块 1 的横截面小低于 20%。所述第二热基底 6 具有 $l=5-200\text{ mm}$ 、 $w=5-200\text{ mm}$ 和 $h=3-30\text{ mm}$ 的优选的尺寸。

在根据本发明的设备的另一个优选的实施方案中，所述至少一个热泵 2 被用于产生热量和转移所述热量到所述第二热基底 6。

在根据本发明的设备的更优选的实施方案中，所述至少一个热泵 2 被进一步用于从所述第二热基底 6 主动转移热量到所述第一热基底 4。

如在此提及的，当 TEC 作为热泵时，反转这些热元件的电流提供了加热或冷却设备。

根据本发明的优选的实施方案是一种设备，其中所述第一热基底 4 和所述第二热基底 6 都没有凹进部分。

根据本发明的另一个优选的实施方案是一种设备，其中所述第一热基底 4 和/或所述第二热基底 6 装备有控制装置 9 来改变所述热基底 4、6 的热传导性质。

优选的是提供具有控制装置 9 的每个热基底，因为如果所述热基底的热传导性质可以独立地改变，所述热基底的作用可以如不同的热循环方案的步骤所希望的切换“开”和“关”。例如，在具有第一 4 和第二热基底 6 的实施方案中，希望的是最小化第一热基底 4 的热传导性质，和最大化第二热基底 6 的热传导性质用于热循环方案的加热步骤。如果所述第一热基底 4 在加热步骤期间不能被切换“关”，在至少一个热泵 2 处产生的很大部分的热量将立即在散热器 5 消散。

注意到，如前描述的控制热基底的热传导性质的方法以及散热器 5、热泵 2、热模块 1、控制装置 9 和控制单元 3 的实施方案也可以针对具有第一和第二热基底 4、6 的设备应用。

在根据本发明的设备的更优选的变体中，所述控制单元 3 进一步控制所述控制装置 9 来改变所述热基底 4、6 的热传导性质。

根据本发明的设备装有控制单元 3。所述控制单元 3 是电力设备，例如计算机，其控制所述至少一个热泵 2 的电源供应，因而调节它们的加热或冷却性质。另外，所述控制单元 3 可以操作至少一个热基底 4、6 的控制装置 9。

本发明的又一个方面是用于多个样品的同时热循环的方法，所述方法包括步骤

a) 提供具有多个凹进部分的热模块 1、至少一个热泵 2、一个热基底 4、任选的第二热基底 6、散热器 5 和控制单元 3，

b) 布置所述具有多个凹进部分的热模块 1、所述至少一个热泵 2、所述第一热基底 4、任选的所述第二热基底 6 和所述散热器 5，其中 - 所述散热器 5 与所述第一热基底 4 热接触，

- 所述第一热基底 4 与所述至少一个热泵 2 热接触, 和
- 所述至少一个热泵 2 或者与所述热模块 1 热接触或者任选的与所述第二热基底 6 热接触, 所述第二热基底 6 与所述热模块 1 热接触,
- c) 将所述多个样品置于所述热模块 1 的凹进部分内, 和
- d) 使用所述控制单元 3 进行热循环方案。

用语热循环方案概况了样品的温度的周期性变化, 其中在一个循环开始时的温度与所述循环的结束时的温度相同。一个温度循环包括加热、冷却(温度斜坡)的阶段以及恒温的阶段。

如在前提及的, 用语两个元件之间的“热接触”在整个本发明中用来强调所述接触必须针对高热传导性来优化。例如, 通过具有高热传导性的糊状物例如热油脂作为两个元件之间的连接物, 或通过软的热传导薄片, 例如石墨薄片作为两个元件之间的媒介物, 可以优化热接触。在所有情况下, 如果将两个元件通过机械力压在一起, 是有益的。

在根据本发明的方法的优选的变体中, 所述第一热基底 4 与所述散热器 5 热接触, 并经由石墨薄片与所述至少一个热泵 2 热接触, 所述至少一个热泵 2 经由石墨薄片与所述热模块 1 或与所述第二热基底 6 热接触。

在根据本发明的方法的另一个优选的变体中, 所述第一热基底 4 是基本上平面的。

在根据本发明的方法的更优选的变体中, 所述第一热基底 4 没有凹进部分。

在根据本发明的方法的又一个优选的变体中, 所述第一热基底 4 的横截面比所述散热器 5 的横截面大低于 20% 或者比所述散热器 5 的横截面小低于 20%, 所述第一热基底 4 的横截面大于所述热模块 1 的横截面, 所述横截面与相应的接触区域平行。

在根据本发明的方法的更优选的变体中, 所述第一热基底 4 的横截面比所述热模块 1 的横截面大至少 1.5 倍, 优选大至少 4 倍, 所述第一热基底 4 具有与所述散热器 2 相同的横截面, 所述横截面与相应的接触区域平行。

还优选的是根据本发明的方法, 其中所述任选的第二热基底 6 是基本上平面的。

更优选的是根据本发明的方法, 其中所述任选的第二热基底 6 没有

凹进部分。

进一步优选的是根据本发明的方法，其中所述任选的第二热基底6具有与所述热模块1相同的横截面。

以上指出的优选的方案的理由之前针对根据本发明的设备已经讨论了。

在根据本发明的方法的优选的实施方案中，所述任选的第二热基底6具有包围所述热模块1的部分或所述热模块1整体的复杂形状。

在根据本发明的方法的另一个优选的实施方案中，所述任选的第二热基底6具有替换所述热模块1的复杂形状。

根据本发明的方法的优选的实施方案，其中第二热基底6具有复杂形状，提供了特别均匀的热模块1调温，因为不仅是所述热模块1的底部与第二热基底6热接触，而且侧壁的部分甚至热模块1的整体都被第二热基底6包被。

