



(10) **DE 10 2004 050 510 B4** 2012.01.12

(12) **Patentschrift**

(21) Aktenzeichen: **10 2004 050 510.1**
(22) Anmeldetag: **15.10.2004**
(43) Offenlegungstag: **20.04.2006**
(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: **12.01.2012**

(51) Int Cl.: **C12M 1/38** (2006.01)
B01L 7/00 (2006.01)
C12P 19/34 (2006.01)

Innerhalb von drei Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 1 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:
Siemens AG, 80333, München, DE

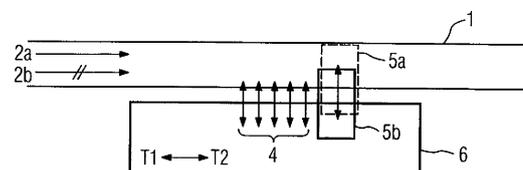
(72) Erfinder:
Gumbrecht, Walter, Dr., 91074, Herzogenaurach, DE; Paulicka, Peter, 91056, Erlangen, DE; Stanzel, Manfred, Dr., 91056, Erlangen, DE

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:

US	2001 / 0 036 672	A1
US	2002 / 0 137 218	A1
US	5 755 942	A
WO	90/ 15 430	A1
WO	2004/ 034 028	A2
WO	2004/ 042 357	A2

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Ventilsteuerung bei der Thermozyklisierung einer Substanz zwecks PCR und zugehörige Anordnung**

(57) Hauptanspruch: Verfahren zur Thermozyklisierung einer Substanz zwecks Durchführung einer PCR,
– wobei eine Probenflüssigkeit in einer PCR-Kammer (120) durch zyklisches Heizen und Kühlen einem vorgegebenen Temperaturverlauf unterzogen wird,
– wobei zunächst eine geeignete Menge der Probenflüssigkeit in die PCR-Kammer (120) gebracht wird,
– wobei nach dem Einbringen der Probenflüssigkeit in die PCR-Kammer (120) steuerbare Ventile (21, 22) die PCR-Kammer (120) automatisiert abschließen,
– wobei zumindest zum Verschließen der Ventile (21, 22) bei Überschreiten einer vorgegebenen Temperatur die thermischen Eigenschaften von Memorymetallen (25) genutzt werden,
– wobei die Memorymetalle (25) Bestandteil mechanischer Aktuatoren (5) sind, die zusätzlich zu den Memorymetallen (25) Federelemente (26, 27) umfassen, dadurch gekennzeichnet,
– dass eine Cartridge (100) verwendet wird, die aus einem planaren, mit Strukturen aus Mikrokanälen bzw. Mikrokavitäten versehenen Kunststoffkörper (101) besteht, in den eine als PCR-Kammer (120) dienende Aussparung eingebracht ist, der als Zufluss und Abfluss Strömungskanäle...



Beschreibung

[0001] Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Ventilsteuerung bei der Thermozyklisierung einer Substanz zwecks PCR gemäß dem Oberbegriff des Anspruchs 1.

[0002] Aus der US 2001/036 672 A1 ist ein Verfahren zur Durchführung einer PCR bekannt, bei dem eine Probenflüssigkeit in einer PCR-Kammer durch zyklisches Heizen und Kühlen einem vorgegebenen Temperaturverlauf unterzogen wird. Zur Durchführung des Verfahrens wird zunächst eine geeignete Menge der Probenflüssigkeit in die PCR-Kammer gebracht. Nach dem Einbringen der Probenflüssigkeit in die PCR-Kammer schließen steuerbare Ventile die PCR-Kammer automatisiert ab. Zumindest zum Verschließen der Ventile bei Überschreiten einer vorgegebenen Temperatur werden die thermischen Eigenschaften von Memorymetallen genutzt. Die Memorymetalle sind Bestandteil mechanischer Aktuatoren, die zusätzlich zu den Memorymetallen Federelemente umfassen.

[0003] Der US 2002/137 218 A1 und der WO 2004/034 028 A1 ist jeweils ein gleichgelagerter Offenbarungsgehalt zu entnehmen.

[0004] Der US 5 755 942 A ist ein ähnlicher Offenbarungsgehalt zu entnehmen. Anstelle von Memorymetallen weisen die Aktuatoren der US 5 755 942 A jedoch Bimetalle auf.

