



TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

(57) Zusammenfassung: Aufgabe war es, eine Vorrichtung zu schaffen, mit welcher Biomoleküle in Proben im Volumenbereich von <1 µl bis 500 µl auf möglichst einfache, aufwandgeringe und praktikable Art und ohne Beschädigungsrisiko für die Vorrichtung schnell, reproduzierbar und verlustfrei aufgenommen, behandelt und aufbewahrt werden können. Es werden Probengefäße (33) vorgeschlagen, welche in Größe und Gestalt als Formund Lage stabile beidseitig offene Kapillaren ausgebildet sind, deren Längswandungen vollständig oder teilweise aus einer semipermeablen Membran bestehen. Die Erfindung dient dem universellen und exakten Handling kleinvolumiger Proben.

Vorrichtung zur Aufnahme, Behandlung und Aufbewahrung kleinvolumiger Proben

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zum möglichst universellen Handling, das heißt für die Aufnahme, die unterschiedlichsten Behandlungen und zur Aufbewahrung von Proben in µl-Volumina.

Wesentliche Bestandteile biologischer Proben, Biomoleküle, Analyte, sowie wesentliche Analyte sind im Sinne der Erfindung synonym verwendete Begriffe, insbesondere für diejenigen Bestandteile in zu untersuchenden Proben, die im Fokus des Interesses des Untersuchers bzw. Anwenders stehen und zusammen mit der sog. Matrix enthalten sind. Dies sind beispielsweise Metabolite, Nukleinsäuren, Peptide, Proteine, Partikel, Zellen, Viren, Mikroorganismen, Sporen, Markierungsstoffe, Enzyme, Substrate oder -produkte und weitere, sowohl in ihrer Ganzheit, bzw. Teile davon und/oder Komplexe daraus.

Unter Matrix im Sinne der Erfindung werden diejenigen Bestandteile einer Probe verstanden, die nicht im Fokus des Interesses stehen und die oftmals Analyseverfahren stören, wie insbesondere das Lösungsmittel und weitere Begleitstoffe, wie beispielsweise Salze, Detergenzien, Puffer, Metallionen, Antibiotika und weitere.

Meistens unterscheiden sich die wesentlichen Bestandteile einer Probe von den Matrixbestandteilen durch ihre Größe bzw. Molekülgröße.

Biologische Proben müssen im Verlauf von präparativen und analytischen Verfahren bezüglich ihrer wesentlichen Bestandteile vielfältig behandelt werden.

Solche Behandlungen sind der Zusatz von Hilfsreagenzien, wie beispielsweise Harnstoff oder Guanidin zum Denaturieren, Mercaptoethanol oder Dithiotreitol zum Reduzieren, Jodacetamid zum Modifizieren, Enzyme und deren Cofaktoren für die selektive Elimination von Modifikationen oder den selektiven Verdau von wesentlichen Analyten, Substrate zum Nachweis von enzymatischen Aktivitäten, Inhibitoren zur Unterdrückung unerwünschter enzymatischer Reaktionen, Capture-Reagenzien zum Binden unerwünschter Stoffe und andere mehr.

Häufig ist es erforderlich, die wesentlichen Bestandteile biologischer Proben in ein anderes Medium, eine andere Matrix (s. o.), zu bringen, um die Kompatibilität zu nachfolgenden Reinigungsschritten bzw. zu Analyseverfahren herzustellen. Da oftmals

nur geringe Mengen von mitunter sehr kostbaren Proben zur Verfügung stehen sowie meist mehrere Analyseverfahren für eine Probe zur Anwendung kommen, empfiehlt es sich, möglichst nur sehr geringe Teilmengen der Probe in das entsprechende zur jeweiligen Analyse kompatible Medium zu transferieren. Für massenspektrometrische

5 Untersuchungen ist darüber hinaus eine sog. Entsalzung, d. h. eine sehr drastische Verminderung der Salz- und Detergenz-Konzentration der Matrix bei Erhalt oft niedermolekularer wesentlicher Bestandteile im Bereich von 1000 bis zu 3000 Da erforderlich.

10 Massenspektrometrische Verfahren kommen zwar mit sehr geringen Volumina (1-5 µl) aus, benötigen jedoch relativ hohe Analytkonzentrationen. Um den Sensitivitätsbereich zu erreichen, ist es häufig erforderlich, die wesentlichen Bestandteile der Proben präanalytisch stark aufzukonzentrieren. Dabei dürfen jedoch die Konzentrationen störender Begleitstoffe nicht gleichermaßen wachsen.

15 Bei analytischen Screening-Verfahren und bei Proteomics-basierten Technologien fallen häufig sehr große Zahlen von gleichartigen Proben an, die jeweils einer Behandlung oder mehreren gleichartigen Behandlungen, beispielsweise Medienwechseln, Entsalzungen bzw. Konzentrierungsprozeduren unterzogen werden müssen.

20 Üblicherweise wird der Mediumwechsel, der auch die Entsalzung einschließen kann, durch drei alternativ einsetzbare Verfahren realisiert: Gelchromatographie, Reverse-Phase-Chromatographie und Dialyse.

Der Gelchromatographie liegt die chromatographische Abtrennung von

25 Matrixbestandteilen nach der Molekulargewichts-Größe zu Grunde. Sie erfordert saubere Chromatographiebedingungen und gegenwärtig relativ große Probenvolumina. Die Probenbestandteile liegen nach dem Mediumwechsel stets in größeren Volumina als das Ausgangsmaterial und gegenwärtig meist im ml-Bereich vor. Für eine Parallelisierung in dem Sinn, dass eine Pluralität gleichartiger Proben gleichzeitig

30 hantiert wird, ist der Fachwelt derzeit keine Lösung bekannt.

Eine Miniaturisierung wäre denkbar, erfordert jedoch Probenvolumen-abhängige Mindest-Trennlängen der Säulchen und damit auch nicht zu unterschreitende Minimal-Volumina der entsalzten Proben. In WO 9502182 wird beispielsweise ein solches

Verfahren in miniaturisiertem Maßstab zur Präfraktionierung für Capillarelektrophorese-Verfahren beschrieben.

Demgegenüber sind analytische chromatographische Trennungen parallelisiert bis in den nano-fluidic-Maßstab möglich (z. B. WO 2004101151). Für eine präparative Anwendung im Rahmen der Probenvorbehandlung ist dies jedoch nicht verwendbar, da die Probenmengen den Sensitivitätsbereich z. B. massenspektrometrischer Verfahren unterschreiten und die Probenbestandteile nach der Chromatographie stets in größeren Volumina, also zusätzlich verdünnt im Vergleich zur Ausgangsprobe, vorliegen.

10 Durch Reverse-Phase-Chromatographie werden vorzugsweise hydrophobe Probenbestandteile an einer festen hydrophoben Phase gebunden. Diese Träger werden danach mit dem potentiellen Verlust von wesentlichen, insbesondere hydrophilen Analyten gewaschen und nachfolgend im gewünschten salzfreien Medium eluiert. 15 Hierbei sind durch die geschickte Wahl der Adsorptions- und Elutionsvolumina auch Aufkonzentrierungsschritte möglich. Es wurden Mikroverfahren für Proben- und Elutionsvolumina im μ l-Bereich in sog. Zip-Tips der Fa. Millipore (WO 9837949) bzw. Perfect Pure (Fa. Eppendorf) entwickelt. Eine Parallelisierung dieser Mikroverfahren ist auf Grund des durch den Untersucher zu kontrollierenden Laufverhaltens der in 20 Pipettenspitzen untergebrachten Mikrosäulchen, Membranen bzw. monolithischer Strukturen nicht oder nur erschwert möglich.

Es gibt parallelisierbare spin-down Vorrichtungen, die in Arrays hydrophober Membranen angeordnet sind. Diese Verfahren kommen, wenngleich unter 25 Einbeziehung einer Zentrifuge, einem praktikablen parallelisierten Hantieren nahe (US 6,998,047). Hierfür werden jedoch deutlich größere Volumina benötigt, als mit Zip-Tips.

Die Festphasenextraktion ist meist eine Sonderform der Reverse-Phase- 30 Chromatographie und kann ebenfalls in stark miniaturisiertem Maßstab zur Anwendung kommen (EP 1139087). In US 2006198765 ist eine Lösung beschrieben, die für kleinste Volumina eine 96-fach parallelisierte Festphasenextraktion oder wahlweise auch Affinitätschromatographie anbietet. Auch in WO 02082051 werden

parallelisierte Affinitätsmatrices zur Probenvorbehandlung für die Massenspektrometrie eingesetzt. Dieses Prinzip wird in zahlreichen weiteren Patentschriften angewendet.

Reverse-Phase-Chromatographie, Festphasenextraktion und Affinitätschromatographie haben zum Prinzip, den/die Analyten aus den Begleitstoffen herauszureinigen und gegebenenfalls dadurch auch aufzukonzentrieren. Diese Verfahren selektieren jedoch
5 dadurch stets spezielle Analyte in Abhängigkeit von den Eigenschaften der Analyte und denen der festen Phase.

In dem nachfolgend beschriebenen Dialyseverfahren werden die Begleitstoffe und das Lösungsmittel entfernt, ohne dabei die Zusammensetzung der wesentlichen Analyte der
10 Probe zu beeinflussen.

Dialyseverfahren und entsprechende Vorrichtungen gibt es gegenwärtig für jeden gewünschten Volumenbereich von ca. 10 µl bis zu mehreren Litern. Üblicherweise werden im Labor Dialyseschläuche, -säckchen oder Kartuschen verwendet. Der Mediumwechsel erfolgt hier via Diffusion der niedermolekularen Matrix-Bestandteile
15 durch eine sog. semipermeable Membran bei Zurückhaltung von wesentlichen Probenbestandteilen.

Semipermeable Membranen im Sinne der Erfindung sind Membranen die Partikel, Zellen oder Moleküle ab einer bestimmten Größe (cut-off) nicht mehr hindurch lassen, d. h. permeieren. Dies geschieht aufgrund der in den Membranen eingebrachten Poren,
20 wobei die Porengrößen meist in einem engen Größen-Bereich realisiert sind. Dies können Fritten mit Poren von mehreren 100 µm, Filtrationsmembranen mit Poren im µm- und sub-µm-Bereich und Molekularsiebmembranen im Molekulargewichtsbereich von wenigen hundert Da bis mehreren 100 kDa sein.

25 Die Diffusion ist ein Vorgang der auf Grund der Brown'schen Molekularbewegung entsprechend dem Fick'schen Diffusionsgesetz (1) zustande kommt.

$$d_m = D \frac{q \times dc \times dt}{dl} \quad (1)$$

30 wobei:

d_m = Menge des diffundierenden Stoffes,

D = Diffusionskoeffizient

q = Diffusionsquerschnitt oder -Fläche,

dc = Konzentrationsunterschied und

dl = Diffusionsweg

dt = Diffusionszeit

bedeuten.

5

An Membranen wirken zusätzliche Faktoren, die von den Eigenschaften des diffundierenden Stoffes als auch von denen der Membran abhängen.

Für niedermolekulare Matrixbestandteile sind dabei die reinen Diffusionszeiten vom Konzentrationsgradienten, der zur Verfügung stehenden Fläche direkt und vom
10 Diffusionsweg umgekehrt proportional abhängig und betragen üblicherweise für einen Diffusionsweg von 1,3 cm ca. 100 h, für 1,3 mm ca. 1 h und für 13 μ m ca. 0,3 sec (S.M. Rappoport, Medizinische Biochemie, Verl. Volk und Gesundheit, 1983, S. 39/40).

Durch eine geeignete Geometrie (große wirksame Fläche, kleine Diffusionswege) und durch geeignete Membranen (keine Interaktion der zu tauschenden Stoffe mit der
15 Membran) ist daher die Diffusion für den effizienten Mediumwechsel insbesondere für kleine Volumina nutzbar. Durch die Erzeugung von Turbulenzen in Probe und/oder Dialyseaußenflüssigkeit durch geeignete mechanische Vorrichtungen, können zusätzlich die Konzentrationsunterschiede (dc in Formel 1) groß gehalten und dadurch die Diffusion durch die Membran beschleunigt werden.

20 Auch Bündel von sog. Hollow-Fasern mit definierten Poren, durch welche die Probenflüssigkeit hindurchfließt, kommen für die Dialyse im Labor und bevorzugt für die Hämodialyse zur Anwendung. Dabei strömt die gleiche, meist großvolumige Probe durch eine gebündelte hohe Zahl von Hollow-Fasern, wodurch die wirksame Oberfläche stark vergrößert ist. Auch Kartuschen mit semipermeablen Membranen werden im
25 Durchfluss zum Mediumwechsel im Labor eingesetzt. Kartuschen und Hollow-Fasern haben durch die Anbindung an Pumpen große Totvolumina und erfordern hohe Drücke, da durch die kleinen Querschnitte große Flusswiderstände und die relativ dicken Wände lange Diffusionsbarrieren vorhanden sind. Dadurch lassen sich beide technische Lösungen nur schwer in stark miniaturisierte oder gar parallelisierte Systeme
30 integrieren.

