



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 10 657 T2 2005.02.10**

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 148 946 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 10 657.8**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/CA00/00119**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 903 455.4**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 00/47323**

(86) PCT-Anmeldetag: **09.02.2000**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **17.08.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **31.10.2001**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **12.05.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **10.02.2005**

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: **B01L 3/00**  
**C30B 7/00**

(30) Unionspriorität:

**2261326 09.02.1999 CA**

(73) Patentinhaber:

**nextal biotechnologie Inc., Montreal, Quebec, CA**

(74) Vertreter:

**Kreutzer, U., Dipl.-Phys., Pat.-Anw., 47119  
Duisburg**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**VIOLA, Jean-Pascal, Quebec H1K 1L3, CA;  
HOUDE, Christian, Quebec H3T 1E3, CA**

(54) Bezeichnung: **LABORVORRICHTUNG MIT VERSCHLUSSKAPPE UND KÜVETTEN FÜR KRISTALLZÜCHTUNG  
MITTELS DAMPFDIFFUSIONSVERFAHREN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung****GEBIET DER ERFINDUNG**

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Handhabung von molekularer und makromolekularer Kristallisierung. Im Einzelnen umfaßt die Vorrichtung einen Mulden- und Kappenaufbau zum Züchten von Proteinkristallen durch herkömmliche Dampfdiffusionstechniken. Die vorliegende Vorrichtung ist dadurch besonders vorteilhaft, daß sie das Vor-Befüllen der Mulde mit einer Lösung für Transport und Handhabung vor Verwendung durch einen Techniker erleichtert.

**HINTERGRUND DER ERFINDUNG**

**[0002]** Kristallographie ist ein ausgesprochen nützliches Instrument für Wissenschaftler und stellt daher ein Forschungsgebiet dar, das viel Interesse erregt. Es ist ein wirksames Mittel, das eine präzise und detaillierte Beschreibung der drei-dimensionalen Struktur der Moleküle liefert und ist eine große Hilfe beim Verstehen von deren Funktionen. Kristallographie von Makromolekülen wie Proteinen wird heute intensiv angewendet, sowohl wissenschaftlich als auch industriell.

**[0003]** Obwohl drei-dimensionale Strukturen von einfachen Proteinen durch Kristallisationsverfahren erhalten wurden, ist es nicht immer einfach, Kristalle aus Makromolekülen zu erhalten. Zum Beispiel können die bevorzugten Bedingungen für die Kristallisation eines gegebenen Moleküls mehrere Hundert wenn nicht Tausende von Versuchen erfordern. Dadurch bedingt wurden Mittel und Verfahren entwickelt, um eine große Zahl von Versuchen relativ schnell durchzuführen, einschließlich der Hängetrophen- und Sitztrophenverfahren. All diese Verfahren verwenden den Vorteil der Dampfdiffusion, um die Kristalle zu erhalten.

**[0004]** Das Hängetrophenverfahren ist derzeit die am meisten verwendete Technik zum Screening verschiedener Kristallisationsbedingungen von Makromolekülen wie Proteinen. Es umfaßt das Hängen eines Tropfens von ungefähr 2 bis 20 µl Lösung, die das zu kristallisierende Makromolekül und ein Präzipitationsmittel enthält, über eine Präzipitationslösung, wie herkömmliches Polyethylenglykol 20 % oder Ammoniumsulfat 40 %, enthalten in einem Behälter oder einer Mulde. Das System wird dann hermetisch verschlossen. Nach einer Weile erreicht die Dampfdiffusion des Lösungsmittels oder der Lösungsmittelmischungen zwischen dem Tropfen und der Lösung im Behälter ein Gleichgewicht. Das Endergebnis ist eine Verringerung von Wasser im Tropfen und ein Anstieg der Konzentration des Makromoleküls und Präzipitationsmittels darin, folglich die Kristallisation des Makromoleküls unter optimierten

Bedingungen bewirkend. Die eigentliche Technik zum Aufbau der Hängetrophen- oder Sitztrophenexperimente ist eine langwierige und schwierige Arbeit und muß durch qualifiziertes und erfahrenes technisches Personal durchgeführt werden.

**[0005]** Üblicherweise wird ein kommerziell erhältliches Tablett, hergestellt aus einem inerten thermoplastischen Material, das eine Mehrzahl von Behältern oder Mulden enthält, vorbereitet und die Präzipitationslösung wird von Hand in jeden Behälter oder Mulde gefüllt. Die Makromoleküllösung wird dann auf einer Glasplatte (Deckglas) mit dem Präzipitationsmittel gemischt und das Ganze wird über den Mulden umgedreht, so bewirkend daß die Makromoleküllösung über der Mulde hängt. Bevor eine Glasplatte über einer Mulde plaziert wird, wird der Rand jeder Mulde eingefettet um einen dichten Verschuß zu gewährleisten. Sorgfalt muß angewandt werden, wenn die Platte über jeder Mulde plaziert wird, da das Fett die Makromoleküllösung leicht kontaminieren kann. Der Kristallisationsvorgang wird mit der Hilfe eines Mikroskops verfolgt. Nachdem man den Kristall erhalten hat, wird die Glasplatte entfernt. Dies muß wiederum mit großer Sorgfalt erfolgen, um eine Kontamination des kristallisierten Makromoleküls mit Fett und/oder Brechen der Glasplatte zu verhindern. Hinzu kommt, daß die Platten kaum für irgendein Experiment wieder verwendbar sind, weil das Fett nur schwer entfernbar ist und ein Teil davon auf den Platten verbleibt.

**[0006]** Ein Vorteil der Hängetrophen- und Sitztrophenverfahren besteht darin, daß sie Screeningbedingungen für Kristallisation bereitstellen und tatsächlich eine Mikrokristallisationstechnik darstellen. Die Dampfdiffusion in dem hängenden oder sitzenden Tropfen ermöglicht das Screening eines weiten Bereichs von Bedingungen und erfordert eine relativ geringe Menge an Makromolekülen. Des Weiteren ermöglicht sie ein relativ klares Sichtbarmachen der Ergebnisse und die etwaigen Kristalle sind frei, d.h. sie sind nicht an irgendeine Oberfläche angeheftet oder geklebt.

**[0007]** Typischerweise werden mehrere hundert Experimente benötigt, um angemessene Kristallisationsbedingungen für die Herstellung von Kristallen mit hoher Qualität zu finden. Demgemäß sind Hängetrophen- und Sitztrophen-Experimente sehr arbeitsintensiv und erfordern qualifiziertes und erfahrenes technisches Personal. Zum Beispiel müssen mehrere Absaug- und Auftragsschritte von Bestandteilen, mehrere Einfettungsschritte usw. im experimentellen Aufbau durchgeführt werden. Des weiteren muß für jede Mulde ein einzelnes Deckglas von Hand umgedreht werden. Die Anzahl und Komplexität der Schritte kann daher eine unerwünscht weite Schwankung von experimentellen Ergebnissen hervorrufen.

