



Neueste thermoelektrische Technik für Echtzeit-PCR

Laird Thermal Systems Anwendungshinweis

Einleitung

Einführung	3
Polymerasekettenreaktion.....	4
Peltier-Module für genaue Temperatursteuerung	6
Thermoelektrische Standardmodule.....	6
Peltier-Module aus der Baureihe PowerCycling PCX.....	6
Verlängerte PCX Peltier-Module für verbesserte Temperaturregelung	7
Fazit.....	8
Über Laird Thermal Systems	9
Kontakt zu Laird Thermal Systems	9

Einführung

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren in der molekularen Diagnostik zur Amplifikation (Vervielfältigung) von DNA-Sequenzen. Die im PCR-Verfahren hergestellte DNA, auch als DNA- oder Gen-Kopieren bekannt, ist unverzichtbar für viele Labor- und klinische Verfahren. PCR-Tests sind bei der Diagnose von SARS-CoV-2 sehr nützlich, besser bekannt als Corona bzw. COVID-19. PCR-Tests erkennen nicht nur die Anwesenheit eines Virus während des Tests, sondern auch Fragmente eines Virus, wenn der Patient schon nicht mehr infiziert ist. Der PCR-Test wird als „Goldstandard-Test“ für die Diagnose von COVID-19 betrachtet, da er zurzeit der genaueste und zuverlässigste Test ist.



PCR wird als das genaueste und zuverlässigste Testverfahren für die Diagnose ansteckender Krankheiten angesehen.

PCR wird durch die Möglichkeiten bei der Erkennung ansteckender Krankheiten zum Standard in unserem täglichen Leben werden.

Es gibt drei Hauptarten von PCR-Maschinen: herkömmliche, echtzeitfähige und quantitative. Die in den 90ern entwickelten herkömmlichen PCR-Maschinen sind nicht sehr genau und empfindlich, und die Ergebnisse liegen erst nach dem Testen vor. Echtzeit-PCR erlaubt es den (Labor)Technikern, die Ergebnisse während des Testvorgangs einzusehen, und bietet die genauesten und präzisesten Daten für die quantitative Bestimmung. Dank Echtzeit-PCR kann das medizinische Personal eine patientennahe Sofortdiagnostik (Point of Care, PoC) anbieten und die Patienten bekommen die Ergebnisse in Minuten anstelle von Stunden. Das PoC-Testing gewährleistet, dass Patienten am richtigen Ort und zur richtigen Zeit die effektivste und effizienteste medizinische Betreuung bekommen. Echtzeit-PCR-Tests sparen Zeit, weil Techniker während des Vor-Testlaufs die Schmelztemperatur optimieren können. Quantitative PCR, auch als digitale PCR oder qPCR bekannt, bietet einen genauen Nachweis seltener Allele, was eine genauere Analyse erlaubt als das, was mit Echtzeit-PCR erkannt werden kann.

PCR wird durch einen Apparat namens Thermocycler ermöglicht, der so programmiert ist, dass alle 30 bis 60 Sekunden eine schnelle Änderung der Reaktionstemperatur zur Denaturierung und Synthetisierung der DNA erfolgt. Dank technologischer Fortschritte konnten die Abmessungen der Thermocycler über die Jahre reduziert und wertvoller Tischplatz in den Laboren eingespart werden. Moderne Thermocycler für das digitale PCR-Testing in Echtzeit nutzen die thermoelektrische Technik für die präzise Einhaltung der Temperatursollwerte und -gradienten. Das



Moderne Thermocycler nutzen thermoelektrische Technologie für die genaue Temperaturkontrolle und steile Temperaturrampen.

Zyklieren kann aufgrund der während der Heiz- und Kühlzyklen auftretenden mechanischen Beanspruchungen eine für herkömmliche Peltier-Module äußerst raue Umgebung erzeugen und deren Leistungsfähigkeit einschränken. Laird Thermal Systems hat mit der Baureihe PowerCycling PCX die nächste Generation von Peltier-Modulen entwickelt, die fortgeschrittene thermoelektrische Materialien und eine proprietäre Prozesslenkung vereint, um eine optimale Leistung und eine robuste Bauweise für Anwendungen mit hoher Temperaturwechselbeanspruchung zu gewährleisten.