Im Labor ist die Dialyse in Säckchen oder Containern mit einfachen Pipettierschritten durchzuführen. Es kommt üblicherweise nur zu unwesentlichen Volumenänderungen der Probe. Bei geschickter Wahl des Membrantyps und der Porengröße

(Molekulargewichts-cut-off) gehen keine wesentlichen Bestandteile biologischer Proben verloren. Für die gleichzeitige Dialyse einer großen Zahl von zwar gleichartigen, in der Zusammensetzung von wesentlichen Analyten und Matrixbestandteilen jedoch verschiedenen kleinvolumigen Proben gibt es jedoch bisher keine befriedigende Lösung.

- 5 Die „drop-dialysis“, d. h. Dialyse mittels vergleichsweise grobporigen auf der Dialyseflüssigkeit schwimmenden Filtrationsmembranen ist zwar zur schnellen Entsalzung kleinster Volumina bis wenige μl konzipiert, jedoch nicht zu parallelisieren und hinsichtlich der zurück zu gewinnenden Probenmenge sowie der darin enthaltenen wesentlichen Bestandteile nicht quantitativ.
- 10 Es gibt singuläre Dialysevorrichtungen bis zu einem minimalen Volumen von gegenwärtig 10 μl (z. B. US 5,503,741) wobei das Oberflächen-Volumen-Verhältnis keinesfalls optimal und eine Parallelisierung nicht vorgesehen ist. Daneben sind spezielle Mikrodialyseeinheiten für noch kleinere Volumina, jedoch nicht für den Mediumwechsel von wesentlichen Probenbestandteilen entwickelt worden, sondern zur Diffusions-
- 15 basierten *in-vivo*-Gewinnung von niedermolekularen Soluten (WO 2004032735). Hierbei wird in der kleinen mit einer semipermeablen Membran teilweise gebildeten Innenkammer ein maximales Oberflächen-Volumenverhältnis erreicht, jedoch in dieser eine Flüssigkeit transportiert, die aus der außen befindlichen lebenden Gewebeprobe diffundierbare Stoffe aufnehmen und so einer Analyse zuführen soll. Hier ist eine
- 20 Parallelisierung ausgeschlossen.

- Mit US 6,458,275 wird eine Möglichkeit zur parallelisierten Gleichgewichtsdialyse zur Untersuchung von Bindungskonstanten im Mikroplattenraster aufgezeigt, die für jede Probe eine eigene Außenflüssigkeit realisiert und wegen des geringen
- 25 Volumenverhältnisses Außenflüssigkeit/Probe prinzipiell nicht zum effizienten Mediumwechsel bzw. zum Entsalzen einsetzbar ist.

- Die parallelisierte Durchführung von Dialysen ist in verschiedenen Lösungen realisiert. Bis zu 12 Proben und einem Volumen von minimal 20 μl (Pierce: Microdialyzer System)
- 30 bzw. von bis zu 96 Proben und einem minimalen Volumen von ca. 24 μl (vorteilhafter Weise im Mikroplattenraster) sind möglich (z. B. US 2004195163, US 2005019774, US 2005148066, SpectrumLabs: Spectra/PorMicrodialyzer). Auf Grund der dabei vorliegenden ungünstigen Oberflächen-Volumen-Verhältnisse, der relativ kleinen

Diffusionsflächen und der daraus resultierenden relativ großen Diffusionswege sind für einen vollständigen Mediumwechsel mit diesen Verfahren viele Stunden erforderlich. In dieser Zeit kommt es sogar bei Deckelung der Probengefäße zu Verdunstungsverlusten durch die Verdunstungsfähigkeit an der großen Oberfläche in die eingeschlossene Luftkammer hinein, und es können sich wesentliche Bestandteile der Proben verändern, beispielsweise Proteine denaturieren. Zudem sind die Proben aus den Mikroplattenwell-förmigen Probengefäßen mit fragilen Membranen nur schwer parallelisiert und verlustarm rückgewinnbar. Eine Standardisierung der Dialysebedingungen für alle Proben ist durch die Zufälligkeit der Ausbildung des effektiven Diffusionsweges durch Volumentoleranzen, Meniskusbildung sowie durch schwer zu kontrollierende Luftblaseneinschlüsse und Luftpolster-Bildung nicht gegeben.

Es sind Probenplatten zur Verwendung in Dialysesystemen bekannt (DE 101 60 975 A1), womit eine Vielzahl von Mikroproben im μl -Bereich dialysiert werden können. Die Probengefäße, deren obere Enden offen und deren untere Enden, d.h. die Stirnflächen der Probengefäße durch eine für die „drop-dialysis“ verwendete Filtrationsmembran verschlossen sind, wurden im zur Anwendung der Liquidhandlingtechnik für die Mikroplattentechnologie passenden Raster angeordnet. Wünschenswert wären allerdings eine weitere Verkürzung der Dialysezeit und eine Verringerung der Beschädigungsgefahr, insbesondere der semipermeablen Membran bei Beschickung (Pipettierbewegung). Darüber hinaus ist die Dialysezeit abhängig von der Füllstandshöhe (Diffusionsweg dl in Formel 1) und damit vom Probenvolumen sowie von der Pipettierpräzision.

Zusammengefasst gibt es noch immer kein vollständig zufrieden stellendes praktikables, schnelles, reproduzierbares Verfahren, mit dem unselektiv für wesentliche Bestandteile von Proben im Volumenbereich von $< 1 \mu\text{l}$ bis $500 \mu\text{l}$ ein Mediumwechsel in kurzer Zeit verlustfrei durchgeführt werden kann. Dialyseverfahren, die in den unteren des genannten Volumenbereiches gelangen, sind nicht quantitativ und nicht parallelisierbar, diejenigen die parallelisiert werden können, benötigen größere Volumina und haben wesentliche Nachteile bezüglich des Handlings, der zu erwartenden Präzision und der benötigten Dialysezeiten.

Aufkonzentrierungen sind prinzipiell mittels Fällungsreaktionen, Ultrazentrifugation, Ultrafiltration, Lyophyllisation, incl. der Sonderform mittels SpeedVac, und Adsorptionsverfahren möglich.

Fällungen mittels Neutralsalzen, Säuren und organischen Lösungsmitteln sind effiziente

- 5 Verfahren der Konzentrationserhöhung für viele Analyte, wie beispielsweise Proteine. Diese Verfahren eignen sich jedoch nicht für niedermolekulare Stoffe und Peptide, sind ebenfalls nicht „unselektiv“ für viele weitere Analyte, da Analyt- und Matrixeigenschaften die Fällereffizienz bestimmen, und denaturieren darüber hinaus meist eine Vielzahl von Proteinen. Zudem sind Fällungsreaktionen nur schwer
- 10 miniaturisier- und parallelisierbar, und die zur Fällung eingesetzten Mittel müssen vor der eigentlichen Analyse in der Regel wieder aus der Probe entfernt werden.

Ultrazentrifugation und Ultrafiltration sind nicht in μ l-Volumina möglich, erfordern Flusshilfen, wie Zentrifugen oder Vakuum, und sind nur schwer parallelisiert zu realisieren.

- 15 In US 2005133425 wird ein Kit vorgeschlagen, der Einzelelemente zur Ultrafiltration zum Zweck der Molekulargewichtsselektiven Konzentrierung und damit selektiven Anreicherung von ausgewählten Analyten enthält.

Mit dem Verfahren der Lyophyllisation, auch mittels SpeedVac, steht zwar ein gut parallelisierbares und miniaturisierbares Verfahren zur Verfügung, jedoch mit dem

20 Nachteil, dass dabei mit dem genutzten physikalischen Prinzip des Verdunstens des Lösungsmittels auch alle störenden Begleitstoffe mit aufkonzentriert werden. Wird das Verfahren bis zum vollständigen Lösungsmittelentzug, d. h. zur sog. Trockne geführt, besteht die Gefahr, dass die wesentlichen Analyte, insbesondere Proteine oder spezielle Peptide oftmals nicht/oder nur partiell wieder lösbar sind.

- 25 Adsorptionen mittels spezifischer Capture-Verbindungen sind elegante Methoden, Analyte auf Oberflächen hoch anzureichern, implizieren jedoch ebenfalls eine Vorauswahl gebundener Analyte. Dies sind Verfahren, die leicht parallelisierbar sind. Solche Verfahren sind beispielsweise für zahlreiche SELDI-Träger in unterschiedlicher
- 30 Ausgestaltung, in WO 2005103718 für Glycoproteine, in US 2003027216 für immunoreaktive Analyte, in WO 2005070141 für verschiedene auszuwählende Analyte beschrieben, wobei hier zudem eine Parallelisierung bis zu 96-fach vorgesehen ist.

Aber auch unspezifischere Adsorptionsverfahren, wie die oben beschriebene Reversed-Phase-Chromatographie in Zip-Tips selektieren spezielle, hier insbesondere hydrophobe, Analyte. Miniaturisierte chromatographische adsorptive Verfahren (US 2003027216, WO 2005070141) erfordern meist eine Flusshilfe, wie Zentrifugalbeschleunigung oder
5 Unterdruck.

Zusammengefasst gibt es außer den nur bedingt in Betracht kommenden und oben beschriebenen adsorptiven Vorrichtungen, wie z. B. Zip-Tips mit den bekannten Nachteilen, keine Vorrichtung und kein praktikables Verfahren, mit denen auch
10 Mediumwechsel in Kombination mit einer deutlichen Aufkonzentrierung von einer Vielzahl paralleler Proben im μ l-Bereich und ohne Selektion eines Teils der Probenbestandteile ermöglicht werden können.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zu Grunde, eine Vorrichtung zu schaffen, mit welcher
15 Biomoleküle in Proben im Volumenbereich von $< 1 \mu$ l bis 500μ l auf möglichst einfache, aufwandgeringe und praktikable Art und ohne Beschädigungsgefahr für die Vorrichtung schnell, reproduzierbar und verlustfrei aufgenommen, umfassend behandelt sowie aufbewahrt werden können.

20 Die Aufnahme und Behandlung der Proben soll mit den Vorzügen der an sich bekannten Liquidhandlingtechnik, wie sie unter anderem für Mikroplatten bekannt ist, erfolgen können.

Die Vorrichtung soll möglichst ohne Änderungen, Umpipettierung und Umrüstungen etc. gleichermaßen für Mediumwechsel, Aufkonzentrierungsschritte und andere
25 Probenbehandlungen, incl. Aufbewahrung, verwendbar sein, um die einmal eingebrachten Proben reproduzierbar hantieren zu können. Dazu sollen möglichst allgemein einsetzbare Verfahren ohne Bevorzugung bzw. Selektion spezieller Analyte durch eventuelle reaktive Oberflächen einsetzbar sein.

30 Erfindungsgemäß wird die Vorrichtung durch mindestens ein Probengefäß für universelle Aufnahme, Behandlung und Aufbewahrung kleinvolumiger Proben realisiert, welches in Größe und Gestalt als Form- und Lage stabile beidseitig offene Kapillare

ausgebildet ist, deren Längswandung vollständig oder teilweise aus einer an sich bekannten semipermeablen Membran ausgebildet ist.

Als Kapillare im Sinne der Erfindung sind röhrenförmige Probengefäße mit sehr kleinem Innendurchmesser zu verstehen. Diese Kapillare kann als gerade Röhre oder
5 auch als ein- oder mehrfach gekrümmte Röhre ausgebildet sein. Zweckmäßig ist beispielsweise eine U-förmig gekrümmte Kapillare, deren beidseitige Öffnungen von derselben Seite der Vorrichtung zugänglich sind.

Zur ihrer Form- und Lagestabilität kann es zweckmäßig sein, wenn die Kapillare mit
10 einem oder mehreren stützenden und somit Form- und Lagestabilisierenden Körpern beispielsweise aus Edelstahl oder aus einem nichtmetallischen Werkstoff, wie Glas, Keramik oder Kunststoff, insbesondere in den Bereichen ihrer Kapillarenden bzw. Stirnflächen, formschlüssig in Verbindung steht. Andererseits ist es auch möglich, dass das Probengefäß in Größe und Gestalt unmittelbar als kapillarförmige Vertiefung,
15 hergestellt beispielsweise durch Gießen, Pressen, Verformen oder Zerspanen, in einem bereits Form- und Lagestabilen Körper, der auch aus mehreren Teilkörpern bestehen kann, eingebracht ist.

