



(11) **EP 2 004 317 B1**

(12) **EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT**

(45) Veröffentlichungstag und Bekanntmachung des
Hinweises auf die Patenterteilung:
25.08.2010 Patentblatt 2010/34

(51) Int Cl.:
B01F 13/08^(2006.01) C12Q 1/68^(2006.01)

(21) Anmeldenummer: **07718377.0**

(86) Internationale Anmeldenummer:
PCT/AT2007/000160

(22) Anmeldetag: **11.04.2007**

(87) Internationale Veröffentlichungsnummer:
WO 2007/118261 (25.10.2007 Gazette 2007/43)

(54) **VORRICHTUNG ZUR STEIGERUNG DER REAKTIONS-, INSBESONDERE DER ANBINDUNGSEFFIZIENZ ZWISCHEN MOLEKÜLEN BZW. MOLEKÜLTEILEN**

APPARATUS FOR ENHANCING THE REACTION EFFICIENCY, ESPECIALLY THE BINDING EFFICIENCY, BETWEEN MOLECULES AND MOLECULAR MOIETIES

DISPOSITIF D'AUGMENTATION DE L'EFFICACITÉ DE RÉACTION, EN PARTICULIER DE LA LIAISON ENTRE DES MOLÉCULES ET/OU DES ÉLÉMENTS DE MOLÉCULES

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL PL PT RO SE SI SK TR

- **NÖHAMMER, Christa**
1100 Wien (AT)
- **SCHOTTER, Jörg**
1050 Wien (AT)
- **EGGELING, Moritz**
49326 Melle (DE)
- **PICHLER, Rudolf**
2485 Wampersdorf (AT)
- **MANSFELD, Markus**
1120 Wien (AT)

(30) Priorität: **13.04.2006 AT 6482006**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
24.12.2008 Patentblatt 2008/52

(73) Patentinhaber:

- **Austrian Research Centers GmbH-ARC**
1220 Wien (AT)
- **tecnet capital Technologiemanagement GmbH**
3100 St. Pölten (AT)

(74) Vertreter: **Wildhack & Jellinek**
Patentanwälte
Landstraßer Hauptstraße 50
1030 Wien (AT)

(72) Erfinder:

- **HEER, Rudolf**
1220 Wien (AT)

(56) Entgegenhaltungen:
EP-A- 1 327 473 US-A- 5 222 808
US-B2- 6 806 050

EP 2 004 317 B1

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents im Europäischen Patentblatt kann jedermann nach Maßgabe der Ausführungsordnung beim Europäischen Patentamt gegen dieses Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist. (Art. 99(1) Europäisches Patentübereinkommen).

Beschreibung

[0001] Die Erfindung befasst sich mit der gezielten Erhöhung der Treffer bzw. Trefferwahrscheinlichkeit zwischen miteinander bindungsfähigen Reaktionspartnern, wodurch einerseits die Menge an Bindungsprodukten erhöht und andererseits die Reaktionszeit wesentlich verkürzt wird.

[0002] Sie ist insbesondere darauf gerichtet, dass die erforderlichen Hybridisierungszeiten in Bioanalyse-Arrays, wie in z.B. in DNA/RNA-, Protein- oder Immuno-Mikroarrays, bei dadurch gleichzeitig erreichbarer Steigerung der auswertbaren Fluoreszenzsignale verkürzt wird. Dies wird durch Agitation der Hybridisierungs-Lösung mit Hilfe magnetischer Mikro- oder Nanopartikel, welche in kontrollierter Weise durch die Hybridisierungslösung bewegt werden und die Target Moleküle zu den einzelnen Spots, also Bindungsstellen transportieren, erreicht. Der Wirkungsbereich der einzelnen Spots, welcher in herkömmlichen Analyseverfahren diffusions-limitiert ist, wird somit wesentlich vergrößert bzw. erweitert.

[0003] Die Erfindung hat den weiteren Vorteil, dass sie in einfacher Weise mit schon vorhandenen Bioanalyse-Array-Systemen kombiniert werden kann, dass sie also ein Nachrüsten schon bestehender Reaktionssysteme, also insbesondere schon vorhandener Bioanalyse-Systeme, ermöglicht.

[0004] Als neue Werkzeuge der Molekularbiologie stellen beispielsweise DNA-Microarrays einen echten Technologiesprung beim Nachweis von Genen und Gendefekten, bei der Genexpressions-Analyse und bei der Vertiefung des Verständnisses von Genfunktionen dar.

[0005] Ein Mikrobio-Array oder Biochip besteht üblicherweise aus einem, in spezieller Weise chemisch beschichteten, Glas-Objektträger, der bis zu einige Tausend mikroskopisch kleine, unterschiedlich funktionalisierte Punkte, so genannte Spots, enthält. Im Falle der DNA-Microarrays oder DNA-Chips besteht jeder einzelne dieser Spots aus zahlreichen Kopien eines eindeutig bestimmten DNA-Abschnitts bzw. Gens, die als "Fängermoleküle" oder Sonden für entsprechende, in einer zu analysierenden Probe vorhandene, spezifische DNA oder mRNA-Moleküle, also Targets, fungieren. Die Targetmoleküle werden zuvor mit Fluoreszenzpartikeln markiert, um sie nach erfolgter Bindung an die entsprechenden Chip-Sonden mittels Fluoreszenzscanner detektieren zu können.

[0006] Die Faktoren Spezifität und Sensitivität spielen in der Bio- bzw. Mikroarrayanalyse eine große Rolle. Während die Spezifität im Wesentlichen von der Auswahl bzw. Sequenzabfolge der DNA-Sonden am Chip abhängig ist und jenen Bedingungen, unter denen man den Andockprozess bzw. Hybridisierung zwischen Targets und Sonden ablaufen lässt, also z.B. die Salzkonzentration des Hybridisierungspuffers und die Reaktionstemperatur, hängt die Sensitivität im Wesentlichen von der vorhandenen Menge des jeweiligen Targets, von der Effizienz der Fluoreszenzmarkierung der Targets, bis zu

einem gewissen Grad auch von der Menge der am Chip vorhandenen DNA-Sonde sowie von der Effizienz der Bindung zwischen Target und Sonde ab.

[0007] Im klassischen Chip-Experiment ist der Transport der Targets zu den Sonden im wässrigen Milieu allein durch die Diffusion gesteuert. In der Praxis wird eine wässrige Pufferlösung mit den fluoreszenz-markierten Targetmolekülen auf den Chip mit den DNA-Sonden aufgebracht und danach wird ein dünnes Glasplättchen bzw. Deckgläschen darüber gelegt. Dadurch wird ein dünner Flüssigkeitsfilm zwischen Chip und Deckgläschen ausgebildet, innerhalb dessen sich die Targetmoleküle durch freie Diffusion bewegen.

[0008] Bisher wurden unterschiedliche Versuche zur Steigerung der auswertbaren Signale in DNA-Microarrays mit unterschiedlichen Misch- oder Pumpvorrichtungen unternommen, welche sich in folgende 3 Gruppen einteilen lassen.