**[0008]** Wie oben angegeben, wird üblicherweise Fett verwendet um eine Dichtung zwischen der Mulde und dem Deckglas zu schaffen. Andere Wege zum Abdichten des Systems sind vorgeschlagen worden. Zum Beispiel kann Fett durch Immersionsöl oder ein Klebeband ersetzt werden. Wie beim Fett weisen diese Dichtungsmittel ernsthafte Nachteile auf. Fett kann nicht immer einfach um den oberen Rand der Mulde aufgetragen werden und es ist eine zeitaufwendige Tätigkeit. Techniker, die diese Tätigkeit Tausende male wiederholen, leiden gelegentlich an körperlichen Schmerzen an ihren Händen. Andere wichtige Probleme und Risiken sind beim Manipulieren des Kristalls auf einem fettigen Deckglas vorhanden. Das Deckglas bricht manchmal während des Verfahrens, was eine Verletzung des Technikers bewirken kann, zusätzlich zum Verlust des Kristalls. Das Immersionsöl ist ebenfalls problematisch. Man muß ein bestimmtes Ölvolumen verwenden. Zuviel Öl führt zu einer Kontamination innerhalb der Mulde, während nicht genug zu einer nicht-hermetischen Abdichtung führen wird, was auf das Verdampfen der Präzipitationslösung hinauslaufen kann. Ein Klebeband ermöglicht schnellere und einfachere Handhabungen, aber alle Experimente werden am Ende des Versuchsaufbaus abgedichtet, so das experimentelle Schwankungen zwischen dem ersten und 24ten Tropfen eingeführt werden. Des Weiteren kleben Kristalle oft an dem Band, was die Gewinnung des Kristalls unmöglich macht, und die Tätigkeiten für die Gewinnung des Tropfens sind ebenfalls problematisch.

**[0009]** Diese Bedingungen förderten die Robotisierung des Verfahrens. Einige automatisierte Kristallisationsvorrichtungen existieren bereits. Die bekannte Cyberlab-200™ Vorrichtung verteilt Lösungen in Mulden, fettet den oberen Rand jeder Mulde, gießt Tröpfchen auf Deckgläser die von einem Vakuumarm gehalten werden, und plaziert die Deckgläser über die Mulden. Solch eine Vorrichtung weist jedoch immer noch einige Nachteile auf, nämlich einen komplizierten experimentellen Aufbau und den beträchtlichen Verbrauch an Fett. Außerdem ist eine solche Vorrichtung extrem teuer.

**[0010]** Einschlägige Literaturstellen auf diesem Gebiet schließen ein US-A-2,366,886; US-A-3,107,204; US-A-3,297,184; US-A-3,537,956; US-A-3,597,326; US-A-3,649,464; US-A-3,692,498; US-A-3,729,382; US-A-3,745,091; US-A-3,907,505; US-A-4,038,149; US-A-4,154,795; US-A-4,495,289; US-A-4,917,707; US-A-5,271,795; US-A-5,419,278 beschreibt eine Dampf-Gleichgewichtsvorrichtung zum Züchten und Screening von Proteinkristallen.

**[0011]** Es wäre daher höchst wünschenswert, eine Vorrichtung zum Kristallisieren von Makromolekülen zu entwickeln, die die obigen Unzulänglichkeiten

überwinden würde. Eine solche Vorrichtung würde die Notwendigkeit von äußeren Mitteln um die Mulde und die Abdeckung abzudichten, wie Fett, Öl oder Klebeband beseitigen, und wäre vorzugsweise einfach zu handhaben, entweder von Hand oder automatisch. Schließlich würde der Vorgang des experimentellen Aufbaus der Vorrichtung stark erleichtert und beschleunigt, während gleichzeitig mögliche Kontaminationsrisiken der etwaigen Kristalle beseitigt würden. Schließlich sollte eine solche Vorrichtung für verschiedene Kristallisationsverfahren wie Hängetropfen- und Sitztropfenverfahren verwendbar sein.

## ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0012]** Gemäß der vorliegenden Erfindung wird eine Vorrichtung gemäß Anspruch 1 und ein Verfahren gemäß Anspruch 20 bereitgestellt. Bevorzugte Ausführungsformen werden in den abhängigen Ansprüchen beschrieben.

## IN DEN ABBILDUNGEN

**[0013]** Fig. 1 zeigt eine perspektivische Ansicht auf einen Kappen- und Muldenaufbau gemäß der vorliegenden Erfindung;

**[0014]** Fig. 2 zeigt eine Schnittansicht einer bevorzugten Ausführungsform einer Kappe;

**[0015]** Fig. 3 zeigt eine perspektivische Ansicht eines Werkzeugs, das ausgebildet ist, um eine Kappe anzubringen und von der Mulde zu entfernen;

**[0016]** Fig. 4 zeigt eine Schnittansicht des Werkzeugs von Fig. 3; und

**[0017]** Fig. 5, 6 und 7 zeigen andere Ausführungsformen des Kappen- und Muldenaufbaus gemäß der vorliegenden Erfindung.

## DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

**[0018]** Es ist eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung eine kristallbildende Vorrichtung unter Verwendung des Dampfdiffusionsverfahrens bereitzustellen. Die Vorrichtung umfaßt eine Mulde und eine durchsichtige Kappe, ausgestaltet um die Mulde zu verschließen und einen abgedichteten Raum zu bilden, wobei die Mulde verschlossen wird, ohne das ein Dichtungsmaterial wie Fett, Öl, Klebeband oder Ähnliches zwischen der Mulde und der Kappe zugefügt werden muß. Die Kappe wird aus durchsichtigem Material hergestellt, um ein Untersuchen und Verfolgen des Kristallwachstums zu ermöglichen, wie auch die Handhabung des Kristalls unter einem Mikroskop. Die vorliegende Vorrichtung stellt daher einen wichtigen Fortschritt bei Verfahren zum Züchten von

Makromolekulkristallen dar, insbesondere auf dem Gebiet der Hänge- und Sitztropfen.

**[0019]** Wegen seiner Einfachheit, können die Tätigkeiten des Füllens der Mulden mit der Präzipitationslösung, des Plazierens eines Tropfens der Makromoleküllösung auf der Kappe und des Abdichtens der Mulde durch das in Position bringen der Kappe über der Mulde durch jeden kompetenten Techniker, nicht nur durch erfahrenes Personal, erreicht werden.

**[0020]** In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird eine Mehrzahl von Mulden zusammen geformt, zum Beispiel in einem Tablett, umfassend 4 Reihen von jeweils 6 Mulden, mit entsprechenden Kappen, die darauf bereitgestellt werden. Das sich ergebende Tablett und Kappen können wahlweise mit einem hydrophoben Agens, wie einem silikonisierendem Agens, behandelt werden.

**[0021]** Wegen der Durchsichtigkeit der Kappe und der unteren Oberfläche der Mulde, kann die Kristallisierung bei minimaler Handhabung verfolgt werden, und ohne das Dampfgleichgewicht innerhalb jeder Mulde zu stören. Weiterhin ist das Sichtbarmachen der Ergebnisse unter dem Mikroskop einfach, weil die Kappe aus durchsichtigem oder durchscheinendem (klarem) Material hergestellt ist.

**[0022]** Vorzugsweise ist das Material für das Tablett und die Kappe dasselbe und umfaßt Materialien, die bei angemessenen Kosten leicht geformt werden können. Das Material sollte für längere Zeitabschnitte gegenüber den verschiedenen chemischen Produkten, die in der Mulde und auf der Kappe vorhanden sind, stabil sein. Das Material sollte vorzugsweise kein Wasser absorbieren und von hoher optischer Qualität sein, um die das Arbeiten und Beobachten unter einem Mikroskop zu erleichtern. Geeignete Beispielsmaterialien schließen verschiedene Thermoplastika wie Polystyrol, Polypropylen, Polycarbonat, Polyacrylat, Polymethacrylat, Acrylnitrilstyrol-Copolymere, Nitril-Acrylnitrilstyrol-Copolymere Polyphenylenoxid, Phenoxiharze, usw. ein, wobei das am stärksten bevorzugte Material Polystyrol ist.