Polymerasekettenreaktion

PCR benötigt für die Erzeugung von Millionen Kopien einer bestimmten DNA-Sequenz eine große Anzahl an Temperaturzyklen. In einem Thermocycler werden Proben vorbereitet und in eine Platte mit 96 oder 384 Wells dispensiert und in jeder Temperaturstufe genau temperiert werden.

Gewöhnlicherweise besteht PCR aus einer Reihe von 20 bis 40 sich wiederholenden Temperaturzyklen, bei denen sich jedes Mal die Anzahl der DNA-Kopien verdoppelt. In ungefähr 40 Zyklen können ca. eine Milliarde DNA-Kopien erzeugt werden, um genügend Biomarker für die hochgenaue Identifizierung durch ein optisches Messsystem zu generieren. Den Durchläufen geht oft ein einzelner Temperaturschritt bei einer hohen Temperatur (95 °C) voraus, bei welcher die DNA getrennt wird, gefolgt von einem Abkühlen auf die Schmelztemperatur von 50 bis 65°C, bei der die Biomarker mit der DNA verbunden werden. Im dritten Schritt wird die Temperatur auf 72°C angehoben, sodass eine Kopie der DNA sequenziert werden kann. Die Solltemperatur und die Verweildauer in jeder Phase hängen von einer Vielfalt von Parametern ab, basierend darauf, wie gut sich die Biomarker an die DNA geheftet haben.

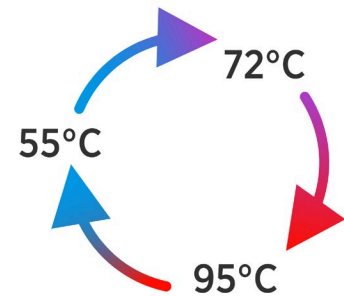
Zur Bestimmung der optimalen Schmelztemperatur könnte ein Testlauf erforderlich sein. Dies kann mit modernen PCR-Maschinen erfolgen, bei denen vier bis sechs Temperaturzonen gleichzeitig auf 50 bis 65°C geregelt werden können.

Zum Finden der optimalen Temperatur, bei der die Biomarker sich an die DNA heften, kann ein Vortest durchgeführt werden. Der kann in Echtzeit bei

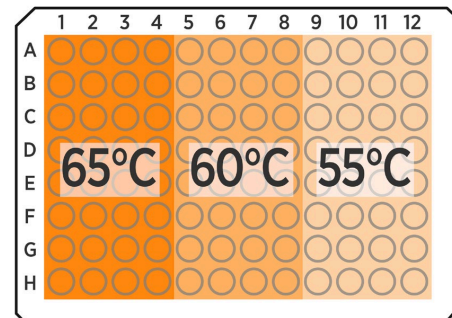
verschiedenen Temperaturzonen überwacht werden, damit die optimale Schmelztemperatur vor dem Durchführen des richtigen Tests bestimmt werden kann. Dies stellt die größtmögliche Genauigkeit der Testresultate sicher und wird für die quantitative PCR benötigt.

Es sind steilere Temperaturrampen nötig, um die Gesamtdauer der Vervielfältigung minimieren und die Anzahl an Tests, die ein PCR-Gerät an einem Tag durchführen kann, maximieren zu können. In herkömmlichen PCR-Maschinen sind Aufheizraten von etwa 3 bis 5 K/s zu erwarten. Bei den neuen Maschinen auf dem Markt erhöhen sich Aufheizraten auf 6 bis 9 K/s.

