



(12) **Gebrauchsmusterschrift**

(21) Aktenzeichen: **20 2018 006 869.1**
(22) Anmeldetag: **17.08.2018**
(67) aus Patentanmeldung: **EP 18 18 9498.1**
(47) Eintragungstag: **18.12.2023**
(45) Bekanntmachungstag im Patentblatt: **25.01.2024**

(51) Int Cl.: **C12Q 1/686 (2018.01)**
C12M 1/34 (2006.01)
B81B 1/00 (2006.01)
B81B 7/02 (2006.01)

(73) Name und Wohnsitz des Inhabers:
Roche Diagnostics GmbH, 68305 Mannheim, DE

(74) Name und Wohnsitz des Vertreters:
Simmons & Simmons LLP, 80538 München, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen.

(54) Bezeichnung: **Mikrofluidisches System für die digitale Polymerasekettenreaktion (dPCR) einer biologischen Probe**

(57) Hauptanspruch: Mikrofluidisches System (1; 1') für die digitale Polymerase-Kettenreaktion dPCR einer biologischen Probe, wobei das mikrofluidische System (1; 1') umfasst:

mindestens eine mikrofluidische Vorrichtung (2) mit einem Einlass (23), einem Auslass (24), einem Strömungskanal (25), der zwischen dem Einlass (23) und dem Auslass (24) angeordnet ist und den Einlass (23) mit dem Auslass (24) verbindet, und einer Anordnung von Reaktionsbereichen (26), die mit dem Strömungskanal (25) in Fluidverbindung stehen;

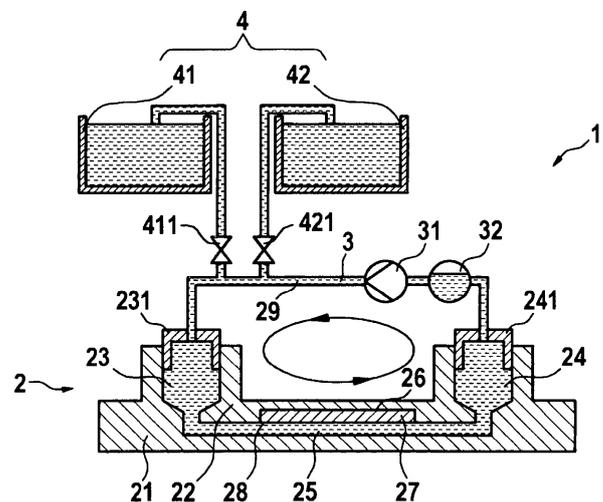
einen Strömungskreislauf (3), der mit der mikrofluidischen Vorrichtung (2) verbindbar ist, um Flüssigkeit durch den Strömungskanal (25) der mikrofluidischen Vorrichtung (2) fließen zu lassen;

eine Probenflüssigkeitsquelle, die mit der mikrofluidischen Vorrichtung (2) verbindbar ist, um den Strömungskanal (25) und damit die Anordnung von Reaktionsbereichen (26) der mikrofluidischen Vorrichtung (2) über den Einlass (23) mit einer Probenflüssigkeit (27) zu versorgen;

eine primäre Trennflüssigkeitsquelle, die mit der mikrofluidischen Vorrichtung (2) verbindbar ist, um den Strömungskanal der mikrofluidischen Vorrichtung (2) über den Einlass (23) mit anfänglicher Trennflüssigkeit (28) zum Versiegeln der Probenflüssigkeit (27) innerhalb der Anordnung von Reaktionsbereichen (26) zu versorgen;

eine sekundäre Trennflüssigkeitsquelle (4), die mit der mikrofluidischen Vorrichtung (2) verbindbar ist, um den Strömungskanal (25) der mikrofluidischen Vorrichtung (2) über den Einlass (23) mit zusätzlicher Trennflüssigkeit (29) zu versorgen,

eine Pumpeinrichtung (31), die mit dem Strömungskreislauf (3) verbunden und geeignet ist, die zusätzliche Trennflüssigkeit (29) durch den Strömungskanal (25) zu pumpen, und eine Steuereinheit in Form einer speicherprogrammierbaren Steuereinheit zum Ausführen eines computerlesbaren Programms mit Anweisungen zur Durchführung von Operationen, die eingerichtet ist, um die Pumpeinrichtung (31) zu steuern, um die zusätzliche Trennflüssigkeit (29) bei Bedarf durch den Strömungskanal (25) zu pumpen, um Gasblasen aus dem Strömungskanal (25) zu spülen.



Beschreibung

TECHNISCHES GEBIET

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich im Allgemeinen auf das technische Gebiet der Probenanalyse, wie z.B. die Untersuchung chemischer oder biochemischer Reaktionen, und insbesondere auf das technische Gebiet der Hochdurchsatzanalyse biologischer Proben. Im Einzelnen betrifft die vorliegende Erfindung ein mikrofluidisches System für die digitale Polymerase-Kettenreaktion (dPCR) einer biologischen Probe. Im Einzelnen umfasst ein solches System eine mikrofluidische Vorrichtung mit einem Strömungskanal, der in Fluidverbindung mit einer Anordnung von Reaktionsbereichen steht, die oft auch als Unterteilungen bezeichnet werden und als Reaktionskammern oder Reaktionsgefäße, beispielsweise in Form von Vertiefungen oder Mikrovertiefungen, umgesetzt sind, die als Reaktionsorte für chemische oder biologische Reaktionen mindestens einer darin bereitgestellten biologischen Probe fungieren, und wobei das System ein gewünschtes Thermocycling-Temperaturprofil in der mikrofluidischen Vorrichtung so schnell und so zuverlässig wie möglich erreichen kann.

HINTERGRUND

[0002] Auf dem Gebiet der Diagnosetechnik für die Untersuchung chemischer oder biochemischer Reaktionen ist es ein Ziel, mehrere verschiedene Untersuchungen an einer oder mehreren Testproben auf derselben - vorzugsweise Einwegmikrofluidischen Vorrichtung durchführen zu können, wodurch Methoden zur unabhängigen Analyse einer oder mehrerer Testproben mit mehreren verschiedenen Reagenzien im Verlauf eines einzigen Analyseprozesses bereitgestellt werden. Als solche Testproben werden in der Regel biologische Proben verwendet, die häufig von medizinischem Personal von Patienten zur Laboranalyse entnommen werden, z.B. zur Bestimmung der Konzentrationen verschiedener Komponenten in den entnommenen Proben. Dementsprechend beziehen sich die Begriffe „Probe“ und „biologische Probe“ auf Material(ien), das/die möglicherweise einen interessierenden Analyten enthält/enthalten, wobei die Probe aus einer beliebigen biologischen Quelle stammen kann, wie z.B. einer physiologischen Flüssigkeit, einschließlich Blut, Speichel, Augenlinsenflüssigkeit, Zerebrospinalflüssigkeit, Schweiß, Urin, Stuhl, Sperma, Milch, Aszitesflüssigkeit, Schleim, Synovialflüssigkeit, Peritonealflüssigkeit, Amnionflüssigkeit, Gewebe, kultivierte Zellen oder dergleichen, wobei die Probe insbesondere im Verdacht steht, ein bestimmtes Antigen oder eine Nukleinsäure zu enthalten.

[0003] Die meisten der bekannten chemischen, biochemischen und/oder biologischen Assays beinhalten

die Immobilisierung einer biologischen Probe, wie oben erwähnt, innerhalb von Reaktionsorten und die Durchführung einer oder mehrerer Reaktionen mit dem immobilisierten Probenmaterial, gefolgt von einem quantitativen und/oder qualitativen Analyseverfahren. Für viele biologische, biochemische, diagnostische oder therapeutische Anwendungen ist es von wesentlicher Bedeutung, die Menge oder Konzentration einer bestimmten Substanz oder Verbindung in der biologischen Probe, d.h. des interessierenden Analyten, genau bestimmen zu können. Um dieses Ziel so genau wie möglich zu erreichen, wurden im Laufe der Jahre in diesem technischen Bereich verschiedene Methoden entwickelt, wie z.B. die weithin bekannte Polymerase-Kettenreaktion (PCR), die die In-vitro-Synthese von Nukleinsäuren in einer biologischen Probe ermöglicht, wodurch ein DNA-Segment spezifisch vervielfältigt werden kann, d.h. eine kostengünstige Möglichkeit, kleine DNA- oder RNA-Segmente in der Probe zu kopieren oder zu amplifizieren. Die Entwicklung solcher Methoden zur Vervielfältigung von DNA- oder RNA-Abschnitten hat enorme Vorteile bei der Genanalyse sowie bei der Diagnose vieler genetischer Krankheiten oder auch beim Nachweis der Viruslast gebracht.

[0004] In der Regel wird thermisches Zyklieren, auch als Thermocycling bezeichnet, verwendet, um die Reaktanten in der Probe innerhalb der Reaktionskammer zu erwärmen und abzukühlen, um solche DNA- oder RNA-Segmente zu amplifizieren, wobei Laborgeräte einschließlich Thermocyclern üblicherweise verwendet werden, um ein automatisches Verfahren für diagnostische Assays auf der Grundlage der PCR zu erreichen, bei dem während einer PCR-Durchführung die flüssigen PCR-Proben wiederholt auf unterschiedliche Temperaturniveaus erwärmt und abgekühlt werden müssen und für eine bestimmte Zeit auf verschiedenen Temperaturplateaus gehalten werden müssen. Bei einem typischen PCR-Verfahren wird beispielsweise eine bestimmte Zielnukleinsäure durch eine Reihe von Wiederholungen eines Zyklus von Schritten amplifiziert, bei denen die in der Reaktionsmischung vorhandenen Nukleinsäuren (a) bei relativ hohen Temperaturen denaturiert werden, beispielsweise bei einer Denaturierungstemperatur von mehr als 90 °C, in der Regel etwa 94 °C bis 95 °C, um die doppelsträngige DNA abzutrennen, dann b) das Reaktionsgemisch auf eine Temperatur abgekühlt wird, bei der kurze Oligonukleotid-Primer an die einzelsträngige Zielnukleinsäure binden, beispielsweise bei einer Hybridisierungstemperatur von etwa 52 °C bis 56 °C zur Primerbindung an die getrennten DNA-Stränge, um Templates bereitzustellen (Annealing bzw. Hybridisierung), und anschließend (c) werden die Primer mit Hilfe eines Polymerase-Enzyms verlängert, z.B. bei einer Verlängerungstemperatur von etwa 72 °C zur Bildung neuer DNA-Stränge, so dass die ursprüngliche Nukleinsäuresequenz repliziert wird.

Wiederholte Zyklen von Denaturierung, Hybridisierung und Elongation, in der Regel etwa 25 bis 30 wiederholte Zyklen, führen zu einem exponentiellen Anstieg der in der Probe vorhandenen Menge an Zielnukleinsäure. Um nun solche Temperaturplateaus während des Thermocyclings genau einhalten zu können, sollte eine gleichmäßige Temperaturverteilung über die Reaktionszone aufrechterhalten werden, so dass alle Reaktionsbereiche gleichmäßig erhitzt und abgekühlt werden können, um eine gleichmäßige Probenausbeute zwischen den Reaktionsbereichen, die die Probe enthalten, zu erhalten. Für die Durchführung einer regulären PCR-Methode können allgemein bekannte Thermocycling-Geräte, wie z.B. Thermocycler / Thermozyklierer, zur Vervielfältigung von DNA-Abschnitten verwendet werden, die im Wesentlichen aus einer Halterung zur Aufnahme der Proben, oft auch als Probentemperaturhalterung bezeichnet, und einer an der Halterung angebrachten Wärmepumpe bestehen, wobei die Wärmepumpe häufig in Form einer Kombination aus einem Peltier-Element, das zur aktiven Erwärmung und Kühlung der Halterung und damit zur aktiven Steuerung der den Proben zugeführten Temperatur dient, und einer entsprechenden Wärmesenke, die mit dem Peltier-Element thermisch gekoppelt ist, um die Wärme abzuführen und beispielsweise in die Umgebung zu leiten, vorgesehen ist.

[0005] Generell besteht die Notwendigkeit, diagnostische Tests immer schneller, kostengünstiger und einfacher durchzuführen und dabei eine hohe Präzision bei gleichzeitiger Steigerung der Effizienz herkömmlicher Laborprozesse zu erreichen. Ein besonderes Beispiel für die genannten Methoden zur Vervielfältigung von DNA- oder RNA-Segmenten, die im Mittelpunkt der vorliegenden Erfindung stehen, ist die digitale Polymerase-Kettenreaktionsmethode, auch als digitale PCR oder dPCR bezeichnet, die eine biotechnologische Weiterentwicklung der oben beschriebenen herkömmlichen PCR-Methode darstellt und zur direkten Quantifizierung und klonierenden Vervielfältigung von Nukleinsäuren, einschließlich DNA, cDNA oder RNA, verwendet werden kann. Dabei liegt der wesentliche Unterschied zwischen dPCR und herkömmlicher PCR im Wesentlichen in der Methode zur Messung der Nukleinsäuremengen, da die herkömmliche PCR eine Reaktion pro Einzelprobe durchführt, während die dPCR eine einzelne Reaktion innerhalb einer Probe durchführt, die in eine große Anzahl von Partitionen aufgeteilt ist, welche in einer entsprechend großen Anzahl von Reaktionsbereichen bereitgestellt werden, wobei die Reaktion in jedem Reaktionsbereich einzeln durchgeführt wird, so dass eine zuverlässigere Erfassung und empfindlichere Messung der Nukleinsäuremengen möglich wird. Dementsprechend wurden erhebliche Anstrengungen unternommen, um eine Miniaturisierung und Integration verschiedener Assay-Vorgänge zu erreichen, um die Anzahl der

parallelen Assays auf einer einzigen Trägervorrichtung zu erhöhen. Als Beispiel für eine solche einzelnen Trägervorrichtung wurden mikrofluidische Vorrichtungen, wie mikrofluidische Chips, entwickelt, die Mikrokanäle und Mikroreaktionsbereiche aufweisen, welche Proben im Mikroliter- oder Nanoliter-Maßstab in Form von strömungsfähiger Probenflüssigkeit, wie z.B. wässriger Probenflüssigkeit, aufnehmen. Reagenzien im Mikrolitermaßstab, die typischerweise im Voraus in ein Array kleiner Vertiefungen, d.h. Mikrovertiefungen oder Nanovertiefungen, die als Reaktionsbereiche auf dem mikrofluidischen Chip vorgesehen sind, gefüllt werden, werden darin platziert, um mit einem Strom von Probenflüssigkeit, der durch einen Strömungskanal fließt, in Kontakt zu treten, wobei jede Art von Assay von den Reagenzien, die in das Array von Reaktionsbereichen geladen werden, sowie von der Konfiguration von Durchflusskanälen und Detektoren abhängt, wobei das Einfüllen von Probenflüssigkeit in den mikrofluidischen Chip durch Pipettieren der Probenflüssigkeit in den Chip erfolgen kann. Diese fortschrittliche Technologie ermöglicht die gleichzeitige Durchführung einer Vielzahl von Tests in einem miniaturisierten Maßstab. Die meisten dieser chemischen, biochemischen und/oder biologischen Assays zielen auf die Immobilisierung biologischer Materialien wie Polypeptide und Nukleinsäuren, Zellen oder Gewebe in den Vertiefungen und die Durchführung einer oder mehrerer Reaktionen mit dem immobilisierten Material ab, gefolgt von einem quantitativen und/oder qualitativen Analyseverfahren, wie z.B. Lumineszenztestmessungen. Zur Veranschaulichung zeigt **Fig. 3A** eine Draufsicht auf ein Beispiel eines bekannten Mikrofluidik-Chips 6 in schematischer Weise, und **Fig. 3B** zeigt den Chip 6 von **Fig. 3A** in einer Querschnittsansicht entlang einer Linie A-A in **Fig. 3A**. Der mikrofluidische Chip 6 besteht aus einer unteren Platte 61 und einer oberen Platte 62, d.h. einem sogenannten zweischichtigen mikrofluidischen Chip, wobei die obere Platte 62 einen Einlass 63 für die Einführung von Flüssigkeit in den Chip und einen Auslass 64 für den Austritt von Flüssigkeit aus dem Chip bereitstellt und die Kombination aus unterer Platte 61, d.h. der unteren Schicht des Chips, und oberer Platte 62, d.h. der oberen Schicht des Chips, bildet dazwischen einen Strömungskanal 65, der den Einlass 63 mit dem Auslass 64 verbindet, wobei eine Anordnung von Mikrovertiefungen 66 in dem Strömungskanal 65 an seiner Oberseite, d.h. an der Innenseite der oberen Platte 62, vorgesehen ist. Hier wird beim Einfüllen einer Probenflüssigkeit durch den Einlass 63 in den Strömungskanal 65 in Richtung des Auslasses 63 die Probenflüssigkeit in jedes Element der Anordnung von Mikrovertiefungen 66 eingefüllt, wenn die Probenflüssigkeit entlang der Anordnung von Mikrovertiefungen strömt.