作为对热模块1被第二热基底6整体包被的选择，热模块1可以被成形象热模块本身的特殊热基底8替代。

在根据本发明的方法的又另一个优选的实施方案中，所述多个样品直接置于所述热模块1的所述凹进部分中，或通过各自包含所述多个样品之又一个的反应容器置于其中。

在根据本发明的方法的更优选的实施方案中，连接所述反应容器以形成一个或多个组，优选的所述反应容器连接成多孔平板的形式。

将多个样品放置在热模块1中的不同选择之前已经针对根据本发明的设备讨论了。

在根据本发明的方法的进一步优选的实施方案中，所述热循环方案适合于进行所述多个样品中的核酸扩增。

再更优选的是根据本发明的方法，其中所述核酸扩增被实时监控。

本发明的又另一个方面是用于多个样品的同时热循环以进行多个核酸扩增反应的系统，所述系统包括

- a) 根据本发明的设备，和
- b) 进行所述多个核酸扩增反应所必需的试剂。

整个本申请中的试剂是各种类型的化学物质，其是借助根据本发明的发明性设备进行以上所列方法之一所必需的。这些试剂可以是液体或固体、纯的材料或混合物，它们可以备用地或作为浓缩物来提供。

在根据本发明的优选的系统中，所述试剂包括缓冲溶液、洗涤剂、酶、核苷酸和引物。

根据本发明的这种优选的系统的试剂是进行 PCR 扩增所必需的试剂。更详细地，试剂是一组单独的核苷酸、聚合酶、一对引物和缓冲溶液。

在根据本发明的另一个优选的系统中，所述多个核酸扩增反应是多个被实时监视的 PCR 扩增。

提供以下的实施例、序列表和附图来帮助理解本发明，它们的真实范围在附随的权利要求中阐述。要理解的是，可以在所列的步骤中进行修改而不背离本发明的精神。

附图说明

附图 1 根据本发明的设备的几个实施方案的示意图。

附图 2 在热模块的加热步骤期间热模块的热图像。

附图 3 在热模块的冷却步骤期间热模块的热图像。

附图 4 说明在包括 6 个循环的热循环方案期间作为时间的函数的与热模块相关的几个温度的图表。

附图 5 说明在一个热循环周期期间作为时间的函数的与热模块相关的几个温度的详细图表。

附图 6 细小病毒 B19 片段的实时扩增曲线。通过实时 PCR 分析了五种不同的目标物浓度，每种浓度由平板的五个不同的反应孔代表（a: 10^6 个拷贝；b: 10^5 个拷贝；c: 10^4 个拷贝；d: 10^3 个拷贝；e: 10^2 个拷贝）。

附图 7 细小病毒 B19 片段的实时扩增曲线。96 个实时扩增曲线记录了平板的 96 个不同的反应孔，每个含有目标序列的 10 个拷贝。

实施例 1

用于 384 多孔平板的热循环的根据本发明的设备包括从铝合金 AlMgSi 0,5 自制的热模块。具有尺寸 $109 \times 73 \times 9.1$ mm 的铝块通过钻孔形成 384 个凹进部分，每个圆锥性凹进部分具有 3.44 mm 的顶部直径（角度 17° ）和 6.8 mm 的深度。

在所述热模块之下布置 6 个 Peltier 元件，通过热传导石墨薄片增强热接触。使用的 Peltier 元件适合于多个热循环步骤，可以加热达到 130

℃。另外，它们每一个具有 75 W 的冷却能力。

通过第二个热传导石墨薄片，将 6 个 Peltier 元件布置在热基底上。使用的热基底是 Thermacore™的定制产品，具有 248×198×5 mm 的尺寸。容器壁由铜制成，工作液体是水。

使用的散热器是从 Webra 商业上获得的（产品号码 W-209），由铝合金 AlMgSi 0,5 制成，具有 250×200×75 mm 的尺寸。在散热器和热基底之间，应用商业的热油脂来增强热接触。

设备的所有四种元件通过 17 个螺丝和弹簧固定在一起，消散性过程通过散热器上的四个风扇循环空气来增强。

实施例 2

在加热步骤（附图 2）和冷却步骤（附图 3）期间使用 IR-照相机（在 PLIR 公司商业上可获得的）来记录如实施例 1 描述的设备的模块的热图像。

加热步骤（附图 2）在 55℃ 的温度开始，加热速率 4℃/s 直到达到 95℃，而冷却步骤（附图 2）在 95℃ 的温度开始，冷却速率 2℃/s 直到达到 55℃。分别在加热步骤和冷却步骤期间的不同时间采集图像。

实施例 3

在附图 4 中，以下热循环方案的 6 个连续温度循环的不同特性温度作为时间的函数来标绘。

步骤	温度	斜坡	保持时间	数目
预循环	40℃	2.0℃/s	120 sec	1
主循环	95℃	4.4℃/s	10 sec	6
	55℃	2.0℃/s	10 sec	
	72℃	4.4℃/s	10 sec	

附图中包括了 7 个不同的温度分布型，热循环方案的温度分布图（'Soll Temp'），热模块的理论温度（'Soil Ist'），热模块的实测温度（'Ist Temp'），热模块的 9 个凹进部分内测量的平均温度（'Mean'），热模块的所述 9 个凹进部分的最小的实测温度（'Mmin'），热模块的所述 9 个凹进部分的最大实测温度（'Max'）和 9 个凹进部分测量的均匀性（'Hom'；均匀性=最大凹进部分温度-最小凹进部分温度）。

标准的多孔平板布置在热模块的凹进部分中，分散的跨越热模块的横截面的 9 个孔用油填充（Type Applied Biosystems, Nujol Ninerol Oil,

Part No. 0186-2302)。使用热电偶 (Thermocouples Omega 5TC-TT-36-72) 对每个凹进部分测量温度。用热模块内的内部温度传感器测量热模块的温度。