Die semipermeable Membran kann vorteilhafterweise mit an sich bekannten Verfahren unlösbar und dichtend mit den Form- und Lagestabilisierenden Körpern verbunden
20 werden. Solche Verfahren sind beispielsweise als Overmolding, IR-Schweißen, UV-Bonden bzw. Kleben bekannt. Diese Verfahren werden seit langem zum unlösbaren Verbinden verschiedenster polymerer Werkstoffe genutzt.

In den Unteransprüchen sind vorteilhafte Ausgestaltungen der kapillaren Probengefäße
25 aufgeführt.

Von Vorteil ist, dass die vorgeschlagenen Kapillaren in einem zur Liquidhandlingtechnik für die Mikroplattentechnologie passenden Raster ($n \times 8 \times 12$ oder $n \times 8$ oder/und $m \times 12$) angeordnet werden können und damit eine multiple Probenbehandlung ermöglichen. Damit ist auch die Anwendung und die Kompatibilität
30 an sich bekannter und in der Praxis etablierter Verfahren der Liquidhandlingtechnik ohne komplizierte Anpassungen und Umrüstungen oder gesonderte Methoden des Probenhandlings gegeben.

Das vorgeschlagene spezielle Probengefäß gestattet insbesondere bei seiner vorgenannten multiplen Anordnung im Rastermaß einfach und praktikabel handhabbare, trotz sehr geringer Probenvolumina äußerst verlustarme Anwendungen sowie den universellen Einsatz für Aufnahme, Behandlung und Aufbewahrung von Proben, unter anderem auch zur Aufkonzentrierung und für den Mediumwechsel. Durch die besagten universellen Verwendungsmöglichkeiten entfallen ansonsten erforderliche Änderungen, Umpipettierung und Umrüstungen etc., die in der Praxis besondere Aufwendungen im Probenhandling, insbesondere bei vielen Tausend Proben in Screeningverfahren und auch die zusätzliche Gefahr von Probenverlusten und -verwechslungen in sich bergen.

Für das parallelisierte Dialysieren von Mikrovolumina wurde eine Geometrie der Probengefäße gefunden, welche nicht nur äußerst kurze und damit effektive Diffusionswege unabhängig vom Probenvolumen im Bereich von unter einem Millimeter ermöglicht, sondern mit der Membrananordnung auch eine sehr effiziente im Vergleich zum Volumen große wirksame Diffusionsfläche realisiert.

Darüber hinaus wird die Verdunstung minimiert und nicht zuletzt eine verlustfreie und leicht parallelisierbare Rückgewinnung der dialysierten Probe ermöglicht. Auf diese Weise werden eine drastische Verkürzung der benötigten Diffusionszeit erreicht und zusätzlich eine hohe Präzision dieses Probenbehandlungsschrittes gewährleistet.

Daneben können ggf. weitere Behandlungen, wie beispielsweise der Zusatz von modifizierenden Reagenzien, deren Reste nach Reaktion ohne weiteren Aufwand durch Dialyse entfernt werden können, oder der Verdau von Proteinanalyten mittels spezifischer Proteasen im selben Probengefäß, in dem zuvor der Mediumwechsel oder eine Konzentrierung stattgefunden hat, mit anschließender erneuter Konzentrierung und Entsalzung, durchgeführt werden.

Die semipermeable Membran ist im Unterschied zu den eingangs beschriebenen bekannten Lösungen nicht quer zur Beschickungsrichtung angeordnet, was aus Erfahrung nicht nur bei unsachgemäßer Behandlung leicht zu Beschädigungen führen kann, sondern in Achs- bzw. Längsrichtung der Kapillare als vollständige oder teilweise Wandung ausgebildet, wodurch das Beschädigungsrisiko der Membran, insbesondere durch Pipettierbewegung, quasi ausgeschlossen ist.

Die Kapillaren werden vorteilhaft in einem Verhältnis ihrer Länge zum Innendurchmesser von größer 4 realisiert. Die größte Ausdehnung des Querschnittes der Kapillaren sollte 5 mm nicht übersteigen. Außerdem können die Kapillaröffnungen, zum Beispiel durch Deckel, Stopfen oder Klebefolien ebenfalls gut handhabbar und zuverlässig verschlossen werden. Durch all diese Merkmale ist auch die Verdunstungsgefahr während eines Mediumwechsels mittels Dialyse auf ein Minimum reduziert, was ebenfalls eine hohe reproduzierbare Genauigkeit des Umgangs und der Analyse der Proben gewährleistet.

- 10 Die vorgeschlagene kapillare Geometrie mit den empfohlenen Abmessungen und dem vergleichsweise großen Anteil der semipermeablen Membran gestattet gut parallelisierbare Verfahrens-kombinierte Anwendungen.

Zum Beispiel, ist im Fall des Eintauchens der Vorrichtung in eine Außenflüssigkeit bei verlustfreiem Erhalt der wesentlichen Analyten in kleinvolumigen Probenvolumina

- 15 a: die Entfernung primär in der Probe enthaltener und die Analyse störender Matrixbestandteile,

b: der Zusatz von Hilfsreagenzien und

c: die Entfernung von Beiprodukten nach Hilfsreaktionen

- 20 relativ problemlos mittels Dialyse über die Außenflüssigkeit möglich. Durch die vergleichsweise kleinen Oberflächen an den offenen Kapillarenden, die zudem auch verschlossen werden können, ist dabei die Verdunstung minimiert bzw. ausgeschlossen.

Bei Aufbewahrung in verdunstungsgeschützter Umgebung ohne kontaktierende Außenflüssigkeit sind die Vorrichtungen als parallelisierte Reaktionsgefäße für analytische Hilfsreaktionen oder zur Lagerung und Transport von Proben verwendbar,

- 25 wie beispielsweise Mikroplatten oder Tubes.

Im Fall der Aufbewahrung in trockener Umgebung ggf. mit kontrollierter Konvektion oder Vakuum kann die Verdunstung des in der Probenlösung vorhandenen Lösungsmittels durch die große Oberfläche der semipermeablen Membran zum Zwecke der Aufkonzentrierung wesentlicher Analyten mit hoher Geschwindigkeit und vorteilhafter Weise ohne Umpipettierung genutzt werden.

- 30 Es ist auch eine beliebige sequenzielle Kombination der aufgeführten Anwendungen und auch bei unterschiedlichen Temperaturen möglich.

Die Kapillarität der Probengefäße und die daraus realisierten Kohäsionskräfte der Flüssigkeitssäule sowie die Nicht-Selektivität der semipermeablen Membran bezüglich des hydrophoben bzw. hydrophilen Charakters der wesentlichen Probenbestandteile ermöglichen zudem deren quasi komplette Rückgewinnung.

- 5 Durch die genannten Möglichkeiten und Merkmale ist die Vorrichtung für eine Vielzahl parallelisierter Verfahren universell, praktikabel, aufwandgering sowie mit guter Präzision und Wiederfindung der wesentlichen Analyte einer Probe einsetzbar.
- 10 Die Erfindung soll nachstehend anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert werden.
Es zeigen:
- Fig. 1: Draufsicht auf eine Kapillare, deren Wandung mit rundem Querschnitt vollständig aus einer semipermeablen Membran besteht, wobei die
15 eigenständige Kapillare zwischen zwei stabilisierenden Körpern angeordnet ist
- Fig. 2: Draufsichten auf vier Kapillaren mit unterschiedlichem Querschnitt, welche jeweils durch eine Vertiefung in einem stabilen Körper gebildet werden, wobei die Vertiefung jeweils durch eine semipermeable Membran
20 abgeschlossen wird
- Fig. 3: Draufsichten auf vier Kapillaren mit unterschiedlichem Querschnitt, welche jeweils als Durchbruch in einem stabilen Körper ausgebildet sind, wobei der Durchbruch jeweils auf beiden Seiten durch eine semipermeable Membran abgeschlossen wird
- 25 Fig. 4: Ausbildung von acht U-förmigen kapillaren Probengefäßen im Mikroplatten-rastermaß in einem stabilen Grundkörper
a: Vorderansicht
b: Schnitt X-X entsprechend Fig. 4a
c: Schnitt Y-Y entsprechend Fig. 4a

d: Seitenansicht in Schnittdarstellung eines Stapels von 12 aneinander gereihten stabilen Grundkörpern gemäß Fig. 4a mit je 8 U-förmigen kapillaren Probengefäßen (vgl. Einzeldarstellung von Fig. 4b)

Fig. 5: Zeitverlauf der Abnahme der p-Nitrophenol-Konzentration in sechs gleichzeitig dialysierten Proben unter Verwendung von U-förmigen kapillaren Probengefäßen; dargestellt sind Mittelwerte (Punkte) und Standardabweichungen (Fehlerbalken)

Fig. 6: Zeitverlauf der Abnahme der NaCl-Konzentration in acht gleichzeitig dialysierten Proben unter Verwendung von U-förmigen kapillaren Probengefäßen; dargestellt sind die Mittelwerte (Punkte)

Fig. 7: Zeitverlauf der Volumen-Abnahme von acht gleichzeitig in U-förmigen kapillaren Probengefäßen im Konvektionsstrom eines Ventilators aufbewahrten Proben

Fig. 8: Massenspektren der drei Proben nach Ausführungsbeispiel 8

a: Massenspektrum von Probe 1, 2 pM Protein, 10 mM Tris/HCl, pH 7.4 mit 150 mM NaCl.

b: Massenspektrum von Probe 2, 9,4 pM Protein, ca. 53 mM Tris/HCl, pH 7.4 mit 700 mM NaCl.

c: Massenspektrum von Probe 3, 19 pM Protein, 10 mM Tris/HCl, pH 7.4 mit 100 mM NaCl

Fig. 9 Lactatproduktion in humanen Erythrozyten nach Ausführungsbeispiel 10

Anwendungsbeispiel 1:

In Fig. 1 ist ein Querschnitt durch ein kapillares Probengefäß 1 mit einer kreisförmigen Hohlraum-Querschnittsfläche 2 dargestellt. Die Kapillare ist zu ihrem Schutz zwischen zwei Form- und Lagestabilisierenden Körpern 3 und 4 angeordnet. Die zylindrische Mantelfläche (Längswandung) des kapillaren Probengefäßes 1 besteht vollständig aus einer semipermeablen Membran 5 (angedeutet in der Schnittdarstellung von Fig. 1 als kreisförmige punktierte Linie).

Anwendungsbeispiel 2:

Fig. 2 zeigt Darstellungen von ebenfalls Querschnitten durch vier kapillare Probengefäße 6, 7, 8, 9 mit unterschiedlichen Hohlraum-Querschnittsflächen 10, 11, 12, 13.

Im Unterschied zu Fig. 1, bei welcher die Kapillare eigenständig, d. h. unabhängig von den benachbarten Form- und Lagestabilisierenden Körpern 3, 4 durch die semipermeable Membran 5 als zylindrische Mantelfläche realisiert ist, werden die kapillaren Probengefäße 6, 7, 8, 9 jeweils als eine beispielsweise durch Gießen, Pressen, Verformen oder Zerspanen hergestellte Vertiefung in einem Form- und Lagestabilen Grundkörper 14, 15, 16, 17 gebildet. Abgedeckt wird jeweils die Vertiefung im Form- und Lagestabilen Grundkörper 14, 15, 16, 17 mit einer z. B. aufgeklebten oder gebondeten semipermeablen Membran 18 (wiederum als punktierte Linie dargestellt), wodurch jeweils der Hohlraum der kapillaren Probengefäße 6, 7, 8, 9 seitlich abgeschlossen wird. Auf diese Weise entstehen im Form- und Lagestabilen Grundkörper 14 ein kapillares Probengefäß 6 mit einer dreieckigen Hohlraum-Querschnittsfläche 10, im Form- und Lagestabilen Grundkörper 15 ein kapillares Probengefäß 7 mit einer halbrunden Hohlraum-Querschnittsfläche 11, im Form- und Lagestabilen Grundkörper 16 ein kapillares Probengefäß 8 mit einer rechteckigen Hohlraum-Querschnittsfläche 12 und im Form- und Lagestabilen Grundkörper 17 ein kapillares Probengefäß 9 mit einer trapezförmigen Hohlraum-Querschnittsfläche 13.