**[0023]** Eine weitere Aufgabe der Erfindung besteht darin, eine kristallbildende Vorrichtung bereitzustellen, welche die Handhabung der Wachstumskristalle unter dem Mikroskop ohne eine Übertragung von der Kappe ermöglicht, wo Lösungen direkt, ohne jede Übertragung der Kristalle, in einer fettfreien Umgebung zugefügt werden können.

**[0024]** Ein weiterer wichtiger Vorteil der Vorrichtung der vorliegenden Erfindung besteht darin, daß sobald eine Serie von Experimenten vervollständig ist, das Tablett wiederverwendet werden kann, einfach durch Nehmen einer anderen Serie von Kappen, die einen Tropfen einer Lösung enthalten, welche ein zu kristal-

lisierendes Makromolekül enthält, und erneutes Anbringen der Kappen über den Mulden. Des weiteren kann eine gegebene Kappe von seiner ursprünglichen Mulde entfernt und auf einer anderen verriegelt werden, welche eine andere Präzipitationslösung enthält.

**[0025]** Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zum Bilden von Kristallen eines Makromoleküls, wobei das Verfahren die Schritte umfaßt des Eingebens einer Präzipitationslösung in eine Mulde; Bilden eines Tropfens in einer Kappe, enthaltend Verriegelungsglieder zum Verriegeln der Kappe über der Mulde; und Verriegeln und Abdichten der Mulde. In einer bevorzugten Ausführungsform wird vorzugsweise ein Ring, hergestellt aus einem elastomeren Material wie Polypropylen, einem Ethylen-Polypropylen-Copolymer, Teflon<sup>TM</sup>, usw., zwischen der Kappe und der Mulde bereitgestellt. In einer weiteren, bevorzugten Ausführungsform kann die Mulde im voraus befällt und fest abgedichtet werden, so daß ein Tablett dem Techniker "Fertig-zum-Gebrauch" bereit gestellt wird.

**[0026]** Wegen der Ergonomie der vorliegenden Erfindung, ist die Kappe leicht in Eingriff zu bringen, so daß kein Bedarf für besondere handwerkliche Geschicklichkeit besteht, im Vergleich zu der Verwendung von herkömmlichen, dünnen, zerbrechlichen Mikroskopdeckgläsern. Das Vorhandensein eines Hohlraums in der Oberfläche der Kappe, die der unteren Oberfläche der Mulde zugewandt ist, ermöglicht die Zugabe von Flüssigkeit direkt über dem Tropfen, nachdem die Kappe umgedreht auf einen Tisch gelegt wurde, ohne daß die Kristalle in eine andere Mulde übertragen werden müssen, begrenzt so die Handhabungen, die die zerbrechlichen Kristalle ruinieren könnten.

**[0027]** Die Verwendung des Kappen- und Muldenaufbaus der vorliegenden Erfindung kann in einer direkten Art und Weise automatisiert werden, durch Bereitstellen der Extremität eines automatischen Arms mit einem einfachen Greifelement, das ein Ende aufweist, welches mit einer Struktur versehen ist, die ausgebildet, die Kappe lösbar zu greifen. Es besteht kein Bedarf für die Anwendung von Fett oder die Handhabung von zerbrechlichen Deckglasstücken. Das Greifelement kann auch von Hand durch einen Techniker bedient werden, wie weiter unten beschrieben.

**[0028]** Der Kappen- und Muldenaufbau der vorliegenden Erfindung findet auch Anwendungen auf dem Gebiet der Zellkulturen, molekularer oder zellulärer Biologie usw.

**[0029]** In einer am meisten bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die Mulde vorher gefüllt und mit der Kappe abgedichtet. Der Techniker erhält einen Aufbau "fertig zum Gebrauch", was die zeitrau-

bende Tätigkeit des Füllens jeder Mulde mit der entsprechenden Präzipitationslösung beseitigt. Der Käufer kann so viele Aufbauten wie gewünscht, mit der gleichen oder unterschiedlichen Präzipitationslösungen bestellen. Für Transportzwecke kann die Kappe auf dem Aufbau durch einen Film ersetzt werden, um einen Kontakt der Präzipitationslösung mit der Kappe zu verhindern. Ein solcher Kontakt würde das Reinigen der Kappe vor deren Verwendung notwendig machen. Man kann auch eine Kappe für Transportzwecke und eine andere Kappe zum Durchführen der Experimente verwenden. Es ist wichtig, daß die Mulde abgedichtet wird, um Verdunstung und Überlaufen der Präzipitationslösung zu vermeiden, entweder während des Transports der vorgefüllten Mulden oder während der Experimente.

**[0030]** Bezugnehmend auf die Zeichnungen, die bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung zeigen, zeigt **Fig. 1** einen Kappen- und Muldenaufbau **10**, welcher ein Tablett oder eine Basisplatte **12** umfaßt, welches) mit einer Mehrzahl von Mulden **14** und entsprechenden Kappen **16** versehen ist. Der Aufbau **10** kann auch eine Abdeckung **18** umfassen, die für Transport- oder Lagerungszwecke verwendet wird. Die bevorzugte Form der Abdeckung **18** umfaßt einen Einsatz (nicht gezeigt) an jeder Ecke, der das Zurückhalten der Abdeckung über den Mulden ermöglicht, ohne sie zu berühren. Die Abdeckung **18** ermöglicht außerdem die Lagerung von mehreren Tabletts mit Experimenten übereinander. Das Tablett **12** umfaßt einen Rand **20**, der über die vier Seitenwände davon hinausragt, und ist an zwei gegenüberliegenden Seitenwänden zur einfacheren Handhabung des Tabletts durch den Techniker mit Fingergriff-Oberflächen **22** ausgestattet, wie jenen, die in der US 4,038,149 beschrieben werden. Die Fingergriff-Oberflächen **22** werden bereitgestellt um Unfälle zu vermeiden und fördern die Handhabung der abgedeckten und nicht-bedeckten Tabletts stark. Die Abdeckung **18** umfaßt einen Bereich **24**, der so ausgebildet ist, daß er um die Fingergriff Oberflächen **22** herum in Eingriff kommt, zum genauen Passen über den Aufbau **10**.

**[0031]** **Fig. 2** zeigt eine Schnittansicht der Kappe **16**. Wie man sehen kann, umfaßt die Kappe **16** eine zylindrische Spalte **26**, in der ein aus einem elastischen Material hergestelltes O-Ringelement **28** eingesetzt ist. Ein solches Material, obwohl es optional ist, wird bereitgestellt, um eine angemessene Abdichtung sicherzustellen, wenn die Kappe **16** über dem oberen Rand **30** der Mulde **14** befestigt wird. Die innere Oberfläche **32** der Spalte **26** weist einen Abschnitt oder eine Wulst **34** auf, der/die über die ebene Oberfläche **36** hinausragt, wodurch ein Hohlraum **38** gebildet wird. Die Oberfläche **36** kann konkav oder konvex sein, aber die ebene Konfiguration, die in **Fig. 2** gezeigt wird, ist stark bevorzugt. Wie oben gesagt, ist das Material der Kappe **16** so, daß es ausrei-

chend durchsichtig oder durchscheinend ist, so daß die Kappe **16** direkt zur Beobachtung und/oder Handhabung der Kristalle unter ein Mikroskop gelegt werden kann.