在附图 5 中, 序列的最后一个循环的放大被标绘来更详细地说明不同的分布型。

实施例 4

为了进一步表明本发明的有效性, 使用基于荧光染料标记的杂交探针的检测的、不同目标物浓度的实时 PCR 扩增使用实施例 1 中描述的设备来进行。对于测试系统, 选择细小病毒 B19 (SEQ ID NO: 1) 的 177 bp 片段的实时 PCR 扩增。对于荧光探针, 使用 LightCycler-细小病毒 B19 定量试剂盒 (Roche Applied Science, Article No. 3 246 809) 的 HybridisationProbe 配对 (SEQ ID NO: 4 和 SEQ ID NO: 5) 或 SybrGreen。结果在附图 6 (HybridisationProbe 配对) 和附图 7 (SybrGreen) 中显示。

PCR

细小病毒 B19 序列的部分片段克隆到 pCR 2.1 质粒载体 (Invitrogen) 中。在 10 mM Tris-HCl、pH 8.3 中制备细小病毒 B19 质粒 DNA 稀释度。每个 PCR 反应 10^6 到 100 个质粒目标拷贝被用于扩增。

对于 PCR 扩增, 使用 LightCycler-细小病毒 B19 定量试剂盒 (Roche Applied Science, Article No. 3 246 809)。典型的 PCR 分析包括 106 到 100 个拷贝的细小病毒 B19 质粒、反应缓冲液、检测缓冲液和根据厂家的说明的 1U FastStart Taq DNA 聚合酶。PCR 方案包括 95°C 10 分钟的初始变性步骤, 随后是 95°C 扩增 10 秒、60°C 15 秒和 72°C 10 秒的 40 个循环。分别地, 斜坡率对于加热是 4.8°C, 对于冷却是 2.4°C。在白色 384 孔微量滴定板 (Treff, Switzerland 的定制产品) 中在 20 μ l 的中体积中进行 PCR 反应。

使用与包含焦阑的透镜的光学系统连接的 CCD 照相机, 在每个循环中在退火步骤的结束时在 60°C 检测荧光发射, 来同时测量平板的所有孔的荧光信号。使用的光学系统在欧洲专利申请 EP 05000863.0 (2005 年 1 月 18 日提交) 中描述。HybridisationProbe 配对在 480 nm 处激发, 在 640 nm 处测量发射。SybrGreen 在 470 纳米处激发, 在 530 nm 处测量发射。曝光时间设置为 1000 ms。

在附图 6 中，标绘了 5 个不同目标浓度的扩增曲线，每个目标浓度由 5 个不同的孔代表（分散的跨越 384 孔平板）。基于相同目标物浓度的扩增曲线的组标记为 (a) 10^6 个拷贝（中值 C_p (弯值) 16.6; SD 0.033），(b) 10^5 个拷贝（中值 C_p 20.1; SD 0.043），(c) 10^4 个拷贝（中值 C_p 23.5; SD 0.029），(d) 10^3 个拷贝（中值 C_p 26.9; SD 0.020），(e) 10^2 个拷贝（中值 C_p 30.4; SD 0.2）。

附图 7 包括在一个 384 孔平板的 96 个不同的孔中记录的 96 个实时扩增曲线，每个含有目标序列的 10^4 个拷贝。96 个扩增反应具有 23.7 的平均值 C_p 值，标准误差 0.08。

细小病毒 B19 的序列信息 (引物的位置是下划线的)SEQ ID NO: 1

1 cagaggttgt gccatttaat ggaagggaa ctaaggctag cataaagttt caaactatgg
61 taaactggct gtgtgaaaac agagtgttta cagaggataa gtggaaacta gttgacttta
121 accagtacac tttactaagc agtagtcaca gtggaagttt tcaaattcaa agtgactaa
181 aactagcaat ttataaagca actaatttag tgcctactag cgcattttta ttgcatacag
241 actttgagca ggttatgtgt attaaagaca ataaaattgt taaattgta ctttgtcaaa
301 actatgacct cctattgggtg gggcagcatg tgtaaagtg gattgataaa aaatgtggca
361 agaaaaatac actgtggttt tatgggccgc caagtacagg aaaaacaac ttggcaatgg
421 ccattgctaa aagtgttcca gtatatggca tggtaactg gaataatgaa aactttccat
481 ttaatgatgt agcaggaaaa agcttggtgg tctgggatga aggtattatt aagtctacaa
541 ttgtagaagc tgcaaaagct attttaggcg ggcaaccac cagggtagat taaaaaatgc
601 gtggaagtgt agctgtgcct ggagtacctg tggttataac cagcaatggt gacattactt
661 ttgttgtaag cgggaacact acaacaactg tacatgctta agccttaaaa gagcgaatgg
721 taaagttaaa ctttactgta ag

PCR 引物和探针的序列:

PCR-引物, 正义 (SEQ ID NO:2): 5'-GGG GCA GCA TGT GTT AAA GTG G-3'
PCR-引物, 反义 (SEQ ID NO:3): 5'-CCT GCT ACA TCA TTA AAT GGA AAG-3'
受体探针 (SEQ ID NO:4): 5'-LCRed640-TTG GCG GCC CAT AAA ACC ACA
GTG TAT- 磷酸 -3'
供体探针 (SEQ ID NO:5): 5'-TGG CCA TTG CCA AGT TTG TTT TTC CTG
T- 荧光素 -3'

扩增的片段的序列:

5'- g gggcagcatg tgtaaagtg gattgataaa aaatgtggca agaaaaatac actgtggttt
tatgggccgc caagtacagg aaaaacaac ttggcaatgg ccattgctaa aagtgttcca
gtatatggca tggtaactg gaataatgaa aactttccat ttaatgatgt agcagg -3'