[0006] Wenn jedoch die Reaktionskammervolumina tatsächlich zu mikrofluidischen Strukturen einer mikrofluidischen Vorrichtung miniaturisiert werden, um die gewünschten kleinen Abmessungen zu erzeugen, nehmen mehrere bereits bekannte Probleme zu, wie z.B. Probleme im Zusammenhang mit dem vergrößerten Verhältnis von Oberfläche zu Volumen oder der unerwünschten Verdampfung von Probenflüssigkeit und insbesondere der unerwünschten Erzeugung von Gasblasen in der Flüssigkeit, die in der mikrofluidischen Vorrichtung bereitgestellt wird oder durch diese strömt. Gasblasen in einer Flüssigkeit innerhalb einer mikrofluidischen Struktur können ein schwerwiegendes Problem darstellen, da Gasblasen, die durch ein mikrofluidisches System zirkulieren, -als Nebenprodukt- nicht nur die mikrofluidische Struktur jeder Art von Sensor, der darin verwendet wird, beschädigen können, sondern vor allem auch die interessierende biologische Probe beschädigen können, da sie eine unerwünschte Vermischung von Proben in benachbarten Mikrovertiefungen verursachen, was zu Kreuzkontaminationen und damit zu erheblichen experimentellen Fehlern und falschen Testergebnissen führt. Gasblasen können beispielsweise zu experimentellen Fehlern an Chromatographiesäulen führen, indem sie die Reaktionskomponenten innerhalb der Reaktionsbereiche austrocknen lassen. Außerdem können Gasblasen die optische Erkennung der Reaktionsbereiche und der darin ablaufenden Reaktionen stark beeinträchtigen, was zu fehlgeschlagenen Assays führen kann. Insbesondere bei der Durchführung der dPCR von Proben in der mikrofluidischen Vorrichtung neigen Gasblasen, wie z.B. Luftblasen, dazu, häufig vorzukommen, aufgrund verschiedener Gründe, wie folgt:

- (a) beim Befüllen der mikrofluidischen Vorrichtung mit Probenflüssigkeit und Trennflüssigkeit können Gasblasen in der mikrofluidischen Vorrichtung eingeschlossen werden;
- (b) während des Thermocyclings können anfänglich eingeschlossene Gasblasen (siehe (a)) aufgrund der Verdampfung der Probenflüssigkeit wachsen; oder
- (c) durch die Verdampfung der Probe können neue Gasblasen entstehen.

[0007] Zur Veranschaulichung der erwähnten Gasblasenbildung und des Gasblasenwachstums ist in den **Fig. 4A** bis **Fig. 4D** ein mikrofluidischer Chip 7 im Querschnitt schematisch dargestellt, wobei der Chip 7 in eine entsprechende, ebenfalls nur schematisch dargestellte Thermocycling-Vorrichtung eingesetzt ist. Der mikrofluidische Chip 7 hat eine ähnliche Struktur wie der mikrofluidische Chip 6 aus **Fig. 3A** & **Fig. 3B**, d.h. mit einer unteren Platte 71 und einer oberen Platte 72, und mit einem Einlass 73, einem Auslass 74 und einem Strömungskanal 75, der den Einlass 73 mit dem Auslass 74 verbindet, wobei in

dem Strömungskanal 75 an seiner Oberseite, d.h. an der Innenseite der oberen Platte 72, eine Anordnung von Reaktionsbereichen 76 in Form von Mikrovertiefungen vorgesehen ist. Dabei ist die Anordnung der Reaktionsbereiche 76 bereits mit Probenflüssigkeit 77 gefüllt und eine Trennflüssigkeit 78 in den Strömungskanal 75 eingebracht worden, die die Probenflüssigkeit 77 innerhalb der Reaktionsbereiche versiegelt und den Strömungskanal 75 vom Einlass 73 bis zum Auslass 74 füllt. Um ein Thermocycling des mikrofluidischen Chips 7 durchführen zu können, ist der Chip 7 in der Thermocycling-Vorrichtung in Form eines sogenannten Plattenzyklizers 8 angeordnet, d.h. eines Thermocyclers oder Thermozyklizers mit einer unteren Heizung 81 und einer oberen Heizung 82, die durch erwärmbare Platten, auch Heizplatten genannt, realisiert sind. In **Fig. 4A** ist der mikrofluidische Chip 7 in einem unbeheizten Zustand der Heizelemente 81, 82 dargestellt, wobei beim Befüllen der mikrofluidischen Vorrichtung 7 mit Probenflüssigkeit 77 und/oder Trennflüssigkeit 78 versehentlich eine Gasblase 91, z.B. eine Luftblase o.ä., in den Strömungskanal 75 unmittelbar unterhalb der Anordnung der Reaktionsbereiche 76 eingebracht wurde.

[0008] Dementsprechend können während des Befüllens „anfängliche“ Gasblasen 91 im Inneren des Chips 7 eingeschlossen werden, z.B. in der in einer Mikrovertiefung bzw. in einem Mikrowell befindlichen Probenflüssigkeit, oder in Abdichtflüssigkeit bzw. Trennflüssigkeit, die sich im Strömungskanal des Chips 7 befindet. Wie in **Fig. 4B** zu sehen ist, in der zumindest der Bodenheizer 81 eingeschaltet wurde, um eine Heiztemperatur von >50 °C zu erreichen, wächst die bereits eingeführte Gasblase 91 aufgrund der Verdampfung der Probenflüssigkeit 77 innerhalb der Anordnung bzw. des Arrays der Reaktionsbereiche 76. Außerdem bildet sich eine neue Gasblase 92 aufgrund der unerwünschten Verdampfung der Probenflüssigkeit 77 innerhalb der Anordnung der Reaktionsbereiche 76. Hier kann die neue Gasblase 92 während der Temperierung in jedem der Reaktionsbereiche entstehen und wachsen und aus diesem in den Strömungskanal 75 austreten. In **Fig. 4C** ist ein fortschreitendes Wachstum der Gasblasen 91, 92 aufgrund einer unerwünschten Verdampfung der Probenflüssigkeit 77 zu erkennen, wobei der Strömungskanal 75 ein Blasenwachstum entlang seiner Erstreckung zeigt, so dass die wachsenden Gasblasen 91, 92 die Trennflüssigkeit 78 allmählich aus dem Strömungskanal 75 und damit aus dem Einlass 73 und dem Auslass 74 herausdrücken, hier durch entsprechende Pfeile dargestellt. Dadurch drängen die wachsenden Gasblasen 91, 92 die Trennflüssigkeit 78 aus den Mikrovertiefungen, was dazu führt, dass die Probenflüssigkeit 77 in den Mikrovertiefungen leichter verdampfen kann. Auch können sich die wachsenden Gasblasen 91, 92 über mehr als eine Mikrovertiefung erstrecken, d.h. die

Blasen 91, 92 können die Trennflüssigkeit 78 von mehreren Mikrovertiefungen wegdrücken und damit diese Mikrovertiefungen insgesamt „freilegen“, so dass der Inhalt einer Mikrovertiefung in eine benachbarte Mikrovertiefung übergehen kann. Bei weiter fortschreitender Erwärmung durch den Thermocycler können die Blasen 91, 92 weiter wachsen und auch zu einer großen Gasblase 93 verschmelzen, siehe **Fig. 4D**, was dazu führt, dass die verschmolzene und weiter wachsende Gasblase 93 die Trennflüssigkeit 78 allmählich weiter aus dem Strömungskanal 75 und damit weiter aus dem Einlass 73 und dem Auslass 74 herausdrängt, was wiederum durch entsprechende Pfeile dargestellt ist. Durch die in den **Fig. 4A** bis **Fig. 4D** dargestellte Entwicklung 4A bis 4D, insbesondere in **Fig. 4D**, ist deutlich zu erkennen, dass die Trennflüssigkeit 78 durch unerwünschte Gasblasenbildung und -wachstum fast vollständig von der Anordnung der Reaktionsbereiche 76 weggedrückt wird, wodurch die Trennwirkung der Trennflüssigkeit 78 aufgehoben wird. Dementsprechend werden die Reaktionskomponenten in der Probenflüssigkeit 77, die sich innerhalb der Anordnung der Reaktionsbereiche 76 befindet, durch die Trennflüssigkeit 78 nicht weiter konserviert und können daher austrocknen. Mit anderen Worten: **Fig. 4A** bis **Fig. 4D** zeigen, dass während des Thermocyclings „anfängliche“ Gasblasen 91 und neu entstehende Gasblasen 92 aufgrund der Verdampfung der innerhalb der Reaktionsbereiche 76 vorgesehenen Probenflüssigkeit 77 wachsen können, wobei das Gasblasenwachstum so lange anhält, bis der Strömungskanal 75 und/oder der in Form der Anordnung der Reaktionsbereiche 76 vorgesehene Messbereich weitgehend entleert ist. Dementsprechend kann es aufgrund der Entfernung der Trennflüssigkeit 78 durch die Gasblasen 91, 92, 93 zu einer Kreuzkontamination zwischen benachbarten Reaktionsbereichen kommen. Außerdem können die Gasblasen 91, 92, 93 die Scherbelastung für das biologische Probenmaterial innerhalb der Reaktionsbereiche 76 erhöhen, da sich die Zellmembranen unter der Kraft der so erzeugten unerwünschten Flüssigkeits-Luft-Grenzfläche dehnen. Darüber hinaus können die Gasblasen, wie bereits erwähnt, ein erhebliches Problem für die optische Erkennung der Reaktionsbereiche und der darin stattfindenden Reaktionen darstellen, was im Wesentlichen zu einem fehlgeschlagenen Assaytest führt, der mit allen Mitteln vermieden werden muss. Daher ist die Beseitigung oder Vermeidung von Gasblasen eine große Herausforderung auf dem vorliegenden technischen Gebiet.

[0009] Bislang gab es verschiedene Ansätze, um das Problem der Gasblasen im Strömungskanal einer mikrofluidischen Vorrichtung zu lösen. Wie beispielsweise in EP 2 830 769 A1 beschrieben, besteht eine Lösung für das Problem der Gasblasen darin, zu verhindern, dass während des Befüllens Gasblasen in die mikrofluidische Vorrichtung gelangen, indem

bestimmte mikrofluidische Strukturen nach einem Einlass vorgesehen werden, wie z.B. die Bereitstellung eines Schlitzes, der entlang einer gesamten Kante eines Substrats ausgebildet ist, durch den Flüssigkeiten von einem Einlassverteiler durch den Schlitz, im Wesentlichen um die gesamte Kante des Substrats herum, und in eine Reaktionskammer bei gleichem Druck und ohne Gasblasen fließen können. Ein wesentlicher Nachteil einer solchen Lösung besteht jedoch darin, dass dann, wenn solche mikrofluidischen Strukturen nicht verhindern, dass Gasblasen in die mikrofluidische Vorrichtung eindringen, die Gasblase in der Reaktionskammer landen und aufgrund der Verdampfung der Probe bei erhöhter Zyklustemperatur wachsen kann, ohne dass eine Möglichkeit besteht, die eingetretene Gasblase zu entfernen. Außerdem kann eine neue Gasblase durch die Verdampfung der Probe bei erhöhten Zyklustemperaturen entstehen, was dazu führt, dass die dPCR-Methode fehlschlägt. Dementsprechend können auch dann, wenn die bekannte Lösung ein Eindringen von bereits vorhandene Gasblasen in die mikrofluidische Vorrichtung mehr oder weniger effektiv verhindern kann, dennoch eintretende Gasblasen oder neu erzeugte Gasblasen während des Thermocyclings nicht gehandhabt werden.

[0010] Eine andere Lösung für das Problem der Gasblasen ist beispielsweise aus der US 2005/0009101 A1 bekannt, in der mikrofluidische Kassetten oder Vorrichtungen beschrieben werden, mit denen eine Reihe von Manipulationen an einer Probe vorgenommen werden können, die letztendlich zum Nachweis oder zur Quantifizierung des Zielanalyten führen, wobei ein Lichtleiter vorgesehen ist, der die Detektion von in Hybridisierungsflüssigkeit oder Waschpuffer gebildeten Blasen ermöglicht, und wobei eine Walze in funktioneller Beziehung zu einer flexiblen Schicht im Sinne einer peristaltischen Interaktion vorgesehen ist, um jegliche detektierten Blasen zu entfernen, wobei ein elastomeres Material der flexiblen Schicht als peristaltisch wirkendes Material verwendet wird. Dementsprechend ist die vorgesehene Lösung auf eine Art des Herausdrückens von Blasen jeglicher Art aus der mikrofluidischen Vorrichtung gerichtet, die jedoch ein elastomeres fluidisches Chipmaterial erfordert. Eine solche Lösung wird jedoch als nicht geeignet für einen dPCR-Chip angesehen, da die Handhabung und Befüllung eines solchen flexiblen Chipmaterials ineffektiv und nur ungenau ist, und die Oberflächenmodifizierbarkeit sowie die optische Qualität eines solchen Materials im Vergleich zu den üblicherweise verwendeten unflexiblen Chipmaterialien schlecht ist.

[0011] Als weitere Lösung für das Problem der Gasblasen im Inneren einer mikrofluidischen Vorrichtung, die durch das Verdampfen der Probenflüssigkeit verursacht werden, kann Druck auf die

mikrofluidische Vorrichtung ausgeübt werden, wie es beispielsweise in der US 2005/0148066 A1 beschrieben ist, bei der eine Vorrichtung zur Durchführung mehrerer gleichzeitiger chemischer und biochemischer Reaktionen in Mikrovolumina in einem Array-Format offenbart wird. Hier wird die Vorrichtung in einem Thermocycler mit einer Rille quer über die Oberfläche thermisch zyklisiert, so dass ein dünner Mikrolochchip in die Rille eingesetzt und thermisch zyklisiert werden kann, wobei ein dünnes wärmeleitendes Silikonkissen verwendet werden kann, um sowohl thermischen Kontakt als auch Druck auf die Oberflächen des Mikrolochchips auszuüben, um die Verdampfung der Proben innerhalb des Arrays und somit die Erzeugung oder das Wachstum von Gasblasen zu verhindern. Ein wesentlicher Nachteil einer solchen Lösung ist die höhere Komplexität der gesamten Instrumentenstruktur sowie die zusätzliche strukturelle Komplexität, die durch die Anwendung von Druck auf den Chip erforderlich ist.

[0012] Daher besteht auf dem technischen Gebiet der dPCR-Tests der allgemeine Bedarf, ein mikrofluidisches System und ein entsprechendes Verfahren für die dPCR einer biologischen Probe bereitzustellen, das eine verbesserte Lösung zur Vermeidung und/oder Entfernung von Gasblasen innerhalb des Strömungskanals aufweist, während die Thermocycling-Effizienz des mikrofluidischen Systems erhalten bleibt oder sogar verbessert wird.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0013] Die Erfinder der vorliegenden Erfindung konnten bestätigen, dass Gasblasen schwerwiegende Probleme im Hinblick auf den erfolgreichen Abschluss des Thermocyclings der Proben verursachen können und somit zu einem erheblichen Versagen des Assays führen können. Es hat sich auch herausgestellt, dass die bisher vorgeschlagenen Lösungen im Hinblick auf die Vermeidung solcher Gasblasen nicht ausreichend oder zufriedenstellend sind. Insbesondere waren die im Stand der Technik bereits vorgeschlagenen Lösungen (siehe oben) entweder zu kostspielig oder nicht ausreichend, um reproduzierbare Testergebnisse zu erzielen. Das Einbringen von Gasblasen in einen Strömungskanal einer mikrofluidischen Vorrichtung sowie die Entstehung neuer Gasblasen und das Gasblasenwachstum während der Temperierung müssen demnach vermieden werden, so dass eine neue und verbesserte Lösung erforderlich wurde. So wurde von den Erfindern eine neue und erfinderische Lösung entwickelt, die im Wesentlichen auf der Idee beruht, bereits vorhandene oder entstehende Gasblasen durch „Spülen“ des mikrofluidischen Chips mit Abtrennflüssigkeit bzw. Abdichtungsflüssigkeit, d.h. mit Trennflüssigkeit, zu entfernen, da Trennflüssigkeit - wenn sie durch den Strömungskanal geströmt wird - jegliche Gasblasen zuverlässig durch den Strö-

mungskanal und aus der Auslassöffnung eines mikrofluidischen Chips spülen kann. Damit löst die vorliegende Erfindung die oben beschriebenen Probleme mit einer vereinfachten und effektiveren Vermeidung und/oder Entfernung von Gasblasen in einem Strömungskanal einer mikrofluidischen Vorrichtung innerhalb eines mikrofluidischen Systems bei gleichzeitiger Verbesserung der Effizienz des Thermocyclings.