- Mechanische Mischung durch Schütteln und/oder Rotieren des Chips auf einer dafür vorgesehene Einrichtung
- Durchpumpen und Rezirkulieren der Hybridisierungslösung am Chip mittels eines externen Fluidsystems
- Mischung der Flüssigkeit am Chip selbst

[0009] Nachfolgend werden Beispiele zu den genannten, dem Stand der Technik entsprechenden Verfahren beschrieben, um Unterscheidungsmerkmale zur vorliegenden Erfindung herausarbeiten zu können.

[0010] Surface Acoustic Waves bzw. akustische Oberflächenwellen werden in einem bereits kommerziell erhältlichen Produkt, mit der Bezeichnung SlideBooster der Firma Advantix AG, Eugen-Sänger-Straße 53.0. D-85649 Brunnthal, www.advantix.de, SlideBooster SB400, zur Durchmischung von dünnen Flüssigkeitsfilmen eingesetzt.

[0011] Eine aktive Durchmischung von Flüssigkeiten wurde von R. H. Liu et al. Bubble-induced acoustic micromixing. Lab Chip, 2002, 2, 151-157 vorgestellt. Zur Realisierung der Wischwirkung werden durch Bläschen induzierte, akustische Mikroströmungen verwendet, welche mittels eines piezoelektrischen Schallgebers erzeugt werden. Zur Steigerung der Effizienz sind in der Mischungskammer mikroskopisch kleine, mechanisch gefertigte, Taschen eingebaut, an denen sich Gasbläschen bilden. Diese Modifikation der Mischungskammer stellt einen beachtlichen Mehraufwand bei der Fertigung von Bio-Chips dar und ist hinsichtlich Wiederverwendbarkeit aus Gründen der Kontamination fragwürdig.

[0012] Weiters ist eine Mischvorrichtung für Bio-Sensoren, bei der mittels Rührer durch eine mechanische Welle von außen in einer Kammer eine Homogenisierung der Probe bewirkt wird, in der WO 94/26396 beschrieben. Dabei wird vom Rührer eine wechselseitige Bewegung normal zur Oberfläche des Sensors während der Messung der Signale durchgeführt

[0013] Eine weitere Patentschrift nämlich GB 876 070 beschreibt ganz allgemein die Durchmischung von Flüssigkeiten mittels rotierender Gitter.

[0014] Das granzflächennahe Mischen einer zu untersuchenden Flüssigkeit in Sensor-Vorrichtungen wird in der WO 00/09991 A1 beschrieben. Hier erfolgt das Durchmischen mittels Bewegung von magnetischen Kügelchen oder mittels beweglicher Netze, wobei im ersten Fall die magnetischen Kügelchen in einer Flüssigkeit abwechselnd zwischen zwei Elektromagneten nach oben und nach unten gezogen werden.

[0015] Speziell die Durchmischung von dünnen Flüssigkeitsschichten, welche eine Suspension beweglicher magnetischer Partikel beinhalten, wird in der EP 0 240 8a2 A1 beschrieben. Die Vorrichtung umfasst ebenfalls Magnetsysteme. Die dort beschriebene Anordnung stellt einen Spalt für die Aufnahme des Flüssigkeitsfilms mit den permanentmagnetischen Partikeln zur Verfügung.

[0016] In einem weiteren Patent, nämlich WO 97/02357 A1 ist eine Mischvorrichtung für den Einsatz bei DNA Chips in Erwägung gezogen. Dort werden eine akustische Mischung und eine magnetische Mischung, welche durch Wechselströme in Elektromagneten bewirkt wird, erwähnt.

[0017] Aus der US 6,806,050 B2 ist ein elektromagnetischer Chip bzw. Bio-Chip bekannt, welcher eine Matrix von individuell anspeisbaren Micro-Elektromagneteinheiten umfasst und an dessen Oberfläche Sonder-Moleküle immobilisiert sind. Mittels der Magneteinheiten werden an kleine Magnetpartikel gebundene Moleküle im Wesentlichen in der Ebene des Bio-Chips bewegt und es wird auf diese Weise eine Erhöhung der Zahl der Bindungen erreicht.

[0018] Dokument EP-A- 1 327 473 offenbart eine Vorrichtung gemäß dem Oberbegriff des Anspruchs 1.

[0019] Die neu entwickelte Vorrichtung gemäß der Erfindung beruht auf der Vergrößerung des Wirkungsbereichs der einzelnen Bindungsstellen, also z.B. DNA-Spots, durch Beimengung magnetischer Mikro- oder Nanopartikel zur Hybridisierungs-Lösung, welche mittels eines extern erzeugten Magnetfeldes bewegt werden und wobei z.B. die DNA Targets an die Sonden der einzelnen Spots wesentlich gezielter heranzuführbar sind. Es werden von den bzw. mittels der magnetischen Partikel die DNA-Targets in einer Mikroströmung mitgeführt und auf diese Weise transportiert.

[0020] Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Vorrichtung zur Steigerung der Kontaktfrequenz bzw. -häufigkeit zwischen zwei miteinander zur Bindung befähigten Reaktionspartnern, vorzugsweise zwischen Analysator-Molekül bzw. -Molekülteil und Analyt-Molekül bzw. -Molekülteil, insbesondere zur Steigerung der Bindungseffektivität und zur Reduktion der für einen Nachweis erforderlichen Bindungszeiten in Bioanalyse-Arrays gemäß dem **Oberbegriff** des Anspruchs 1, welche die im **kennzeichnenden Teil** dieses Anspruches genannten **Merkmale** aufweist.

[0021] Insbesondere die Kombination der matrixförmigen

Anordnung der Mikro- bzw. Milli-Magnetspulen mit nur einer gegenüberliegenden zentralen Magnetspule gestattet eine gezielte, präzise Bewegung der magnetischen Partikel innerhalb der Reaktionsflüssigkeit, also insbesondere des Hybridisierungs-Flüssigkeitsfilms und somit im Konkreten ein kontrolliertes Heranzuführen von Target-DNA an die immobilisierten Sonden auf dem DNA-Bio-Chip.

[0022] Die spezielle Anordnung der Mikro- bzw. Milli-Spulen und die "Muster" zu deren Anspeisung mit Magnetisierungsstrom verhindern ein Anhäufen der magnetischen Partikel und stellt somit einen wesentlichen Vorteil gegenüber den bisher bekannten, oben genannten, auf der Bewegung magnetischer Partikel beruhender, Mischvorrichtungen dar. Die Verwendung magnetischer Felder ermöglicht außerdem die einfache Kombination mit einer Probenkammer, in welcher die Feuchte und Temperatur kontrolliert wird, so dass ein hoher Grad an Systemintegration ermöglicht wird.

[0023] Die matrix-artige bzw. array-förmige Anordnung der Milli-Magnetspulen mit oder ohne Magnetkerne (n), z.B. unterhalb des DNA-Chips und nur einer Magnetspule oberhalb des DNA-Chips ermöglicht eine ganz gezielte Bewegung der magnetischen Partikel.