<110>	Roche Diagnostics GmbH F. Hoffmann-La Roche AG	
<120>	包含多个样品的模块的热循环	
<130>	23080 WO	
<150>	EP 05007267	
<151>	2005-04-04	
<160>	5	
<170>	PatentIn version 3.2	
<210>	1	
<211>	742	
<212>	DNA	
<213>	细小病毒B19	
<400>	1	
	cagaggttgt gccatttaat gggaagggaa ctaaggctag cataaagttt caaactatgg	60
	taaactggct gtgtgaaaac agagtgttta cagaggataa gtggaaacta gttgacttta	120
	accagtacac ttactaagc agtagtcaca gtggaagttt tcaaattcaa agtgcaactaa	180
	aactagcaat ttataagca actaatttag tgcctactag cgcattttta ttgcatacag	240
	actttgagca ggttatgtgt attaaagaca ataaaattgt taaattgtta ctttgtaaaa	300
	actatgacc cctattgggtg gggcagcatg tgttaaagtg gattgataaa aaatgtggca	360
	agaaaaatac actgtggttt tatgggccc caagtacagg aaaaacaaac ttggcaatgg	420
	ccattgctaa aagtgttcca gtatatggca tggttaactg gaataatgaa aactttccat	480
	ttaatgatgt agcaggaaaa agcttgggtg tctgggatga aggtattatt aagtctacaa	540
	ttgtagaagc tgcaaaagct attttaggcg ggcaaccac cagggtagat taaaaaatgc	600
	gtggaagtgt agctgtgcct ggagtacctg tggttataac cagcaatggt gacattactt	660
	ttgttgtaag cggaacact acaacaactg tacatgctta agccttaaaa gagcgaatgg	720
	taaagttaaa ctttactgta ag	742

<210> 2	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> PCR-引物正义	
<400> 2	
ggggcagcat gtgttaaagt gg	22
<210> 3	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> PCR-引物反义	
<400> 3	
cctgctacat cattaaatgg aaag	24
<210> 4	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 受体探针	
<400> 4	
ttggcggccc ataaaaccac agtgtat	27
<210> 5	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 供体探针	
<400> 5	
tggccattgc caagtttggt tttcctgt	28