Die Steuerseite besteht aus einem Kühlblock mit spanend hergestellten Bohrungen zur Aufnahme von Probengefäßen. Eine der größten Herausforderungen in dieser Anwendung ist das Minimieren des Temperaturgradienten über die Platte, sodass alle Wells auf dieselbe Solltemperatur aufgeheizt/abgekühlt werden. Probenplatten müssen über die Dauer des PCR-Verfahrens innerhalb von einem halben Grad Celsius gehalten werden, ansonsten sind sie (wahrscheinlich) fehlerhaft und für die Analyse nicht mehr brauchbar. Die wärmeabführende Seite besteht aus Kühlkörper und Lüfter mit einer Heizpatrone. Häufig wird zur Stabilisierung der Warm-Seiten-Temperatur eine sekundäre Regelschleife auf der wärmeabführenden Seite eingesetzt, während die Steuerseite über eine Temperaturdifferenz von 40 °C schwankt. Dies verbessert die Temperaturregelung und hilft dabei, das Über- bzw. Unterschreiten von Solltemperaturen zu minimieren, besonders bei steilen Temperaturrampen.

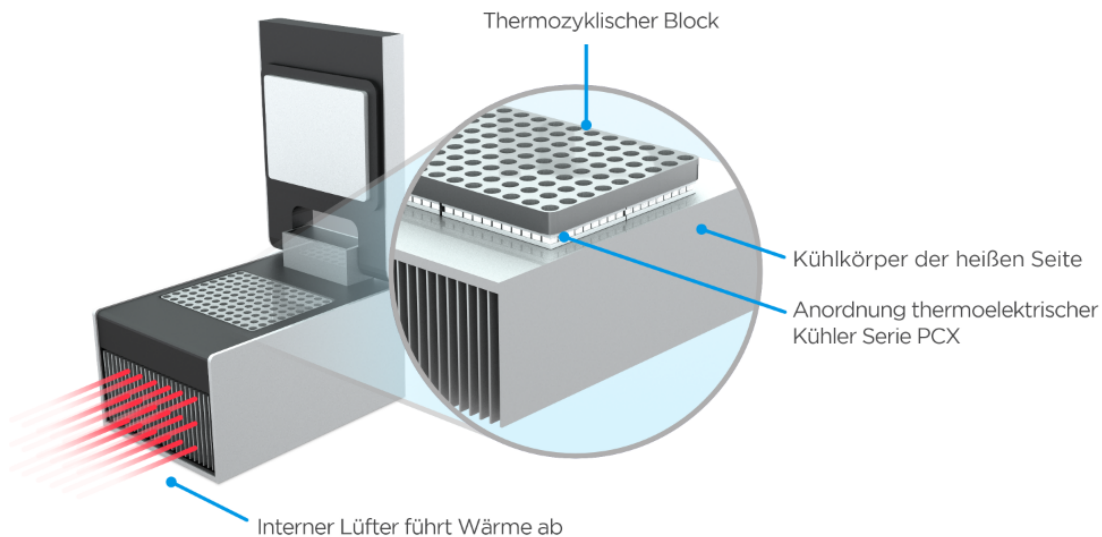


PCR consists of three temperature cycling stages.



Temperaturzonen werden in Vortests zum Finden der optimalen Schmelztemperatur genutzt, bei der die Biomarker sich an die DNA anheften.

Thermocycler können in PCR-Verfahren mit strengsten Anforderungen an die Temperaturregelung eingesetzt werden. Die Temperaturhaltung auf 0,5 °C genau kann insbesondere bei den Wells an der Plattenkante eine Herausforderung darstellen. Die laterale Wärmeverteilung und eine Kühlplatte mit großer Wärmeleitfähigkeit sind entscheidend für einen möglichst geringen Temperaturgradienten über die Platte.



In Echtzeit-PCR-Thermocyclern werden hochentwickelte Peltier-Module verwendet, da sie im Vergleich zu anderen Technologien eine präzisere Regelung und steilere Rampen bieten.