[0014] Gemäß einem ersten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein mikrofluidisches System für die dPCR einer biologischen Probe bereitgestellt, das beispielsweise zur Untersuchung einer biologischen Probe, die in Form einer Probenflüssigkeit, wie einer polaren wässrigen Probenlösung, bereitgestellt wird, auf einzelne Reaktionsbereiche eines Arrays von Reaktionsbereichen verwendet wird, wobei das mikrofluidische System mindestens eine mikrofluidische Vorrichtung mit einem Einlass, einem Auslass, einem Strömungskanal, der den Einlass mit dem Auslass verbindet, und einem Array von Reaktionsbereichen in Fluidkommunikation mit dem Strömungskanal umfasst. Dabei kann die mikrofluidische Vorrichtung eine Struktur aufweisen, die aus mindestens einer oberen Schicht und einer unteren Schicht besteht, wobei entweder die obere Schicht oder die untere Schicht die Anordnung von Reaktionsbereichen, den Einlass und den Auslass bereitstellen kann. Der Strömungskanal ist zwischen der oberen Schicht und der unteren Schicht ausgebildet und steht in Fluidverbindung mit dem Array von Reaktionsbereichen, das in Form von Mikrowells oder Nanowells ausgeführt sein kann, wodurch die mikrofluidische Vorrichtung beispielsweise zu einem mikrofluidischen Chip wird. Die Breite des gesamten Strömungskanals, auch als Pfadbreite bezeichnet, kann beispielsweise in einem Bereich zwischen 6 mm und 7 mm liegen, beispielsweise bei 6,4 mm, was in der Regel Platz in der Breite für etwa 60 bis 100 Wells nebeneinander, d.h. in einer Querrichtung des Strömungskanals, bietet. Darüber hinaus kann die Querschnittsfläche einer Öffnung jeder Vertiefung kreisförmig, oval oder polygonal, z.B. sechseckig, geformt sein. Bei einer polygonalen Form der Wellöffnung und insbesondere bei einer sechseckigen Form der Wellöffnung ist es möglich, die Wellöffnungen mit einem geringeren Abstand zueinander anzuordnen, d.h. eine höhere Dichte der Verteilung der Wellöffnungen im Strömungskanal zu erreichen. Dementsprechend kann die Anzahl der Wells bzw. der Vertiefungen in der Anordnung der Vertiefungen der Platte weiter maximiert werden. Darüber hinaus kann die Breite der Wellöffnung, einschließlich eines Zwischenraums zwischen den Wells, $60 \mu\text{m} \leq w \leq 110 \mu\text{m}$ betragen, beispielsweise $62 \mu\text{m}$ (für eine kleine Vertiefung) $\leq w \leq 104 \mu\text{m}$ (für eine große Vertiefung). Ferner umfasst das mikrofluidische System einen Strömungskreislauf, der mit der mikrofluidischen Vorrichtung verbunden werden kann, um Flüssig-

sigkeit durch den Strömungskanal der mikrofluidischen Vorrichtung strömen zu lassen, und eine Probenflüssigkeitsquelle, die mit der mikrofluidischen Vorrichtung verbunden werden kann, um die mikrofluidische Vorrichtung mit einer Probenflüssigkeit zu versorgen, zum Beispiel mittels des Strömungskreislaufs. Als Material für die mikrofluidische Vorrichtung, d.h. für die Vorrichtungsschichten, können Materialien wie z.B. zyklisches Olefin-Copolymer (COC), zyklisches Olefin-Polymer (COP) o.ä. verwendet werden, wobei die Verwendung von COP z.B. aus Kostengründen bevorzugt ist. Weiterhin kann der Strömungskreislauf mittels eines Schlauchsystems, beispielsweise eines flexiblen Schlauchsystems, bestehend aus einem oder mehreren flexiblen Schläuchen, realisiert werden, wobei die Schläuche aus einer Innenschicht aus Ethylen-Propylen-Dien-Monomer (EPDM)-Kautschuk und einer Außenschicht aus Nitril-Butadien (NBR)-Kautschuk hergestellt sein können, möglicherweise auch mit einem synthetischen Netz verstärkt, oder allgemein aus EPDM, NBR, fluoriertem Ethylen-Propylen-Polymer (FEP), Polytetrafluorethylen (PTFE), Polyvinylchlorid (PVC), Polyethersulfon (PES), Fluorelastomer (FKM), Silikon bestehen und zusätzlich mit einem wärmeisolierenden Material ummantelt sein können.

[0015] Darüber hinaus umfasst das mikrofluidische System der vorliegenden Erfindung eine primäre Trennflüssigkeitsquelle, die mit der mikrofluidischen Vorrichtung verbunden werden kann, um die mikrofluidische Vorrichtung mit anfänglicher oder primärer Trennflüssigkeit zum Abdichten der Probenflüssigkeit innerhalb der Anordnung von Reaktionsbereichen zu versorgen, wobei die anfängliche Trennflüssigkeit eine untemperierte Trennflüssigkeit sein kann, d.h. eine nicht erhitzte Trennflüssigkeit, die beispielsweise bei oder in etwa bei Umgebungstemperatur bereitgestellt wird. Darüber hinaus umfasst das mikrofluidische System der vorliegenden Erfindung eine sekundäre Trennflüssigkeitsquelle, die mit der mikrofluidischen Vorrichtung verbunden werden kann, um die mikrofluidische Vorrichtung mit zusätzlicher Trennflüssigkeit zu versorgen, und ein Pumpmittel, das mit dem Strömungskreislauf verbunden ist und die zusätzliche Trennflüssigkeit durch den Strömungskanal pumpen kann. Das Pumpmittel der vorliegenden Erfindung kann beispielsweise eine Peristaltikpumpe, eine Dosierpumpe oder eine Spritzenpumpe sein, oder alternativ - mit zusätzlichen fluidischen Komponenten wie Ventilen oder dergleichen - kann das Pumpmittel der vorliegenden Erfindung eine beliebige andere Art von Pumpe sein, z.B. eine Membranpumpe, eine Taumelkolbenpumpe, eine Mikrozahnradpumpe oder dergleichen. Ferner kann, als Beispiel für die Anschlussfähigkeit zwischen der mikrofluidischen Vorrichtung und den anschließbaren Komponenten des mikrofluidischen Systems der vorliegenden Erfindung, der Einlass und/oder der Auslass der mikrofluidischen Vorrich-

tung in Form eines einzigen Anschlusses, wie z.B. eines kreisförmigen fluiddichten Anschlusses, ausgeführt sein, zum Beispiel in Form eines Luer-Lock-Adapters oder dergleichen, zur Verbindung der mikrofluidischen Vorrichtung mit der Probenflüssigkeitsquelle, zur Verbindung der mikrofluidischen Vorrichtung mit der primären Trennflüssigkeitsquelle oder zur Verbindung der mikrofluidischen Vorrichtung mit der sekundären Trennflüssigkeitsquelle ausgeführt sein.

[0016] Mit der oben beschriebenen Kombination aus Trennflüssigkeitsquelle und Pumpeinrichtung des mikrofluidischen Systems der vorliegenden Erfindung und der Möglichkeit, zusätzliche Trennflüssigkeit durch den Strömungskanal zu pumpen, können bereits im Strömungskanal vorhandene Gasblasen oder jede Art von Gasblasen, die während des Thermocyclings der Probe im Inneren der mikrofluidischen Vorrichtung entstehen, durch Spülen des Strömungskanals mit zusätzlicher Trennflüssigkeit aus der mikrofluidischen Vorrichtung entfernt werden. Dementsprechend kann mit der vorliegenden Erfindung der negative Einfluss von Gasblasen auf die Testergebnisse zumindest reduziert oder ganz vermieden werden, was zu einem deutlich verbesserten mikrofluidischen System führt.

[0017] Mit anderen Worten, die vorliegende Erfindung befasst sich mit dem allgemeinen technischen Gebiet der PCR unter Verwendung einer Well-Platten-basierten Thermocycling-Struktur, wobei der Schwerpunkt auf der Endpunkt-ausgerichteten digitalen PCR liegt. Genauer gesagt ist die Well-Platte in einem mikrofluidischen Chip in Form einer Mikrotiterplatte oder sogar einer Nanowell-Platte mit mehreren tausend Nanowells vorgesehen. Dabei kann es sich um einen Einweg-Mikrofluidik-Chip handeln, bei dem der Strömungskanal in Form eines geschlossenen Füllkanals auf der Seite der Vertiefungsöffnungen vorliegt, der auf der einen Seite mit der makroskopischen Einlassöffnung für die Füllung und auf der anderen Seite mit einer Auslassöffnung für den Überlauf verbunden ist. Der mikrofluidische Einwegchip kann auch mehr als ein Array von Reaktionsbereichen mit einer solchen Mikrotiterplattenstruktur und dementsprechend mehr als einen Füllkanal auf der Seite der Öffnungen enthalten. In der Regel kann der mikrofluidische Chip mit einem sogenannten PCR-Mastermix vorgefüllt werden, der mit dem Zielgemisch in Form der Probenflüssigkeit gemischt wird. Anschließend wird der Strömungskanal an der Seite der Öffnungen der Mikrovertiefungen mit einer Trennflüssigkeit, z.B. einem Abdecköl, gefüllt, um zu verhindern, dass die Probenflüssigkeit in den Mikrovertiefungen während des Thermocyclings verdampft und die Probe von Vertiefung zu Vertiefung wandert. Hier kann das Öl z.B. mit Hilfe von Peristaltikpumpen unter einem Druck von etwa 500 mbar in den Strömungskanal eingefüllt werden. Schließlich

kann das mikrofluidische System der vorliegenden Erfindung mit verschiedenen Sensoren ausgestattet werden, die die Befüllung, die korrekte Platzierung und Ähnliches überprüfen.

[0018] Gemäß einer speziellen Ausführungsform des mikrofluidischen dPCR-Systems der vorliegenden Erfindung bestehen die anfängliche Trennflüssigkeit und die zusätzliche Trennflüssigkeit aus ein und demselben Trennflüssigkeitsmaterial, was bedeutet, dass jede Trennflüssigkeit, die mit dem mikrofluidischen System der vorliegenden Erfindung verwendet wird, derselbe Trennflüssigkeitstyp sein kann. Außerdem muss jede Trennflüssigkeit unmischbar mit der Probenflüssigkeit sein. Als solche unmischbare Flüssigkeit kann eine Öflüssigkeit oder eine Polymerflüssigkeit verwendet werden, z.B. eine Silikonflüssigkeit, wie Polydimethylsiloxan (PDMS), oder eine Mischung aus einer Öflüssigkeit und einer Polymerflüssigkeit. Darüber hinaus können die anfängliche Trennflüssigkeit und die zusätzliche Trennflüssigkeit von unterschiedlichen Trennflüssigkeitsquellen oder alternativ von derselben Trennflüssigkeitsquelle bereitgestellt werden, d.h. die anfängliche Trennflüssigkeitsquelle und die sekundäre Trennflüssigkeitsquelle können durch unterschiedliche Trennflüssigkeitsreservoirs oder alternativ durch ein gemeinsames Trennflüssigkeitsreservoir realisiert werden. Insbesondere für den Fall, dass die Ausgangsperrflüssigkeit und die Zusatzsperrflüssigkeit aus ein und demselben Trennflüssigkeitsmaterial bzw. -typ bestehen, können die primäre Trennflüssigkeitsquelle und die sekundäre Trennflüssigkeitsquelle durch einen gemeinsamen Trennflüssigkeitsbehälter realisiert werden, wobei sich die Begriffe „primär“ und „sekundär“ in diesem Fall lediglich auf die Funktionalität des gemeinsamen Trennflüssigkeitsbehälters beziehen, d.h. der gemeinsame Trennflüssigkeitsbehälter, d.h. der gemeinsame Trennflüssigkeitsbehälter kann als primäre Trennflüssigkeitsquelle für die Bereitstellung der anfänglichen Trennflüssigkeit fungieren, die die Probe innerhalb des Arrays von Reaktionsbereichen der mikrofluidischen Vorrichtung primär versiegelt, und kann dann als sekundäre Trennflüssigkeitsquelle für die Bereitstellung zusätzlicher Trennflüssigkeit zum Ausspülen etwaiger Gasblasen aus dem Strömungskanal der mikrofluidischen Vorrichtung fungieren. Eine solche Konfiguration kann gewählt werden, da die Komplexität der Struktur des mikrofluidischen Systems im Vergleich zur Bereitstellung von zwei verschiedenen Trennflüssigkeitsbehältern reduziert werden kann.

[0019] Gemäß einer weiteren spezifischen Ausführungsform des dPCR-mikrofluidischen Systems der vorliegenden Erfindung kann die Pumpeinrichtung von einer Steuereinheit gesteuert werden, um die zusätzliche Trennflüssigkeit bei Bedarf durch den Strömungskanal zu pumpen, um Gasblasen aus

dem Strömungskanal zu spülen. Dabei kann die Steuereinheit von Hand durch einen Bediener oder automatisch ausgelöst werden, z.B. auf der Grundlage eines Rückmeldesignals von einer zusätzlichen Systemkomponente, die das Auftreten von Gasblasen im Strömungskanal erkennt oder überwacht. Auch kann die Steuereinheit die Pumpeinrichtung anweisen, zusätzliche Trennflüssigkeit nach einem vorgegebenen Muster durch den Strömungskanal zu pumpen, z.B. auf der Grundlage der Thermocycling-Schritte, die auf die Probenflüssigkeit in den Reaktionsbereichen anzuwenden sind. Dabei kann es vorteilhaft sein, dass die Pumpeinrichtung so gesteuert wird, dass sie eine vorbestimmte Menge der zusätzlichen Trennflüssigkeit durch den Strömungskanal pumpt, wobei die Pumpeinrichtung so gesteuert werden kann, dass sie die zusätzliche Trennflüssigkeit entweder ständig, intermittierend oder bei Erkennung von Gasblasen im Strömungskanal durch den Strömungskanal pumpt.

[0020] Gemäß einer weiteren spezifischen Ausführungsform des dPCR-mikrofluidischen Systems der vorliegenden Erfindung kann das mikrofluidische System ferner eine mit dem Strömungskreislauf verbundene Blasenfalle zur Abtrennung von Luft aus der Abdichtflüssigkeit umfassen, wobei die Blasenfalle stromabwärts des Auslasses der mikrofluidischen Vorrichtung angeordnet ist. Dadurch können etwaige Gasblasen, die durch die zusätzlich ausgeströmte Trennflüssigkeit aus dem Strömungskanal der mikrofluidischen Vorrichtung herausgespült werden, aus der im Strömungskreislauf fließenden Trennflüssigkeit entfernt werden. Dementsprechend kann die optionale Blasenfalle im Fluidweg der Trennflüssigkeit, wie er durch den Strömungskreislauf vorgegeben ist, angeordnet werden, um Luftblasen aus der geströmten Trennflüssigkeit abzutrennen. Dadurch können Gasblasen sofort aus dem mikrofluidischen System der vorliegenden Erfindung entfernt werden, ohne dass die aus der mikrofluidischen Vorrichtung austretende Trennflüssigkeit aufgefangen und Gasblasen daraus extrahiert werden müssen.

[0021] Gemäß einer weiteren spezifischen Ausführungsform des dPCR-mikrofluidischen Systems der vorliegenden Erfindung kann die Probenflüssigkeit eine wässrige Lösung sein, die die biologische Probe und die für den dPCR-Assay erforderlichen Reagenzien umfasst, wobei die Probenflüssigkeit zunächst durch den Strömungskanal in die Anordnung der Reaktionsbereiche geströmt werden kann, um jeden Reaktionsbereich mit Probenflüssigkeit zu füllen. Anschließend, d.h. nach der Bereitstellung der Probenflüssigkeit für die Anordnung von Reaktionsbereichen, wird die anfängliche Trennflüssigkeit in den Strömungskanal der mikrofluidischen Vorrichtung geströmt, um die Probenflüssigkeit innerhalb der Reaktionsbereiche zu versiegeln.