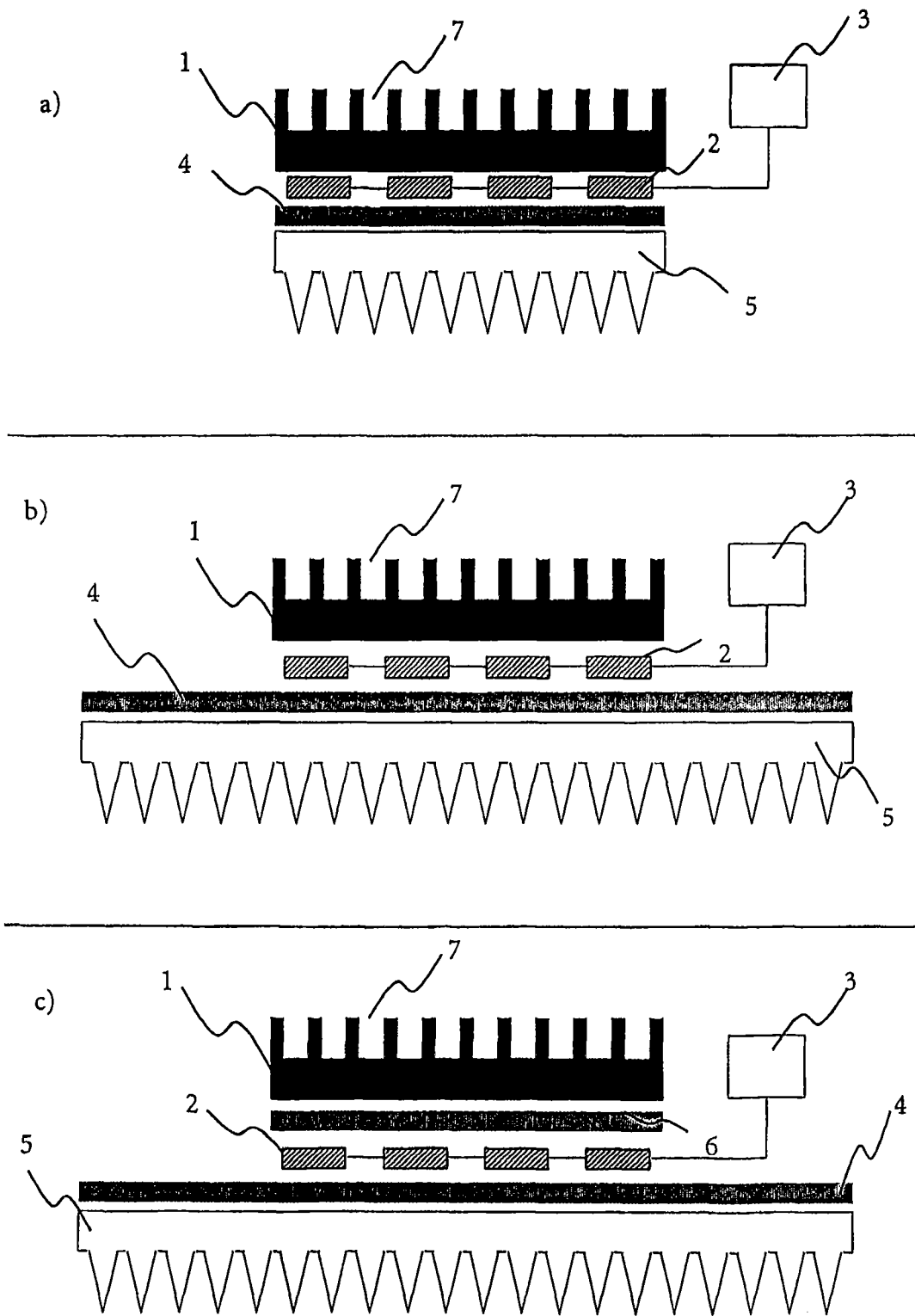
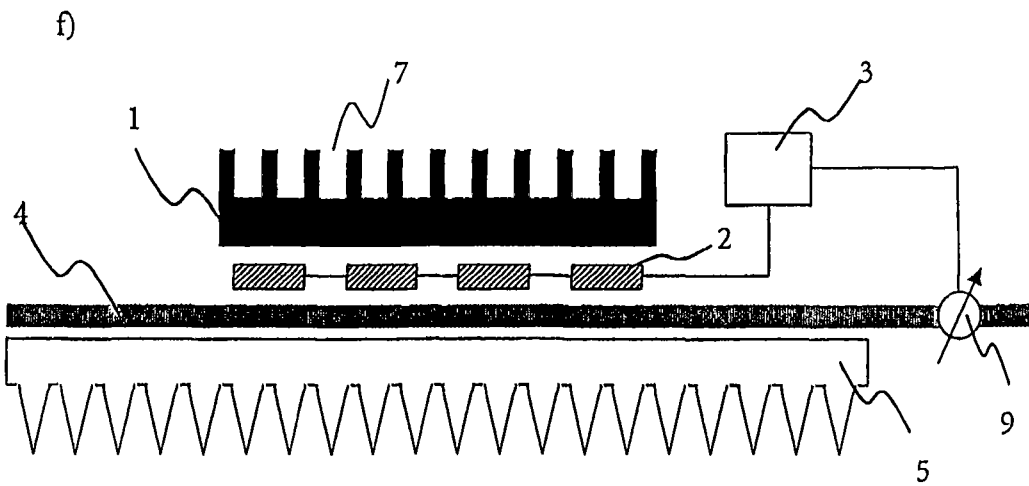
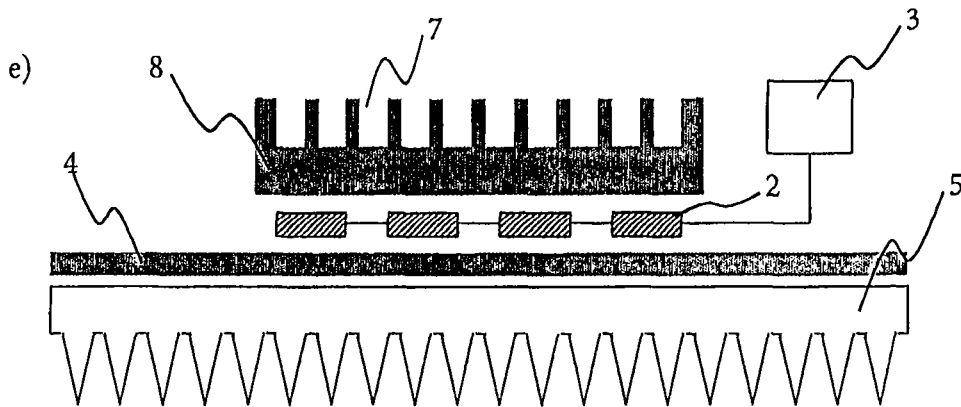
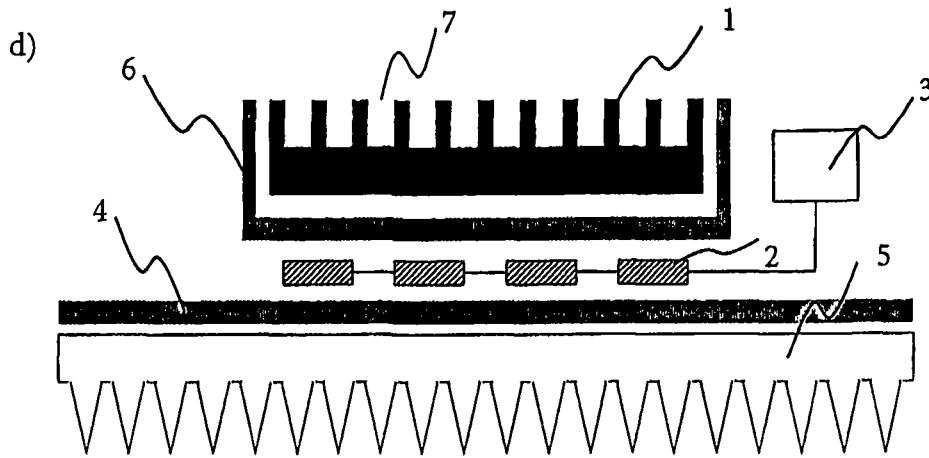
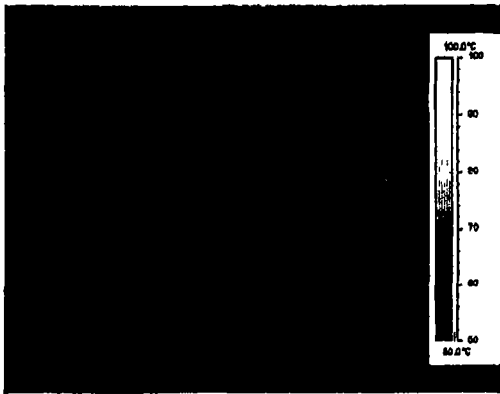


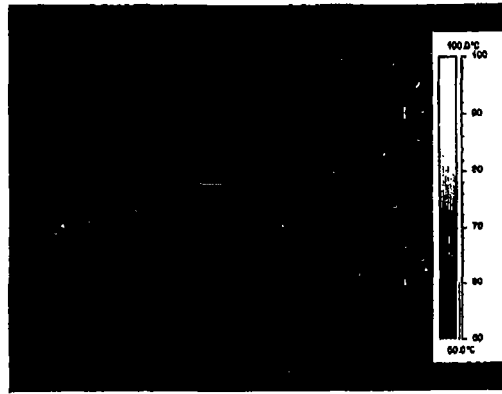
图 1



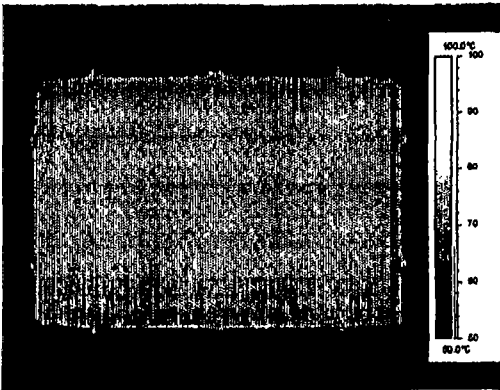
a)