Darüber hinaus müssen enge Längstoleranzen beim Peltier-Modul eingehalten werden, um den Abstand zwischen den Kontaktflächen von Kühlkörper und Kühlblock auf ein Minimum zu reduzieren. Die Wärmetauscher an den Peltier-Modulen sollten ebenfalls eine Oberfläche mit hoher Ebenheit und Glattheit aufweisen. So wird sichergestellt, dass sich bei der Montage alle Peltier-Module in einer Ebene befinden und die Luft von den Grenzflächenmaterialien entfernt wird, um den Temperaturgradienten zu minimieren.

Der AC-Widerstand (ACR) der Module ändert sich mit der Zeit. Dass sich der ACR über die Lebensdauer etwas verändert, ist nicht ungewöhnlich, und nicht alle Peltier-Module ändern sich mit derselben Rate. Fertigungstoleranzen können von Los zu Los um mehr als 5 % schwanken. Damit sich die ACR Abweichung auf den Temperaturgradienten möglichst wenig auswirkt, wird empfohlen, die Peltier-Module nach ACR Wert zu sortieren und für jede PCR-Maschine in Sätzen zu gruppieren. Das gewährleistet, dass sich Temperaturgradienten zwischen Peltier-Modulen mit der Zeit nicht sehr verändern und verlängert die Nutzungsdauer von PCR-Maschinen im praktischen Einsatz.

Ein PCR-Protokollbeispiel beschreibt die Erwärmung von Gewebeschnitten für die in situ Hybridisierung. Der geregelte Temperaturanstieg mittels Thermocycler ermöglicht das Untersuchen der temperaturabhängigen Kinetik. Zusätzlich zum Optimieren eines PCR-Verfahrens, ermöglicht ein Thermocycler mit einer Gradientenfunktion die Bestimmung der besten Temperatur für jede Enzymaktivität.

Peltier-Module für genaue Temperatursteuerung

Verglichen mit herkömmlichen PCR-Thermocyclern, bei denen es Stunden bis zum Ergebnis dauern kann, bietet die moderne Echtzeit-PCR schon Ergebnisse im laufenden Test. So können Techniker den Test im Falle eines Fehlers anhalten und anpassen. Die erhöhte Geschwindigkeit der Echtzeit-PCR ist größtenteils durch die verringerten Zykluszeiten bedingt, das Entfernen von post-PCR Erkennungsverfahren und dem Einsatz fluorogener Sonden und empfindlicher Methoden zur Detektion ihrer Emissionen. In Echtzeit-Thermocyclern werden hochentwickelte Peltier-Module verwendet, da sie im Vergleich zu anderen Technologien durch präzisere Temperaturregelung, weniger Platzbedarf und mehr Effizienz überzeugen. Dank steilerer Temperaturrampen sorgen Peltier-Module für größeren Durchsatz und schnellere Testergebnisse.