[0005] Aus der WO 90/15 430 A1 ist bekannt, Memorymetalle oder Bimetalle für Ventile zu verwenden, die thermisch beeinflussbar sein sollen. Zur stabilen Zustandsüberführung können unterstützende Federn vorhanden sein.

[0006] Aus der WO 2004/042 357 A2 sind eine Cartridge zur Durchführung einer PCR und der Einsatz von Memorymetallen in den Ventilen der Cartridge bekannt.

[0007] Zur Durchführung der PCR in einem „Lab-on-a-Chip“-System gemäß eigener Anmeldung wird die PCR-Kammer über einen Zuflusskanal gefüllt und über einen Abflusskanal entleert, während der Thermozyklisierung für die PCR werden Temperaturen zwischen 50 und 95°C eingestellt. Dabei steigt aufgrund von Ausgasen gelöster Luft und Wärmeausdehnung des Wassers der Druck in der Kammer an und es kann zu einer Verschiebung der Flüssigkeit und damit zu unkontrollierten Bedingungen während der PCR kommen. Um dies zu vermeiden, müssen sowohl Zufluss als auch Abfluss der PCR-Kammer verschlossen werden.

[0008] Zum Verschließen der PCR-Kammer kann eine bewegliche, elastische Membran bzw. Folie auf

den jeweiligen Kanal, z. B. Zuflusskanal, gepresst werden. Dazu muss eine mechanische Kraft angewendet werden. Vom Stand der Technik sind verschiedene Ventil-Antriebssysteme bekannt.

[0009] Für die Entwicklung eines kostengünstigen, kleinvolumigen Gerätes sind diese bekannten Systeme ungeeignet, da sie eine Erhöhung der Komplexität und somit eine Erhöhung der Kosten und des Gerätevolumens mit sich bringen.

[0010] Aufgabe der Erfindung ist es daher, ein verbessertes Verfahren zur Ventilsteuerung bei der Thermozyklisierung im Rahmen einer PCR anzugeben.

[0011] Die Aufgabe ist erfindungsgemäß durch die Maßnahmen des Patentanspruches 1 gelöst. Eine Weiterbildung des Verfahrens ist Gegenstand des Anspruchs 2.

[0012] Gegenstand der Erfindung ist also eine solche Ventilsteuerung bei der die Thermozyklisierung einer Substanz zwecks PCR, die PCR-Kammer durch steuerbare Ventile automatisiert abschließt. Dabei werden die thermischen Eigenschaften von Metallen dergestalt genutzt, dass sie mit dem Heiz-/Kühl-Aktuator für die PCR in unmittelbarem Kontakt stehen. Zumindest zum Verschließen der Ventile bei Überschreiten einer vorgegebenen Temperatur werden dabei die thermischen Eigenschaften von Metallen dadurch genutzt, dass Memory-Metallelemente eingesetzt werden, die im heißen Zustand die Schließposition der Ventile definieren. Bei Unterschreiten der vorgegebenen Temperatur kommen dagegen Federelemente zum Einsatz, die das Öffnen der Ventile bewirken.

[0013] Insbesondere macht sich die Erfindung die Technik der Memory-Metalle zunutze. Ein spezieller thermischer Aktuator (Heizung/Kühlung) für ein Memory-Metall-getriebenes Ventil, das mit den Zielen der Geräteentwicklung (Kosten, Baugröße) nicht vereinbar wäre, ist erfindungsgemäß nicht mehr notwendig. Es werden nämlich die bereits für die Thermozyklisierung vorhandenen Heiz- und Kühlelemente für die Memory-Metall-Technik genutzt, wobei deren spezifische Anordnung und deren Betrieb wesentlich sind.

[0014] Weitere Einzelheiten und Vorteile der Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden Figurenbeschreibung von Ausführungsbeispielen anhand der Zeichnung in Verbindung mit den Patentansprüchen.

[0015] Es zeigen in schematischer Darstellung:

[0016] [Fig. 1](#) schematisch das Prinzip der Erfindung,

[0017] [Fig. 2](#) und [Fig. 3](#) eine entsprechend aufgebaute Ventilordnung im geöffneten und im geschlossenen Zustand und

[0018] [Fig. 4](#) den zeitlichen Verlauf einer Thermozyklisierungskurve unter Einsatz der erfindungsgemäßen Ventilsteuerung.