**[0032]** Jede Kappe **16** umfaßt ein Paar aus Verriegelungselementen **40**, die sich diametral gegenüber stehen und einen Wulstabschnitt **41** umfassen. Die Kappe **16** umfaßt außerdem einen weiteren Rand **46**, der mit einer Reihe von darunter liegenden Abstandshaltern **45** versehen ist. Sobald die Präzipitationslösung in die Mulde **14** gefüllt wurde, legt der Techniker die Kappe **16** umgedreht auf eine flache Oberfläche und setzt einen Tropfen der Makromolekül-enthaltenen Lösung auf die Oberfläche **36**. Die Kappe **16** wird dann vorsichtig umgeklappt und jedes Verriegelungselement **40** wird in eine entsprechende Öffnung **42** eingesetzt, die auf der oberen Oberfläche **44** des Tabletts **12** vorhanden ist, bis der Anschlag vom oberen Rand **30** der Mulde **14** mit dem O-Ringelement **28** innerhalb der Spalte **26** erreicht ist. Die Kappe **16** wird dann gedreht, so daß Verriegelungselemente **40** jeweils in eine Spalte **43** gleiten, die eine geringere Breite aufweist als die Öffnung **42** und auf einen Bereich der Peripherie der Mulde **14** hinausreicht, bis die obere Oberfläche des Bereichs **41** sich vollständig unter der oberen Oberfläche **44** befindet, wodurch die Mulde wirksam abgedichtet und die Kappe **16** festgehalten wird. In einer am meisten bevorzugten Ausführungsform ist ein Abschnitt **47** des Bereichs **41** konisch zulaufend, um das Gleiten unter die obere Oberfläche **44** zu erleichtern. Um eine noch bessere Verriegelung und ein noch besseres In-Position-Halten der Kappe sicherzustellen, wird ein kleiner Höcker (nicht gezeigt) auf Abschnitt **49** bereit gestellt, der ausgebildet ist, nach dem vollständigen Einführen des Bereichs **41** unter die Oberfläche **44** in eine entsprechende Vertiefung (nicht gezeigt), die unter der Oberfläche **44** vorhanden ist, zu passen.

**[0033]** Um die Kappe **16** auf der Mulde **14** zu platzieren, oder sie davon zu entfernen, kann ein Werkzeug **48** verwendet werden, wie in **Fig. 3** und **4** gezeigt. Das Werkzeug **48** umfaßt einen Körper **50**, eingeteilt in einen Abschnitt **52**, der in einer Weise geformt ist, daß er das Halten durch einen Techniker oder einem automatisiertem Arm erleichtert; einen zylindrischen Abschnitt **54** mit einer äußeren Oberfläche **57**, die einen Umfang, der etwas größer ist als derjenige des Randes **46**, und eine innere Oberfläche **59** aufweist, die einen Umfang aufweist, der etwas geringer ist als derjenige des Randes **46**. Werkzeug **48** umfaßt weiter zwei sich diametral gegenüber stehende kappen-greifende Elemente **60**, die jeweils ausgestattet sind mit einem Greiffinger **62**. Das Greifelement **60** kann auf der inneren Oberfläche **59**, direkt auf dem Rand **66** oder auf der äußeren Oberfläche **57** zur Verfügung gestellt werden. Beim Betrieb wird das Werkzeug **48** über der Kappe **16** platziert, so daß jeder Finger **62** in eine Spalte **64**, die in den Rand **46** geschnit-

ten sind, eingeschoben wird, bis mindestens ein Teil **65** jedes Elements **60** an den Rand **46** anstößt. Das Werkzeug **48** wird dann gedreht bis der Greiffinger **62** vollständig unter dem Rand **46** in Eingriff gebracht wurde und die Drehbewegung wird aufrechterhalten bis die Verriegelungsglieder **40** mit den Spalten **42** fluchten. Die Kappe **16** wird dann einfach hochgezogen. Um die Kappe wieder an die Stelle zu bringen, wird das Verfahren in einer umgekehrten Weise durchgeführt. Die äußere Oberfläche **53** des Abschnittes **52** sollte eben sein, so daß sie in stabiler Weise auf einen Tisch oder unter ein Mikroskop gelegt werden kann und es dem Techniker ermöglicht, die Kristalle zu beobachten oder an ihnen zu arbeiten. Um direkt unter einem Mikroskop arbeiten zu können, muß die Oberfläche **53** eine Öffnung umfassen, die vorzugsweise dem inneren Durchmesser des zylindrischen Anteils **54** entspricht (siehe Fig. 4).

**[0034]** Fig. 5 zeigt eine andere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung. Der Kappen- und Muldenaufbau **100**, der ein Tablett oder eine Grundplatte (nicht gezeigt) umfaßt, ist ausgestattet mit einer Mehrzahl von Mulden **112** und entsprechender Kappe **114**, die einen zylindrischen Spalt **116** umfaßt, in dem ein O-Ringelement **118** eingefügt ist, das aus einem elastischen Material hergestellt ist. Wie bei der vorher gezeigten Ausführungsform wird der O-Ring, obwohl optional, bereitgestellt, um eine angemessene Abdichtung sicher zu stellen.

**[0035]** Jede Kappe **114** umfaßt ein Paar von Verriegelungselementen **120**, die sich diametral gegenüberstehen und einen Randabschnitt **122** umfassen. Die Kappe **114** wird in Position auf dem Tablett verriegelt durch Einführen jedes Verriegelungselements **120** in eine entsprechende Öffnung **124**, die auf der oberen Oberfläche **126** des Tablett vorgesehen ist, bis die untere Oberfläche **128** von Kappe **114** flach auf der oberen Oberfläche **126** des Tablett liegt. Die Kappe **114** wird dann gedreht, so daß die Verriegelungselemente **120** in einen Spalt **130** gleiten, der eine Breite aufweist, die geringer ist als diejenige der Öffnung **124** und auf einen Teil der Peripherie von Mulde **112** hinausragt, bis die obere Oberfläche des Randabschnitts **122** sich vollständig unter der oberen Oberfläche **126** befindet, wodurch die Mulde wirksam abgedichtet und die Kappe **114** festgehalten wird.

**[0036]** Fig. 6 zeigt eine andere einfache Variation der vorliegenden Erfindung, wobei die obere Oberfläche **152** einer Mulde **150** einen Spalt **154** entlang ihres Umfangs umfaßt und ausgebildet ist, ein mit einer Kappe **158** gekoppeltes O-Ringelement **156** aufzunehmen. Der Abschnitt von Spalt **154** ist so, daß er etwas kleiner ist als der von Element **156**, so daß beim Einfügen in den Spalt eine undurchlässige Abdichtung durch das Verriegeln der Kappe **158** auf der Mulde **150** gebildet wird, ohne die Notwendigkeit irgendeines Klebemittels oder Fetts.

**[0037]** Fig. 7 zeigt eine weitere Ausführungsform der Erfindung, wobei die Kappe **170** auf die Mulde **172** geschraubt wird.