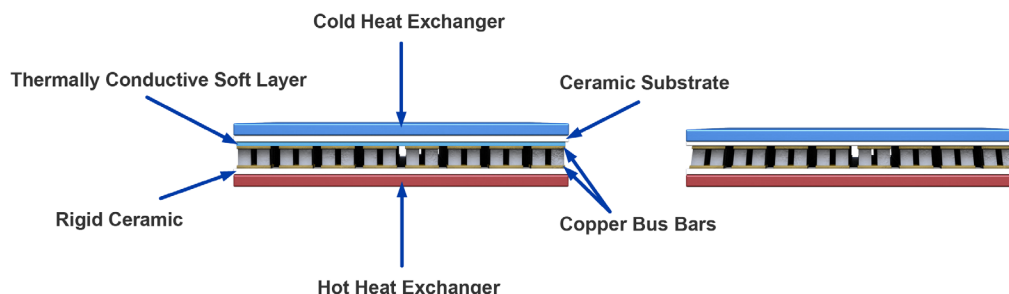
Thermoelektrische Standardmodule

Peltier-Standardmodule sind ausschließlich für Kälteanwendungen konzipiert. Die solide Bauweise besteht aus Lötverbindungen zwischen den kupfernen Sammelschienen auf den Keramiksubstraten und den Halbleiterpaaren. Aufgrund der steifen Struktur übt das thermische Zyklieren eine mechanische Beanspruchung auf die Peltier-Module aus, da das Modul sich durch wiederholte Heiz- und Kühlzyklen schnell ausdehnt und zusammenzieht. Die thermische Kontraktion bewirkt ein Schrumpfen der Keramik auf der kalten Seite, während sich das Keramiksubstrat auf der heißen Seite ausdehnt. Die Halbleiterelemente sind an beide Seiten angelötet und sind während der Zyklierung der mechanischen Ermüdung und Scherspannungen ausgesetzt. Das kann zu einem Versagen führen oder die Lebensdauer des Peltier-Moduls deutlich verringern, was die PCR-Maschine unbrauchbar macht.

Peltier-Module der Serie PowerCycling PCX

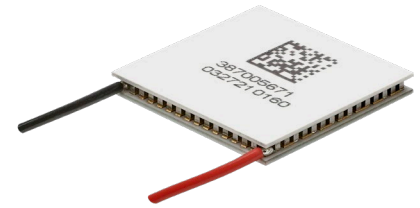
Die Serie PowerCycling PCX, die zur präzisen Temperierung unter den Thermocycler-Platten (Wells) installiert wird, ist speziell dafür ausgelegt, Hunderttausende von Temperaturzyklen bei minimalem Leistungsverlust zu überstehen. Die hochzuverlässige PowerCycling PCX-Serie verlängert die Zeit zwischen zwei Ausfällen (MTBF) des Thermocyclers und senkt die Anschaffungs- und Betriebskosten durch weniger Ausfallzeiten und Wartungsaufwand. Durch die Verlängerung der Lebensdauer des PCR-Blocks können OEMs den Verkauf von Verbrauchsmaterialien für jedes Gerät maximieren.

Das PCX-Modul zeichnet sich durch ein einzigartiges, robustes Design mit thermoelektrischen Materialien der neuesten Generation aus, die die thermische Beanspruchung deutlich reduzieren. Eine flexible, wärmeleitende „Soft“-Schicht unter dem Keramiksubstrat auf der kalten Seite absorbiert die mechanische Beanspruchung durch Temperaturwechsel und verlängert so die Gesamtlebensdauer in Anwendungen mit abwechselnden Aufheiz- und Abkühlphasen. Die Peltier-Module der Serie PowerCycling PCX haben das Validierungs-Testprotokoll eines führenden PCR-Herstellers mit extrem anspruchsvollen Zyklusbedingungen, die realen Anwendungen nachempfunden sind, bestanden.



Schematische Darstellung der relativen Dehnung in Halbleiter-Pellets bei übermäßiger Wärmeausdehnung in einem normalen Peltier-Modul (rechts) und einem Modul aus der Baureihe PowerCycling mit einer dielektrischen, thermisch leitenden Weichlage (links).

Das PCX-Peltier-Modul wird mit verbesserter Prozessregelung und Löttechnik gebaut, um in Temperaturen bis 120 °C zu funktionieren, was die Anforderungen für PCR-Anwendungen übersteigt. Die mit neuesten thermoelektrischen Materialien hergestellte PCX-Baureihe bietet im Vergleich zu herkömmlichen Peltier-Modulen steilere Temperaturrampen.



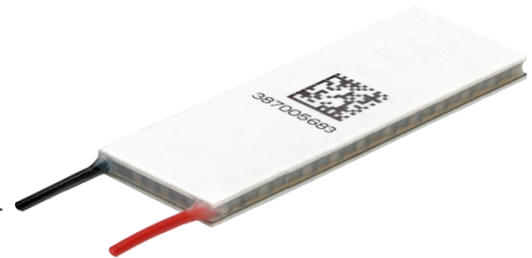
Die PCX Baureihe ist für den Betrieb in Temperaturen bis 120 °C ausgelegt, was die Anforderungen für PCR-Anwendungen überschreitet.