20

Anwendungsbeispiel 3:

In ähnlicher Weise wie in Fig. 2 zeigt Fig. 3 ebenfalls vier Querschnitte durch kapillare Probengefäße 19, 20, 21, 22 welche jeweils in einem Form- und Lagestabilen Grundkörper 23, 24, 25, 26 realisiert sind. Im Gegensatz zu Fig. 2 werden in diesem Ausführungsbeispiel die Kapillaren nicht durch Vertiefungen, sondern jeweils als Durchbruch durch den Form- und Lagestabilen Grundkörper 23, 24, 25 bzw. 26 ausgebildet. Die Durchbrüche sind beidseitig durch semipermeable Membranen 27, 28 (auch hier als punktierte Linien dargestellt) abgedeckt. Auf diese Weise entstehen die vier kapillaren Probengefäße 19, 20, 21, 22, deren in Fig. 3 gezeigte Hohlraum-Querschnittflächen 29, 30, 31, 32 jeweils unterschiedliche Formen mit den dargestellten geraden und/oder gekrümmten Polygonzügen aufweisen.

30

Anwendungsbeispiel 4:

Fig. 4 zeigt eine spezielle Ausbildung von acht U-förmigen kapillaren Probengefäßen 33 im Mikroplattenrastermaß $n \times 8$, mit $n = 1$ in einem Form- und Lagestabilen Grundkörper 34. Jedes Probengefäß 33 besteht aus zwei vertikalen Kapillarröhrchen 35, 36, die der Hohlraum-Querschnittsform von Probengefäß 22 in Fig. 3 entsprechen und welche nach oben offene Röhrchenenden 37 aufweisen sowie zur besagten U-förmigen Probengefäßausbildung unten über ein horizontales Kapillarröhrchen 38 in der Form von Probengefäß 8 (siehe Fig. 2) in Verbindung stehen. Dieses Kapillarröhrchen 38 enthält vorzugsweise einen stabilisierenden, das Lumen nur teilweise einengenden, Verbindungssteg 43 zwischen einer Materiallippe 44 und dem restlichen Grundkörper 34.

Die Röhrchenenden 37 der Kapillarröhrchen 35, 36 stehen bei jedem Probengefäß 33 jeweils über ein Verbindungsrohrchen 39 mit der Öffnung 40 (Kapillarröhrchen 35) zur Befüllung bzw. Entnahme von aus Übersichtsgründen nicht in der Zeichnung dargestellter Proben oder mit der Belüftungsöffnung 41 (Kapillarröhrchen 36) für die Probenbefüllung bzw. -entnahme in Verbindung.

Fig. 4b zeigt zur Verdeutlichung einen Schnitt in der bei Fig. 4a angezeigte Ebene X-X durch das Kapillarröhrchen 35 eines Probengefäßes 33 mit der Öffnung 40 zur besagten Probenbefüllung bzw. -entnahme sowie eine durch Bonden aufgebrachte und dadurch das U-förmige Probengefäß 33 vervollständigende semipermeable Membran 42.

Fig. 4c zeigt zur Verdeutlichung einen Schnitt in der bei Fig. 4a angezeigte Ebene Y-Y durch das Kapillarröhrchen 38 eines Probengefäßes 33 mit dem stabilisierenden, das Lumen nur teilweise einengenden, Verbindungssteg 43 und der Materiallippe 44.

Fig. 4d zeigt in Seitendarstellung einen Schnitt durch einen Stapel von insgesamt zwölf aneinandergereihten Form- und Lagestabiler Grundkörpern 34 gemäß Fig. 4a mit jeweils (wie in Fig. 4a abgebildet) acht U-förmigen kapillaren Probengefäßen 33. Der in Fig. 4b dargestellte Schnitt X-X entspricht bei Fig. 4d dem linken Probengefäß 33. In Fig. 4d rechts daneben sind weitere elf Form- und Lagestabile Grundkörper 34

angereicht (realisierbar auch durch einen einzigen Form- und Lagestabilen Grundkörper für den gesamten Block der insgesamt 96 vorhandenen Probengefäße 33).

Dadurch werden die U-förmigen kapillaren Probengefäße 33 in mehreren Ebenen in einem Rastermaß von hier $n \times 8 \times 12$ mit $n = 1$ entsprechend dem an sich bekannten

- 5 Mikroplattenrastermaß angeordnet. Zwischen den zwölf aneinandergereihten Form- und Lagestabilen Grundkörpern 34 befinden sich jeweils vergleichsweise großlumige Kanäle 45, in denen sich eine nicht dargestellte Dialyseaußenflüssigkeit befinden bzw. hindurchgeleitet werden kann.
- 10 Im Nachfolgenden werden weitere Anwendungsbeispiele aufgeführt, welche die Verwendung der erfindungsgemäßen Vorrichtung verdeutlichen sollen.

Anwendungsbeispiel 5:

- Mediumwechsel am Beispiel der Entfernung von p-Nitrophenollösung aus einer Lösung
15 im Kapillarmodul

- In sechs der acht U-förmigen kapillaren Probengefäße 33 entsprechend Fig. 4a, die durch Ausfräsung eines Form- und Lagestabilen Grundkörpers 34 aus Polymethylmethacrylat (PMMA) sowie aus aufgeklebten semipermeablen
20 Membranen 42 (Spektra/Por® 1, RC, MWCO 6-8 kDa, SpectrumLabs) entstanden sind, werden je 200 µl einer Lösung aus 6 mM p-Nitrophenol in 1 M Diethanolamin/HCl, pH 9,8 (Puffer A) pipettiert, in zwei weitere kapillare Probengefäße 33 ein Farbstofffreier Puffer A. Das Modul wird bei Raumtemperatur in ein Gefäß mit 150 ml deionisiertem Wasser (Außenflüssigkeit) gestellt. Nach 30 min wird das deionisierte
25 Wasser gegen frisches ausgetauscht. Nach jeweils unterschiedlichen Zeiten werden der gesamte Inhalt aller Kapillaren mit einer Pipette herausgesaugt, Aliquots davon 1 zu 10 bis 1 zu 100 in Puffer A in Mikroplatten-Wells verdünnt und die Absorbanz bei 405 nm in einem Reader (Spectramax Plus384) gemessen. Der Rest wird zurück pipettiert und weiter dialysiert.
- 30 Aus dem Diagramm in Fig. 5 ist ersichtlich, dass nach ca. 2 h nur noch 12 %, nach ca. 3 h nur noch ca. 7 % der ursprünglichen Farbkonzentration vorhanden ist. Anhand der geringen Streuung der Einzelwerte ist die hohe Reproduzierbarkeit der Methode erkennbar.

Die geringe Farbkonzentration in denjenigen Kapillaren mit Puffer A vor Wechsel der Außenflüssigkeit ist auf die retrograde Diffusion in die Kapillaren hinein zurückzuführen.

- 5 Nach dem Wechsel (nach 30 min) ist in den mit Puffer A gefüllten Kammern keine Absorbanz mehr nachweisbar, d. h. die durch Kleben der semipermeablen Membran vervollständigten kapillaren Probengefäße 33 sind dicht, es gibt keine Kreuzkontamination.

Anwendungsbeispiel 6:

- 10 Entfernung von NaCl mittels Kapillarmodul

In alle acht parallele U-förmige kapillare Probengefäße 33 (vgl. Fig. 4a) werden je 190 µl einer Lösung aus 10 mM Tris/HCl, pH 7,4 (Puffer B) mit 150 mM NaCl pipettiert. Das Modul wird bei Raumtemperatur in ein Gefäß mit 150 ml Puffer B (Außenflüssigkeit) gestellt. Nach 30 min wird die Außenflüssigkeit gegen frische ausgetauscht. Nach verschiedenen Zeiten wird der gesamte Inhalt der Kapillaren mit einer Pipette herausgesaugt. Es wird mit einem Osmometer (Knauer, Semi-Microosmometer) die Osmolarität der Lösungen gemessen und mit Eichlösungen verglichen. Danach werden die Lösungen zurück pipettiert und weiter dialysiert.

- 20 Im Diagramm in Fig. 6 ist zu erkennen, dass nach 120 min bzw. 180 min nur noch ca. 8 % bzw. 4 % der Ausgangs-NaCl-Konzentration vorhanden sind.

Die Methode ist gut reproduzierbar, da die Variationskoeffizienten der jeweiligen 8-fach-Bestimmungen im Bereich von ≤ 1 % liegen.

- 25 Anwendungsbeispiel 7:

Verdunstung von Wasser im Kapillarmodul

- 30 In alle acht der U-förmigen kapillaren Probengefäße 33 (vgl. Fig. 4a) werden 200 µl deionisiertes Wasser hinein pipettiert. Das Modul wird bei üblicher Raumtemperatur an einem Stativ befestigt und ein im Luftstrom darauf gerichteter Ventilator (Diffusor, Fa. Braun) in ca. 30 cm Abstand auf der geringsten Stufe und ohne Zusatzheizung eingeschaltet. Nach verschiedenen Zeiten wird jeweils das Modul gewogen.

Aus dem Diagramm in Fig. 7 ist zu sehen, dass nach ca. 2 h etwa noch 5 % und nach 3 h nur noch 0,6 % der Ausgangsflüssigkeitsmenge vorhanden ist, was bei Anwesenheit von nichtflüchtigen Analyten einem Konzentrierungsfaktor von mehr als 20 bzw. ca. 160 entsprechen würde.

5

Anwendungsbeispiel 8:

Kombinierte Probenbehandlung: Konzentrierung und Dialyse

- 10 In alle acht der U-förmigen kapillaren Probengefäße 33 (vgl. Fig. 4a) werden 190 µl einer Lösung mit Rinder-IgG (Serva No. 22550, 0,3 mg/ml, 2,0 µM, in 10 mM Tris/HCl, pH 7,4, Probe 1) pipettiert. Das Modul wird wie in Anwendungsbeispiel 7 an einem Stativ befestigt und ein Ventilator (Diffusor, Fa. Braun) in ca. 30 cm Abstand auf der geringsten Stufe und ohne Zusatzheizung eingeschaltet. Nach Verdunstung des
- 15 überwiegenden Teils von Flüssigkeit werden die Restvolumina in einem einzigen der U-förmigen kapillaren Probengefäße 33 vereinigt und die entleerten kapillaren Probengefäße 33 sequenziell mit 100 µl 10 mM Tris/HCl, pH 7,4 gespült. Die erhaltene Spülflüssigkeit wird in dasselbe kapillare Probengefäß 33 mit den besagten Restvolumina dazu gegeben. Es wird erneut mit dem Ventilator konzentriert (Probe 2).
- 20 Danach wird ohne weiteres Umpipettieren im gleichen Modul 2 h gegen 10 mM Tris/HCl, pH 7,4 mit 100 mM NaCl dialysiert (Probe 3).

Von den Proben 1-3 werden Massenspektren mittels MALDI-MS aufgezeichnet (siehe A. Horn et al.: Proteomics, 6, 2006, 559).

Fig. 8 a bis Fig. 8c zeigen die Massenspektren der Proben 1 bis 3.

- 25 In nachstehender Tabelle sind für die drei Proben jeweils Probenvolumen, Konzentrierungsfaktor und MALDI-Resultat gegenübergestellt:

Probe	Gesamt-Volumen (µl)	Konzentration von IgG [µM] ca	Konzentration von Tris/NaCl [mM] ca	Verwertbare Massenspektren Ja/nein*	Konzentrierungs-Faktor (nach Volumen)
1	1520	2,0	10/150	Nein	1,0
2	65	46,8	264/3510	Nein	23,4
3	80	38	10/100	Ja	19,0

* unter den in Fig. 8a-c angegebenen Bedingungen. Verwertbare Massespektren sind solche, die ein hohes, zur exakten Bestimmung der Mittleren Masse ausreichendes Signal/Rausch-Verhältnis aufweisen.