[0022] Gemäß einer weiteren spezifischen Ausführungsform des dPCR-mikrofluidischen Systems der vorliegenden Erfindung kann das mikrofluidische System ferner eine Detektionseinrichtung zum Nachweis des Vorhandenseins oder der Erzeugung von Gasblasen in der mikrofluidischen Vorrichtung umfassen, wie z.B. eine optische Abbildungsvorrichtung, beispielsweise eine optische Kamera, die das Vorhandensein oder die Erzeugung von Gasblasen im Inneren des Strömungskanals vor und während des Thermocyclings nachweisen und/oder überwachen kann, sofern der Strömungskanal eine optische Überwachung ermöglicht. Dabei kann z.B. das Innere des Strömungskanals von außen sichtbar gemacht werden, z.B. durch ein Sichtfenster, transparente Wände des Strömungskanals, o.ä.. Dementsprechend kann die Detektionseinrichtung dazu verwendet werden, ein Rückmeldesignal zu liefern, das das Auftreten von Gasblasen im Inneren des Strömungskanals anzeigt, wobei die Steuereinheit auf der Grundlage eines solchen Rückmeldesignals ausgelöst werden kann. Mit einer solchen Struktur kann das mikrofluidische System automatisch arbeiten, ohne dass ein Bediener die mikrofluidische Vorrichtung während des Thermocyclings oder dergleichen überwachen muss.

[0023] Um das Probenmaterial in den Reaktionsbereichen mit einem Thermozyklus-Temperaturprofil zu versehen, kann das mikrofluidische System eine thermische Halterung umfassen, die die mikrofluidische Vorrichtung aufnimmt, um die Anordnung der Reaktionsbereiche mit einem Thermozyklus-Temperaturprofil zu versehen. Beispielsweise kann eine thermische Struktur, wie sie im Zusammenhang mit einer der **Fig. 4A bis Fig. 4D** beschrieben ist, verwendet werden, d.h. ein sogenannter Plattenzyklierer kann die mikrofluidische Vorrichtung des mikrofluidischen Systems der vorliegenden Erfindung aufnehmen. Alternativ kann die Bereitstellung eines Thermocycling-Temperaturprofils für das Array von Reaktionsbereichen mittels einer Heiz- und/oder Kühleinrichtung zum Aufheizen und/oder Abkühlen der Temperatur der zusätzlichen Trennflüssigkeit auf eine gewünschte Thermocycling-Temperaturprofiltemperatur erfolgen. Somit kann das gewünschte Thermocycling-Temperaturprofil des Inhalts der Reaktionsbereiche nicht durch Wärmezufuhr mittels einer externen Wärmequelle in thermischer Verbindung mit der mikrofluidischen Vorrichtung realisiert werden, sondern mittels einer jeweils erwärmten oder gekühlten Trennflüssigkeit, die durch den Strömungskanal der mikrofluidischen Vorrichtung strömt, d.h. eine neue Art der Wärmezufuhr zum Probenmaterial, wobei jegliche Art von Gasblasen im Strömungskanal ausgespült werden kann. Mit einer solchen Lösung kann also nicht nur die Entfernung von Gasblasen, sondern auch die Erwärmung und/oder Abkühlung der biologischen Probe in den Reaktionsbereichen innerhalb der mikrofluidischen Vorrichtung

erreicht werden. Dementsprechend kann auch eine direktere und schnellere Anwendung eines Thermocycling-Temperaturprofils auf die biologischen Proben erreicht werden, wobei die üblicherweise bekannten externen Komponenten, wie z.B. ein oberer Heizer und ein unterer Heizer, weggelassen werden können, wodurch der bekannte Aufbau einer Thermocycling-Vorrichtung vereinfacht wird. Um eine solche Temperatursteuerung aus dem Inneren der mikrofluidischen Vorrichtung anstelle einer externen Wärmezufuhr zu erreichen, gibt es hier mehrere Optionen, die auf Wunsch miteinander kombiniert werden können, darunter die folgenden:

(a) die sekundäre Trennflüssigkeitsquelle ein Reservoir mit nicht beheizter zusätzlicher Trennflüssigkeit umfasst, wobei stromabwärts des Reservoirs eine Durchflusserwärmungseinrichtung vorgesehen ist, um die zusätzliche Trennflüssigkeit bei Bedarf zu erwärmen, d.h. um die durch die Durchflusserwärmungseinrichtung strömende Trennflüssigkeit zu erwärmen, wenn das Temperaturprofil des Thermozyklus dies erfordert, wobei die Durchflusserwärmungseinrichtung in Form einer Temperiereinrichtung, die um einen Teil des vom Trennflüssigkeitsreservoir kommenden Strömungskreislaufs vorgesehen ist, eines angeschlossenen Durchflusserhitzers oder dergleichen ausgeführt sein kann;

(b) die sekundäre Trennflüssigkeitsquelle mindestens ein Reservoir mit erwärmter zusätzlicher Trennflüssigkeit und mindestens ein Reservoir mit nicht erwärmter oder gekühlter zusätzlicher Trennflüssigkeit umfasst, wobei die Reservoirs mittels eines jeweiligen Ventilmechanismus oder dergleichen, wie beispielsweise eines elektronisch gesteuerten Abgabeventils, trennbar mit dem Strömungskreislauf verbunden sein können, oder die Reservoirs mittels eines Mischventils mit dem Strömungskreislauf verbunden sein können, um erwärmte zusätzliche Trennflüssigkeit und nicht erwärmte oder gekühlte zusätzliche Trennflüssigkeit zu mischen, um die gewünschte Temperatur der der mikrofluidischen Vorrichtung zuzuführenden Trennflüssigkeit zu erreichen;

(c) die zusätzliche Trennflüssigkeit ein elektrisch leitfähiges Material, wie z.B. Graphen, umfasst, um die zusätzliche Trennflüssigkeit bei Bedarf durch die Anwendung von Elektrizität auf die zusätzliche Trennflüssigkeit zu erhitzen.

[0024] Bei Verwendung einer der Optionen (a) und (b) oder einer Kombination davon muss die Pumpeinrichtung so angepasst sein, dass sie den gewünschten dPCR-Zyklen folgen kann, d.h. die jeweils temperierte zusätzliche Trennflüssigkeit über das Probenarray und wieder davon weg bringen und eine beliebige Menge an zusätzlicher Trennflüssig-

keit durch den Strömungskanal pumpen, um Gasblasen zu entfernen. Im Falle von Option (c), d.h. wenn die Trennflüssigkeit elektrisch erwärmt wird, sollte es sich um eine elektrisch leitfähige Flüssigkeit handeln, die einen geeigneten Widerstand bietet, so dass sie sich beim Stromfluss erwärmt. Hier eignet sich eine Graphenlösung für eine solche Anwendung. In diesem Fall kann die Trennflüssigkeit jedoch nicht elektrisch abgekühlt werden; stattdessen muss entweder das Reservoir oder der mikrofluidische Chip selbst gekühlt werden, falls die Proben temperatur während der dPCR gesenkt werden muss. Außerdem könnte bei Anwendung der elektrischen Heizlösung ein kreisförmiges Trennflüssigkeitssystem ohne Reservoir verwendet werden, was eine genaue Kontrolle der dPCR-Zyklen erfordern würde, zum Beispiel durch eine umfassende Sensorstruktur, die die Temperaturen und Strömungen in Echtzeit überwacht.

[0025] Gemäß einer weiteren Ausführungsform des dPCR-mikrofluidischen Systems der vorliegenden Erfindung kann das mikrofluidische System zusätzlich eine Druckkammer umfassen, die zumindest die mikrofluidische Vorrichtung umgibt. Hier kann die Funktionalität einer solchen zusätzlichen Druckkammer die bereits erreichte Vermeidung oder Beseitigung von Gasblasen im Inneren des mikrofluidischen Systems der vorliegenden Erfindung ergänzen und damit weiter sicherstellen, dass Gasblasen die Assay-Ergebnisse nicht stören können. Für das Thermocycling selbst kann die mikrofluidische Einwegvorrichtung einschließlich der ölgefüllten Öffnungen daher unter einen Druck von 1 bis 2 bar, beispielsweise etwa 1,5 bar, gesetzt werden, um die Blasenbildung während des Thermocyclings weiter zu unterdrücken. Dabei wird der Druck vorzugsweise auf die Innenseite der mikrofluidischen Vorrichtung aufgebracht, indem die gesamte mikrofluidische Vorrichtung innerhalb der Druckkammer angeordnet wird.

[0026] Gemäß einer weiteren spezifischen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann die erfindungsgemäße Vorrichtung ferner mindestens einen Sensor zur Überwachung der Temperatur der in der mikrofluidischen Vorrichtung aufgenommenen biologischen Proben umfassen, wobei ein solcher Sensor ein Temperatursensor sein kann, beispielsweise in Kombination mit einem Fluidflusssensor. Durch die Bereitstellung eines entsprechenden Sensors an einer der Komponenten des erfindungsgemäßen mikrofluidischen Systems kann die Temperatur der biologischen Proben während der dPCR genau überwacht werden, und die Heiz-/Kühlfunktion des mikrofluidischen Systems kann basierend auf den gemessenen Temperaturwerten der Proben gesteuert werden, um die verschiedenen Temperaturplateaus der dPCR genau und effizient zu regulieren. Dementsprechend ermöglichen derartige Sensoren, z.B. Temperatursensoren, eine präzise Steuerung der

Thermocycling-Temperatur durch einen Steueralgorithmus oder Ähnliches, wobei Temperatursensoren und andere Sensoren zur Steuerung der jeweiligen Heiz-/Kühlrate verwendet werden, wobei die Heiz-/Kühlleistung durch Änderung der Fluidpumpgeschwindigkeit erheblich variiert werden kann.

[0027] Ferner wird hierin ein Verfahren zur dPCR einer biologischen Probe in einem wie oben beschriebenen mikrofluidischen System beschrieben, wobei das Verfahren einen Schritt des Strömens einer Probenflüssigkeit durch den Strömungskanal der mikrofluidischen Vorrichtung, die insbesondere in Form eines mikrofluidischen Chips bereitgestellt wird, und des Füllens der Anordnung von Reaktionsbereichen mit der Probenflüssigkeit in einer aufeinanderfolgenden Weise durch Drücken der Probenflüssigkeit durch den Strömungskanal umfasst, einen anschließenden Schritt des Durchströmens einer anfänglichen Trennflüssigkeit durch den Strömungskanal der mikrofluidischen Vorrichtung, um jeden Reaktionsbereich zu versiegeln, nachdem dieser mit der Probenflüssigkeit gefüllt wurde, und um restliche Probenflüssigkeit aus der mikrofluidischen Vorrichtung herauszudrücken, einen Schritt des Anlegens eines Thermocycling-Temperaturprofils an die Anordnung von Reaktionsbereichen und einen Schritt des Pumpens zusätzlicher Trennflüssigkeit durch den Strömungskanal der mikrofluidischen Vorrichtung, um Gasblasen aus dem Strömungskanal zu spülen. Dabei können der Schritt des Aufbringens eines Temperaturprofils auf die Anordnung von Reaktionsbereichen und der Schritt des Pumpens von zusätzlicher Trennflüssigkeit durch den Strömungskanal der mikrofluidischen Vorrichtung zum Ausspülen von Gasblasen aus dem Strömungskanal in einem kombinierten Schritt erfolgen, d.h. wenn die Beaufschlagung des Arrays von Reaktionsbereichen mit einer Temperatur durch das Pumpen von erwärmter zusätzlicher Trennflüssigkeit durch den Strömungskanal erreicht wird, wobei das Pumpen der zusätzlichen Trennflüssigkeit zu einer Erwärmung der Probenflüssigkeit im Inneren der Reaktionsarrays und gleichzeitig zum Ausspülen von Gasblasen aus dem Strömungskanal führt. Weiter bevorzugt umfasst das beschriebene dPCR-Verfahren auch einen Schritt des Assays der in dem Array von Reaktionsbereichen bereitgestellten biologischen Probe, wodurch das Verfahren zu einem auf dPCR basierenden Analyseverfahren wird.

[0028] Der Schritt des Pumpens zusätzlicher Trennflüssigkeit kann durch den Strömungskanal das Pumpen einer vorbestimmten Menge zusätzlicher Trennflüssigkeit durch den Strömungskanal bei Bedarf umfassen, wobei der Schritt des Pumpens zusätzlicher Trennflüssigkeit durch den Strömungskanal entweder ein Schritt des ständigen Pumpens zusätzlicher Trennflüssigkeit durch den Strömungskanal oder ein Schritt des intermittierenden Pumpens

zusätzlicher Trennflüssigkeit durch den Strömungskanal, beispielsweise nur dann, wenn die Probenflüssigkeit innerhalb der Reaktionsbereiche temperiert werden muss, und/oder ein Schritt des Pumpens zusätzlicher Trennflüssigkeit durch den Strömungskanal bei Erkennung von Gasblasen im Strömungskanal sein kann. Durch die Möglichkeit, bei Bedarf zusätzliche Trennflüssigkeit durch den Strömungskanal zu pumpen, können bereits vorhandene Gasblasen im Strömungskanal oder jegliche Art von Gasblasen, die während des Thermocyclings der Probe im Inneren der mikrofluidischen Vorrichtung entstehen, durch Spülen des Strömungskanals mit zusätzlicher Trennflüssigkeit aus der mikrofluidischen Vorrichtung entfernt werden. Dementsprechend kann mit diesem Verfahren der negative Einfluss von Gasblasen auf die Testergebnisse zumindest reduziert oder ganz vermieden werden, was zu einem deutlich verbesserten Verfahren zur dPCR einer biologischen Probe in dem erfindungsgemäßen mikrofluidischen System führt.

[0029] Das hierin beschriebene Verfahren kann ferner einen Schritt der Überwachung und des Nachweises des Vorhandenseins oder der Erzeugung von Gasblasen in der mikrofluidischen Vorrichtung umfassen, z.B. mit Hilfe der Nachweismittel, z.B. in Form einer optischen Kamera oder dergleichen, die das Vorhandensein oder die Erzeugung von Gasblasen im Inneren des Strömungskanals vor und während des Thermocyclings nachweisen und/oder überwachen kann, vorausgesetzt, dass der Strömungskanal eine optische Überwachung ermöglicht, d.h. das Innere des Strömungskanals ist von außen sichtbar, z.B. mittels eines Sichtfensters, transparenter Wände des Strömungskanals oder dergleichen. Dementsprechend kann die Detektionseinrichtung dazu verwendet werden, ein Rückmeldesignal zu liefern, das das Auftreten von Gasblasen im Inneren des Strömungskanals anzeigt, wobei die Steuereinheit auf der Grundlage eines solchen Rückmeldesignals ausgelöst werden kann, was zu einem rückmeldegesteuerten dPCR-Verfahren führt. Alternativ oder zusätzlich kann das Verfahren einen weiteren Schritt zur Abtrennung von Gasblasen aus der zusätzlichen Trennflüssigkeit umfassen, beispielsweise mit Hilfe der Blasenfalle, die mit dem Strömungskreislauf stromabwärts des Auslasses der mikrofluidischen Vorrichtung verbunden ist. Auf diese Weise kann jede Gasblase, die durch die strömende zusätzliche Trennflüssigkeit aus dem Strömungskanal der mikrofluidischen Vorrichtung herausgespült wird, aus der im Strömungskreislauf fließenden Trennflüssigkeit entfernt werden. Dementsprechend kann der optionale Schritt der Abtrennung von Gasblasen aus der zusätzlichen Trennflüssigkeit mittels der im Fluidpfad der Trennflüssigkeit angeordneten Blasenfalle nützlich sein, um Gasblasen sofort aus dem mikrofluidischen System der vorliegenden Erfindung zu entfernen, ohne die Notwendigkeit, die aus der

mikrofluidischen Vorrichtung austretende Trennflüssigkeit zu sammeln und alle Gasblasen zu einem späteren Zeitpunkt daraus zu extrahieren. Alternativ oder zusätzlich kann das Verfahren auch einen Schritt der Druckbeaufschlagung der mikrofluidischen Vorrichtung umfassen, zum Beispiel mittels einer Druckkammer, die zumindest die mikrofluidische Vorrichtung umgibt. Die Funktionalität eines solchen zusätzlichen Druckaufbringungsschritts kann die bereits erreichte Vermeidungs- oder Entfernungsfähigkeit des dPCR-Verfahrens ergänzen, wodurch weiter sichergestellt wird, dass Gasblasen die Testergebnisse nicht stören. Dabei kann die mikrofluidische Vorrichtung mit einem Druck von 1 bis 2 bar, beispielsweise etwa 1,5 bar, beaufschlagt werden, um die Blasenbildung während des Thermocyclings weiter zu unterdrücken, wobei der Druck auf das Innere der mikrofluidischen Vorrichtung aufgebracht werden kann, entweder durch Druckbeaufschlagung einer Seitenwand des Strömungskanals, die als flexibles druckübertragendes Bauteil wirkt, oder durch Druckbeaufschlagung der gesamten mikrofluidischen Vorrichtung, die in diesem Fall eine gewisse Kompressibilität aufweisen muss.