[0024] So dient die einzelne Magnetspule oberhalb des Chips dazu, die magnetischen Partikel zu einer Aufwärtsbewegung zu veranlassen. Wenn diese Spule durch Abschalten des Stromes nicht mehr magnetisch ist, beginnen die Magnetpartikel wieder abzusinken. Ein Absinken in der gleichen Bahn wie die Anhebungsbahn wird dadurch verhindert, dass die Mikro-Magnetspulen der Mikro-Magnet-Matrix unterhalb des Chips, z.B. wellenartig, magnetisiert werden und somit die Magnetpartikel während ihres Absinkens seitwärts verschoben werden und somit letztlich eine Art Schrägströmung in der Reaktionsflüssigkeit induziert wird, durch welche die Target-Moleküle mehr bewegt und dadurch auch mehr Sonden-Molekülen zugeführt werden.

[0025] Es werden also mittels des erfindungsgemäß vorgesehenen Aufbaus die Partikel jeweils lateral in Richtung des Zentrums der entsprechend beschalteten Mikro-Magnet-Matrix bewegt. Durch Variation der Dauer und der relativen Stärke der Impulse von jeweils benachbarten Mikro-Magnetspulen und der oberhalb des Chips angeordneten Magnetspule lassen sich nach Belieben flexible Bewegungsmuster programmieren, um einen gezielten lateralen und vertikalen Transport der in dem Hybridisierungs-Flüssigkeitsfilm gelösten Target-Moleküle zu ermöglichen.

[0026] Die erfindungsgemäß vorgesehene Anordnung gestattet im Gegensatz zu den eingangs erwähnten Anordnungen gemäß dem Stand der Technik, welche sich mit der ungerichteten oder höchstens in einer Richtung erfolgenden Durchmischung von Flüssigkeitsfilmen befassen, eine vorprogrammierte, ganz gezielte Bewegung der eingesetzten Mikro-Magnetpartikel. Im Gegensatz zu den erwähnten Patent Veröffentlichungen kann mit der erfindungsgemäßen Einrichtung insbesondere das Ver-

klumpen und das Ansammeln der Magnetpartikel verhindert werden.

[0027] Außerdem bietet die Erfindung den Vorteil, dass sie problemlos mit schon etablierten, bestehenden Bioanalyse-Arreys kombinierbar ist und weitere, dass bei Integration der Magnetspule in einen entsprechenden Träger die Temperatur an der Grenzfläche zum Bio-Chip präzise eingestellt werden kann, was durch einen später noch zu erörternden integrierten Kühl/Heizkreislauf ermöglicht wird.

[0028] Die Vorrichtung gemäß der Erfindung unterscheidet sich dadurch insbesondere von einer Anordnung, welche ausschließlich auf mögliche Prozessschritte in einem integrierten Mikrofluidik-Biochip abzielt und für eine Nachrüstung schon existierender DNA-Mikro-Arreys nicht geeignet ist.

[0029] Zum Nachweis der Wirkungsweise der erfindungsgemäßen Vorrichtung wurden Hybridisierungs-Experimente auf gleichartigen DNA-Bio-Chips mit Unterstützung durch die erfindungsgemäße Vorrichtung und parallel dazu auf konventionelle Art durchgeführt - Hierbei waren konstante Temperaturverhältnisse (65 °C), Hybridisierungszeiten (25 min.) und Auswerteverfahren in den jeweiligen Experimenten sichergestellt; es zeigten sich beim Einsatz der erfindungsgemäßen Vorrichtung über sämtliche Experimente ein mittlerer Signalgewinn von etwa 150 % Signalgewinn $= ((\text{Vorrichtungssignale} - \text{Referenzsignale}) / \text{Referenzsignale}) \cdot 100$ gegenüber dem entsprechenden Ergebnissen bei herkömmlicher Hybridisierung.

[0030] Gemäß einer vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung ist eine Ansteuerungseinrichtung für die Mikro-Magnetspulen einerseits und die Einzel-Magnetspule andererseits gemäß Anspruch 2 vorgesehen, mittels welcher jede einzelne Mikro-Magnetspule individuell ansteuerbar ist und mittels welcher jedes zeitabhängige Magnetisierungs-Muster auf die Magnet-Matrixfläche aufprägbare ist.

[0031] Insbesondere im Sinne einer ungestörten, optischen Kontrolle ist eine Ausführungsform der Einzelmagnetspule der erfindungsgemäßen Vorrichtung ohne Kern, also mit freigelassener mittlerer Ausnehmung, gemäß **Anspruch 3** günstig, wodurch eine freie Sicht auf das Reaktionsgeschehen, insbesondere auf den Bioanalyse-Chip bzw. -Array ermöglicht ist.

[0032] Zur Erhöhung der Effektivität der Anordnung der Mikro-Magnetspulen in der Magnetspulen-Matrix dienen die Merkmale des **Anspruchs 4**.

[0033] Weiters ist eine Anordnung der Analyse-Vorrichtung in einer Art klimatisierter Kammer gemäß **Anspruch 5**, insbesondere im Hinblick auf genau einzubauende stabile Umgebungsbedingungen bevorzugt.

[0034] Der **Anspruch 6** betrifft eine konkrete Anordnung der Komponenten der erfindungsgemäßen Vorrichtung.

[0035] Schließlich hat der **Anspruch 7** eine bevorzugte Ausführungsvariante der Vorrichtung mit einer Aufnahme-kammer für das Reaktionsgefäß, insbesondere

für den Bio-Analysearray-Mikrochip, zum Gegenstand.

[0036] Anhand der Zeichnung wird die Erfindung näher erläutert:

[0037] Es zeigen die Fig. 1 die grundsätzliche Anordnung der wesentlichen Komponenten der erfindungsgemäßen Vorrichtung, die Fig. 2 schematisch die Vorgänge während der Magnetisierung auf dem Objektträger, die Fig. 3 schematisch die Steuerung der neuen Vorrichtung, die Fig. 4 ein Beispiel für eine reale Ausführungsform der neuen Vorrichtung, die Fig. 5 schematisch ein Diagramm des Weges, welchen ein Magnetpartikel innerhalb der Probenflüssigkeit zurücklegt, die Fig. 6a ein Diagramm, welches die Signalsteigerung bei Einsatz der neuen Vorrichtung im Vergleich zeigt und die Fig. 6b ein Diagramm, in welchem die Signalsteigerung in Abhängigkeit von der Hybridisierungszeit ebenfalls im Vergleich zum Stand der Technik dargestellt ist.

[0038] In der Schrägrissdarstellung der Fig. 1 ist der prinzipielle Aufbau der erfindungsgemäßen Vorrichtung 1 für eine magnet-induzierte Intensivierung der Kontakte zwischen zwei Reaktions-, insbesondere Bindungspartnern, wie z.B. Target-Molekül und Sonden-Molekül gezeigt.

[0039] Auf dem Objektträger 4 aus Glas ist unterhalb des Deckgläschens 5 der Bioanalyse-Array 6 mit in regelmäßig aufgetragenen feinen Spots mit den Sonden-Molekülen bzw. der Bio-Chip 6 angeordnet. Zwischen Objektträger 4 und Deckgläschen 5 befindet sich die Reaktions-, insbesondere Hybridisierungsflüssigkeit mit den Target-Molekülen und den für die Agitation der Flüssigkeit vorgesehenen Mikro-Magnetpartikel.