**[0038]** Der vorliegende Kappen- und Muldenaufbau ist besonders sowohl für Hängetropfen- als auch für Sitztropfen-Kristallisationsverfahren geeignet. Bezüglich des Sitztropfenverfahrens, obwohl in den Zeichnungen nicht konkret gezeigt, wird jeder Fachmann ohne weiteres erkennen, daß jede herkömmliche Tropfenunterlage in die Mulde eingesetzt oder geformt werden kann. Beispiele für solche Sitztropfenunterlagen schließen die Micro-Bridges™ oder die Sitztropfen-Glasstäbe, hergestellt und verkauft durch Hampton Research (Laguna Hills, Kalifornien), ein.

**[0039]** Jede Mulde wird sorgfältig mit einer ausgewählten Equilibrierungslösung gefüllt. Nachfolgend wird ein Tropfen eines ausgewählten Proteins auf der Kappe abgesetzt. Die Form und Struktur der unteren Oberfläche kann variiert werden, um optimale Ergebnisse für eine bestimmte zu kristallisierende Proteinlösung zu erhalten, zum Beispiel wenn Lösungen mit geringer Oberflächenspannung verwendet werden, einschließlich detergenzhaltige Proteinlösungen. Die Zugabe der Equilibrierungslösung und der Proteintropfen zur Vorrichtung kann entweder von Hand oder durch eine kommerzielle, automatische Pipettier Vorrichtung durchgeführt werden, und das Abdichten der Kappen über der Lösung kann ebenfalls von Hand oder in einer automatisierten Weise durchgeführt werden.

**[0040]** Während die Erfindung in Verbindung mit bestimmten Ausführungsformen davon beschrieben wurde, wird man verstehen, daß die vorliegende Erfindung ebenso nach Ausführen von entsprechenden Modifikationen an den oben beschriebenen Ausführungsformen anwendbar ist, wobei die Erfindung nur durch den Schutzbereich der hieran angehängten Ansprüche definiert und begrenzt wird.

## Patentansprüche

1. Vorrichtung zum Bilden von Kristallen durch Dampfdiffusion, umfassend ein Tablett (**12**), das mit einer Mehrzahl von Mulden (**14**; **112**; **150**; **172**) versehen ist, wobei jede Mulde der Mehrzahl von Mulden zum Aufnehmen einer Präzipitationslösung an einem oberen Ende davon offen ist, wobei das Tablett (**12**) eine obere Oberfläche (**44**; **126**), einen Boden und eine aufrechte Umfangswand, welche sich von der oberen Oberfläche zum Boden erstreckt, umfaßt, sich die Mehrzahl von Mulden von der oberen Oberfläche abwärts erstreckt, einzelne entfernbare Kappen (**16**; **114**; **158**; **170**) zum gesonderten und unabhängigen Abdecken jeder aus der Mehrzahl von Mulden vorgesehen sind, jede der einzelnen entfernbaren Kappen eine Unter-

seite aufweist, welche eine Trägeroberfläche (36) zum Aufhängen eines Tropfens einer Lösung definiert, die ein Molekül oder ein Makromolekül enthält, welches über der Präzipitationslösung, die in der zugeordneten Mulde enthalten ist, kristallisiert werden soll,

und die einzelnen entfernbaren Kappen zum Ermöglichen der Prüfung und Überwachung von Kristallwachstum ausreichend transparent sind,

**dadurch gekennzeichnet**, daß:

jede der einzeln entfernbaren Kappen weiterhin mit einem einstückig angeformten Verriegelungsglied (40; 120; 156) versehen ist, das mit einem Zusammenwirkungsmittel (42, 43; 124, 130; 154), welches jeder aus der Mehrzahl von Mulden zugeordnet ist, in Eingriff gebracht werden kann, um die einzeln entfernbaren Kappen auf abgedichtete Weise lösbar an der Mehrzahl von Mulden zu verriegeln.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Mulden (14; 112; 150; 172) und die Kappen (16; 114; 158; 170) zylindrisch sind.

3. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sich ein Rand (30) jeder Mulde (14) über die obere Oberfläche (44) des Tablett (12) hinaus erstreckt.

4. Vorrichtung nach einem beliebigen der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Kappe (16; 144) rohrförmig ist und das Verriegelungsglied gleichmäßig voneinander beabstandete Verriegelungselemente (40; 120) aufweist, wobei jedes Verriegelungselement in eine entsprechende Öffnung (42; 124) in der oberen Oberfläche des Tablett dem Rand der Mulde (14; 112) benachbart verriegelnd eingeführt werden kann.

5. Vorrichtung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß jede Kappe einen rohrförmigen Abschnitt rund um eine äußere Oberfläche davon umfaßt und dadurch dort dazwischen einen zylindrischen Spalt (26) definiert, welcher ein einem oberen Ende des Spalts (26) geschlossen ist, wobei der Spalt (26) ausgebildet ist, um darin den Rand (30) einer zugeordneten Mulde (14) aufzunehmen, wobei der rohrförmige Abschnitt die damit verbundenen Verriegelungselemente (40) umfaßt.

6. Vorrichtung nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß jedes Verriegelungsglied (40) eine Zunge umfaßt, die sich vom oberen zum unteren Ende der Kappe (16) erstreckt, wobei die Zunge einen Abschnitt (41) umfaßt, der sich senkrecht zur Außenseite der äußeren Kappenoberfläche erstreckt.

7. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein O-Ring-Element (156) mit jeder Kappe (158) verbunden ist und eine obere Oberfläche (152) jeder Mulde (150) einen Spalt (154) ent-

lang ihrem Umfang umfaßt, der ausgebildet ist, um das O-Ring-Element aufzunehmen, um die Kappe (158) an der Mulde (150) zu verriegeln.

8. Vorrichtung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß ein elastomeres Material (28; 118) in den Spalt (26; 116) zwischen dem Rand der Mulde und dem oberen Ende des Spalts eingesetzt ist.

9. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß jede Kappe einen Hohlraum (38) in einer Oberfläche (36) umfaßt, welche der Bodenfläche der zugeordneten Mulde (14) zugewandt ist und ausgebildet ist, um einen Tropfen einer molekül- oder makromolekülhaltigen Lösung aufzunehmen.

10. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß der Hohlraum (38) eine flache Bodenfläche aufweist.

11. Vorrichtung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Hohlraum (38) eine Umfangswand (34) umfaßt, welche sich senkrecht zur flachen Bodenfläche (36) erstreckt.

12. Vorrichtung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß jede Kappe auf einer äußeren Oberfläche davon einen Rand (46) aufweist, wobei der Rand gleichmäßig voneinander beabstandete Spalten (64) umfaßt.

13. Vorrichtung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß sie weiterhin ein Werkzeug (48) zum Anbringen der Kappe an der Mulde von einer unverriegelten Position in eine verriegelte Position oder aber zum Lösen der Kappe aus einer verriegelten Position in eine unverriegelte Position umfaßt, wobei das Werkzeug einen zylindrischen Abschnitt (54) und Kappengreifelemente (60), die mit Greiffingern (62) versehen sind, um mit den Spalten (64), die auf dem Rand (46) der Kappe vorgesehen sind, zusammenzuwirken, zum lösbaren Ergreifen der Kappe umfaßt, wobei das Werkzeug weiterhin einen Griffabschnitt (52) zum Ergreifen durch einen Techniker oder durch einen automatisierten Arm umfaßt.

14. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie weiterhin eine Abdeckung (18) umfaßt, die über dem und rund um das Tablett (12) angeordnet ist.

15. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Tablett (12) weiterhin gleichmäßig voneinander beabstandete Fingergriffoberflächen (22) auf ihrer Umfangswand umfaßt.

16. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Tablett (12) und die Kappen (16; 114; 158; 170) aus einem transparenten oder transluzenten Material hergestellt sind.

17. Vorrichtung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß das Material aus einer Gruppe von Materialien ausgewählt wird, umfassend: Polystyrol, Polypropylen, Polycarbonat, Polyacrylat, Polymethacrylat, Acrylnitril-Styrol-Copolymere, Nitril-Acrylnitril-Styrol-Copolymere, Polyphenylenoxid, Phenoxyharze und Mischungen daraus.

18. Vorrichtung nach Anspruch 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Verriegelungsglied (**40**; **120**) und das Zusammenwirkungsmittel (**42**, **43**; **124**, **130**) miteinander drehbar in Eingriff gebracht werden können, um die Kappe an der Mulde zu verriegeln oder davon zu entriegeln.

19. Vorrichtung nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß das Verriegelungsglied und das Zusammenwirkungsmittel durch Schrauben der Kappe (**170**) auf die Mulde (**172**) miteinander in Eingriff gebracht werden können.

20. Verfahren zum Bilden von Kristallen durch Dampfdiffusion, umfassend die Schritte des Eingebens einer Präzipitationslösung in eine Mulde (**14**), welche in einem Tablett (**12**) angeordnet ist, des Vorsehens eines Tropfens einer Lösung, die ein Molekül oder ein Makromolekül enthält, auf einer Trägeroberfläche (**36**), wobei die Trägeroberfläche (**36**) auf der Unterseite einer transparenten Kappe (**16**) definiert ist, wobei die Kappe (**16**) vorgesehen ist, um eine Mulde, die sich von einer oberen Oberfläche (**44**) des Tablett (**12**) abwärts erstreckt, gesondert und unabhängig abzudecken, des Wendens der Trägeroberfläche (**36**) über der Mulde (**14**), welche die Präzipitationslösung enthält, so daß der Tropfen über der Präzipitationslösung hängt, dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren weiterhin den Schritt des Verriegelns der entfernbaren Kappe an der Mulde durch Ineingriffbringen eines einstückig angeformten Verriegelungsglieds (**40**), welches auf der Kappe vorgesehen ist, mit einem Zusammenwirkungsmittel (**42**, **43**), welches der Mulde zugeordnet ist, umfaßt, um die Mulde abzudichten.

21. Verfahren nach Anspruch 20, wobei der Schritt des Verriegelns das Drehen des Verriegelungsglieds (**40**) relativ zum Zusammenwirkungsmittel (**42**, **43**) umfaßt.

22. Verfahren nach Anspruch 20, umfassend den Schritt des Vorbefüllens der Mulde (**14**) mit der Präzipitationslösung und des Abdichtens der Mulde vor dem Versand an einen Käufer.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen



Anhängende Zeichnungen

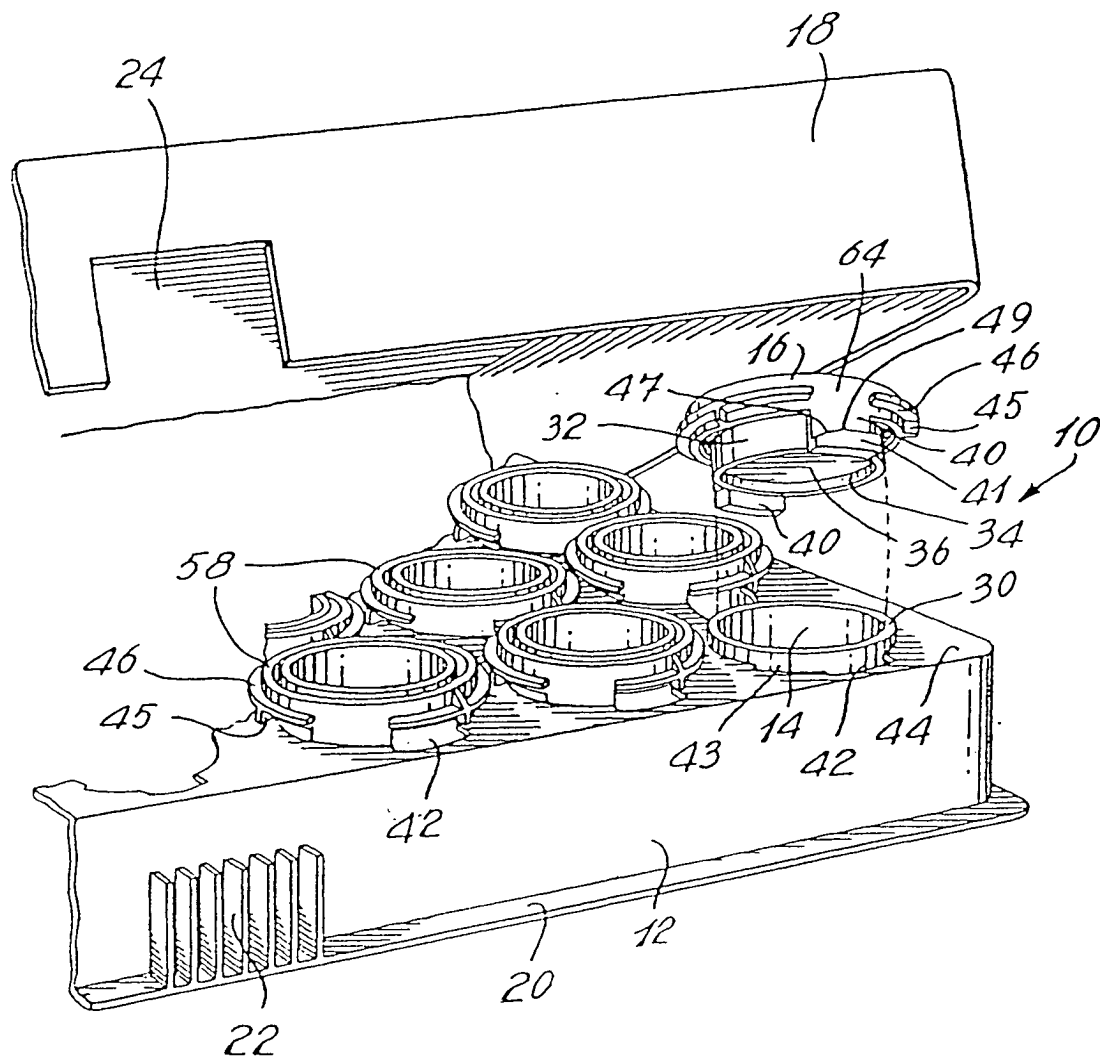
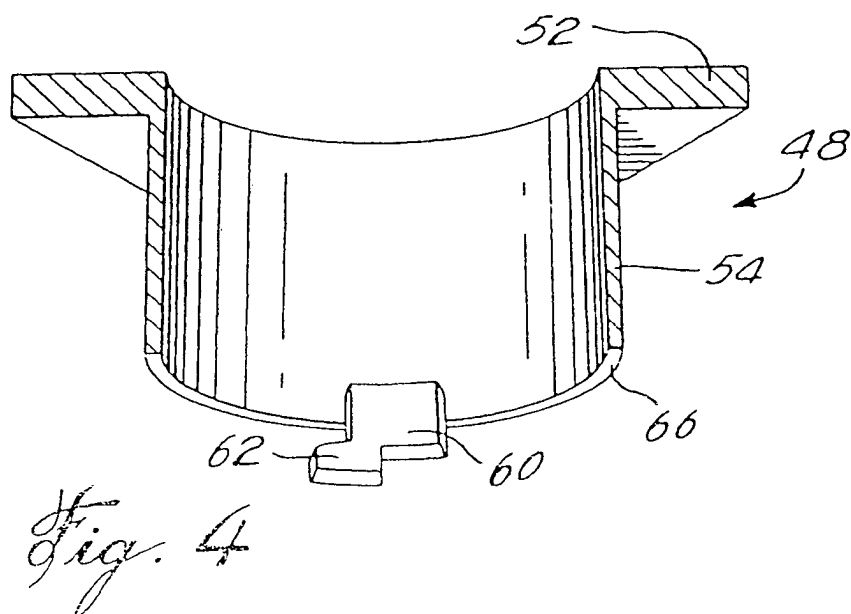
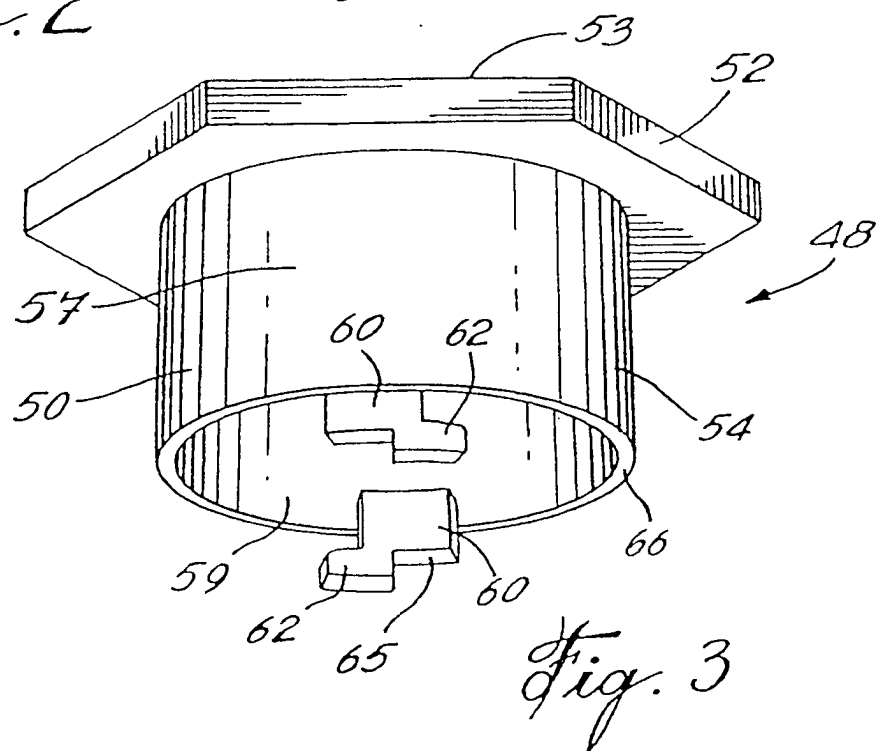
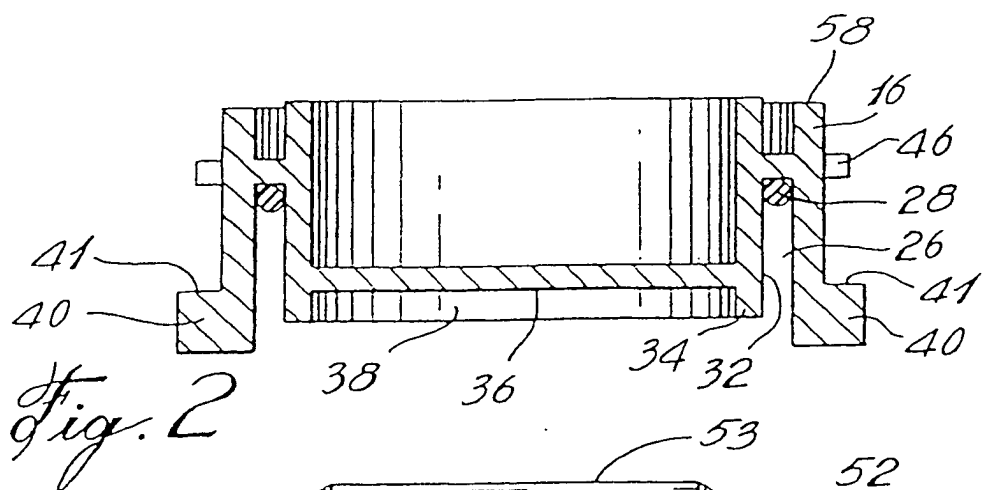
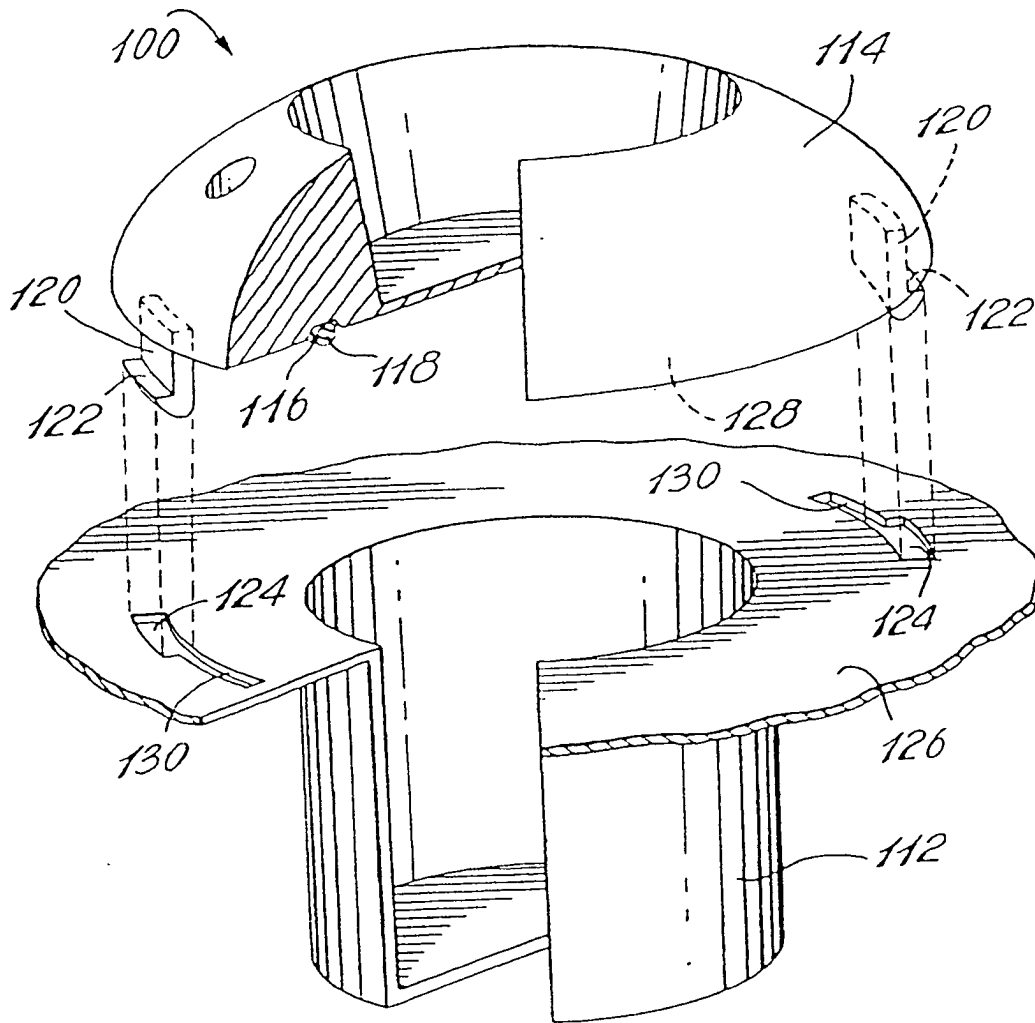
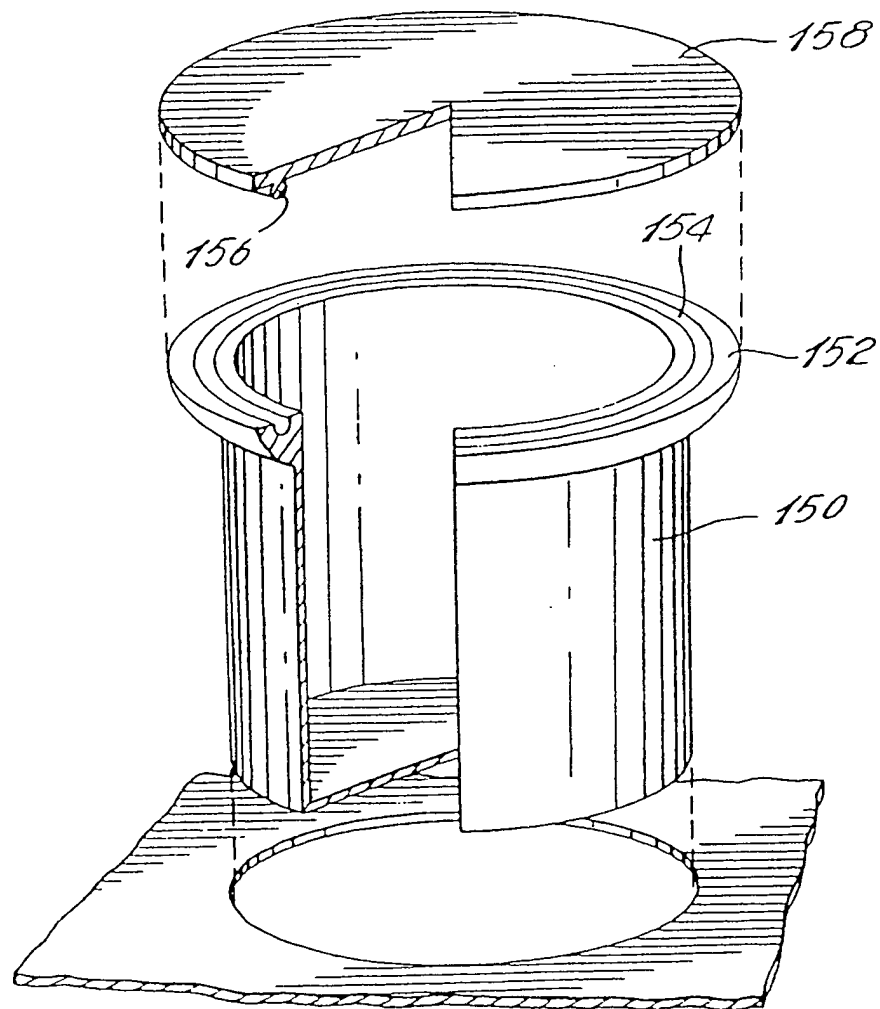