[0030] Der Schritt der Anwendung eines Thermocycling-Temperaturprofils auf das Array von Reaktionsbereichen kann einen Schritt der Steuerung des Temperaturprofils einer thermischen Halterung, die die mikrofluidische Vorrichtung aufnimmt, umfassen, um ein Thermocycling-Temperaturprofil für das Array von Reaktionsbereichen bereitzustellen, oder - alternativ - einen Schritt der Steuerung einer Heiz- und/oder Kühleinrichtung zum Erhitzen und/oder Kühlen der Temperatur der Trennflüssigkeit auf eine gewünschte Thermocycling-Temperaturprofiletemperatur. Dabei kann der Schritt der Steuerung einer Heiz- und/oder Kühleinrichtung eine der folgenden Optionen umfassen:

- (a) einen Schritt zur Steuerung einer stromabwärts von der sekundären Trennflüssigkeitsquelle vorgesehenen Durchflussheizeinrichtung, um die zusätzliche Trennflüssigkeit bei Bedarf zu erwärmen;
- (b) einen Schritt der Steuerung eines Ventilmechanismus zum Mischen von zusätzlicher Trennflüssigkeit aus mindestens einem Vorratsbehälter mit einer beheizten zusätzlichen Trennflüssigkeit und mindestens einem Vorratsbehälter mit einer nicht beheizten oder gekühlten zusätzlichen Trennflüssigkeit;
- (c) einen Schritt des Anlegens von Elektrizität an die zusätzliche Trennflüssigkeit je nach Bedarf, wobei die zusätzliche Trennflüssigkeit elektrisch leitendes Material, wie Graphen-Material, zur Erwärmung der zusätzlichen Trennflüssigkeit durch die Anwendung von Elektrizität umfasst;

(d) eine Kombination der zuvor genannten optionalen Schritte (a) bis (c).

[0031] Das oben beschriebene mikrofluidische System der vorliegenden Erfindung kann Teil eines automatisierten Verarbeitungssystems sein, wie z.B. eines analytischen, präanalytischen oder postanalytischen Verarbeitungssystems, das üblicherweise in modernen Laboratorien zur automatischen Verarbeitung biologischer Proben eingesetzt wird, das jedes Gerät oder jede Gerätekomponente umfassen kann, welches bzw. welche in der Lage ist/sind, einen oder mehrere Verarbeitungsschritte/Arbeitsschritte an einer oder mehreren biologischen Proben auszuführen, und das analytische Instrumente, präanalytische Instrumente und auch postanalytische Instrumente umfasst. Der Ausdruck „Verarbeitungsschritte“ bezieht sich dabei auf physisch ausgeführte Verarbeitungsschritte, wie z.B. die Durchführung der einzelnen Schritte eines dPCR-Verfahrens. Der Begriff „analytisch“, wie er hier verwendet wird, umfasst jeden Prozessschritt, der von einem oder mehreren Laborgeräten oder operativen Einheiten ausgeführt wird, die zur Durchführung eines analytischen Tests an einer oder mehreren biologischen Proben geeignet sind. Im Kontext der biomedizinischen Forschung ist die analytische Bearbeitung ein technisches Verfahren zur Charakterisierung der Parameter einer biologischen Probe oder eines Analyten. Eine solche Charakterisierung von Parametern umfasst beispielsweise die Bestimmung der Konzentration bestimmter Proteine, Nukleinsäuren, Metaboliten, Ionen oder Moleküle verschiedener Größen in biologischen Proben, die von Menschen oder Labortieren stammen, oder Ähnliches. Die gesammelten Informationen können verwendet werden, um z.B. die Auswirkungen der Verabreichung von Medikamenten auf den Organismus oder auf bestimmte Gewebe zu bewerten. Weitere Analysen können optische, elektrochemische oder andere Parameter der biologischen Proben oder der im Probenmaterial enthaltenen Analyten bestimmen.

[0032] Die oben beschriebenen Verfahrensschritte können von der Steuereinheit des beschriebenen mikrofluidischen Systems gesteuert werden, die auch jede Art von Betätigung oder Überwachung des oben beschriebenen mikrofluidischen Systems und seiner Komponenten steuern kann, wobei der Begriff „Steuereinheit“, wie er hier verwendet wird, jedes physische oder virtuelle Verarbeitungsgerät, wie z.B. eine CPU oder ähnliches, umfasst, das auch ein ganzes Laborinstrument oder sogar eine ganze Arbeitsstation, die ein oder mehrere Laborinstrumente umfasst, so steuern kann, dass Arbeitsabläufe und Arbeitsschritte durchgeführt werden. Die Steuereinheit kann beispielsweise verschiedene Arten von Anwendungssoftware tragen und das automatisierte Verarbeitungssystem oder ein bestimmtes Instrument oder Gerät davon anweisen,

präanalytische, postanalytische und analytische Arbeitsabläufe/Arbeitsschritte durchzuführen. Die Steuereinheit kann von einer Datenverwaltungseinheit Informationen darüber erhalten, welche Schritte mit einer bestimmten Probe durchgeführt werden müssen. Darüber hinaus kann die Steuereinheit in eine Datenverwaltungseinheit integriert sein, aus einem Servercomputer bestehen und/oder Teil eines Instruments sein oder sogar über mehrere Instrumente des automatisierten Verarbeitungssystems verteilt sein. Die Steuereinheit kann beispielsweise als speicherprogrammierbare Steuerung ausgeführt werden, die ein computerlesbares Programm mit Anweisungen zur Durchführung von Operationen ausführt. Um solche Anweisungen von einem Benutzer zu erhalten, kann zusätzlich eine Benutzerschnittstelle vorgesehen werden, wobei der Begriff „Benutzerschnittstelle“, wie er hier verwendet wird, jede geeignete Anwendungssoftware und/oder Hardware für die Interaktion zwischen einem Bediener und einer Maschine umfasst, einschließlich, aber nicht beschränkt auf eine grafische Benutzerschnittstelle, die als Eingabe einen Befehl von einem Bediener empfängt und auch Rückmeldungen und Informationen an diesen übermittelt. Ein System/Gerät kann auch mehrere Benutzerschnittstellen aufweisen, um verschiedene Arten von Benutzern/Bedienern zu bedienen.

[0033] Wie hier und auch in den beigefügten Ansprüchen verwendet, schließen die Singularformen „ein“, „eine“ und „der/die/das“ den Plural ein, sofern der Kontext nicht eindeutig etwas anderes vorschreibt. In ähnlicher Weise sind die Wörter „umfassen“, „enthalten“ und „einschließen“ eher inklusiv als exklusiv zu verstehen, d.h. im Sinne von „einschließlich, aber nicht beschränkt auf“. Ebenso soll das Wort „oder“ „und“ einschließen, sofern aus dem Kontext nicht eindeutig etwas anderes hervorgeht. Die Begriffe „Vielzahl“, „Mehrzahl“ oder „Pluralität“ beziehen sich auf zwei oder mehr, d.h. 2 oder >2, mit ganzzahligen Vielfachen, während sich die Begriffe „Einzahl“ oder „Singularität“ auf einen, d.h. =1, beziehen. Darüber hinaus ist der Begriff „mindestens eine“ als eine oder mehrere, d.h. 1 oder >1, auch mit ganzzahligen Vielfachen, zu verstehen. Dementsprechend schließen Wörter, die den Singular oder Plural verwenden, auch den Plural bzw. Singular ein. Darüber hinaus beziehen sich die Wörter „hierin“, „oben“, „vorher“ und „unten“ sowie Wörter ähnlicher Bedeutung, wenn sie in dieser Anmeldung verwendet werden, auf diese Anmeldung als Ganzes und nicht auf bestimmte Teile der Anmeldung.

[0034] Die Beschreibung spezifischer Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit oder auf eine Beschränkung der Offenbarung auf die angegebene genaue Form. Während die spezifischen Ausführungsformen und Beispiele für die vorliegende Offenbarung hier

zur Veranschaulichung beschrieben werden, sind verschiedene äquivalente Abwandlungen innerhalb des Umfangs der Offenbarung, wie sie in den beigefügten Ansprüchen dargestellt sind, möglich, wie es für einen Fachmann auf dem vorliegenden technischen Gebiet ersichtlich ist. Bestimmte Elemente der vorstehend und später beschriebenen Ausführungsformen können kombiniert oder durch Elemente in anderen Ausführungsformen ersetzt werden. Um Wiederholungen zu vermeiden, sind in den Zeichnungen dieselben Elemente mit denselben Bezugszeichen gekennzeichnet, und Teile, die von einem Fachmann leicht umzusetzen sind, können weggelassen sein. Während die mit bestimmten Ausführungsformen der Offenbarung verbundenen Vorteile im Zusammenhang mit diesen Ausführungsformen beschrieben wurden, können auch andere Ausführungsformen solche Vorteile aufweisen, und nicht alle Ausführungsformen müssen notwendigerweise solche Vorteile aufweisen, um in den durch die beigefügten Ansprüche definierten Umfang der Offenbarung zu fallen.

[0035] Die folgenden Beispiele dienen der Veranschaulichung spezifischer Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung. Die im Folgenden beschriebenen spezifischen Ausführungsformen sind nicht als Einschränkung des Anwendungsbereichs der vorliegenden Erfindung zu verstehen. Dem Fachmann ist ersichtlich, dass verschiedene Abwandlungen, Änderungen und Modifikationen vorgenommen werden können, ohne vom Anwendungsbereich der vorliegenden Erfindung, wie er durch die beigefügten Ansprüche definiert ist, abzuweichen, und es ist daher zu verstehen, dass solche äquivalenten Ausführungsformen hierin enthalten sind. Weitere Aspekte und Vorteile der vorliegenden Erfindung werden aus der folgenden Beschreibung der in den Figuren dargestellten Ausführungsformen ersichtlich.

KURZBESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

Fig. 1 ist eine konzeptionelle Darstellung eines mikrofluidischen Systems für dPCR einer biologischen Probe gemäß einer ersten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung im Querschnitt;

Fig. 2 ist eine konzeptionelle Darstellung eines mikrofluidischen Systems für dPCR einer biologischen Probe gemäß einer zweiten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung im Querschnitt;

Fig. 3A und **Fig. 3B** sind schematische Strukturdarstellungen eines bekannten mikrofluidischen Systems in Draufsicht und Querschnittsansicht; und

Fig. 4A bis **Fig. 4D** zeigen verschiedene Stufen einer dPCR mit schematischen Funktionsdar-

stellungen des Wachstums und der Erzeugung von Gasblasen in einem bekannten mikrofluidischen System.

LISTE DER REFERENZNUMMERN

1	mikrofluidisches System (erste Ausführungsform)
1'	mikrofluidisches System (zweite Ausführungsform)
2	mikrofluidische Vorrichtung
21	untere Platte / untere Schicht der mikrofluidischen Vorrichtung
22	obere Platte / obere Schicht der mikrofluidischen Vorrichtung
23	Einlass der mikrofluidischen Vorrichtung
231	Einlassabdeckung der mikrofluidischen Vorrichtung
24	Auslass der mikrofluidischen Vorrichtung
241	Auslassabdeckung der mikrofluidischen Vorrichtung
25	Strömungskanal der mikrofluidischen Vorrichtung
26	Anordnung/Array an Reaktionsbereichen / Vertiefungen / Wells
27	Probenflüssigkeit (in die Reaktionsbereiche gefüllt)
28	anfängliche Trennflüssigkeit
29	zusätzliche Trennflüssigkeit
3	Strömungskreislauf
31	Pumpe
32	Blasenfalle
4	sekundäre Trennflüssigkeitsquelle
41	temperiertes Reservoir
411	elektronisch gesteuertes Förderventil
42	nicht temperiertes Reservoir
421	elektronisch gesteuertes Förderventil
5	Durchlauferhitzer
6	Mikrofluidik-Chip / mikrofluidischer Chip
61	untere Platte / untere Schicht des mikrofluidischen Chips
62	obere Platte / oberste Schicht des mikrofluidischen Chips
63	Einlass des mikrofluidischen Chips

- 64 Auslass des mikrofluidischen Chips
 65 Strömungskanal des mikrofluidischen Chips
 66 Array von Mikrovertiefungen / Mikrowells
 7 Mikrofluidik-Chip / mikrofluidischer Chip
 71 untere Platte / untere Schicht des mikrofluidischen Chips
 72 obere Platte / oberste Schicht des mikrofluidischen Chips
 73 Einlass des mikrofluidischen Chips
 74 Auslass des mikrofluidischen Chips
 75 Strömungskanal des mikrofluidischen Chips
 76 Anordnung der Reaktionsbereiche / Vertiefungen / Wells
 77 Probenflüssigkeit (in die Reaktionsbereiche gefüllt)
 78 Trennflüssigkeit
 8 Plattenzyklierer
 81 untere Heizung des Plattenzyklers
 82 obere Heizung des Plattenzyklers
 91 anfängliche Gasblase
 92 neu entstehende Gasblase
 93 verschmolzene Gasblase

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG

[0036] Fig. 1 zeigt ein mikrofluidisches System 1 zur dPCR einer biologischen Probe gemäß einer ersten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung in einer schematischen Darstellung, wobei die Hauptkomponenten entweder im illustrativen Querschnitt oder als Piktogramm dargestellt sind. Das in Fig. 1 dargestellte mikrofluidische System 1 umfasst eine mikrofluidische Vorrichtung 2 in Form eines mikrofluidischen Chips, wobei die Vorrichtung 2 einen ähnlichen Aufbau wie der in Fig. 3B dargestellte Chip 7 aus dem Stand der Technik aufweist, wobei die Vorrichtung 2 im Wesentlichen aus einer unteren Platte 21 und einer oberen Platte 22 besteht und einen Einlass 23, einen Auslass 24 und einen Strömungskanal 25 aufweist, welcher den Einlass 23 mit dem Auslass 24 verbindet. Des Weiteren ist im Strömungskanal 25 an seiner Oberseite, d.h. an der Innenseite der oberen Platte 22, eine Anordnung von Reaktionsbereichen 26 in Form von Mikrowells oder Nanowells vorgesehen, um die Reaktionen in den Reaktionsbereichen 26 von oben überwachen zu können. Darüber hinaus ist die mikrofluidische Vorrichtung 2 im gezeigten Zustand bereits mit Pro-

benflüssigkeit 27 gespült worden, die in die Anordnung der Reaktionsbereiche 26 eingefüllt wird, d.h. die in jede einzelne Mikrovertiefung der Anordnung der Reaktionsbereiche 26 eingefüllt werden soll. Ein solches Einfüllen der Probenflüssigkeit 27 in das Array von Reaktionsbereichen 26 kann an einer Füllstation (nicht dargestellt) vorgenommen werden, bevor die mikrofluidische Vorrichtung 2 innerhalb des mikrofluidischen Systems 1 angeordnet wird, wobei die (nicht dargestellte) Füllstation als Teil des mikrofluidischen Systems 1 betrachtet wird, das für die Einführung der Probenflüssigkeit 27 in das Array von Reaktionsbereichen 26 verwendet wird. Auch ist die anfängliche Trennflüssigkeit 28 bereits in die mikrofluidische Vorrichtung 2 eingefüllt worden, die die Probenflüssigkeit 27 innerhalb der Anordnung von Reaktionsbereichen 26 versiegelt, wobei das Einfüllen der anfänglichen Trennflüssigkeit 28 in den Strömungskanal 25, um die Anordnung von Reaktionsbereichen 26 zu versiegeln, auch an der (nicht dargestellten) Füllstation vorgenommen werden kann, bevor die mikrofluidische Vorrichtung 2 innerhalb des mikrofluidischen Systems 1 angeordnet wird. Alternativ kann das Einfüllen der anfänglichen Trennflüssigkeit 28 in den Strömungskanal 25 zum Verschließen des Arrays an Reaktionsbereichen 26 auch mittels des mikrofluidischen Systems 1 selbst erfolgen, und zwar mittels der zusätzlichen Trennflüssigkeit 29, wobei der Teil der zusätzlichen Trennflüssigkeit 29, der die Probenflüssigkeit 29 innerhalb des Arrays an Reaktionsbereichen 26 tatsächlich verschließt, als „anfängliche“ Trennflüssigkeit 28 zu verstehen ist. Da hier die Füllstation an die mikrofluidische Vorrichtung 2 anschließbar ist, um die mikrofluidische Vorrichtung 2 mit Probenflüssigkeit 27 zu versorgen, kann die (nicht dargestellte) Füllstation als Probenflüssigkeitsquelle sowie als primäre Trennflüssigkeitsquelle betrachtet werden, als anschließbarer kombinierter Funktionsteil des mikrofluidischen Systems 1.