[0040] In der Fig. 1 oberhalb dieser Anordnung ist die hier flachringartige bzw. toriodförmige Einzelmagnetspule 3 ohne Kern, also mit freier zentraler Öffnung 36 angeordnet, durch welche die Durchsicht auf die Reaktion auf dem Objektträger 4 bzw. unterhalb des Deckgläschens 5 freigehalten ist.

[0041] Unterhalb des Bio-Chips 6 und seinem Nahbereich ist unterhalb des Objektträgers 4 eine große Anzahl von individuell mit Magnetisierungsstrom versorgbaren Mikro-Magnetspulen 2 mit Spulenkernen 21, vorzugsweise in einer Sechseck-Matrix 20 angeordnet.

[0042] Die schematische Darstellung der Fig. 2 zeigt - bei sonst gleichbleibenden Bezugszeichenbedeutungen - wie sich zwischen dem Objektträger 4 mit den Spots mit den Sonden-Molekülen 63 des Bio-Chips 6 die Reaktionsflüssigkeit 70 befindet, und wie sich in derselben - von den vorher erläuterten Elektro-Magneten 2 bzw. 20, 3 und deren variablen Magnetfeldern beaufschlagten, die hier kreisrund dargestellten Magnetpartikel 75 etwa in den durch Pfeile symbolisieren Bewegungsrichtungen bewegen und die durch Sternchen symbolisierten - Fluoreazenzfarbstoff 72 beaufschlagten Target-Moleküle 73 mit den immobilisierten Sonden-Molekülen 83 in Kontakt bringen und dort wesentlich öfter binden, als dies z.B. durch Diffusion erreichbar wäre.

[0043] Die in der Fig. 3 - bei sonst gleichbleibenden Bezugszeichenbedeutungen - sehr schematisch darge-

stellten Steuerungs-Einrichtung 8 dient zur individuellen Anspeisung der Mikro-Magnetspulen 2 der Mikro-Magnetmatrix 20 mit variablen Magnetisierungsströmen sowie zur ebenfalls variablen Anspeisung der Einzel-Magnetspule 3 mit Strom.

[0044] Die Zentral-Steuerungseinheit (PC-Control) 81 ist mit einer Steuereinheit, z.B. D/A-card 82 verbunden, welche einerseits mit der Stromversorgungseinheit (Power-Supply 1) 83 für die Mikro-Magnetspulen-Matrix 20 und andererseits mit der Stromversorgungseinheit (Power Supply 2) 84 für die Einzel-Magnetspule 3 verbunden ist.

[0045] Die Stromversorgungseinheit (Power Supply 1) 83 ist mit einer - selbst direkt mit der D/A-Card 82 verbundenen Relaismatrix-Einheit 85 verbunden, von der aus die zeitabhängig variable individuelle Stromversorgung jeder einzelnen mit derselben verbundenen einzelnen Mikromagnetspule 2 der Magnetmatrix 20 gemäß einem von der Zentral-Steuerungseinheit 81 gelieferten Programm erfolgt.

[0046] Vorgesehen ist weiters auch eine Kontrolle der Temperatur an der Probe. Diese erfolgt mittels einer direkt mit der Zentral-Steuerungseinheit 81 verbundenen Temperatur-Kontrolleinheit (Thermocontrol) 86, welche von hier nicht gezeigten Thermosensoren, welche im Probereich bzw. in Nähe der Magnete 2, 20 und 3 angeordnet sind, mit den aktuellen Temperaturdaten versorgt werden.

[0047] Die Fig. 4 zeigt - bei sonst gleichbleibenden Bezugszeichenbedeutungen - jeweils in Schnittansichten von der Seite und von oben, die reale Konfiguration der Komponenten in der neuen verbesserten Analyse-Vorrichtung 1. Es ist hier eine Deckeinheit II und eine Grundblockeinheit 1 gezeigt, zwischen welchen der hier nicht gezeigte Objektträger mit der durchzuführenden Reaktion angeordnet wird.

[0048] Die Grundblockeinheit I besteht - wie aus Fig. 4a ersichtlich - aus einem von Kühl/Heizmediumskanälen 22, 22' durchzogenen Aluminiumblock 21, in welchem mittig die Magnetspulen-Matrix 20 mit den Mikro-Magnetspulen 2 angeordnet ist. Unterhalb dieser Matrix 20 ist ein weiterer kleiner, ebenfalls von einem Kühl- bzw. Heizmediumskanal 225 durchzogener Aluminiumblock 25 angeordnet.

[0049] Den Verlauf der Kühl/Heizmediumskanäle 22, 22' im Grundriss erläutert die Fig. 4b, in welcher die Zu- und Abflüsse durch Pfeile gekennzeichnet sind. Durch die Fertigung der Kanäle im Block 21 bedingte Öffnungen sind mit Stopfen verschlossen.

[0050] Nach oben hin abgedeckt ist der Aluminiumblock 21 mit einer dünnen Folie 23, auf welcher randseitig umlaufende Gummiringe 26, 27 aufliegen, innerhalb welcher sich ein Raum 230 für die Platzierung der Probe befindet.

[0051] Die in der Fig. 4c gezeigte Deckeinheit II umfasst einen - hier mit der mittig eine. Ausnehmung 34 aufweisenden Edelstahldeckfläche 35 - nach oben hin begrenzten Aluminiumblock 31, welcher ebenfalls von Kühl/Heizmediumskanälen 32 durchzogen ist und in wel-

chem die ringförmige Einzel-Magnetspule 3 untergebracht ist.

[0052] Der Aluminiumblock 31 ist von einer mittigen Öffnung 34' durchsetzt, durch welche der Blick auf die Probe freigehalten ist, und nach unten hin mit einer Glasplatte 33 abgeschlossen.

[0053] Die Temperaturkontrolle erfolgt mittels Thermoelementen, welche die aktuellen Temperaturdaten an die schon oben genannte Thermokontrolleinheit abgeben.

[0054] Die Fig. 4d ermöglicht eine Übersicht über den Verlauf der Kühl/Heizmediumskanäle 32 im Aluminiumblock 31 der Deckeinheit II in Draufsicht.

[0055] Die Fig. 5 zeigt bei sonst gleichbleibenden Bezugszeichenbedeutungen - schematisch den Weg- bzw. Bewegungsverlauf der Mikro-Magnetpartikel 75 im Flüssigkeitsfilm 70 zwischen Objektträger 4 bzw. Bio-Chip 6 und Deckglas 5. Bei Aktivieren der oberen Einzel-Magnetspule 3 wird das einzelne Magnetpartikel 75 entlang Bahn A etwa senkrecht aufwärts gezogen und durch das Magnetfeld einer etwas außerhalb der Aufstiegs-Bahn A liegenden jetzt magnetisierten Mikro-Magnetspule 2 und beim - durch Abschalten der Einzel-Magnetspule 3 erfolgenden Absinken wird das Magnetpartikel 75 seitlich abgelenkt und folgt dann etwa der Bahn B usw.