5

Anwendungsbeispiel 9:

Proteinmodifikation, Dialyse und Verdau

16 Proben von Human-Serumalbumin (Sigma, 3 μ M, je 60 μ l in 20 mM Ammonium-Hydrogencarbonat) werden nach Zusatz von 20 μ l 8 M Guanidin-HCL und Denaturierung in Polycarbonatgefäßen 20 min bei 90 °C auf zwei Sätze zu je 8 Proben aufgeteilt. Je einer dieser Probensätze wird parallel herkömmlich in acht Tubes (Methode A) bzw. vorschlagsgemäß als Methode B in den besagten acht U-förmigen kapillaren Probengefäßen 33 (siehe wiederum Fig. 4a), modifiziert und verdaut. Das

15 herkömmliche Verfahren (Methode A) in Tubes umfasst folgende Arbeitsschritte: Nacheinander Zupipettieren von DTT- und Jodacetamid-Lösung, mit jeweiliger Inkubation, Umpipettieren in Dialysegefäße, 2 h Dialyse gegen 20 mM Ammonium-Hydrogencarbonat, Umpipettieren in neue Tubes, Zusatz von Trypsin und Inkubation. In den U-förmigen kapillaren Probengefäßen 33 (Methode B) erfolgen prinzipiell die

20 gleichen Reaktionen, jedoch entfällt das zweimalige Umpipettieren vor bzw. nach Dialyse: Die nach dieser Behandlung jeweils in den acht Probengefäßen (Tubes bzw. U-förmige kapillare Probengefäße 33) erhaltenen Peptidgemische wurden mittels MALDI-MS jeweils als Vierfachbestimmung pro Reaktionsgefäß analysiert (Bublitz et al.: Proteomics 2006, 6, 3909). Die Ergebnisse sind in nachstehender Tabelle

25 zusammengefasst. Es ist zu erkennen, dass sowohl die Anzahl der gefundenen Peptide, die erreichten normierten Höhensummen, welche ein verlässliches quantitatives massenspektrometrisches Maß darstellen und die Zusammensetzung der gefundenen Peptidgemische mit beiden Methoden vergleichbar sind.

Parameter	Methode A	Methode B	Maßzahl
Umfüllende Pipettierschritte	2	0	Anzahl
Reaktionsgefäße	2	1	Stück
Anzahl der gefundenen Peptide	37,1 ± 3,5	37,4 ± 5,4	Mittelwert ± SD (n=32)
Normierte Höhensumme der gefundenen Peptide*	11,91 ± 2,94	9,15 ± 4,35	Mittelwert ± SD (n=32)
Molekulargewicht der gefundenen Peptide (Mittelwert der Mittelwerte und der SD)	1521.02 498.31	1503.23 508.48	kDa (n=8)
Molekulargewicht der gefundenen Peptide (SD der Mittelwerte und der SD)	56.34 42.33	45.90 58.42	kDa (n=8)

* vgl. Bublit et al.: Proteomics 2006, 6, 3909, SD: Standardabweichung

5

Anwendungsbeispiel 10

Untersuchung von Metaboliten lebender Zellen

In alle acht parallele U-förmige kapillare Probengefäße 33 (vgl. Fig. 4a) werden je 170 µl einer Suspension aus einem Teil Zellsediment und vier Teilen physiologischer Kochsalzlösung (NaCl) mit frisch abgenommenen und zuvor dreimal mit NaCl gewaschenen humanen Erythrozyten pipettiert. Das Modul wird bei Raumtemperatur in ein Gefäß mit 10,0 ml NaCl mit 10 mM Glukose (Außenflüssigkeit) gestellt. Nach jeweils etwa 60 min wird die Außenflüssigkeit gemischt 100 µl davon entnommen und das Modul erneut in der Außenflüssigkeit platziert. In den entnommenen Proben wird die Lactatkonzentration nach Bergmeyer, H. U. in: Methods of Enzymatic Analysis, 3. Ed., Vol. VI, S. 582-588 bestimmt. Lactat in der Außenflüssigkeit kann nur aus Glukose gebildet sein, die mittels Diffusion in die Kapillaren gelangt, über die anaerobe Glycolyse der Erythrozyten entstanden und in die Außenflüssigkeit zurück diffundiert sein.

Im Diagramm in Fig. 9 ist die Lactatkonzentration in der Außenflüssigkeit für einen Zeitraum von 5 h aufgetragen. In dieser Zeit ist eine lineare Konzentrationszunahme dieses Metaboliten zu beobachten. Die Lactatproduktion beträgt unter diesen Bedingungen 0.0103 $\mu\text{Mole}/(\text{min} \times \text{ml Erythrozytensediment})$ oder ca. 0.7 $\mu\text{Mole}/(\text{min} \times 10^{11} \text{ Zellen})$.

Der Vorteil dieser Methode ist, dass die gepackten Zellen in der Kapillare ohne Störung verbleiben können, via Diffusion versorgt und ebenso von Stoffwechselendprodukten, wie Lactat, befreit werden können. Außerdem stellt die gewählte Membran eine mikrobielle Barriere dar. Da die Membran nicht von Zellen oder Makromolekülen passiert werden kann, ist die Lactatbestimmung ohne aufwendige Entproteinisierung möglich.

Aufstellung der verwendeten Bezugszeichen

	1, 6, 7, 8, 9, 19, 20, 21, 22, 33	-	kapillares Probengefäß
5	2, 10, 11, 12, 13, 29, 30, 31, 32	-	Hohlraum-Querschnittsfläche des kapillaren Probengefäßes
	3, 4	-	Form- und Lagestabilisierender Körper
	5, 18, 27, 28, 42	-	semipermeable Membran
	14, 15, 16, 17, 23, 24, 25, 26, 34	-	Form- und Lagestabiler Grundkörper
	35, 36, 38	-	Kapillarröhrchen
10	37	-	Röhrchenende
	39	-	Verbindungsröhrchen
	40	-	Öffnung zur Befüllung bzw. Entnahme
	41	-	Belüftungsöffnung
	43	-	Verbindungssteg
15	44	-	Materiallippe des Grundkörpers
	45	-	Kanal für eine Dialyseaußenflüssigkeit

Patentansprüche

1. Vorrichtung zur Aufnahme, Behandlung und Aufbewahrung kleinvolumiger Proben, bestehend aus mindestens einem
5 Probengefäß (1, 6, 7, 8, 9, 19, 20, 21, 22, 33), welches in Größe und Gestalt als Form- und Lage stabile beidseitig offene Kapillare ausgebildet ist, deren Längswandung vollständig oder teilweise aus einer semipermeablen Membran (5, 18, 27, 28, 42) besteht.
- 10 2. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Teil der Längswandung des Probengefäßes (6, 7, 8, 9, 19, 20, 21, 22, 33) der nicht aus einer semipermeablen Membran gebildet wird, aus einem metallischen Werkstoff, beispielsweise Edelstahl, besteht.
- 15 3. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Teil der Längswandung des Probengefäßes (6, 7, 8, 9, 19, 20, 21, 22, 33), der nicht aus einer semipermeablen Membran gebildet wird, aus einem nichtmetallischen Werkstoff, beispielsweise Glas, Keramik oder Kunststoff, besteht.
- 20 4. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die semipermeable Membran (5, 18, 27, 28, 42) aus einer Dialysemembran, beispielsweise einer sogenannten Regenerierten Zellulose, Zelluloseester oder Polyvinylidendifluorid, aus einer Filtrationsmembran, beispielsweise aus gemischten Zelluloseestern, Polyethersulfonen, aus Fritten, Glasfasern oder Filterpapiern oder aus anderen
25 Membranmaterialien, wie Nitrocellulose, Nylon oder Polytetrafluoroethylen, porösen Polyethylen, Polypropylen bzw. Fluorokarbon bzw. Kompositen daraus, besteht.
5. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Kapillare des
30 Probengefäßes (1, 6, 7, 8, 9, 19, 20, 21, 22) als gerade Röhre ausgebildet ist.

6. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Kapillare des Probengefäßes (1, 6, 7, 8, 9, 19, 20, 21, 22, 33) als ein- oder mehrfach gekrümmte bzw. abgewinkelte Röhre (35, 36, 38) ausgebildet ist.
- 5 7. Vorrichtung gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Kapillare des Probengefäßes (33) einen im Wesentlichen um 360° gekrümmten Abschnitt (35, 36, 38) aufweist, wobei sich beide Röhrchenenden (37) der Kapillare auf ein und derselben Seite der Vorrichtung befinden.
- 10 8. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass alle Seitenwände der Längswandung die Kapillare des Probengefäßes (1, 6, 7, 8, 9, 19, 20, 21, 22, 33) parallel umschließen.
- 15 9. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Längswandung der Kapillare Seitenwände oder Teile davon enthält, die nicht parallel zueinander ausgerichtet sind.
10. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Kapillare des Probengefäßes (1) einen runden Querschnitt (2) aufweist.
- 20 11. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Kapillare des Probengefäßes (6 bis 9, 19 bis 22, 33) einen polygonen Querschnitt (10, 12, 13, 29, 30, 31, 32) mit zumindest drei Ecken aufweist.
- 25 12. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Kapillare des Probengefäßes (7, 19, 20) einen Querschnitt mit einer oder mehreren gekrümmten Linien, beispielsweise zur Ausbildung eines konvex- oder konkavartig gestalteten Querschnitts, aufweist.
- 30 13. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Kapillare in einem Verhältnis ihrer Länge zum Innendurchmesser von größer 4, vorzugsweise von größer 10, ausgebildet ist.

14. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die größte Ausdehnung des Querschnittes der Kapillaren 5 mm nicht übersteigt.
- 5 15. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Kapillare im Fassungsvermögen für Mikrolitervolumina ausgeführt ist, welches vorzugsweise 500 µl nicht übersteigt.
- 10 16. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass eine Pluralität der Kapillaren in einem zur Liquidhandlingtechnik für die Mikroplattentechnologie passenden Raster (n x 8 x 12 oder n x 8 oder/und m x 12) angeordnet ist.
17. Vorrichtung gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass alle im Raster angeordneten Kapillaren jeweils gleiche Fassungsvermögen aufweisen.
- 15 18. Vorrichtung gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die im Raster angeordneten Kapillaren unterschiedliche Fassungsvermögen aufweisen.
- 20 19. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Kapillare des Probengefäßes (6 bis 9, 19 bis 22, 33) in oder an einem oder mehreren Form- und Lagestabilen Grundkörpern (14 bis 17, 23 bis 26, 34) angeordnet ist.
- 25 20. Vorrichtung gemäß Ansprüchen 16 und 19, dadurch gekennzeichnet, dass eine Pluralität von 2 bis 1536 Kapillaren als Probengefäße (1, 6, 7, 8, 9, 19, 20, 21, 22, 33) in oder an einem oder mehreren Form- und Lagestabilen Grundkörpern (14 bis 17, 23 bis 26, 34) angeordnet ist.
- 30 21. Vorrichtung gemäß Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass die Kapillare des Probengefäßes (6 bis 9, 19 bis 22, 33) in oder an einem oder mehreren Form- und Lagestabilen Grundkörpern (14 bis 17, 23 bis 26, 34) zumindest im Bereich einer ihrer Stirnflächen fest verankert ist.

22. Anordnung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Kapillare des Probengefäßes (1) zum Zweck ihrer Form- und Lagestabilisierung mit einem oder mehreren stützenden Körpern (3, 4) formschlüssig in Verbindung steht.
- 5 23. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Kapillare des Probengefäßes (6 bis 9) als Vertiefung in einem Form- und Lagestabilen Grundkörper (14 bis 17) ausgebildet ist.
- 10 24. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Kapillare des Probengefäßes (19 bis 22) als Durchbruch im Form- und Lagestabilen Grundkörper (23 bis 26) ausgebildet ist.
- 15 25. Vorrichtung gemäß Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass eine Pluralität von 2 bis 1536 Kapillaren als Probengefäße (1) zum Zweck ihrer Form- und Lagestabilisierung mit einem oder mehreren stützenden Körpern (3, 4) formschlüssig in Verbindung steht.
- 20 26. Vorrichtung gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass eine Grundplatte, auf welcher die Kapillaren Form- und Lagestabil angeordnet sind, in bezug auf Form und Größe die äußeren Abmessungen für die Liquidhandlingtechnik von Mikroplatten aufweist.
- 25 27. Vorrichtung gemäß Ansprüchen 20 oder 25, dadurch gekennzeichnet, dass alle im Raster der Liquidhandlingtechnik angeordnete Kapillaren der Probengefäße (1, 6, 7, 8, 9, 19, 20, 21, 22, 33) jeweils in derselben Ebene des oder der Körper (3, 4, 14 bis 17, 23 bis 26, 34) ausgebildet sind.
- 30 28. Vorrichtung gemäß Ansprüchen 16, 20 oder 25, dadurch gekennzeichnet, dass die im Raster der Liquidhandlingtechnik angeordnete Kapillaren der Probengefäße (1, 6, 7, 8, 9, 19, 20, 21, 22, 33) jeweils gruppenweise im Raster $n \times 8 \times 12$, $n \times 8$ und $m \times 12$ bzw. $n \times 8$ oder $m \times 12$ in unterschiedlichen Ebenen des oder der Körper (3, 4, 14 bis 17, 23 bis 26, 34) ausgebildet sind.