[0037] Das mikrofluidische System 1 umfasst ferner einen Strömungskreislauf 3, der mit der mikrofluidischen Vorrichtung 2 verbunden ist, wobei der Strömungskreislauf 3 dazu dient, zusätzliche Trennflüssigkeit 29 durch den Strömungskanal 25 der mikrofluidischen Vorrichtung 2 zu leiten, und zwar hauptsächlich dazu, die zusätzliche Trennflüssigkeit 29 durch den Strömungskanal 25 der mikrofluidischen Vorrichtung 2 zu leiten. Der Fluss der zusätzlichen Trennflüssigkeit 29 ist hier durch einen gegen den Uhrzeigersinn drehenden Pfeilkreis dargestellt. Die zusätzliche Trennflüssigkeit 29 stammt im Wesentlichen aus einer sekundären Trennflüssigkeitsquelle 4, die aus einem temperierten Reservoir 41 mit erwärmter zusätzlicher Trennflüssigkeit 29 und einem nicht temperierten Reservoir 42 mit nicht erwärmter oder gekühlter zusätzlicher Trennflüssigkeit 29 besteht, wobei die Reservoirs 41, 42 jeweils über ein elektronisch gesteuertes Abgabeventil 411,

421 mit dem Strömungskreislauf 3 verbunden sind. So kann durch Steuerung des Förderventils 411 erwärmte zusätzliche Trennflüssigkeit 29 in den Strömungskreislauf 3 und durch Steuerung des Förderventils 421 nicht erwärmte zusätzliche Trennflüssigkeit 29 in den Strömungskreislauf 3 eingeleitet werden, was zu einem gewünschten Temperaturprofil der zusätzlichen Trennflüssigkeit 29 im Strömungskreislauf 3 führt. Alternativ können sich das temperierte Reservoir 41 und das nicht temperierte Reservoir 42 ein gemeinsames Mischventil teilen, das dann im Sinne eines Mischhahns mit dem Strömungskreislauf 3 verbunden ist, so dass bereits vorgemischte und damit entsprechend temperierte zusätzliche Trennflüssigkeit 29 in den Strömungskreislauf 3 eingeleitet und der mikrofluidischen Vorrichtung 2 zugeführt wird.

[0038] Um nun die zusätzliche Trennflüssigkeit 29 dem Strömungskanal 25 zuzuführen, ist eine Peristaltikpumpe 31, die als Pumpeinrichtung des mikrofluidischen Systems 1 fungiert, als Teil des Strömungskreislaufs 3 vorgesehen, um die zusätzliche Trennflüssigkeit 29 durch ihren Einlass 23 durch den Strömungskanal 25 und aus dem Auslass 24 zur mikrofluidischen Vorrichtung 2 zu pumpen. Dadurch wird nicht nur die Anordnung der Reaktionsbereiche 26 mit Wärme oder Kälte versorgt, um die Proben innerhalb der Anordnung der Reaktionsbereiche 26 zu thermozyklieren, sondern es wird auch erreicht, dass Gasblasen, falls diese innerhalb des Strömungskanals 25 auftreten, aus dem Strömungskanal 25 und dem Auslass 24, d.h. aus der mikrofluidischen Vorrichtung 2 herausgespült werden. Dabei kann die Pumpe 31 die zusätzliche Trennflüssigkeit 29 ständig durch den Strömungskanal 25 pumpen, oder sie kann die zusätzliche Trennflüssigkeit 29 intermittierend durch den Strömungskanal 25 pumpen, zum Beispiel nur dann, wenn die Probenflüssigkeit 27 innerhalb der Anordnung von Reaktionsbereichen 26 temperiert werden muss. Durch die Möglichkeit, bei Bedarf zusätzliche Trennflüssigkeit 29 durch den Strömungskanal 25 zu pumpen, können also bereits vorhandene Gasblasen innerhalb des Strömungskanals 25 oder jegliche Art von Gasblasen, die beim Thermocycling der Probenflüssigkeit 27 entstehen, durch Spülen des Strömungskanals 25 mit zusätzlicher Trennflüssigkeit 29 aus der mikrofluidischen Vorrichtung 2 entfernt werden. Um etwaige Gasblasen endgültig aus dem gesamten Strömungssystem entfernen zu können, umfasst das mikrofluidische System 1 ferner eine stromabwärts des Auslasses 24 der mikrofluidischen Vorrichtung 2 und in der vorliegenden Ausführungsform vor der Pumpe 31 angeordnete Blasenfalle 32, mit der etwaige Gasblasen aus der geströmten zusätzlichen Trennflüssigkeit 29 abgeschieden werden. Auf diese Weise können eventuelle Gasblasen sofort aus dem mikrofluidischen System 1 entfernt werden. Somit kann ein negativer Einfluss von Gasblasen auf die

Testergebnisse zumindest reduziert oder ganz vermieden werden.

[0039] In **Fig. 2** ist eine zweite Ausführungsform einer mikrofluidischen Vorrichtung 1' der vorliegenden Erfindung dargestellt, die im Wesentlichen aus einer ähnlichen Struktur besteht, wie sie in Bezug auf die erste Ausführungsform in **Fig. 1** beschrieben ist. Hier bezeichnen gleiche Bezugszeichen gleiche Elemente, und die jeweilige diesbezügliche Beschreibung wird weggelassen, um Wiederholungen zu vermeiden. Im Gegensatz zur ersten Ausführungsform umfasst die mikrofluidische Vorrichtung 1' jedoch nur das nicht temperierte Reservoir 42, das eine nicht beheizte zusätzliche Trennflüssigkeit 29 enthält, wobei stromabwärts des Reservoirs 42 ein Durchflusserhitzer 5 vorgesehen ist, um das nicht temperierte Reservoir 42 gemäß einem gewünschten Thermocycling-Temperaturprofil zu temperieren, das auf die Proben innerhalb der Anordnung von Reaktionsbereichen 26 anzuwenden ist. Auch hier ist das Reservoir 42 über ein entsprechendes elektronisch gesteuertes Förderventil 421 mit dem Strömungskreislauf 3 verbunden, wobei durch die Steuerung des Förderventils 421 eine entsprechend temperierte zusätzliche Trennflüssigkeit 29 in den Strömungskreislauf 3 eingeleitet und von der Pumpe 31 in die mikrofluidische Vorrichtung 2 gepumpt werden kann, um nicht nur das gewünschte Thermocycling-Temperaturprofil auf die Proben innerhalb des Arrays von Reaktionsbereichen 26 aufzubringen, sondern vor allem auch, um eventuell im Strömungskanal 25 auftretende Gasblasen auszuspülen.

[0040] Gemäß einer alternativen Ausführungsform kann die Struktur der zuvor beschriebenen Ausführungsform, wie sie in **Fig. 2** gezeigt ist, jedoch ohne den Durchflusserhitzer 5, auf einen Plattenzyklierer 8 angewendet werden, wie er bekannt ist und in Verbindung mit einer der **Fig. 4A** bis **Fig. 4D** beschrieben, wobei der Plattenzyklierer 8 die darin vorgesehene mikrofluidische Vorrichtung 2 aufweist. Auf diese Weise kann der Plattenzyklierer 8 der Probenflüssigkeit 27 in der Anordnung der Reaktionsbereiche 26 ein gewünschtes Thermocycling-Temperaturprofil verleihen, und das Pumpen der nicht beheizten zusätzlichen Trennflüssigkeit 29 wird nur zur Entfernung von Gasblasen im Strömungskanal 25, falls vorhanden, verwendet. Darüber hinaus kann gemäß einer anderen alternativen Ausführungsform der Aufbau der in **Fig. 2** gezeigten Ausführungsform ohne einen Durchflusserhitzer 5 oder ohne einen Plattenzyklierer 8 angewendet werden, wobei jedoch die zusätzliche Trennflüssigkeit 29 elektrisch leitendes Graphenmaterial umfasst, um die zusätzliche Trennflüssigkeit 29 durch die Anwendung von Elektrizität auf die zusätzliche Trennflüssigkeit 29 bei Bedarf zu erhitzen, wodurch eine Erhitzung der zusätzlichen Trennflüssigkeit 29 erreicht wird, um in

der Lage zu sein, ein gewünschtes thermozyklisches Temperaturprofil auf das Probenmaterial innerhalb der Anordnung von Reaktionsbereichen 26 anzuwenden, ohne dass irgendeine Art von externem Heizer oder beheiztem Reservoir erforderlich ist.

[0041] Obwohl die vorliegende Erfindung in Bezug auf ihre spezifischen Ausführungsformen beschrieben wurde, dient diese Beschreibung nur der Veranschaulichung. Dementsprechend wird die Erfindung nur durch den Umfang der beigefügten Ansprüche begrenzt.

ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

Zitierte Patentliteratur

- EP 2830769 A1 [0009]
- US 20050009101 A1 [0010]
- US 20050148066 A1 [0011]

Schutzansprüche

1. Mikrofluidisches System (1; 1') für die digitale Polymerase-Kettenreaktion dPCR einer biologischen Probe, wobei das mikrofluidische System (1; 1') umfasst:

mindestens eine mikrofluidische Vorrichtung (2) mit einem Einlass (23), einem Auslass (24), einem Strömungskanal (25), der zwischen dem Einlass (23) und dem Auslass (24) angeordnet ist und den Einlass (23) mit dem Auslass (24) verbindet, und einer Anordnung von Reaktionsbereichen (26), die mit dem Strömungskanal (25) in Fluidverbindung stehen;

einen Strömungskreislauf (3), der mit der mikrofluidischen Vorrichtung (2) verbindbar ist, um Flüssigkeit durch den Strömungskanal (25) der mikrofluidischen Vorrichtung (2) fließen zu lassen;

eine Probenflüssigkeitsquelle, die mit der mikrofluidischen Vorrichtung (2) verbindbar ist, um den Strömungskanal (25) und damit die Anordnung von Reaktionsbereichen (26) der mikrofluidischen Vorrichtung (2) über den Einlass (23) mit einer Probenflüssigkeit (27) zu versorgen;

eine primäre Trennflüssigkeitsquelle, die mit der mikrofluidischen Vorrichtung (2) verbindbar ist, um den Strömungskanal der mikrofluidischen Vorrichtung (2) über den Einlass (23) mit anfänglicher Trennflüssigkeit (28) zum Versiegeln der Probenflüssigkeit (27) innerhalb der Anordnung von Reaktionsbereichen (26) zu versorgen;

eine sekundäre Trennflüssigkeitsquelle (4), die mit der mikrofluidischen Vorrichtung (2) verbindbar ist, um den Strömungskanal (25) der mikrofluidischen Vorrichtung (2) über den Einlass (23) mit zusätzlicher Trennflüssigkeit (29) zu versorgen,

eine Pumpeinrichtung (31), die mit dem Strömungskreislauf (3) verbunden und geeignet ist, die zusätzliche Trennflüssigkeit (29) durch den Strömungskanal (25) zu pumpen, und

eine Steuereinrichtung in Form einer speicherprogrammierbaren Steuereinheit zum Ausführen eines computerlesbaren Programms mit Anweisungen zur Durchführung von Operationen, die eingerichtet ist, um die Pumpeinrichtung (31) zu steuern, um die zusätzliche Trennflüssigkeit (29) bei Bedarf durch den Strömungskanal (25) zu pumpen, um Gasblasen aus dem Strömungskanal (25) zu spülen.

2. Mikrofluidisches System (1; 1') nach Schutzanspruch 1, wobei die Probenflüssigkeit (27) eine wässrige Lösung ist, die die biologische Probe und die für den dPCR-Assay erforderlichen Reagenzien umfasst, und wobei jede Trennflüssigkeit (28, 29) eine mit der Probenflüssigkeit (27) nicht mischbare Flüssigkeit ist.

3. Mikrofluidisches System (1; 1') nach Schutzanspruch 2, wobei jede Trennflüssigkeit (28, 29) ent-

weder Öl oder eine Polymerflüssigkeit, wie eine Silikonflüssigkeit, oder ein Gemisch davon ist.

4. Mikrofluidisches System (1; 1') nach Schutzanspruch 3, wobei die anfängliche Trennflüssigkeit (28) und die zusätzliche Trennflüssigkeit (29) aus demselben Trennflüssigkeitsmaterial bestehen.

5. Mikrofluidisches System (1; 1') nach einem der vorhergehenden Schutzansprüche, wobei die primäre Trennflüssigkeitsquelle und die sekundäre Trennflüssigkeitsquelle (4) durch unterschiedliche Trennflüssigkeitsreservoirs oder durch ein gemeinsames Trennflüssigkeitsreservoir realisiert sind.

6. Mikrofluidisches System (1; 1') nach Schutzanspruch 5, wobei die initiale Trennflüssigkeit (28) eine untemperierte Trennflüssigkeit ist.

7. Mikrofluidisches System (1; 1') nach Schutzanspruch 1, wobei die Pumpeinrichtung (31) so gesteuert wird, dass sie eine vorbestimmte Menge der zusätzlichen Trennflüssigkeit (29) durch den Strömungskanal (25) pumpt.

8. Mikrofluidisches System (1; 1') nach Schutzanspruch 7, wobei die Pumpeinrichtung (31) so gesteuert wird, dass sie die zusätzliche Trennflüssigkeit (29) konstant, intermittierend oder bei Detektion von Gasblasen im Strömungskanal (25) durch den Strömungskanal (25) pumpt.

9. Mikrofluidisches System (1; 1') nach einem der vorhergehenden Schutzansprüche, wobei das mikrofluidische System (1; 1') ferner eine mit dem Strömungskreislauf (3) verbundene Blasenfalle (32) zur Abtrennung von Gas aus der Trennflüssigkeit (28, 29) aufweist, wobei die Blasenfalle (32) stromabwärts des Auslasses (24) der mikrofluidischen Vorrichtung (2) angeordnet ist.

10. Mikrofluidisches System (1; 1') nach einem der vorhergehenden Schutzansprüche, wobei das mikrofluidische System (1; 1') zum Untersuchen der biologischen Probe verwendet wird, die in Form der Probenflüssigkeit (27) zu jedem Element des Arrays von Reaktionsbereichen (26) bereitgestellt wird.

11. Mikrofluidisches System (1; 1') nach einem der vorhergehenden Schutzansprüche, wobei der Einlass (23) und/oder der Auslass (24) in Form eines Verbindungsports zur Verbindung der mikrofluidischen Vorrichtung (2) mit der Probenflüssigkeitsquelle, zur Verbindung der mikrofluidischen Vorrichtung (2) mit der primären Trennflüssigkeitsquelle und/oder zur Verbindung der mikrofluidischen Vorrichtung (2) mit der sekundären Trennflüssigkeitsquelle (4) ausgeführt sind.

12. Mikrofluidisches System (1; 1') nach einem der vorhergehenden Schutzansprüche, wobei die mikrofluidische Vorrichtung (2) mit mindestens einer unteren Schicht (21) und einer oberen Schicht (22) aufgebaut ist, wobei entweder die untere Schicht (21) oder die obere Schicht (22) das Array von Reaktionsbereichen (26), den Einlass (23) und den Auslass (24) bereitstellt, und wobei der Strömungskanal (25) zwischen der unteren Schicht (21) und der oberen Schicht (22) eingerichtet ist und in Fluidverbindung mit dem Array von Reaktionsbereichen (26) steht.

13. Mikrofluidisches System (1; 1') nach Schutzanspruch 12, wobei jeder Reaktionsbereich eine Mikrovertiefung oder eine Nanovertiefung ist.