[0019] In [Fig. 1](#) ist ein Fluidik-Kanal **1** dargestellt, der Querschnittsdimensionen von 10 µm bis wenige mm hat. Der Fluidik-Kanal **1** steht in thermischem Kontakt **4** mit einem Heiz-/Kühl-Aktuator **6**. Ein mechanischer Aktuator **5** steht als Ventil ebenfalls in Kontakt mit dem Heiz-/Kühl-Aktuator **6**. Der mechanische Aktuator **5** ist z. B. eine Kombination aus Memory-Metall und einem Federelement, was anhand der [Fig. 2](#) und [Fig. 3](#) verdeutlicht wird.

[0020] Der Heiz-/Kühl-Aktuator **6** kann mindestens zwei Temperaturen T_1 und T_2 einstellen. Dabei nimmt der mechanische Aktuator **5** zwei verschiedene Positionen **5a** und **5b** ein, so dass in der Position **5b/2a** der Fluss im Kanal **1** ermöglicht wird und in der Position **5a/2b** der Fluss unterbrochen wird.

[0021] Wenn der mechanische Aktuator **5** so betrieben wird, dass bei Überschreiten einer niedrigen Temperatur, jedoch über Raumtemperatur (z. B. 40°C) das Ventil **5** schließt, dann kann eine Probenflüssigkeit, in der eine PCR-Reaktion ablaufen soll, während des Aufheizens in einem vorbestimmten Volumenelement – siehe die [Fig. 2](#) und [Fig. 3](#) – eingeschlossen werden und während der Thermozyklisierung zwischen 50°C und 95°C in diesem Volumenelement gehalten werden. Nach Abschluss der Thermozyklisierung öffnet beim Abkühlen, d. h. Unterschreiten von 40°C, das Ventil **5** und das PCR-Produkt kann aus der PCR-Kammer **120** herausgepumpt werden.

[0022] In den [Fig. 2](#) und [Fig. 3](#) ist ein Ausschnitt aus dem Thermo-Aktuator-Bereich mit Heizung/Kühlung dargestellt, wie er insbesondere in der parallelen Patentanmeldung der Anmelderin mit gleicher Anmeldepriorität (jetzt DE 10 2004 050 575 B3) im Einzelnen beschrieben ist. Dabei wird eine Cartridge (Karte) **100** in den Aktuatorbereich eingeschoben, um dort eine PCR durchführen zu können.

[0023] Im Einzelnen besteht die Karte als so genannte Cartridge **100** aus einem planaren, mit Strukturen aus Mikrokanälen bzw. Mikrokavitäten versehenen Kunststoffkörper **101**, auf den eine Folie **121** aufgebracht ist. Im planaren Kunststoffkörper **101** ist eine Aussparung als Probenkammer **120** vorhanden. Strömungskanäle **134** und **135** dienen als Zufluss bzw. Abfluss für die Probenflüssigkeit.

[0024] Es sind weiterhin eine Wärmeankopplungsplatte **14**, eine Einrichtung mit Peltierelementen **16** und eine Einheit mit Kühlkörpern **17** angedeutet.

[0025] Auf der anderen Seite der Cartridge **100** befindet sich ebenfalls eine gleiche Anordnung aus Wärmeankopplungsplatte **14**, einer Einrichtung mit Peltierelementen **16** und einer Einheit mit Kühlkörpern **17**, die in den [Fig. 2](#) und [Fig. 3](#) nicht dargestellt ist.

[0026] Wesentlich ist in [Fig. 2](#) und [Fig. 3](#), dass in der Wärmeankopplungsplatte **14** Aussparungen **23**, **24** vorhanden sind, in die z. B. kugelförmige Dichtungselemente **21** und **22** eingreifen können. Die Dichtungselemente **21** und **22** drücken mit ihrem Umfang auf die Folie **121** der Cartridge **100**, wozu im Kunststoffkörper geeignete Aussparungen **136** und **137** vorhanden sind.

[0027] Rückseitig befindet sich zwischen der Wärmeankopplungsplatte **14** und der Einheit mit den Peltierelementen **16** ein Element **25** aus einem Memorymetall, das endseitig jeweils von Federelementen **26** und **27** abgestützt wird.