29. Vorrichtung gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 19 bis 25 und 27, 28 dadurch gekennzeichnet, dass der oder die Körper (3, 4, 14 bis 17, 23 bis 26, 34) im Wesentlichen aus Metall, Keramik, Kunststoff oder Glas bestehen.
- 5 30. Vorrichtung gemäß nach einem oder mehreren der Ansprüche 19 bis 25 und 27, 28 dadurch gekennzeichnet, dass der oder die Körper (3, 4, 14 bis 17, 23 bis 26, 34) durch Gießen, Pressen, Verformen oder Zerspanen hergestellt sind.
- 10 31. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Längswandung der Kapillare des Probengefäßes (6 bis 9, 19 bis 22, 33) teilweise aus der semipermeablen Membran (18, 27, 28, 42) besteht und dass die semipermeable Membran (18, 27, 28, 42) mit der übrigen Wandung der Kapillare des Probengefäßes (6 bis 9, 19 bis 22, 33) unlösbar verbunden ist.
- 15 32. Vorrichtung gemäß Ansprüchen 11 und 31, dadurch gekennzeichnet, dass die Kapillare des Probengefäßes (6 bis 9) einen polygonen Querschnitt (10 bis 13) aufweist, wobei die semipermeable Membran (18) eine dieser Polygonlinien entsprechenden Fläche der Längswandung der Kapillare des Probengefäßes (6 bis 9) bildet.
- 20 33. Vorrichtung gemäß Ansprüchen 11 und 31, dadurch gekennzeichnet, dass die Kapillare des Probengefäßes (19 bis 22, 33) einen polygonen Querschnitt (29 bis 32) aufweist, wobei die semipermeable Membran (27, 28, 42) zumindest zwei dieser Polygonlinien entsprechenden Flächen der Längswandung der Kapillare des Probengefäßes (19 bis 22, 33) bildet.
- 25 34. Vorrichtung gemäß Ansprüchen 32 oder 33, dadurch gekennzeichnet, dass der für die Probenbehandlung wirksame Teil der Längswandung der Kapillare des Probengefäßes (1, 6 bis 9, 19 bis 22, 33) durch die semipermeable Membran (18, 27, 28, 42) gebildet wird.
- 30

35. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass eine Klebefolie als lösbarer Verschluss für die jeweils stirnseitigen Öffnungen (40, 41) der Kapillaren des Probengefäßes (33) zur Probenbeschickung, Probenentnahme und Belüftung vorgesehen ist.

5

36. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass Deckel als lösbare Verschlüsse für die jeweils stirnseitigen Öffnungen (40, 41) der Kapillaren des Probengefäßes (33) zur Probenbeschickung, Probenentnahme und Belüftung vorgesehen sind.

10

37. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass Stopfen als lösbare Verschlüsse für die jeweils stirnseitigen Öffnungen (40, 41) der Kapillaren des Probengefäßes (33) zur Probenbeschickung, Probenentnahme und Belüftung vorgesehen sind.

15

38. Verwendung der Vorrichtung gemäß Anspruch 1 als Reaktionsgefäße.

39. Verwendung der Vorrichtung gemäß Anspruch 1 als Dialysegefäße.

20 40. Verwendung der Vorrichtung gemäß Ansprüchen 1 und 39 zum Mediumwechsel und zur Entsalzung.

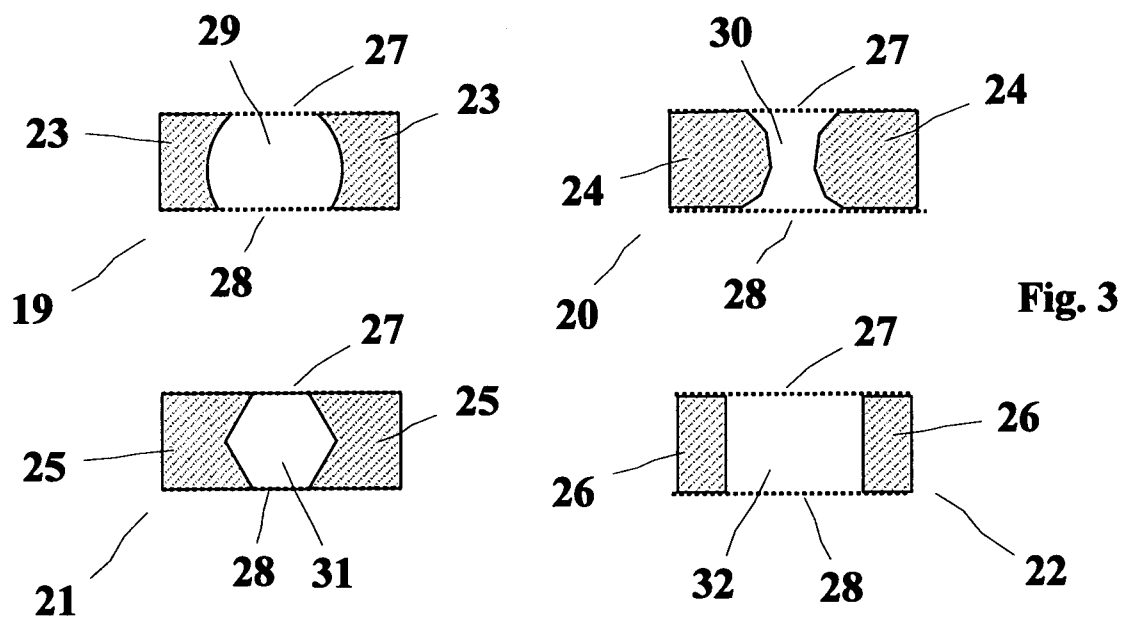
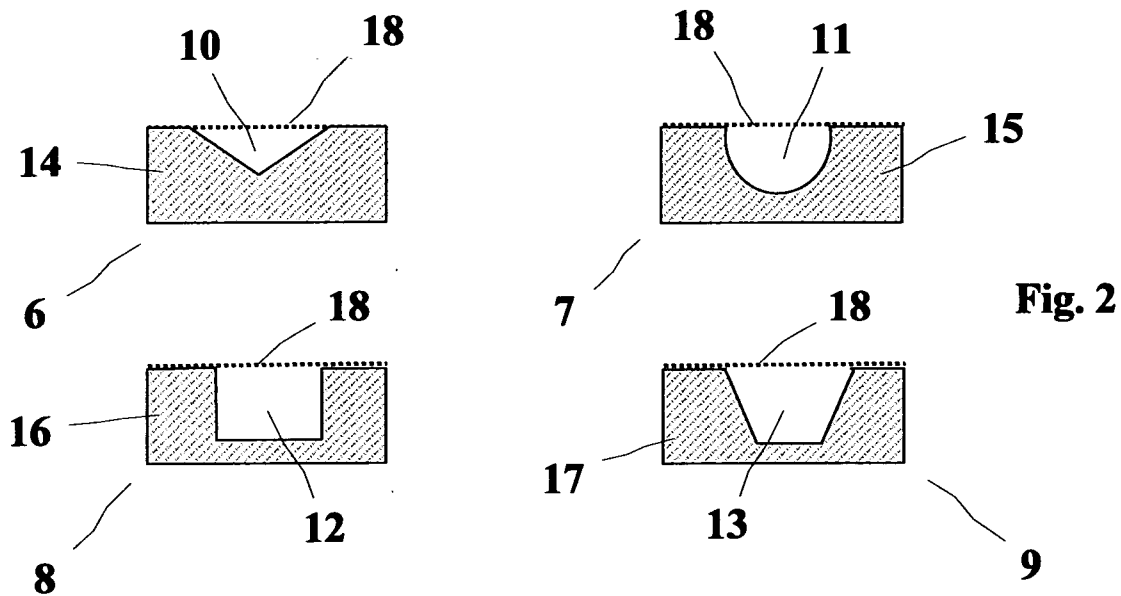
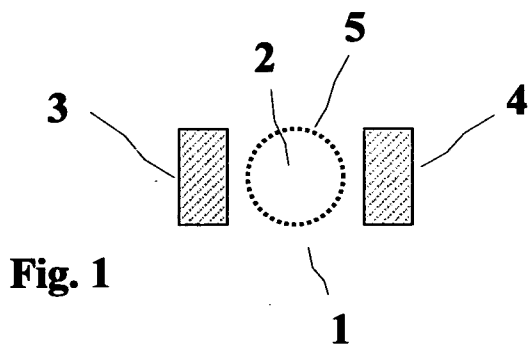
41. Verwendung der Vorrichtung gemäß Anspruch 1 zur Aufbewahrung von Proben.

25 42. Verwendung der Vorrichtung gemäß Ansprüchen 39 und 40, dadurch gekennzeichnet, dass die Probengefäße (1, 6, 7, 8, 9, 19, 20, 21, 22, 33) zur Dialyse, zum Mediumwechsel und/oder zur Entsalzung mit einer ruhenden oder bewegten Außenflüssigkeit direkten Kontakt haben, deren Flüssigkeitsvolumen mindestens dem 30-fachen des Gesamtvolumens aus allen Probenvolumina der
30 Vorrichtung beträgt.

43. Verwendung der Vorrichtung gemäß Anspruch 1 als Gefäße zum Aufkonzentrieren.

44. Verwendung der Vorrichtung gemäß Anspruch 43, dadurch gekennzeichnet, dass die Probengefäße (1, 6, 7, 8, 9, 19, 20, 21, 22, 33) in ruhender oder bewegter nicht dampfgesättigter Umgebung gelagert werden.
- 5 45. Verwendung der Vorrichtung gemäß Anspruch 43, dadurch gekennzeichnet, dass die Probengefäße (1, 6, 7, 8, 9, 19, 20, 21, 22, 33) in nicht dampfgesättigter Umgebung mit Unterdruck gelagert werden.
- 10 46. Verwendung der Vorrichtung gemäß Anspruch 38 und 41, dadurch gekennzeichnet, dass die Probengefäße (1, 6, 7, 8, 9, 19, 20, 21, 22, 33) in dampfgesättigter Umgebung gelagert werden.