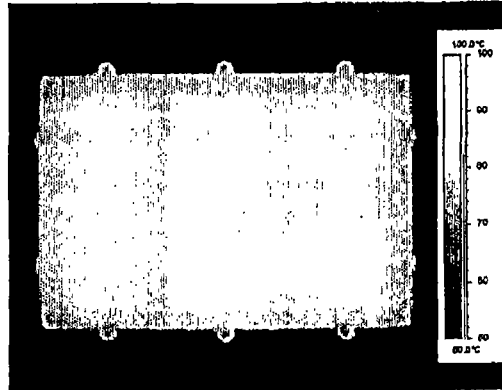
b)



c)



d)



e)

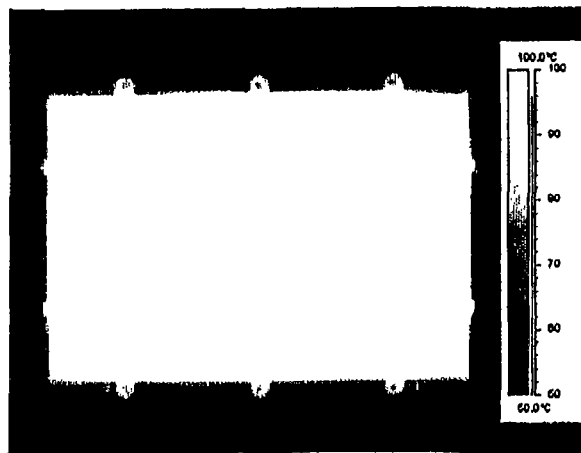
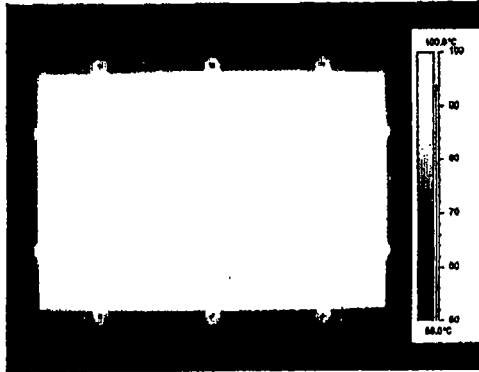
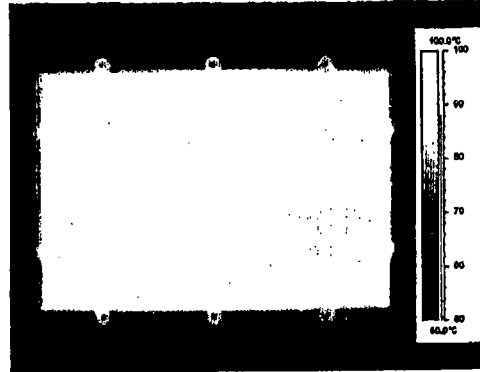


图 2

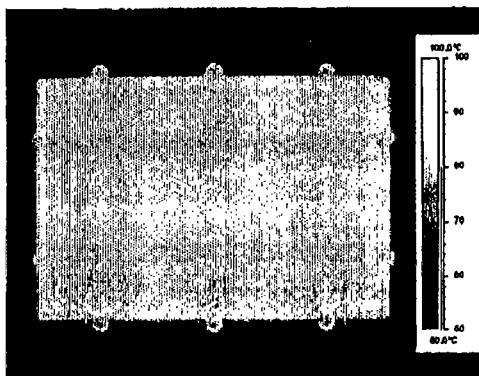
a)



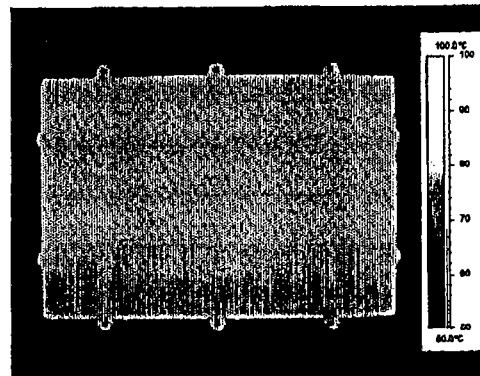
b)



c)



d)



e)