[0056] In der Fig. 6a und 6b sind die mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung erreichten Signalsteigerungen als Funktion der Konzentration an magnetischen Partikeln nach der Hybridisierung gezeigt:

[0057] Auf der Ordinate des Diagramms Fig 6a ist die Intensität der Fluoreszenz-Indikation und auf der Abszisse ist die Konzentration der Magnetpartikel M-PVA 13 bead (5-8 μm) (Chemagen AG, Arnold-Sommerfeld-Ring 2, D-52499 Baesweiler) in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ aufgetragen.

[0058] Die in Quadratform dargestellten Signalwerte wurden mit der beschriebenen Vorrichtung erzielt, die mit Kreuzen dargestellten auf konventionelle Weise. Es zeigt sich ein hoher mittlerer Signalgewinn. Die Fig. 6a zeigt weiters in der linken Spalte unten die Referenzsignale der DNA-Sonde Ec. faecium 2 als kleine Kreuze. Der entsprechende Mittelwert ist in der rechten Spalte als kleines rotes Kreuz eingezeichnet. In der mittleren Spalte sind zu vier unterschiedlichen bead-Konzentrationen die Signale der Sonde Ec. faecium 2 bei Einsatz der neuen Vorrichtung dargestellt. Jeder der hier gezeigten Datenpunkte (kleine Quadrate) entspricht einem Experiment, die Fehlerbalken ergeben sich dabei durch die Auswertung von je 6 Replikaten der Sonde Ec. faecium 2 pro Experiment. Die Hybridisierungszeit betrug in den jeweiligen experimenten 25 min.

[0059] Es zeigte sich bei Einsatz der neuen Vorrichtung bei dieser Sonde über sämtliche Experimente ein mittlerer Signalgewinn von ca. 150 %, gegenüber einer herkömmlich durchgeführten Hybridisierung. Die Berechnung erfolgte durch arithmetisches Mitteln der Signale für die DNA-Sonde Ec. faecium 2 bei unterschiedlichen bead-Konzentrationen.

[0060] In der Fig. 6b sind - bei sonst gleichbleibenden

Bezugszeichenbedeutungen nebenfalls die unter Einsatz der erfindungsgemäßen Vorrichtung erzielten Intensitäten 1 der Fluoreszenz-Signale den Intensitäten der auf bisher bekannter Weise erhaltenen Signalen als Funktion der Hybridisierungszeit gegenübergestellt.

[0061] Hier ist auf der Abzisse die Hybridisierungszeit in min aufgetragen und die Konzentration an Mikro-Magnetpartikeln bzw. -beads M-PVA 13 bead 5-8 µm ist mit [1,8 µg/µl] konstant gehalten.

[0062] Es zeigt sich schon nach 5 min ein sehr großer Signalgewinn bei Einsatz der erfindungsgemäßen Vorrichtung.

(1) Advalytix AG, Eugen-Sänger-Straße 53.0, D-85649 Brunnthal, www.advalytix.de, SlideBooster SB400

(2) R.H. Liu et. al. Bubble-induced acoustic micro-mixing, Lab Chip, 2002, 2, 151-157

(3) WO 94/28396

(4) GB 876,070 A

(5) WO 00/09991 A1

(6) EP 0 240 862 A1

(7) WO 97/02357 A1

(8) US 6,806,050 B2

Patentansprüche

1. Vorrichtung zur Steigerung der Kontaktfrequenz bzw. -häufigkeit zwischen zwei miteinander zur Bindung befähigten Reaktionspartnern, vorzugsweise zwischen Analysator-Molekül bzw. -Molekülteil und Analyt-Molekül bzw. -Molekülteil, insbesondere zur Steigerung der Bindungseffektivität und zur Reduktion der für einen Nachweis erforderlichen Bindungszeiten in Bioanalyse-Arrays, wie z.B. DNA/RNA-, Protein- oder Immuno-Mikroarrays mit Hilfe von - mittels beidseitig des Reaktionsvolumens bzw. Reaktionsfluidfilms angeordneter, mit veränderlichen Strömen anspeisbarer Elektromagneten (3, 2, 20) - extern generierten Magnetfeldern berührungslos im fluiden Reaktionsmedium, insbesondere mit in der den Bioanalyse-Array umgebenden Flüssigkeit gezielt in Bewegung gesetzten para-, superpara- oder ferromagnetischen, sphärisch oder unregelmäßig geformten, gegebenenfalls mit einem der Reaktionspartner gecoateten, Mikro- oder Nanopartikeln (75) **dadurch gekennzeichnet, dass** auf einer Seite des Reaktionsgefäßes bzw. Reaktionsfluidfilms, insbesondere eines Objektträgers (4) mit - den bzw. die Reaktionspartner (73) und die Reaktionsflüssigkeit (70) und vorzugsweise ein Mikro-Bioanalyse-Array (6) abdeckendem - transparentem Deckglas (5), in der unmittelbaren Nähe eine zweidimensional flächige Matrix (20) bzw. ein Array mit einer Mehrzahl von individuell mit Magnetisierungsstrom jeweils vorgegebener, zeitabhängig variabler Stärke und/oder Spannung - einem jeweils ge-

wünschten zeitabhängig variablen bzw. veränderlichen Magnetisierungs- bzw. Feldstärke-Muster entsprechend - anspeisbaren Miniatur- bzw. Milli-Magnetspulen (2) gegebenenfalls mit oder ohne feldverstärkendem Kern (21), angeordnet ist und

dass auf der anderen Seite des Reaktionsgefäßes, insbesondere Objektträger (4) mit dem Mikro-Bioanalysearray (6), in dessen unmittelbarer Nähe nur eine, ebenfalls mit variablen Magnetisierungsstrom anspeisbare Magnetspule (3) positioniert ist, deren Magnetfeld das gesamte Reaktionsgefäß oder wesentliche Teile desselben, insbesondere den gesamten (Mikro)-Bioanalysearray (6), durchsetzt.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** sie eine Magneten-Ansteuerungseinrichtung (8) mit Zentral-Steuereinheit (81) aufweist, mittels welcher die Einzel-Magnetspule (3) und jede der Miniatur-Magnetspulen (2) der Magnetspulen-Matrix bzw. des Magnetspulen-Arrays (20) jeweils individuell und unabhängig von den anderen Miniatur-Magnetspulen, mit insbesondere hinsichtlich Stromart, wie DC oder AC, mit beliebiger Frequenz, Wellenform, Amplitude und/oder Phasenverschiebung, variablen Magnetisierungsstrom anspeisbar bzw. bestrombar sind, sodass - einem jeweils gewählten Programm entsprechend - jeweils örtlich, in allen drei Raumrichtungen, verschieden - eine ortsvariable Bewegung der Magnetpartikel (75) mit jeweils gewünschter Bewegungsrichtung, -bahn und -geschwindigkeit in der Reaktionsflüssigkeit im Reaktionsfluidfilm bzw. in der den (Mikro)-Bioanalyse-Array bzw. Bio-Chip (6) umgebenden Flüssigkeit induzierbar ist.

3. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Einzel-Magnetspule (3) ringförmig und ohne Kern ausgebildet ist, um die Sicht auf das Reaktionsgefäß, insbesondere auf den (Mikro)-Bioanalyse-Array bzw. Mikro-Biochip (6), freizuhalten.

4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Mikro-Magnetspulen (2) der Mikro-Magnetspulen-Matrix (20) mit möglichst kleinen Zwischenräumen zwischen einander mit jeweils kreisförmigem, quadratischem oder hexagonalem Querschnitt ausgebildet und in einer Quadrat-Matrix oder bienenwabenartigen Sechseck-Matrix (20) angeordnet sind.

5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet, dass** sie insgesamt in einer Kammer angeordnet ist, in welcher die Feuchte des Reagenzgefäßes, insbesondere den (Mikro)-Bioanalyse-Array (6), umge-

benden Gases, sowie vorzugsweise die bzw. dessen Temperatur und gegebenenfalls Druck kontrollier- und einstellbar ist.

6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5 **dadurch gekennzeichnet,**

- **dass** die Einzel-Magnetspule (3) in einem Block (31) aus gut wärmeleitfähigem Material, insbesondere aus Aluminium, angeordnet ist und dass in demselben ein diese Einzel-Magnetspule (3) im Nahbereich ihrer dem Reaktionsgefäß, insbesondere dem (Mikro-)Bioanalyse-Array (6), nahen Oberfläche außen umringender und ein vorzugsweise gesonderter, oberhalb derselben im Nahbereich von deren Innenrand angeordneten, mit einer Kühl- oder Heizflüssigkeit durchströmbarer Fluidmediums-Kanal (32, 32') vorgesehen ist.
- **dass** gegebenenfalls auch die Mikro-Magnetspulen-Matrix (20) in einem Aluminiumblock oder -tisch (21) angeordnet ist und seitlich rundum von einem mit einer Kühl- oder Heizflüssigkeit durchströmbaren Fluidmediums-Kanal (22, 227 umgeben ist und
- **dass** gegebenenfalls zusätzlich unterhalb der Mikro-Magnetspulen-Matrix (20) ein Kühlkanal-System (225) in einem gesonderten Metallblock (25) angeordnet ist.

7. Vorrichtung nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet,**

- **dass** der Metall-, insbesondere Aluminiumblock (31) mit der Einzelmagnetspule (3) zum Reaktionsgefäß, insbesondere zum Bioanalyse-Array (6) bzw. Mikro-Biochip, hin mit einer Glasplatte (33) abgeschlossen ist,
- **dass** gegebenenfalls der Metall-, insbesondere Aluminiumblock (21) mit der Mikro-Magnetspulen-Matrix (20) mittels Aluminium- oder Kunststoff-Deckfolie (23) abgeschlossen ist und
- **dass** gegebenenfalls die beiden Metall-, insbesondere Aluminiumblöcke (21, 31) mittels mindestens eines randnah angeordneten geschlossenen Gummi-Ringelements (26, 27) zwischen der oben genannten Glasplatte (33) und der Deckfolie (23) unter Ausbildung einer von der Umgebung und deren Einflüssen abgeschotteten Probenkammer (230) voneinander beabstandet gehalten sind.

Claims

1. A device for increasing a contact rate or frequency between first and second reaction partners capable of bonding with each other, and preferably between

analyzer molecules or parts of molecules and analyte molecules or parts of molecules, especially for increasing a bonding effectiveness and for reducing bonding times required for detection in bioanalysis-arrays, such as DNA/RNA, protein or immunomicroarrays with magnetic fields that are externally generated by electromagnets (3, 2, 20) in a contactless manner in a fluid reaction medium, especially a liquid surrounding the bioanalysis array for moving in targeted fashion para-, superpara- or ferromagnetic, spherical or irregularly shaped micro- or nanoparticles (75) that are optionally coated with one of the reaction partners, the electromagnets being adapted to be fed variable currents and arranged on both sides of a reaction volume or reaction fluid film,

characterized in that

a reaction vessel or reaction fluid film, especially an object carrier (4), is provided and a transparent cover glass (5) is arranged on a side thereof, the reaction partner (73) or partners and the reaction fluid (70) and preferably a micro bioanalyze array (6) being covered by the cover glass in an immediate vicinity of a two-dimensional surface matrix (20) or an array of a plurality of miniature and/or millimagnetic coils (2), with or without a field enhancing core (21), which can be supplied with individual magnetizing currents having preestablished, time-dependent, variable strengths and/or voltages that correspond to a desired, time-dependent, variable or changeable magnetization and/or field strength sample, and **in that** only one magnetic coil (3), also adapted to be fed a variable magnetizing current, is positioned at another side of the reaction vessel, especially the object carrier (4) with the micro bioanalyze array (6), in an immediate vicinity of the object carrier and the micro bioanalyze array so that a magnetic field of the only one magnet extends through at least a portion of the reaction vessel or important parts thereof including particularly the entire micro bioanalysis array (6).

2. A device according to Claim 1, including a magnet control device (8) with a central control unit (81) for supplying or feeding the only one magnetic coil (3) and each of the miniature magnetic coils (2) of the magnetic coil matrix and/or the magnetic coil array (20) individually and independently of the other miniature magnetic coils with a variable magnetization current, especially with respect to the type of current, such as DC or AC, frequency, wave shape, amplitude and/or phase shift so that, according to a selected program, a locally-variable movement of the magnetic particles (75) in all three spatial directions is induced in the desired movement direction, path and velocity in the reaction liquid of the reaction fluid film and/or in the liquid surrounding the (micro)bioanalysis array or biochip (6).

3. A device according to any one of Claims 1 or 2, **characterized in that** the only one magnetic coil (3) is annular and without a core to permit viewing the reaction vessel, especially of the microbioanalysis array or microbiochip (6). 5
4. A device according to any one of Claims 1 to 3, **characterized in that** the micromagnetic coils (2) of the micromagnetic coil matrix (20) have the smallest possible intermediate spaces between each other, have a circular, square or hexagonal cross-section, and are arranged in a square matrix or a honeycomb-like hexagonal matrix (20). 10
5. A device according to any one of Claims 1 to 4, **characterized in that** the device is arranged in a chamber in which a moisture of a gas surrounding the reagent vessel, especially the microbioanalysis array (6), and preferably also its temperature and optionally its pressure are controllable and adjustable. 15 20
6. A device according to any one of Claims 1 to 5, **characterized in that** the only one magnetic spool (3) is positioned in an aluminum block (31) of a good heat conducting material, especially aluminum, 25
in that a preferably separate fluid medium flow channel (32, 32') is provided in the aluminum block which extends proximate to an outer surface thereof in a vicinity of the reaction vessel, especially the (micro) bioanalysis array (6) and above thereof in a proximity to an inner boundary thereof, 30
in that the micromagnetic coil matrix (20) is optionally arranged in an aluminum block or a table (21) and is laterally surrounded by another fluid medium flow channel (22, 22') through which a cooling or heating fluid can flow, and 35
in that a cooling channel system (225) is additionally optionally arranged in a separate metal block (25) beneath the micromagnetic coil matrix (20). 40
7. A device according to Claim 6, **characterized by** a glass plate (33) which seals the metal, especially aluminum, block (31) with the only one magnetic coil (3) relative to the reaction vessel, especially the bioanalysis array (6) or microbiochip, by an optional aluminum or plastic cover film (23) that closes the metal, especially aluminum, block (21) with the micromagnetic coil matrix (20), and by at least one closed rubber ring element (26, 27) arranged near an edge between the above-mentioned glass plate 33 and the cover film (23) that optionally holds the two metal, especially aluminum, blocks (21, 31) at a spacing from each other to form a sample chamber (230) that is shielded from the surroundings and its effects. 45 50 55