1/7



2/7

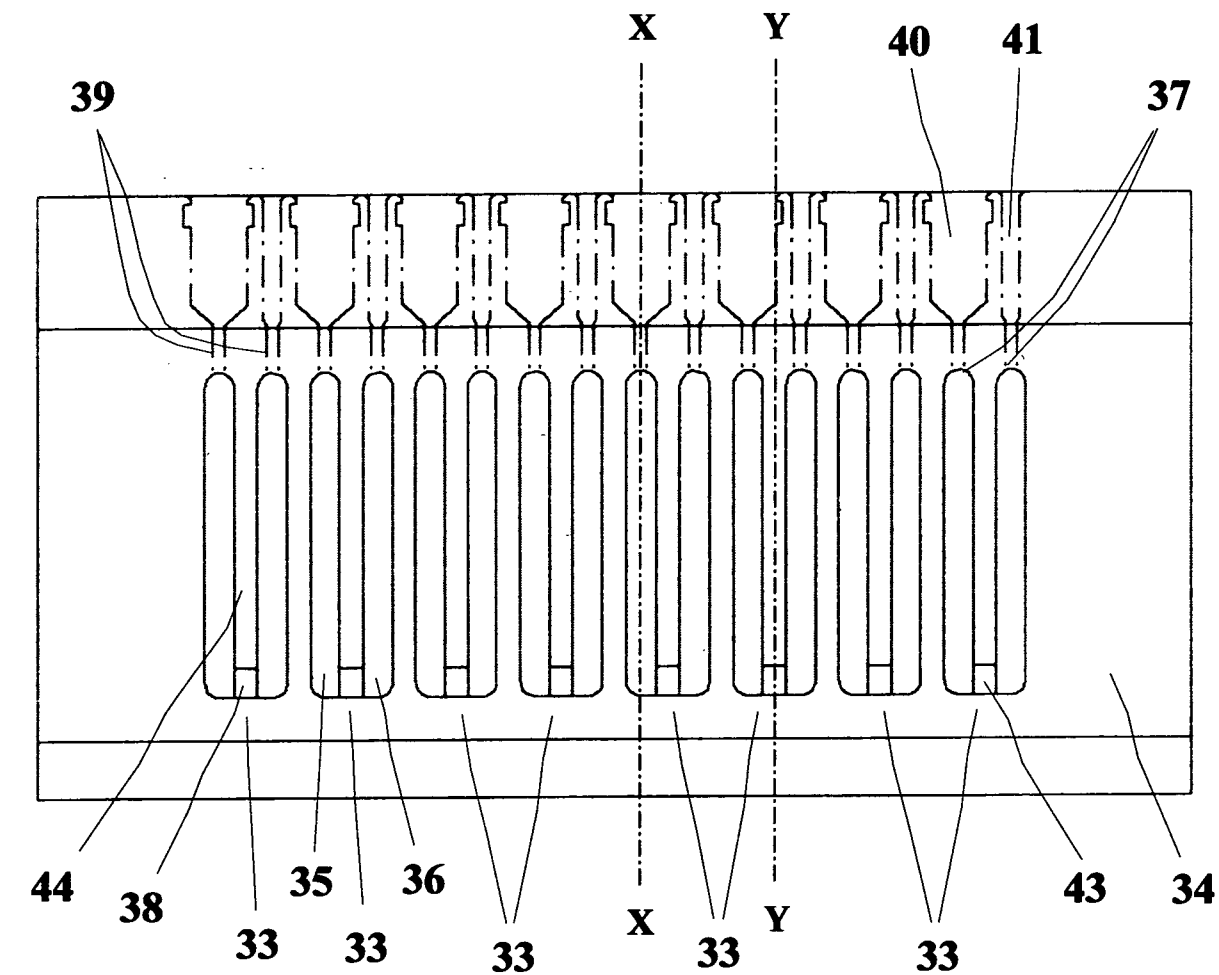


Fig. 4a

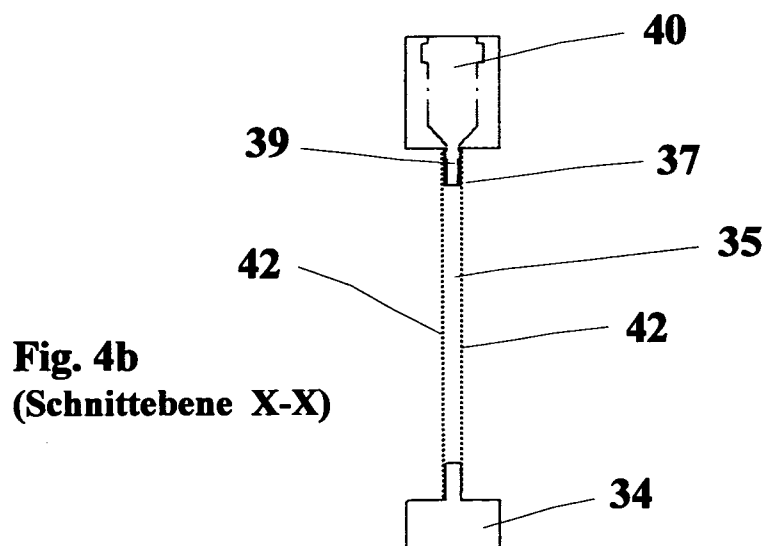


Fig. 4b
(Schnittebene X-X)

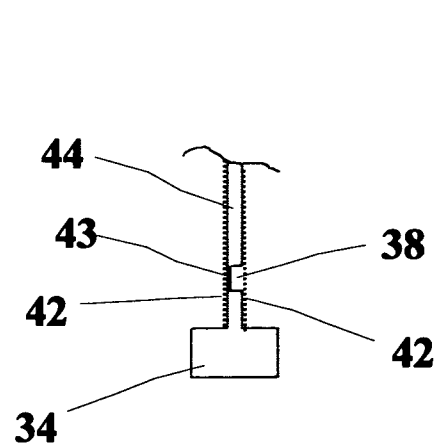


Fig. 4c
(Schnittebene Y-Y)

3/7

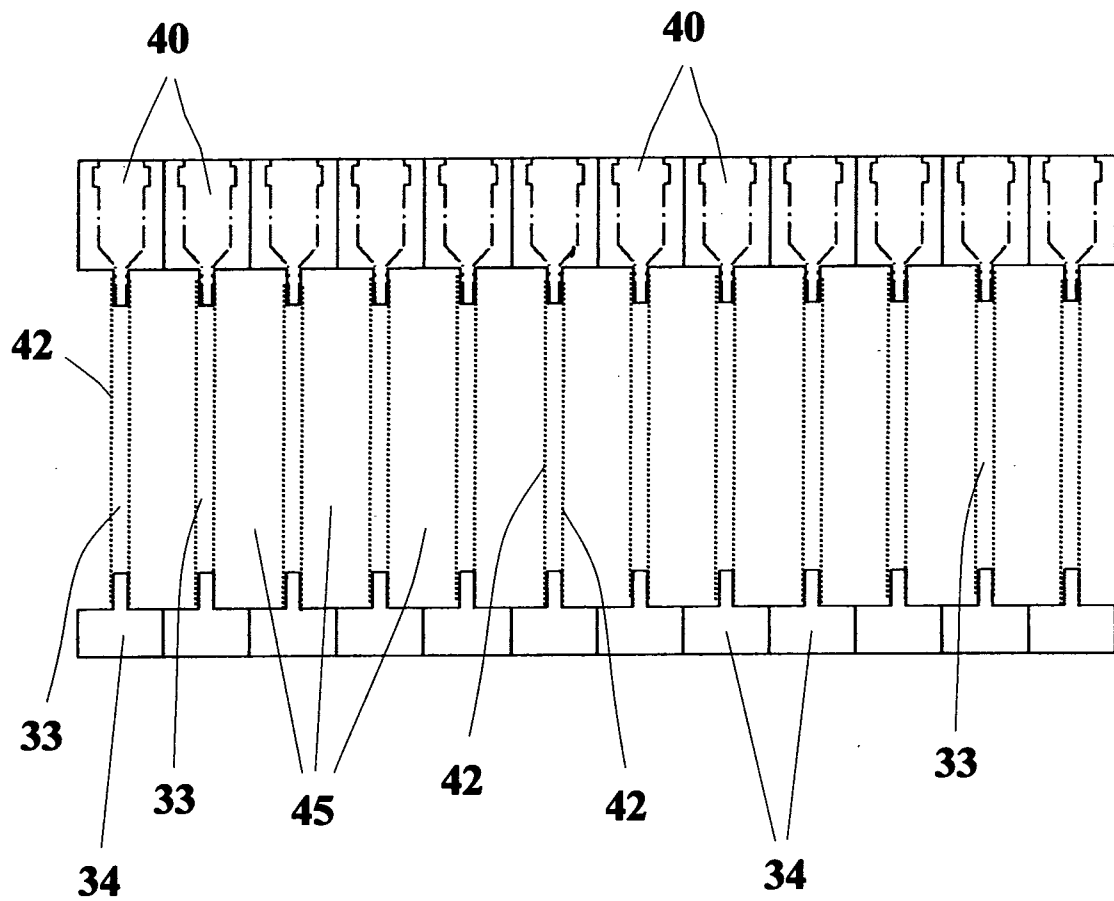
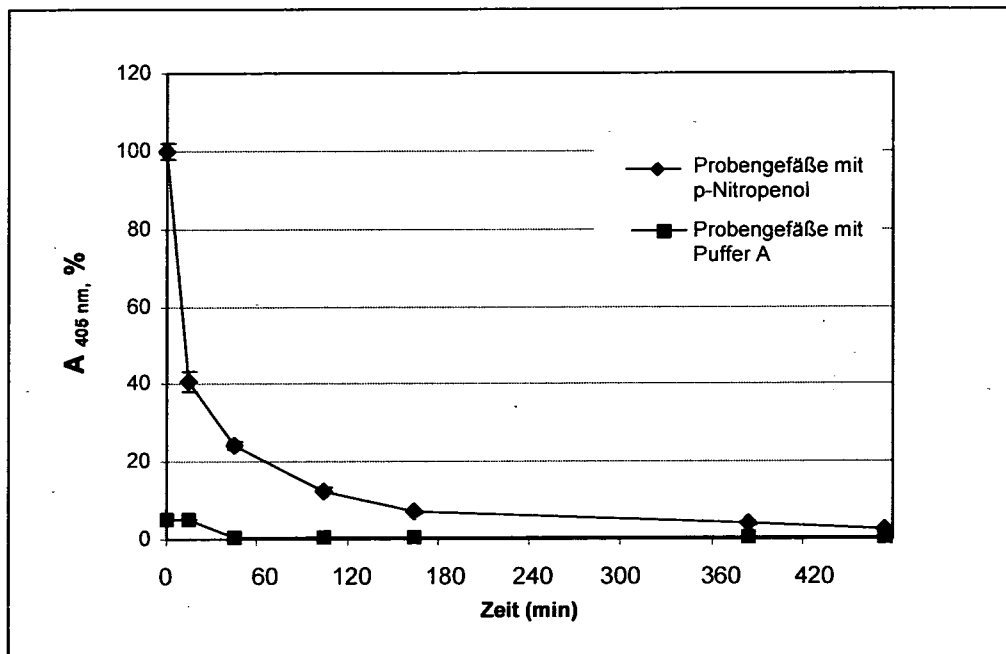
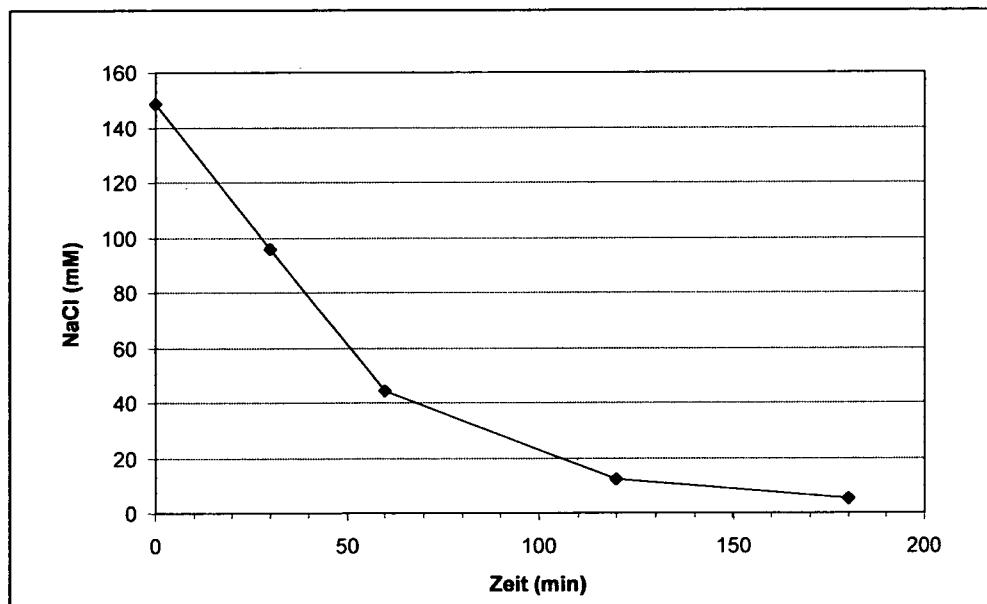
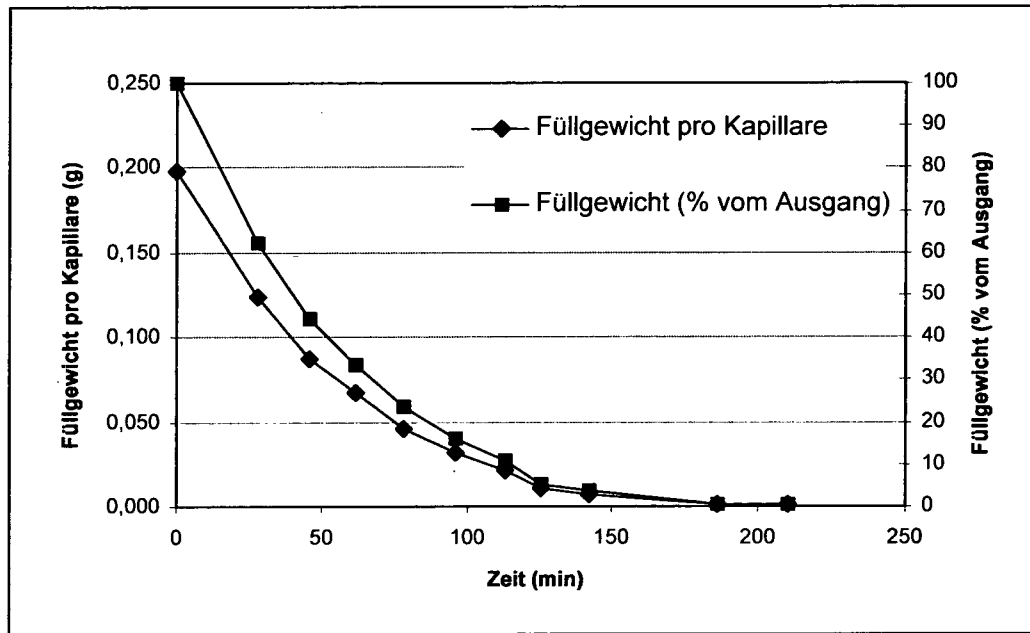