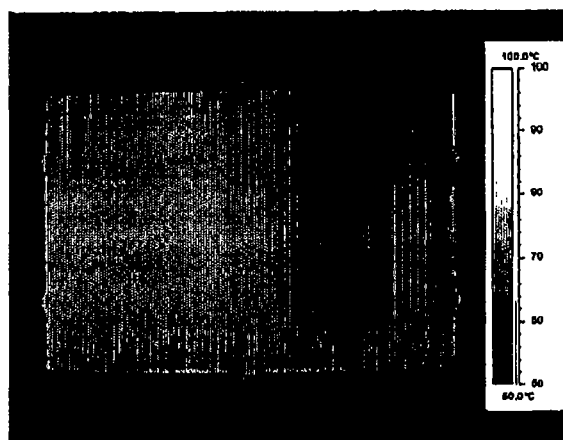


图 3

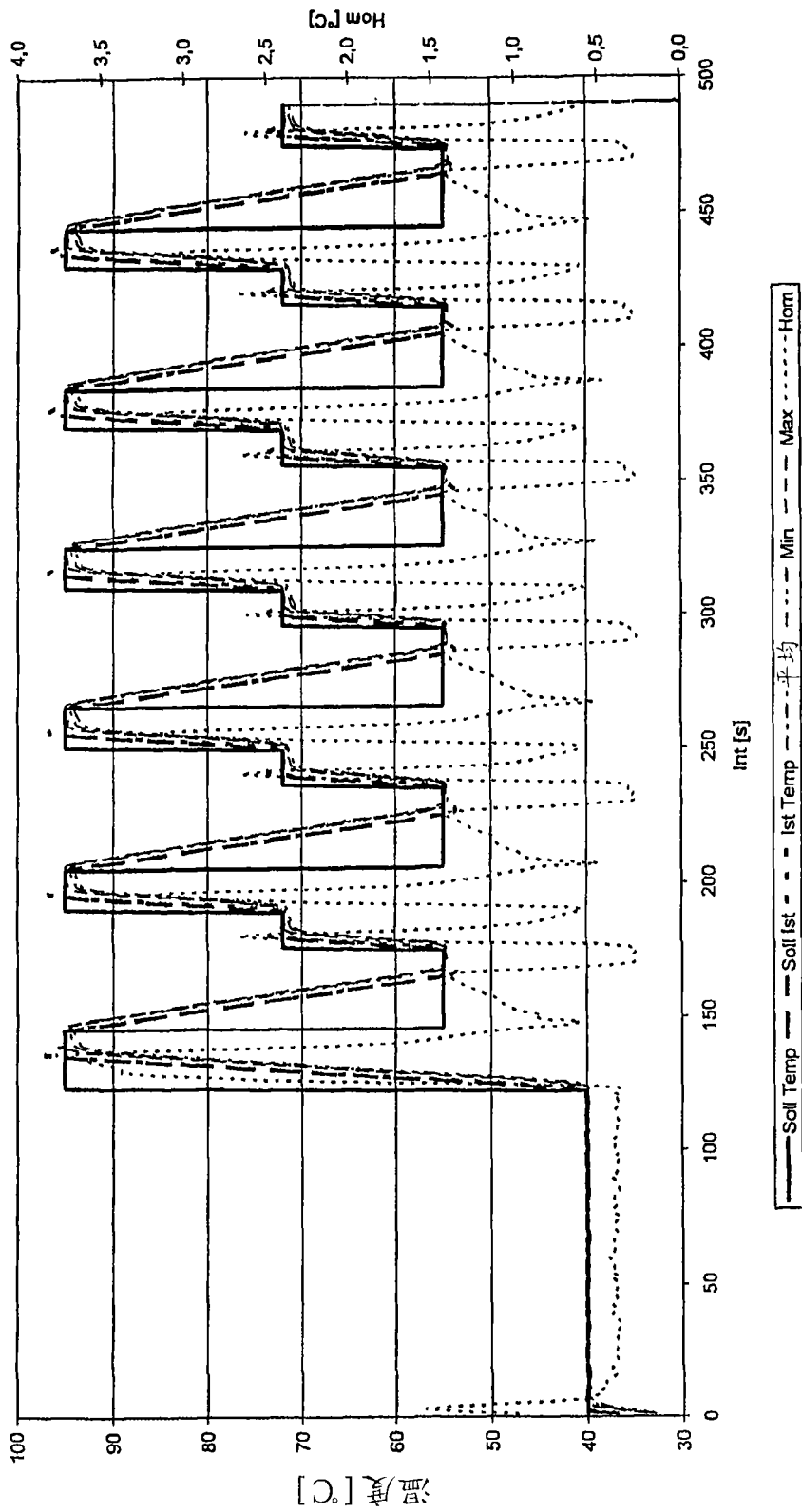


图 4

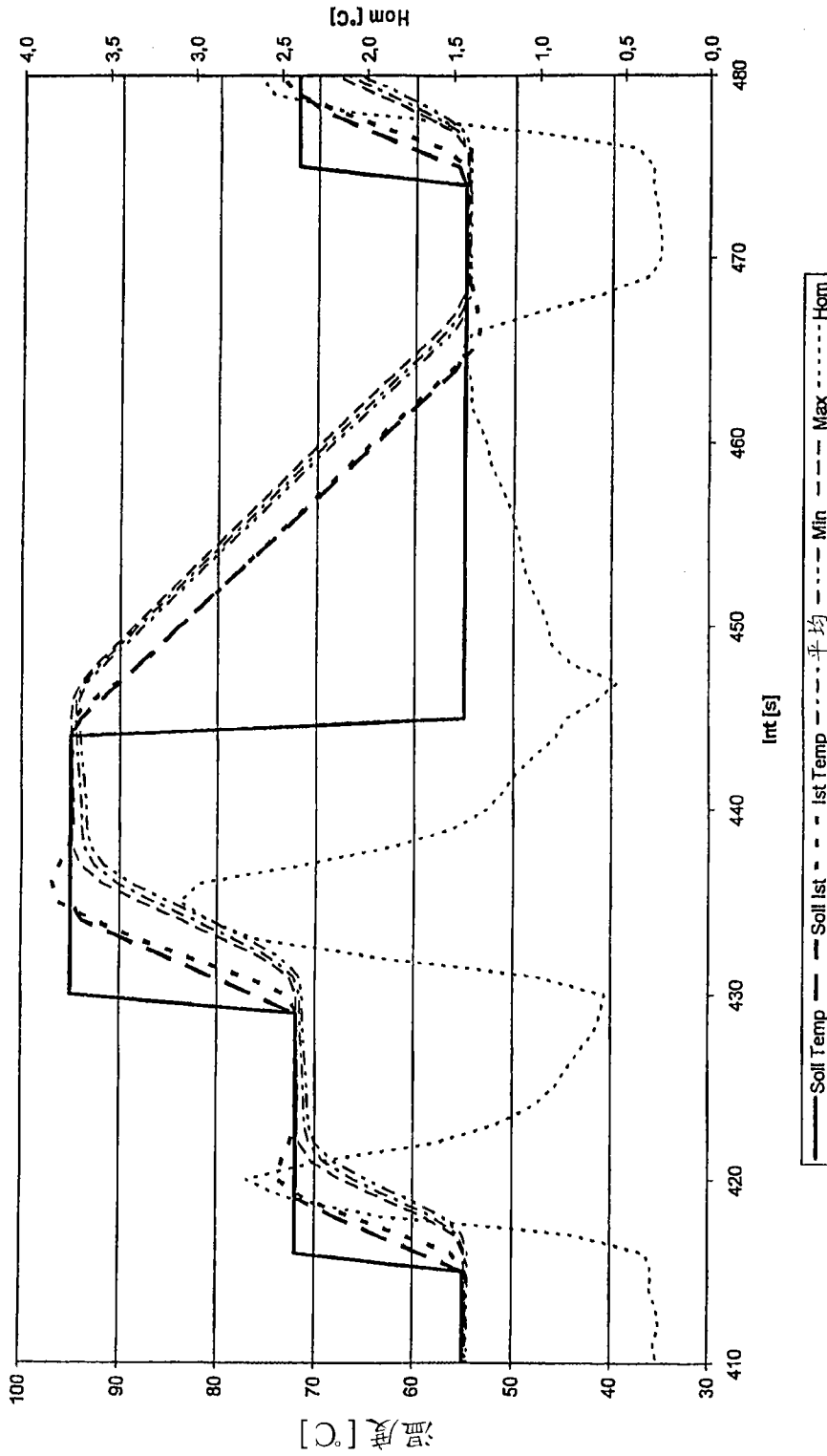