[0028] Bei dem Aufbau gemäß [Fig. 2/Fig. 3](#) ergibt sich folgende Funktion:

Bei Unterschreiten einer vorgegebenen Temperatur hat das Memorymetall-Element **25** eine Lage gemäß [Fig. 2](#). Es ist insbesondere bei Raumtemperatur leicht verformbar und wird durch die Federelemente **26/27** in der in [Fig. 2](#) dargestellten Form gehalten. Das Memorymetall-Element **25** drückt also nicht auf die Ventilelemente **21** und **22**, was bedeutet, dass beide Ventile **21**, **22** offen sind und Probenflüssigkeit in die Untersuchungskammer **120** einströmen kann.

[0029] Wird nunmehr die Temperatur erhöht, tritt der Memoryeffekt ein, d. h. das Memorymetall-Element **25** kehrt in seine vorprogrammierte, starre Form zurück und überwindet die Federkraft der Federn **26** und **27**. Durch den Druck der Ventilelemente **21** und **22** wird die Folie **121** verformt und die Strömungskanäle **134**, **135** werden abgeschlossen/abgedichtet.

[0030] In [Fig. 4](#) ist der zeitliche Temperaturverlauf bei der PCR dargestellt: Aufgetragen ist auf der Abszisse die Zeit und auf der Ordinate die Temperatur im Bereich zwischen 20°C (Raumtemperatur) und etwa 95°C (obere Grenztemperatur der Thermozyklisierung).

[0031] Im Bereich A wird bei offenen Ventilen **21**, **22** die PCR-Kammer **120** befüllt. Anschließend wird beheizt, wobei bei Überschreiten der Temperatur $T = 45^\circ\text{C}$ der Memory-Effekt des Elementes **25** zum Tragen kommt, so dass z. B. die Ventilkugeln **21**, **22** mit konstanter Kraft die Folie **121** auf den Karten-Grundkörper **101** drücken und somit die Probenkammer **120** dicht abschließen. Ein Flüssigkeitsstrom zwischen Probenkammer **120** und Außenbereich ist nunmehr nicht mehr möglich.

[0032] Im Bereich B kann nunmehr die PCR durchgeführt werden: Dabei wird die Temperatur auf ca. 95°C hochgefahren und variiert periodisch nach einem vorgegebenen Programm entsprechend dem Graphen **41** zwischen diesem Wert und einer unteren Temperatur von ca. 50°C mit einem Zwischenplateauwert von ca. 70°C. Es können n Zyklen durchfahren werden.

[0033] Nach Abschluss der PCR wird im Bereich C abgekühlt und die PCR-Kammer **120** entleert. Das PCR-Produkt kann zur weiteren Analyse in der Cartridge **100** transportiert werden.

[0034] Mit der beschriebenen Ventilanordnung ist also in einfacher Weise ein Öffnen und Verschließen der Probenkammer **120** möglich, wobei das Öffnen jeweils bei Unterschreiten einer unteren Grenztemperatur nach Durchführung der PCR erfolgt. Da diese Ventilanordnung in einfacher Weise in den thermischen Aktuator **6** mit Heizung und Kühlung integrierbar ist, ergibt sich für den spezifischen Anwendungszweck eine einfache Problemlösung.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Thermozyklisierung einer Substanz zwecks Durchführung einer PCR,
 – wobei eine Probenflüssigkeit in einer PCR-Kammer (**120**) durch zyklisches Heizen und Kühlen einem vorgegebenen Temperaturverlauf unterzogen wird,
 – wobei zunächst eine geeignete Menge der Probenflüssigkeit in die PCR-Kammer (**120**) gebracht wird,
 – wobei nach dem Einbringen der Probenflüssigkeit in die PCR-Kammer (**120**) steuerbare Ventile (**21**, **22**) die PCR-Kammer (**120**) automatisiert abschließen,
 – wobei zumindest zum Verschließen der Ventile (**21**, **22**) bei Überschreiten einer vorgegebenen Temperatur die thermischen Eigenschaften von Memorymetallen (**25**) genutzt werden,
 – wobei die Memorymetalle (**25**) Bestandteil mechanischer Aktuatoren (**5**) sind, die zusätzlich zu den Memorymetallen (**25**) Federelemente (**26**, **27**) umfassen,
dadurch gekennzeichnet,
 – dass eine Cartridge (**100**) verwendet wird, die aus einem planaren, mit Strukturen aus Mikrokanälen bzw. Mikrokavitäten versehenen Kunststoffkörper (**101**) besteht, in den eine als PCR-Kammer (**120**) dienende Aussparung eingebracht ist, der als Zufluss und Abfluss Strömungskanäle (**134**, **135**) aufweist und auf den eine Folie (**121**) aufgebracht ist,
 – dass die Cartridge (**100**) in einen Thermo-Aktuator-Bereich eingeschoben wird, der eine Heizung/Kühlung (**6**) und die mechanischen Aktuatoren (**5**) enthält, so dass die PCR-Kammer (**120**) im Bereich der Heizung/Kühlung (**6**) und die Strömungskanäle (**134**, **135**) im Bereich der mechanischen Aktuatoren (**5**) zu liegen kommen,