Fig. 4d
Schnittebene X-X

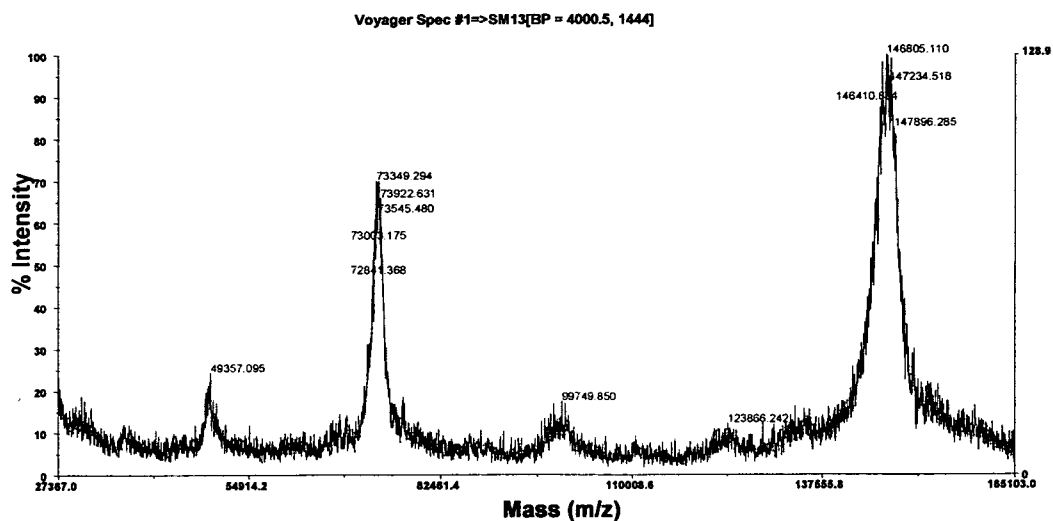
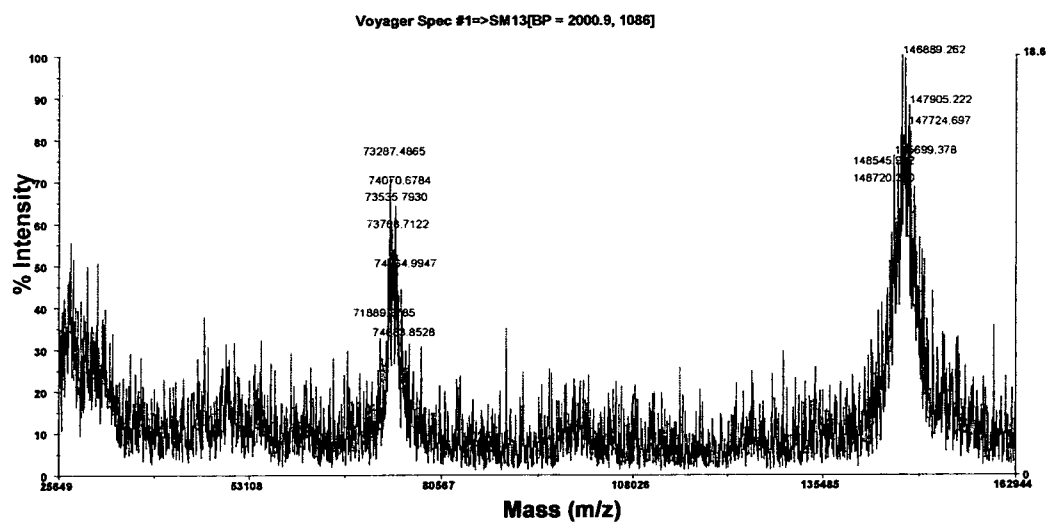
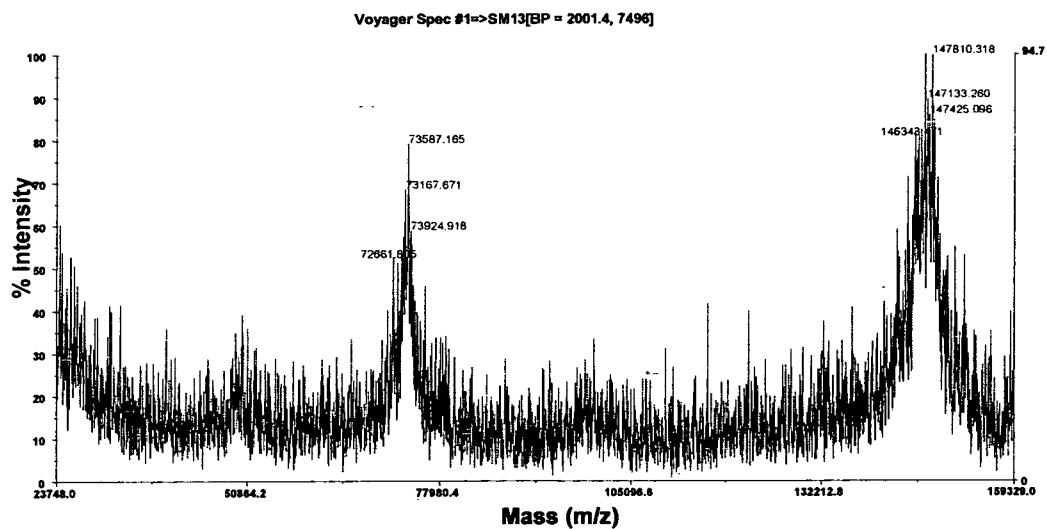
4/7

**Fig. 5****Fig. 6**

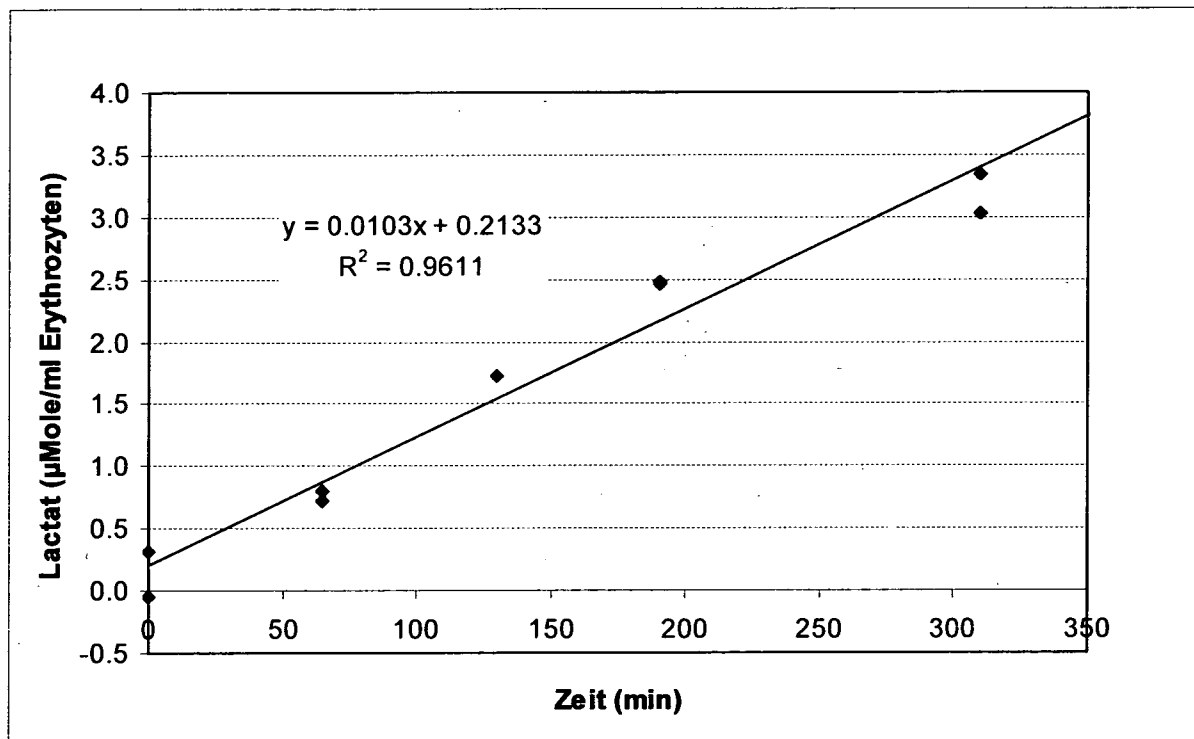
5/7

**Fig. 7**

6/7



7/7

**Fig. 9**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/DE2008/000412

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. B01L3/00 G01N1/40

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N B01D B01J B01L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/088672 A (VARIAN INC [US]; KALLURY KRISHNA [US]; FAN JOY [US]; RASMUSSEN KNUT [N]) 7 November 2002 (2002-11-07) abstract; figures 5-C page 2, line 8 - line 13 page 19, line 6 - line 15 -----	1-46
X	WO 2006/055756 A (LINDEN TECHNOLOGIES INC [US]; HUANG TAI-NANG [US]) 26 May 2006 (2006-05-26) abstract; figures 1,3,4 page 6, line 12 - line 14 page 8, line 9 - line 24 ----- -/-	1-46



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 Juni 2008

Date of mailing of the international search report

03/07/2008

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

van Lith, Joris

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/DE2008/000412

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/16652 A (GENOME THERAPEUTICS CORP [US]; BENN JAMES [US]; MANCHEC JEAN FRANCOIS) 28 February 2002 (2002-02-28) abstract; figures 1,2,10,12 page 7, line 19 - line 32 -----	1-46
A	US 6 187 190 B1 (SMITH RICHARD D [US] ET AL) 13 February 2001 (2001-02-13) abstract; figure 1c -----	1-46
A	US 2005/186118 A1 (BISHOP DAVID J [US] ET AL BISHOP DAVID JOHN [US] ET AL) 25 August 2005 (2005-08-25) abstract; figure 1 -----	43-45

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/DE2008/000412

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
W0 02088672	A	07-11-2002	CA 2445316 A1 DE 60216076 T2 EP 1388005 A1 JP 2004535563 T	07-11-2002 21-06-2007 11-02-2004 25-11-2004
W0 2006055756	A	26-05-2006	EP 1827659 A2 US 2006102547 A1	05-09-2007 18-05-2006
W0 0216652	A	28-02-2002	AU 8675601 A AU 8678401 A WO 0215949 A2	04-03-2002 04-03-2002 28-02-2002
US 6187190	B1	13-02-2001	NONE	
US 2005186118	A1	25-08-2005	US 2007241066 A1	18-10-2007

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2008/000412

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. B01L3/00 G01N1/40

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

G01N B01D B01J B01L

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 02/088672 A (VARIAN INC [US]; KALLURY KRISHNA [US]; FAN JOY [US]; RASMUSSEN KNUT [N]) 7. November 2002 (2002-11-07) Zusammenfassung; Abbildungen 5-C Seite 2, Zeile 8 - Zeile 13 Seite 19, Zeile 6 - Zeile 15 -----	1-46
X	WO 2006/055756 A (LINDEN TECHNOLOGIES INC [US]; HUANG TAI-NANG [US]) 26. Mai 2006 (2006-05-26) Zusammenfassung; Abbildungen 1,3,4 Seite 6; Zeile 12 - Zeile 14 Seite 8, Zeile 9 - Zeile 24 ----- -/-	1-46

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen ☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

26. Juni 2008

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

03/07/2008

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

van Lith, Joris

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2008/000412

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 02/16652 A (GENOME THERAPEUTICS CORP [US]; BENN JAMES [US]; MANCHEC JEAN FRANCOIS) 28. Februar 2002 (2002-02-28) Zusammenfassung; Abbildungen 1,2,10,12 Seite 7, Zeile 19 - Zeile 32 -----	1-46
A	US 6 187 190 B1 (SMITH RICHARD D [US] ET AL) 13. Februar 2001 (2001-02-13) Zusammenfassung; Abbildung 1c -----	1-46
A	US 2005/186118 A1 (BISHOP DAVID J [US] ET AL BISHOP DAVID JOHN [US] ET AL) 25. August 2005 (2005-08-25) Zusammenfassung; Abbildung 1 -----	43-45

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2008/000412

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 02088672	A	07-11-2002	CA 2445316 A1	07-11-2002
			DE 60216076 T2	21-06-2007
			EP 1388005 A1	11-02-2004
			JP 2004535563 T	25-11-2004
WO 2006055756	A	26-05-2006	EP 1827659 A2	05-09-2007
			US 2006102547 A1	18-05-2006
WO 0216652	A	28-02-2002	AU 8675601 A	04-03-2002
			AU 8678401 A	04-03-2002
			WO 0215949 A2	28-02-2002
US 6187190	B1	13-02-2001	KEINE	
US 2005186118	A1	25-08-2005	US 2007241066 A1	18-10-2007