图 5

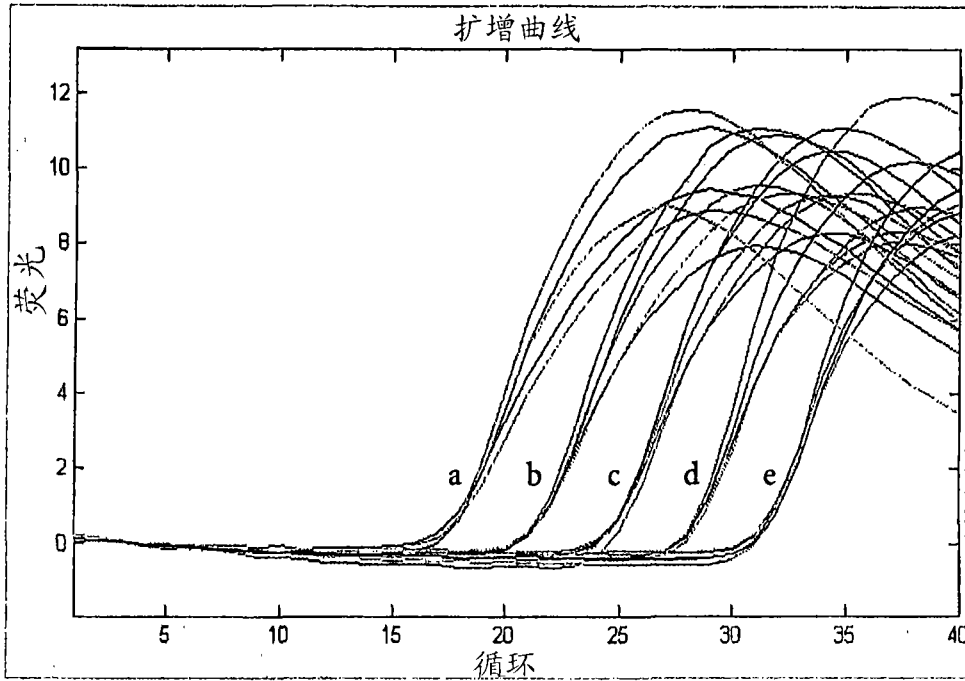


图 6

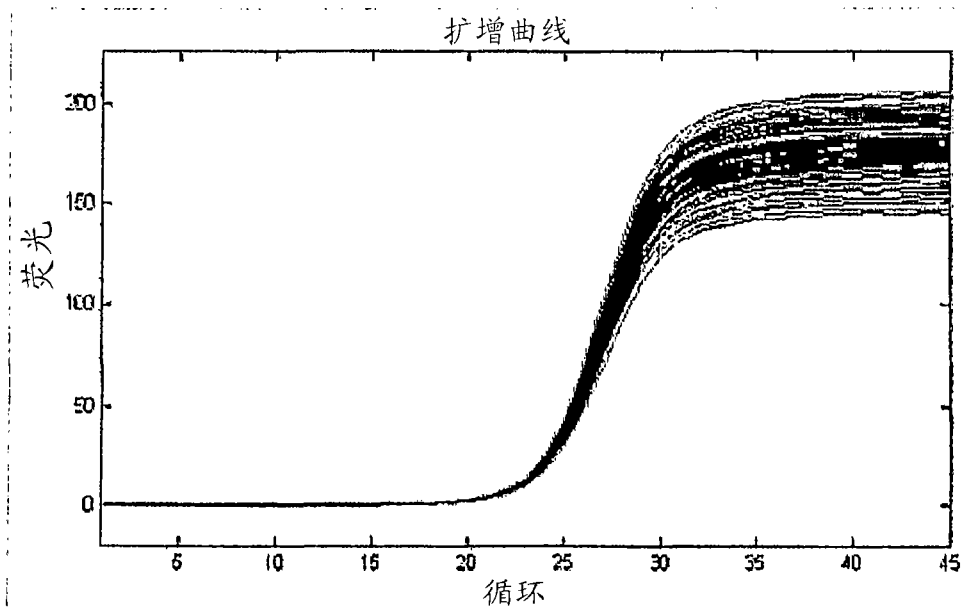


图 7