Revendications

1. Dispositif d'augmentation de la fréquence de contact entre deux partenaires de réaction capable à une liaison l'un avec l'autre, préférablement entre un molécule analyseur ou une part de ce molécule et un molécule d'analyte ou une part de ce molécule, particulièrement d'augmentation de l'efficacité de liaison et de réduction des temps de liaison nécessaire pour la preuve dans des arrays de bicanalyse, comme par exemple des microarrays d'ADN/ARN, de protéine ou d'immuno, à l'aide des micro- ou nanoparticules (75) paramagnétiques, superparamagnétiques ou ferromagnétiques, sphériques ou formés d'une façon irrégulière, le cas échéant enrobés d'un partenaire de réaction, mis en mouvement d'une manière visée sans contact dans le milieu fluide de réaction, particulièrement par des champs magnétiques extérieurement générés au moyen des électroaimants (3, 2, 20) disposés aux deux côtés du volume de réaction et alimentés des courants variables dans un liquide entourant l'array de bioanalyse, **caractérisé en ce,**
qu'à un côté du récipient de réaction ou du filme de fluide de réaction, particulièrement d'un porte-objet (4) avec un couvre-objet (5) transparent, qui couvre le ou les partenaire(s) de réaction (73) et le liquide de réaction (70), et de préférence un microarray de bioanalyse (6), en proximité immédiate, une matrice plane à deux dimensions (20) ou un array avec une pluralité des millibobines magnétiques miniaturisées (2), le cas échéant avec ou sans noyau (21), qui amplifie le champ, à alimenter d'un courant et/ou une tension de magnétisation d'une intensité donnée, d'une intensité variable en fonction du temps, qui correspond à un dessin de magnétisation ou d'intensité de champ respectivement désiré, variable ou changeant en fonction du temps est disposée, et
qu'à l'autre côté du récipient de réaction, particulièrement du porte-objet (4) avec l'array de bioanalyse (6), en proximité immédiate de ceci, seulement une bobine magnétique (3) à alimenter de même d'un courant de magnétisation variable est disposée, dont le champ magnétique traverse tout le récipient de réaction ou des parties essentielles de ceci, en particulier tout le (micro)array de bioanalyse (6).
2. Dispositif selon la revendication 1, **caractérisé en ce,**
qu'il comprend un dispositif de commande d'aimant (8) avec une unité de commande centrale (81), au moyen de laquelle la seule bobine magnétique (3) et chacune des bobines magnétiques miniaturisées (2) de la matrice de bobines magnétiques ou de l'array des bobines magnétiques (20) peuvent être alimentées en courant chacune individuellement et indépendamment des autres bobines magnéti-

- ques miniaturisées d'un courant de magnétisation variable, en particulier en vue du type de courant, comme DC ou AC, avec une fréquence, une forme d'onde, amplitude et/ou opposition de phases désirée, de manière que, en correspondance avec un programme respectivement choisi, on peut induire à la place respective et différent dans les trois directions de l'espace un mouvement d'une variable position des particules magnétiques (75) avec une direction, une trajectoire et une vitesse de mouvement respectivement désirées dans le liquide de réaction dans le filme de fluide de réaction ou dans le liquide entourant le (micro)array de bioanalyse ou le biochip (6).
3. Dispositif selon une quelconque des revendications 1 ou 2, **caractérisé en ce, que** la seule bobine magnétique (3) est annulaire est sans noyau pour maintenir libre la vue au récipient de réaction, particulièrement à l'array de (micro)bioanalyse ou au microbiochip (6).
4. Dispositif selon une quelconque des revendications 1 à 3, **caractérisé en ce, que** les microbobines magnétiques (2) de la matrice des microbobines magnétiques (20) sont formé avec des espaces intermédiaires si petits que possible entre eux, ayant un coupe en travers respectif annulaire, carré ou hexagonal, est sont disposées dans une matrice carré ou dans une matrice hexagonale (20) en forme de nid d'abeilles.
5. Dispositif selon une quelconque des revendications 1 à 4, **caractérisé en ce, qu'il** est tout disposé dans une chambre, dans laquelle l'humidité du gaz entourant le récipient de réactif, particulièrement de l'array de (micro)bioanalyse (6), ainsi que de préférence la température ou la de ceci et, le cas échéant, la pression peuvent être contrôlées et ajustées.
6. Dispositif selon une quelconque des revendications 1 à 5, **caractérisé en ce,**
- **que** la seule bobine magnétique (3) est disposée dans un bloc (31) d'un matériau d'un bon conducteur de chaleur, particulièrement d'aluminium, et qu'un canal à un milieu fluide (32, 32') est prévu, dont l'un entoure extérieurement cette seule bobine magnétique (3) dans la zone proche de sa surface, qui est proche au récipient de réaction, particulièrement à l'array de (micro)bioanalyse (6), et dont l'autre est préférentiellement séparé, est au-dessus de celle-ci

dans la zone proche au bord intérieur, et peut être passé à travers d'un liquide de chauffage ou de refroidissement.

- **que**, le cas échéant, la matrice des microbobines magnétiques (20) est disposé dans un bloc ou table d'aluminium (21), et est entourée latéralement tout autour d'elle d'un canal à un milieu fluide (22, 22'), qui peut être passé à travers d'un liquide de chauffage ou de refroidissement, et