Bei Verwendung als Array unter einer Thermocycler-Platte optimieren die Peltier-Module aus der Baureihe PCX die laterale Wärmeverteilung und sorgen so für eine einheitliche Temperaturstabilität von $\pm 0,5$ °C über den gesamten Kühlblock. Die Größe des Arrays richten sich nach der Anzahl der Plattenwells.

Die PCX Baureihe bietet eine große Auswahl an Kühlleistungen von 14 bis 215 Watt in vielen Breiten- und Längenkombinationen für eine Vielzahl an unterschiedlichen Plattengrößen und Wells-Anzahlen.

Verlängerte PCX Peltier-Module für verbesserte Temperaturregelung

Die hochgenaue Temperaturregelung ist entscheidend für die Bestimmung der optimalen Schmelztemperatur, bei der sich Biomarker an die DNA heften. Mehr Temperaturzonen auf der PCR-Platte erzeugen weniger Abweichungen zwischen den einzelnen Well-Gruppen, wodurch die Techniker die optimale Schmelztemperatur einfacher bestimmen können und Testergebnisse schneller vorliegen.

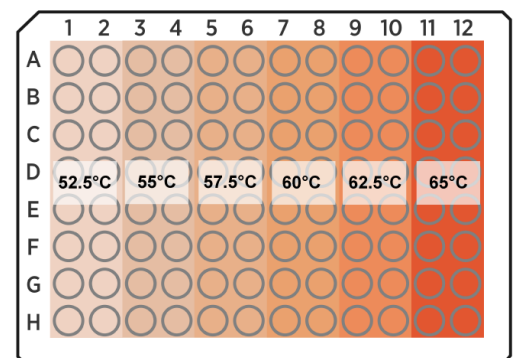


Die verlängerten PCX-Peltier-Module ermöglichen schmalere Temperaturzonen auf dem PCR-Tray, was es Technikern einfacher macht, die optimale Schmelztemperatur zu finden.

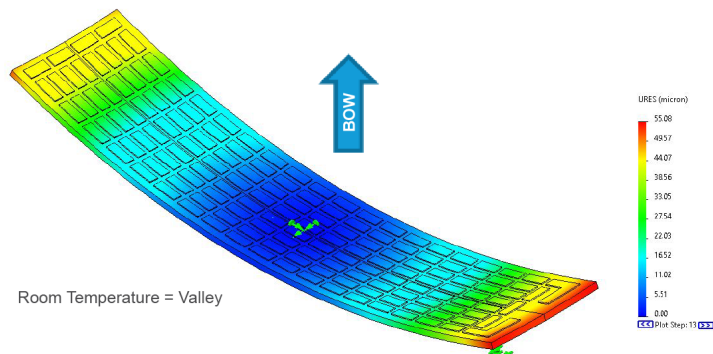
Durch die Installation verlängerter Peltier-Module unter den PCR Wells werden die Temperaturzonen schmäler und der Temperaturgradient über die Platte auf ein Minimum reduziert. Die Auslegung des PCR-Trays würde in diesem Beispiel sechs Peltier-Module mit je einem Peltier-Modul pro Zone vorsehen.

Der Herstellungsprozess der verlängerten Peltier-Module ist aufgrund des bei längeren Bauteilen auftretenden Wölbungseffekts allerdings eine sehr große Herausforderung. Mit zunehmendem Länge-zu-Breite-Verhältnis nimmt auch die Wölbungsneigung der Keramik zu, was bei der Montage eine Herausforderung darstellen kann.

Mithilfe einer verbesserten, firmeneigenen Prozesssteuerung und modernsten thermoelektrischen Materialien konnte Laird Thermal Systems die Peltier-Modulbaureihe PCX Elongated entwickeln, die dank überlegenem Aufbau höchste Zuverlässigkeit bietet und den Wölbungseffekt weitestgehend beseitigt. Die PCX Baureihe hat anspruchsvollste Prüfungen mit Stromrichtungsumkehr bestanden. Die Baureihe PCX Elongated erfüllt die aktuellen PCR-Branchenstandards.