14. Mikrofluidisches System (1; 1') nach Schutzanspruch 13, wobei die mikrofluidische Vorrichtung (2) ein mikrofluidischer Chip ist

15. Mikrofluidisches System (1; 1') nach einem der vorhergehenden Schutzansprüche, wobei die Probenflüssigkeit (27) eine wässrige Lösung ist, welche die biologische Probe und Reagenzien zum dPCR Assay aufweist.

16. Mikrofluidisches System (1; 1') nach Schutzanspruch 15, wobei zunächst die Probenflüssigkeit (27) durch den Strömungskanal (25) in die Anordnung von Reaktionsbereichen (26) geströmt wird, und wobei die anfängliche Trennflüssigkeit (28) in den Strömungskanal (25) der mikrofluidischen Vorrichtung (2) geströmt wird, nachdem die Probenflüssigkeit (27) der Anordnung von Reaktionsbereichen (26) zugeführt wurde.

17. Mikrofluidisches System (1; 1') nach einem der vorhergehenden Schutzansprüche, wobei das mikrofluidische System (1; 1') ferner ein Detektionsmittel zum Erfassen des Vorhandenseins oder der Erzeugung von Gasblasen in der mikrofluidischen Vorrichtung (2) umfasst.

18. Mikrofluidisches System (1; 1') nach Schutzanspruch 17, wobei das Detektionsmittel eine optische Abbildungsvorrichtung ist.

19. Mikrofluidisches System (1; 1') nach Schutzanspruch 18, wobei das Detektionsmittel eine optische Kamera ist.

20. Mikrofluidisches System (1; 1') nach einem der vorhergehenden Schutzansprüche, wobei das mikrofluidische System (1; 1') weiterhin eine thermische Halterung umfasst, die die mikrofluidische Vorrichtung (2) aufnimmt, um dem Array von Reaktionsbereichen (26) ein Thermocycling-Temperaturprofil zu verleihen.

21. Mikrofluidisches System (1; 1') nach einem der Schutzansprüche 1 bis 19, wobei eine Bereitstellung eines Thermocycling-Temperaturprofils für die Anordnung von Reaktionsbereichen (26) mittels einer Heiz- und/oder Kühleinrichtung zum Erwärmen und/oder Kühlen der Temperatur der Trennflüssigkeit auf eine gewünschte Thermocycling-Temperaturprofiltemperatur implementiert ist.

22. Mikrofluidisches System (1; 1') nach Schutzanspruch 21, wobei die sekundäre Trennflüssigkeitsquelle (4) einen Vorratsbehälter (42) mit nicht beheizter zusätzlicher Trennflüssigkeit (29) umfasst, wobei stromabwärts des Vorratsbehälters (42) eine Strömungsheizeinrichtung (5) vorgesehen ist, um die zusätzliche Trennflüssigkeit (29) bei Bedarf zu erwärmen.

23. Mikrofluidisches System (1; 1') nach Schutzanspruch 21 oder 22, wobei die sekundäre Trennflüssigkeitsquelle (4) mindestens ein Reservoir (41) mit erwärmter zusätzlicher Trennflüssigkeit (29) und mindestens ein Reservoir (42) mit nicht erwärmter oder gekühlter zusätzlicher Trennflüssigkeit (29) umfasst, wobei die Reservoirs (41, 42) durch einen Ventilmechanismus (411, 421), wie z.B. ein jeweiliges elektronisch gesteuertes Abgabeventil (411, 421) oder ein gemeinsames Mischventil, trennbar mit dem Strömungskreislauf (3) verbunden sind.

24. Mikrofluidisches System (1; 1') nach einem der Schutzansprüche 21 bis 23, wobei die zusätzliche Trennflüssigkeit (29) elektrisch leitfähiges Material, wie z. B. Graphenmaterial, umfasst, um die zusätzliche Trennflüssigkeit (29) durch das Anlegen von Elektrizität an die zusätzliche Trennflüssigkeit bei Bedarf zu erwärmen.

25. Mikrofluidisches System (1; 1') nach einem der vorhergehenden Schutzansprüche, wobei das mikrofluidische System (1; 1') weiterhin eine Druckkammer umfasst, die zumindest die mikrofluidische Vorrichtung (2) umgibt.

26. Verwendung eines mikrofluidischen Systems (1; 1') nach einem der vorhergehenden Schutzansprüche zum Ausspülen von Gasblasen aus dem Strömungskanal (25) mittels zusätzlicher Trennflüssigkeit (29) nachdem die Probenflüssigkeit (27) innerhalb der Anordnung von Reaktionsbereichen (26) durch anfängliche Trennflüssigkeit (28) vollständig versiegelt wurde.

27. Verwendung eines mikrofluidischen Systems (1; 1') nach Schutzanspruch 26, wobei Probenflüssigkeit (27) durch den Strömungskanal (25) der mikrofluidischen Vorrichtung (2) geströmt wird, die in Form eines mikrofluidischen Chips vorgesehen sein kann, und die Anordnung von Reaktionsbereichen (26) sukzessive durch Schieben der

Probenflüssigkeit (27) durch den Strömungskanal (25) mit der Probenflüssigkeit (27) gefüllt wird; anfängliche Versiegelungsflüssigkeit (28) durch den Strömungskanal (25) der mikrofluidischen Vorrichtung (2) geströmt wird, zum Versiegeln jedes Reaktionsbereichs der Anordnung von Reaktionsbereichen (26), nachdem derselbe mit der Probenflüssigkeit (27) gefüllt wurde, und zum Herausdrücken der restlichen Probenflüssigkeit (27) aus der mikrofluidischen Vorrichtung (2); ein Thermocycling-Temperaturprofil auf das Array von Reaktionsbereichen (26) angewandt wird, und zusätzliche Trennflüssigkeit (29) durch den Strömungskanal (25) der mikrofluidischen Vorrichtung (2) gepumpt wird, um Gasblasen aus dem Strömungskanal (25) zu spülen.

28. Verwendung eines mikrofluidischen Systems (1; 1') nach Schutzanspruch 26 oder 27, wobei die zusätzliche Trennflüssigkeit (29) nach dem Versiegeln der Probenflüssigkeit (27) innerhalb der Anordnung von Reaktionsbereichen (26) durch anfängliche Trennflüssigkeit (28) durch den Strömungskanal (25) gepumpt wird, wobei das Pumpen ein Pumpen einer vorbestimmten Menge an zusätzlicher Trennflüssigkeit (29) durch den Strömungskanal (25) auf Anforderung umfasst.

29. Verwendung eines mikrofluidischen Systems (1; 1') nach Schutzanspruch 28, wobei das Pumpen von zusätzlicher Trennflüssigkeit (29) durch den Strömungskanal (25) ein konstantes Pumpen von zusätzlicher Trennflüssigkeit (29) durch den Strömungskanal (25) oder ein intermittierendes Pumpen von zusätzlicher Trennflüssigkeit (29) durch den Strömungskanal (25) oder ein Pumpen von zusätzlicher Trennflüssigkeit (29) durch den Strömungskanal (25) bei Detektion von Gasblasen im Strömungskanal (25) ist.

30. Verwendung eines mikrofluidischen Systems (1; 1') nach einem der Schutzansprüche 26 bis 29, wobei das Vorhandensein oder die Erzeugung von Gasblasen in der mikrofluidischen Vorrichtung (2) überwacht und erfasst wird.

31. Verwendung eines mikrofluidischen Systems (1; 1') nach Schutzanspruch 30, wobei das Vorhandensein oder die Erzeugung von Gasblasen in der mikrofluidischen Vorrichtung (2) mittels eines Erfassungsmittels, wie einer optischen Abbildungsvorrichtung, zum Beispiel einer optischen Kamera, überwacht und erfasst wird.

32. Verwendung eines mikrofluidischen Systems (1; 1') nach einem der Schutzansprüche 26 bis 31, wobei Gasblasen aus der zusätzlichen Trennflüssigkeit (29) abgetrennt werden.

33. Verwendung eines mikrofluidischen Systems (1; 1') nach Schutzanspruch 32, wobei das Abtrennen mittels einer Blasenfalle (32) erfolgt, die mit dem Strömungskreislauf (3) stromabwärts des Auslasses (24) der mikrofluidischen Vorrichtung (2) verbunden ist.

34. Verwendung eines mikrofluidischen Systems (1; 1') nach einem der Schutzansprüche 26 bis 33, wobei Druck auf die mikrofluidische Vorrichtung (2) aufgebracht wird.

35. Verwendung eines mikrofluidischen Systems (1; 1') nach Schutzanspruch 34, wobei der Druck mittels einer Druckkammer aufgebracht wird, die zumindest die mikrofluidische Vorrichtung (2) umgibt.

36. Verwendung eines mikrofluidischen Systems (1; 1') nach einem der Schutzansprüche 26 bis 35, wobei die biologische Probe, die in der Anordnung von Reaktionsbereichen (26) bereitgestellt wird, getestet wird.

37. Verwendung eines mikrofluidischen Systems (1; 1') nach einem der Schutzansprüche 26 bis 36, wobei das Anwenden des Thermocycling-Temperaturprofils auf die Anordnung von Reaktionsbereichen (26) eine Steuerung des Temperaturprofils einer thermischen Halterung umfasst, die die mikrofluidische Vorrichtung (2) aufnimmt, um der Anordnung von Reaktionsbereichen (26) ein Thermocycling-Temperaturprofil zu liefern, oder eine Steuerung einer Heizeinrichtung zum Erwärmen oder einer Kühleinrichtung zum Kühlen der Temperatur der Trennflüssigkeit auf eine gewünschte Temperatur des Thermocycling-Temperaturprofils umfasst, oder eine Steuerung einer Heizeinrichtung zum Erwärmen und einer Kühleinrichtung zum Kühlen der Temperatur der Trennflüssigkeit auf eine gewünschte Temperatur des Thermocycling-Temperaturprofils umfasst.

38. Verwendung eines mikrofluidischen Systems (1; 1') nach Schutzanspruch 37, wobei die Steuerung der Heiz- oder Kühleinrichtung (5) ein Steuern einer stromabwärts der sekundären Trennflüssigkeitsquelle (4) vorgesehenen Durchflussheizeinrichtung (5) zum Erwärmen der zusätzlichen Trennflüssigkeit (29) auf Anforderung umfasst.

39. Verwendung eines mikrofluidischen Systems (1; 1') nach einem der Schutzansprüche 37 und 38, wobei die Steuerung der Heiz- oder Kühleinrichtung (5) ein Steuern eines Ventilmechanismus (411, 421) zum Mischen von zusätzlicher Trennflüssigkeit (29) aus mindestens einem Reservoir (41) mit einer erwärmten zusätzlichen Trennflüssigkeit (29) und mindestens einem Reservoir (42) mit einer nicht

erwärmten oder gekühlten zusätzlichen Trennflüssigkeit (29) umfasst.

40. Verwendung eines mikrofluidischen Systems (1; 1') nach einem der Schutzansprüche 37 bis 39, wobei die Steuerung der Heiz- oder Kühleinrichtung (5) ein Anlegen von Elektrizität an die zusätzliche Trennflüssigkeit (29) auf Anforderung umfasst, wobei die zusätzliche Trennflüssigkeit (29) elektrisch leitendes Material, wie Graphenmaterial, zum Erwärmen der zusätzlichen Trennflüssigkeit (29) durch das Anlegen von Elektrizität umfasst.

41. Mikrofluidisches System (1; 1') für die digitale Polymerase-Kettenreaktion dPCR einer biologischen Probe, wobei das mikrofluidische System (1; 1') umfasst:

mindestens eine mikrofluidische Vorrichtung (2) mit einem Einlass (23), einem Auslass (24), einem Strömungskanal (25), der den Einlass (23) mit dem Auslass (24) verbindet, und einer Anordnung von Reaktionsbereichen (26), die mit dem Strömungskanal (25) in Fluidverbindung stehen;
einen Strömungskreislauf (3), der mit der mikrofluidischen Vorrichtung (2) verbindbar ist, um Flüssigkeit durch den Strömungskanal (25) der mikrofluidischen Vorrichtung (2) fließen zu lassen;
eine Probenflüssigkeitsquelle, die an die mikrofluidische Vorrichtung (2) anschließbar ist, um die mikrofluidische Vorrichtung (2) mit einer Probenflüssigkeit (27) zu versorgen;
eine primäre Trennflüssigkeitsquelle, die mit der mikrofluidischen Vorrichtung (2) verbindbar ist, um die mikrofluidische Vorrichtung (2) mit anfänglicher Trennflüssigkeit (28) zum Versiegeln der Probenflüssigkeit (27) innerhalb der Anordnung von Reaktionsbereichen (26) zu versorgen;
eine sekundäre Trennflüssigkeitsquelle (4), die an die mikrofluidische Vorrichtung (2) anschließbar ist, um die mikrofluidische Vorrichtung (2) mit zusätzlicher Trennflüssigkeit (29) zu versorgen, und
eine Pumpeinrichtung (31), die mit dem Strömungskreislauf (3) verbunden und geeignet ist, die zusätzliche Trennflüssigkeit (29) durch den Strömungskanal (25) zu pumpen,
wobei das mikrofluidische System weiterhin eine Steuereinrichtung umfasst, um die Pumpeinrichtung (31) zu steuern, um die zusätzliche Trennflüssigkeit (29) bei Bedarf durch den Strömungskanal (25) zu pumpen, um Gasblasen aus dem Strömungskanal (25) zu spülen.

42. Mikrofluidisches System (1; 1') nach Schutzanspruch 41, wobei die Probenflüssigkeit (27) eine wässrige Lösung ist, die die biologische Probe und die für den dPCR-Assay erforderlichen Reagenzien umfasst, und wobei jede Trennflüssigkeit (28, 29) eine mit der Probenflüssigkeit (27) nicht mischbare Flüssigkeit ist.

43. Mikrofluidisches System (1; 1') nach Schutzanspruch 42, wobei jede Trennflüssigkeit (28, 29) entweder Öl oder eine Polymerflüssigkeit, wie eine Silikonflüssigkeit, oder ein Gemisch davon ist.

44. Mikrofluidisches System (1; 1') nach Schutzanspruch 43, wobei die anfängliche Trennflüssigkeit (28) und die zusätzliche Trennflüssigkeit (29) aus demselben Trennflüssigkeitsmaterial bestehen.

45. Mikrofluidisches System (1; 1') nach einem der Schutzansprüche 41 bis 44, wobei die primäre Trennflüssigkeitsquelle und die sekundäre Trennflüssigkeitsquelle (4) durch unterschiedliche Trennflüssigkeitsreservoirs oder durch ein gemeinsames Trennflüssigkeitsreservoir realisiert sind.

46. Mikrofluidisches System (1; 1') nach Schutzanspruch 45, wobei die initiale Trennflüssigkeit (28) eine untemperierte Trennflüssigkeit ist.

47. Mikrofluidisches System (1; 1') nach einem der Schutzansprüche 41 bis 46, wobei die Pumpeinrichtung (31) so gesteuert wird, dass sie eine vorbestimmte Menge der zusätzlichen Trennflüssigkeit (29) durch den Strömungskanal (25) pumpt.

48. Mikrofluidisches System (1; 1') nach Schutzanspruch 47, wobei die Pumpeinrichtung (31) so gesteuert wird, dass sie die zusätzliche Trennflüssigkeit (29) konstant, intermittierend oder bei Detektion von Gasblasen im Strömungskanal (25) durch den Strömungskanal (25) pumpt.

49. Mikrofluidisches System (1; 1') nach einem der Schutzansprüche 41 bis 48, wobei das mikrofluidische System (1; 1') ferner eine mit dem Strömungskreislauf (3) verbundene Blasenfalle (32) zur Abtrennung von Gas aus der Trennflüssigkeit (28, 29) aufweist, wobei die Blasenfalle (32) stromabwärts des Auslasses (24) der mikrofluidischen Vorrichtung (2) angeordnet ist.

50. Mikrofluidisches System (1; 1') nach einem der Schutzansprüche 41 bis 49, wobei das mikrofluidische System (1; 1') zum Untersuchen der biologischen Probe verwendet wird, die in Form der Probenflüssigkeit (27) zu jedem Element des Arrays von Reaktionsbereichen (26) bereitgestellt wird.

51. Mikrofluidisches System (1; 1') nach einem der Schutzansprüche 41 bis 50, wobei der Einlass (23) und/oder der Auslass (24) in Form eines Verbindungsports zur Verbindung der mikrofluidischen Vorrichtung (2) mit der Probenflüssigkeitsquelle, zur Verbindung der mikrofluidischen Vorrichtung (2) mit der primären Trennflüssigkeitsquelle und/oder zur Verbindung der mikrofluidischen Vorrichtung (2) mit der sekundären Trennflüssigkeitsquelle (4) ausgeführt sind.