Fig. 1

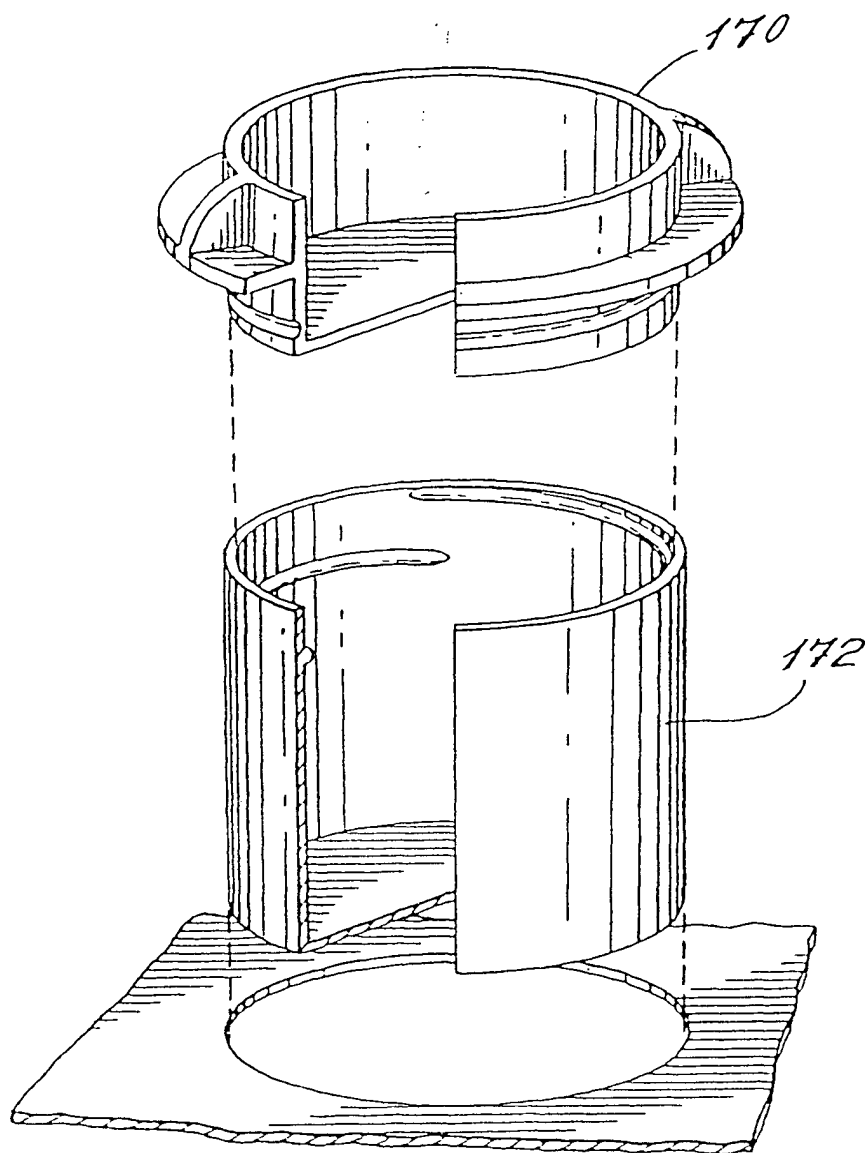




*Fig. 5*



*Fig. 6*



*Fig. 7*