FEA Simulation - at 25°C with $T_{ref} = 54^\circ\text{C}$



Die Fertigung verlängerter Bauelemente ist aufgrund des bei höheren Temperaturen auftretenden Wölbungseffekts eine Herausforderung. Durch die überlegene Modulbauweise unserer Baureihe PowerCycling PCX Elongated werden die Auswirkungen dieses Effekts weitestgehend beseitigt.

Fazit

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) benötigt für die Erzeugung von Millionen Kopien einer bestimmten DNA-Sequenz eine große Anzahl an zyklisch wiederkehrenden Temperaturänderungen. Dies stellt für herkömmliche Peltier-Module aufgrund der hohen mechanischen Beanspruchungen, die während der Heiz- und Kühlphase auftreten, eine raue Umgebung dar. Laird Thermal Systems hat eine neue Baureihe PowerCycling PCX mithilfe neuester thermoelektrischer Materialien und einer eigens entwickelten Modulbauweise geschaffen, die mechanische Beanspruchungen aufnehmen kann und so die Lebensdauer des Peltier-Moduls verlängert. Dies wurde durch strengste Prüfungen nach aktuellen PCR-Qualifikationsstandards nachgewiesen.

Die Baureihe PCX ist in verschiedenen Abmessungen und Formen erhältlich, die eine flexible Auslegung von PCR-Temperaturzonen oder -Trays ermöglicht. Dieses kompakte Peltier-Modul bietet deutliche Vorteile im Vergleich zu anderen Arten von thermisch zyklierenden Apparaten, wozu neben einer präziseren Temperaturregelung und steileren Temperaturrampen auch ein erhöhter Wirkungsgrad gehört, wodurch sich die Ergebnisse deutlich verbessern und das PCR-Testen erheblich beschleunigt.

Weiterführende Informationen zur Baureihe PowerCycling PCX oder zu den Prüfprotokollen finden Sie auf lairdthermal.com.

Finden Sie mit dem [Thermal Wizard PCR Calculator](#) das beste Peltier-Modul für Ihre PCR-Anwendung.

Über Laird Thermal Systems

Laird Thermal Systems entwickelt Wärmemanagementlösungen für anspruchsvolle Anwendungen in den Bereichen Medizin, Industrie, Transport und Telekommunikation. Wir stellen eines der vielfältigsten Produktportfolios der Branche her, das von aktiven thermoelektrischen Kühlern und Baugruppen bis hin zu Temperaturreglern und Flüssigkeitskühlssystemen reicht. Unsere Ingenieure nutzen fortschrittliche thermische Modellierungs- und Managementtechniken, um komplexe Wärme- und Temperatursteuerungsprobleme zu lösen. Wir bieten ein breites Spektrum an Design-, Prototyping- und internen Testmöglichkeiten und arbeiten während des gesamten Produktentwicklungszyklus eng mit unseren Kunden zusammen, um Risiken zu reduzieren und die Markteinführung zu beschleunigen. Unsere weltweiten Fertigungs- und Supportressourcen helfen unseren Kunden, Produktivität, Betriebszeit, Leistung und Produktqualität zu maximieren. Laird Thermal Systems ist die optimale Wahl für standardmäßige oder kundenspezifische thermische Lösungen. Weitere Informationen finden Sie unter www.lairdthermal.com

Kontakt zu Laird Thermal Systems

Haben Sie eine Frage oder benötigen Sie weitere Informationen über Laird Thermal Systems? Bitte kontaktieren Sie uns über die Website www.lairdthermal.com.

Neueste-thermoelektrische-Technik-für-Echtzeit-PCR

Trademarks

© Copyright 2023 Laird Thermal Systems, Inc. All rights reserved. Laird™, the Laird Ring Logo, and Laird Thermal Systems™ are trademarks or registered trademarks of Laird Limited or its subsidiaries.