– dass die PCR-Kammer (**120**) bei geöffneten Strömungskanälen (**134**, **135**) mit einer Probenflüssigkeit gefüllt wird,
 – dass die mit der Probenflüssigkeit gefüllte PCR-Kammer (**120**) aufgeheizt wird,
 – dass durch das Aufheizen der PCR-Kammer (**120**) bei Überschreiten einer vorgegebenen Temperatur die mechanischen Aktuatoren (**5**) betätigt werden und dadurch die Strömungskanäle (**134**, **135**) temperaturgesteuert geschlossen werden, so dass kein Stoffaustausch zwischen der PCR-Kammer (**120**) und der Umgebung erfolgen kann,
 – dass bei geschlossenen Strömungskanälen (**134**, **135**) eine n-fache Thermozyklisierung der PCR-Kammer (**120**) nach vorgegebenem Programm erfolgt und
 – dass beim Abkühlen der PCR-Kammer (**120**) bei Unterschreiten der vorgegebenen Temperatur die mechanischen Aktuatoren (**5**) freigegeben werden und dadurch die Strömungskanäle (**134**, **135**) temperaturgesteuert geöffnet werden, so dass das PCR-Produkt durch den als Abfluss dienenden Strömungskanal (**135**) weitertransportiert werden.

2. verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die vorgegebene Temperatur bei 40°C oder 45°C liegt.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG 1