52. Mikrofluidisches System (1; 1') nach einem der Schutzansprüche 41 bis 51, wobei die mikrofluidische Vorrichtung (2) mit mindestens einer unteren Schicht (21) und einer oberen Schicht (22) aufgebaut ist, wobei entweder die untere Schicht (21) oder die obere Schicht (22) das Array von Reaktionsbereichen (26), den Einlass (23) und den Auslass (24) bereitstellt, und wobei der Strömungskanal (25) zwischen der unteren Schicht (21) und der oberen Schicht (22) eingerichtet ist und in Fluidverbindung mit dem Array von Reaktionsbereichen (26) steht.

53. Mikrofluidisches System (1; 1') nach Schutzanspruch 52, wobei jeder Reaktionsbereich eine Mikrovertiefung oder eine Nanovertiefung ist.

54. Mikrofluidisches System (1; 1') nach Schutzanspruch 53, wobei die mikrofluidische Vorrichtung (2) ein mikrofluidischer Chip ist

55. Mikrofluidisches System (1; 1') nach einem der Schutzansprüche 41 bis 54, wobei die Probenflüssigkeit (27) eine wässrige Lösung ist, welche die biologische Probe und Reagenzien zum dPCR Assay aufweist.

56. Mikrofluidisches System (1; 1') nach Schutzanspruch 55, wobei zunächst die Probenflüssigkeit (27) durch den Strömungskanal (25) in die Anordnung von Reaktionsbereichen (26) geströmt wird, und wobei die anfängliche Trennflüssigkeit (28) in den Strömungskanal (25) der mikrofluidischen Vorrichtung (2) geströmt wird, nachdem die Probenflüssigkeit (27) der Anordnung von Reaktionsbereichen (26) zugeführt wurde.

57. Mikrofluidisches System (1; 1') nach einem der Schutzansprüche 41 bis 56, wobei das mikrofluidische System (1; 1') ferner ein Detektionsmittel zum Erfassen des Vorhandenseins oder der Erzeugung von Gasblasen in der mikrofluidischen Vorrichtung (2) umfasst.

58. Mikrofluidisches System (1; 1') nach Schutzanspruch 57, wobei das Detektionsmittel eine optische Abbildungsvorrichtung ist.

59. Mikrofluidisches System (1; 1') nach Schutzanspruch 58, wobei das Detektionsmittel eine optische Kamera ist.

60. Mikrofluidisches System (1; 1') nach einem der Schutzansprüche 41 bis 59, wobei das mikrofluidische System (1; 1') weiterhin eine thermische Halterung umfasst, die die mikrofluidische Vorrichtung (2) aufnimmt, um dem Array von Reaktionsbereichen (26) ein Thermocycling-Temperaturprofil zu verleihen.

61. Mikrofluidisches System (1; 1') nach einem der Schutzansprüche 41 bis 60, wobei eine Bereitstellung eines Thermocycling-Temperaturprofils für die Anordnung von Reaktionsbereichen (26) mittels einer Heiz- und/oder Kühleinrichtung zum Erwärmen und/oder Kühlen der Temperatur der Trennflüssigkeit auf eine gewünschte Thermocycling-Temperaturprofiltemperatur implementiert ist.

62. Mikrofluidisches System (1; 1') nach Schutzanspruch 61, wobei die sekundäre Trennflüssigkeitsquelle (4) einen Vorratsbehälter (42) mit nicht beheizter zusätzlicher Trennflüssigkeit (29) umfasst, wobei stromabwärts des Vorratsbehälters (42) eine Strömungsheizeinrichtung (5) vorgesehen ist, um die zusätzliche Trennflüssigkeit (29) bei Bedarf zu erwärmen.

63. Mikrofluidisches System (1; 1') nach Schutzanspruch 61 oder 62, wobei die sekundäre Trennflüssigkeitsquelle (4) mindestens ein Reservoir (41) mit erwärmter zusätzlicher Trennflüssigkeit (29) und mindestens ein Reservoir (42) mit nicht erwärmter oder gekühlter zusätzlicher Trennflüssigkeit (29) umfasst, wobei die Reservoirs (41, 42) durch einen Ventilmechanismus (411, 421), wie z.B. ein jeweiliges elektronisch gesteuertes Abgabeventil (411, 421) oder ein gemeinsames Mischventil, trennbar mit dem Strömungskreislauf (3) verbunden sind.

64. Mikrofluidisches System (1; 1') nach einem der Schutzansprüche 61 bis 63, wobei die zusätzliche Trennflüssigkeit (29) elektrisch leitfähiges Material, wie z. B. Graphenmaterial, umfasst, um die zusätzliche Trennflüssigkeit (29) durch das Anlegen von Elektrizität an die zusätzliche Trennflüssigkeit bei Bedarf zu erwärmen.

65. Mikrofluidisches System (1; 1') nach einem der Schutzansprüche 41 bis 64, wobei das mikrofluidische System (1; 1') weiterhin eine Druckkammer umfasst, die zumindest die mikrofluidische Vorrichtung (2) umgibt.

Es folgen 4 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

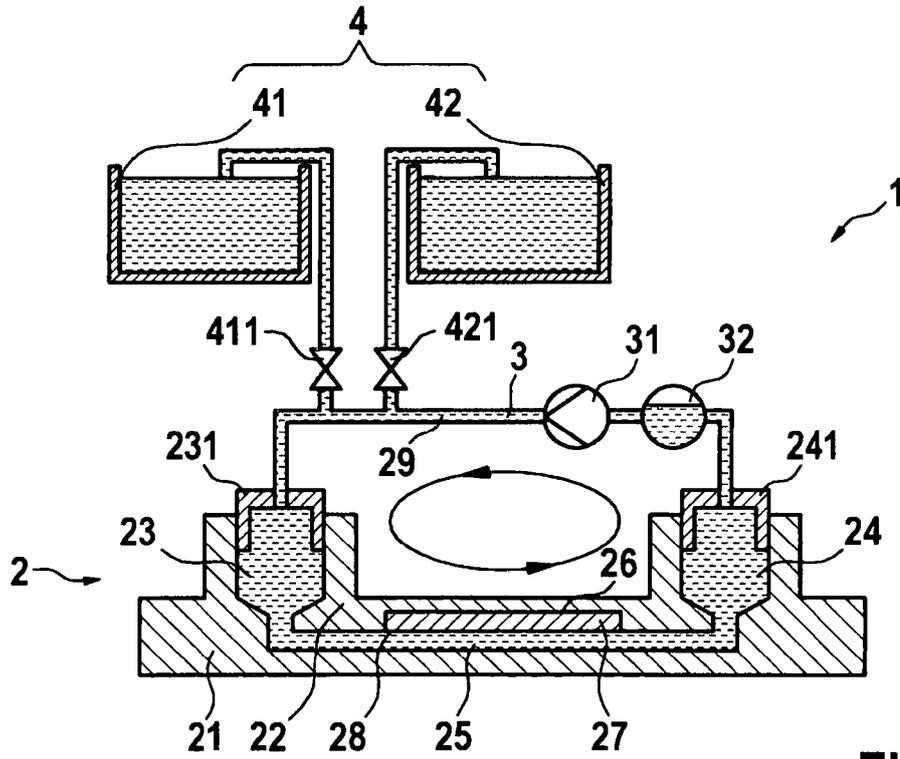


Fig. 1

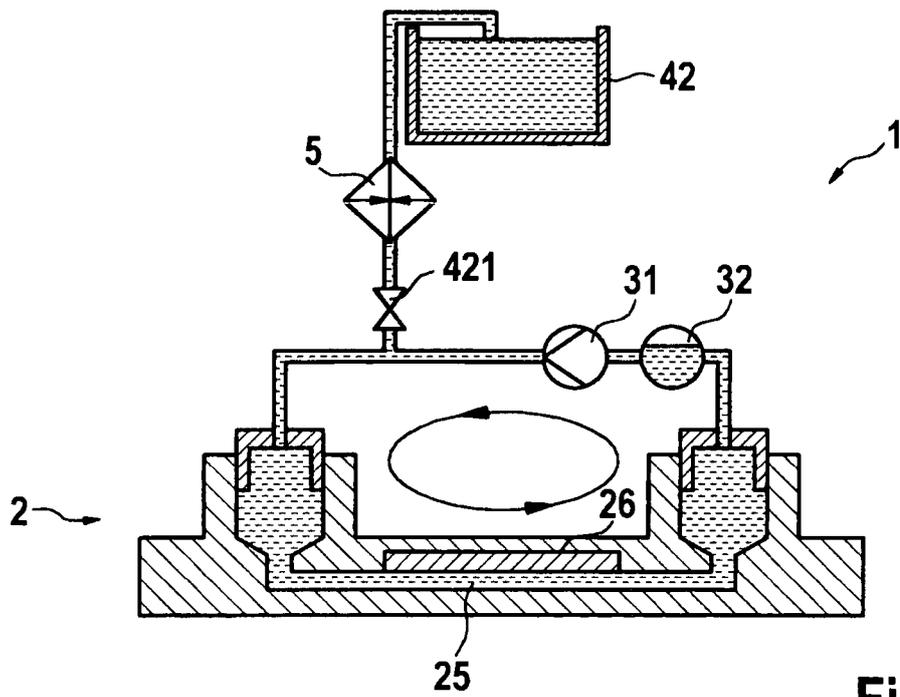


Fig. 2

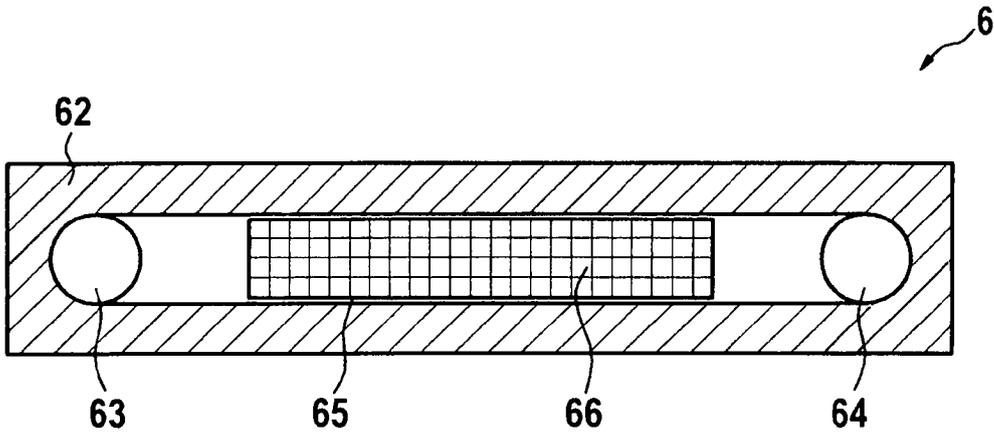


Fig. 3A

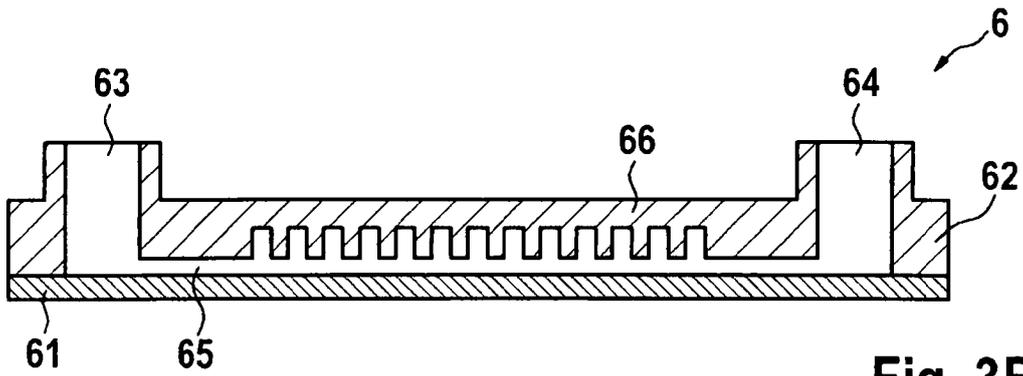


Fig. 3B

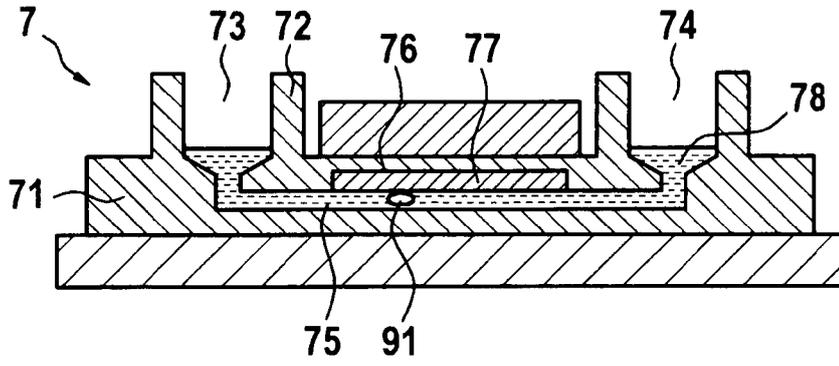


Fig. 4A

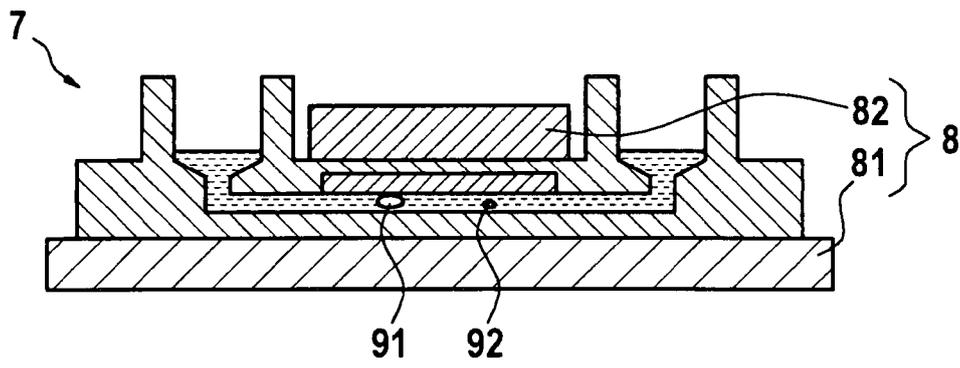


Fig. 4B

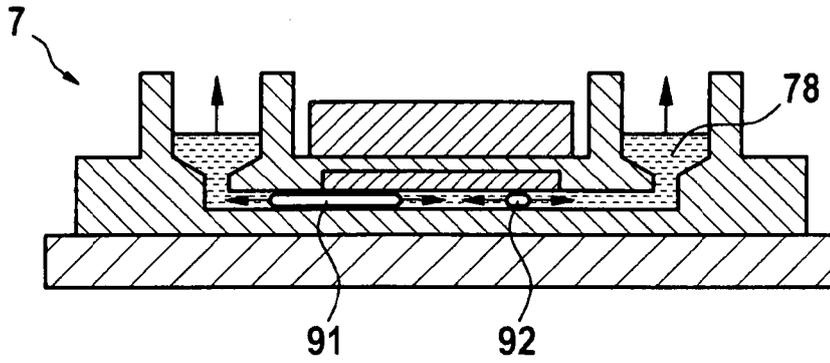


Fig. 4C

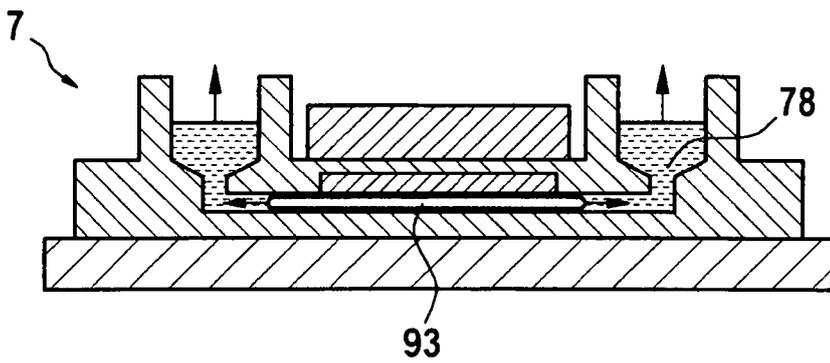


Fig. 4D