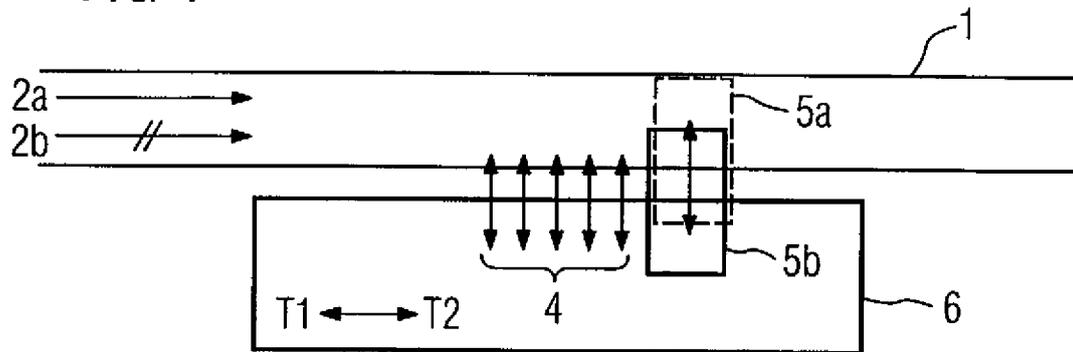


FIG 2

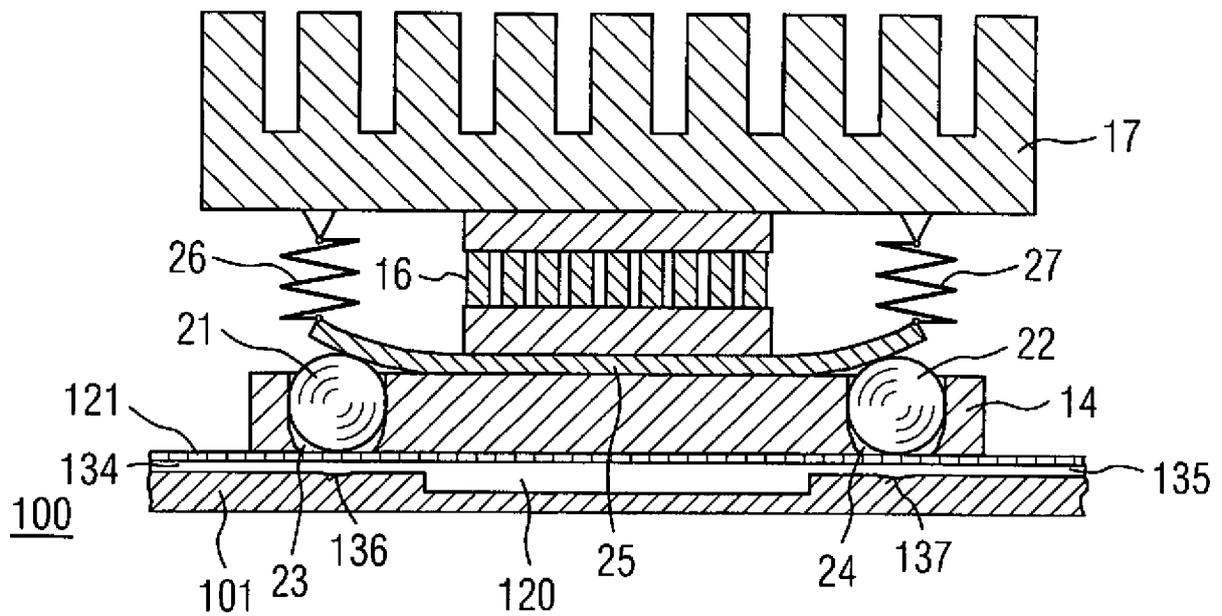


FIG 3

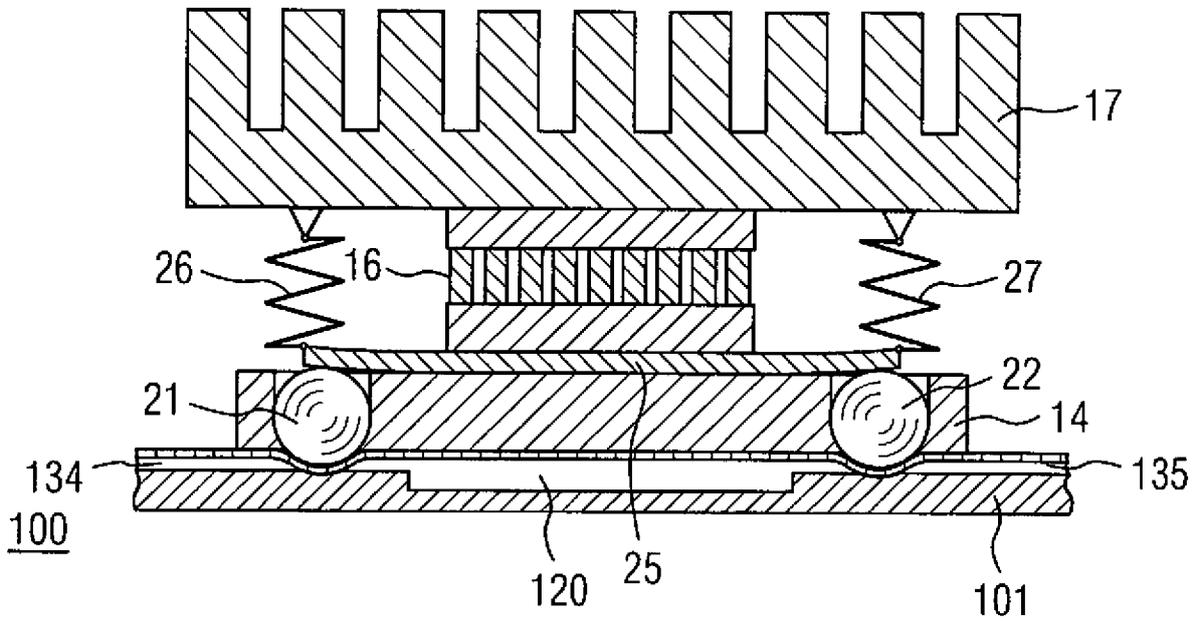


FIG 4