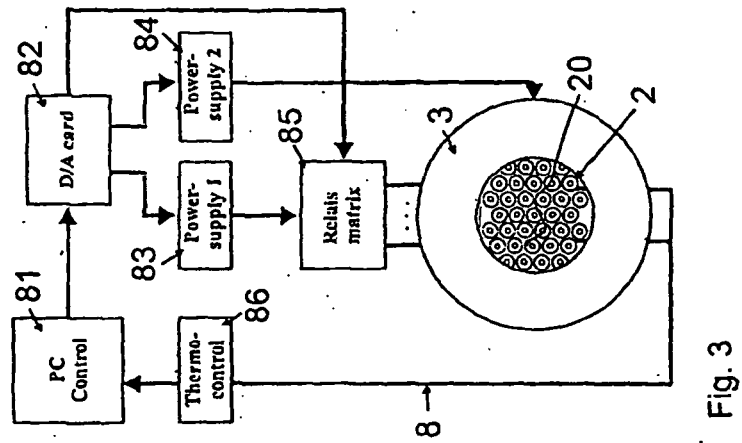
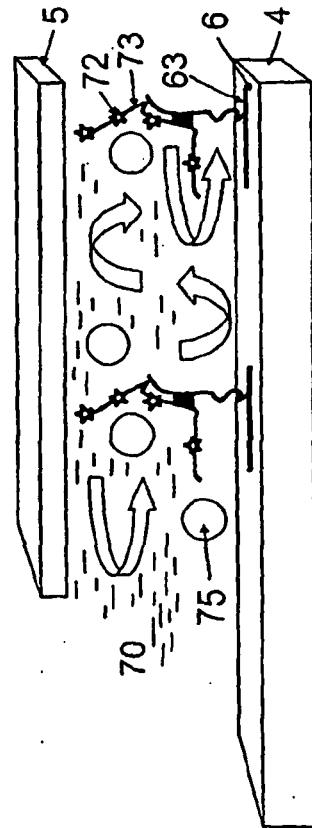
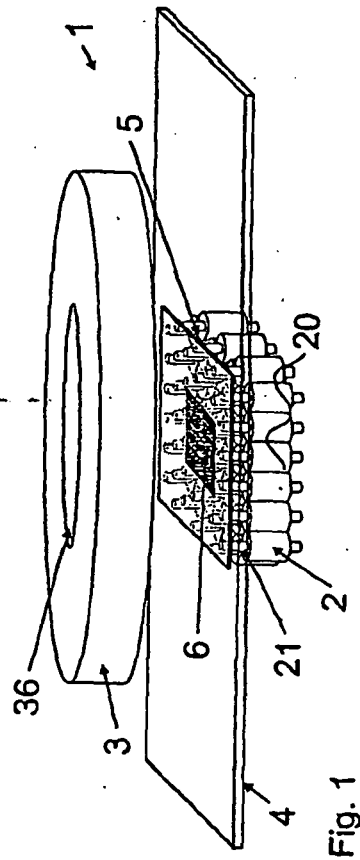
- **que**, le cas échéant, additionnellement un système de canal de refroidissement (225) est disposé dans un bloc de métal séparé (25) au-dessous de la matrice des microbobines magnétiques (20).

7. Dispositif selon la revendication 6, **caractérisé en ce,**

- **que** le bloc de métal, en particulier d'aluminium (31), avec la seule bobine magnétique (3) est fermé vers le récipient de réaction, particulièrement vers l'array de bioanalyse (6) ou le microbiochip par une plaque de verre (33),

- **que**, le cas échéant, le bloc de métal, en particulier d'aluminium (21), avec la matrice de microbobines magnétiques (20) est fermé au moyen d'une feuille couvrante d'aluminium ou de matière synthétique (23), et

- **que**, le cas échéant, les deux blocs de métal, en particulier d'aluminium (21, 31), sont maintenus espacés l'un de l'autre au moyen d'au moins un élément annulaire fermé de caoutchouc (26, 27) disposé proche au bord entre la plaque de verre susmentionnée (33) et la feuille couvrante (23) en formant une chambre d'échantillon (230) étanchée vers l'ambiance et les influences de laquelle.



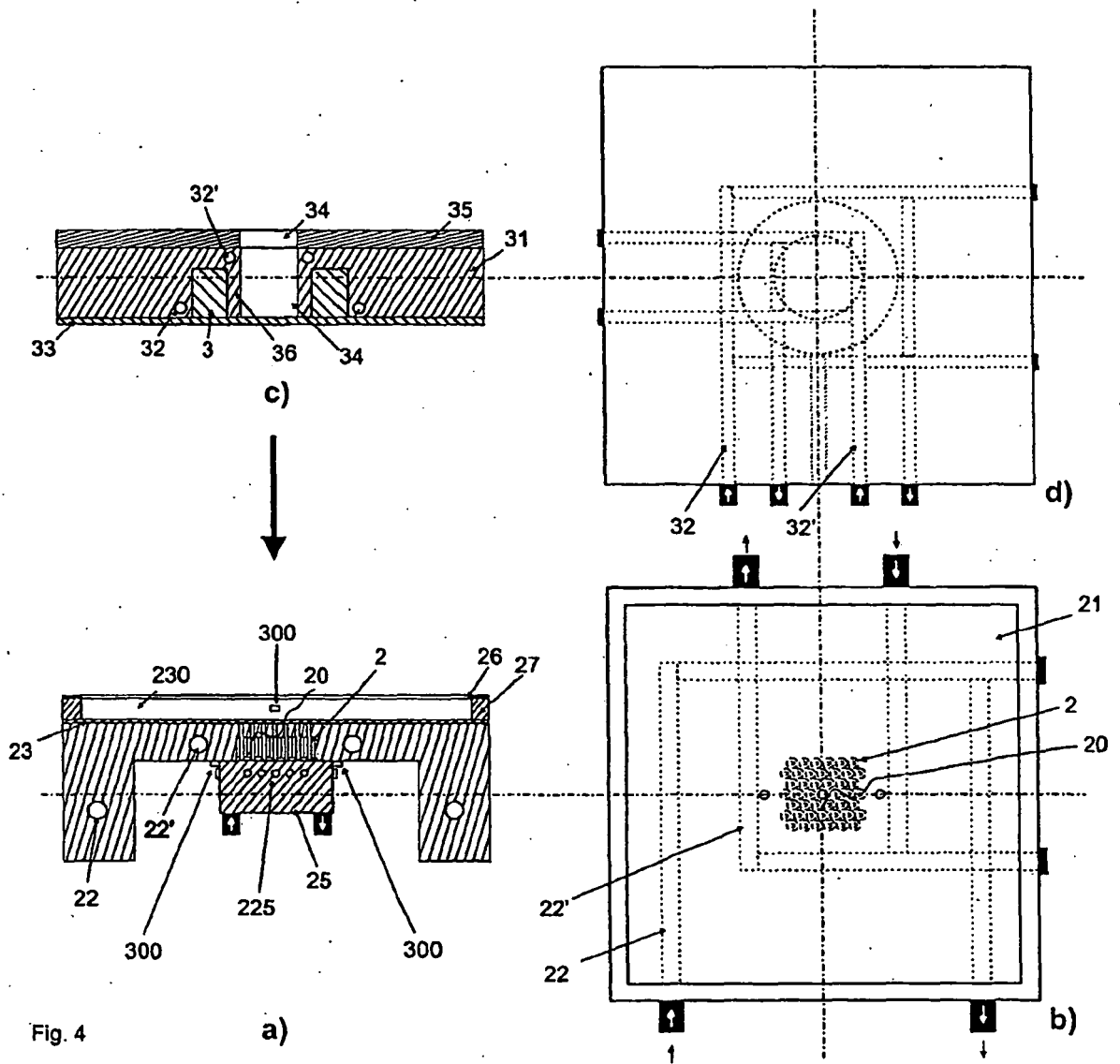


Fig. 4

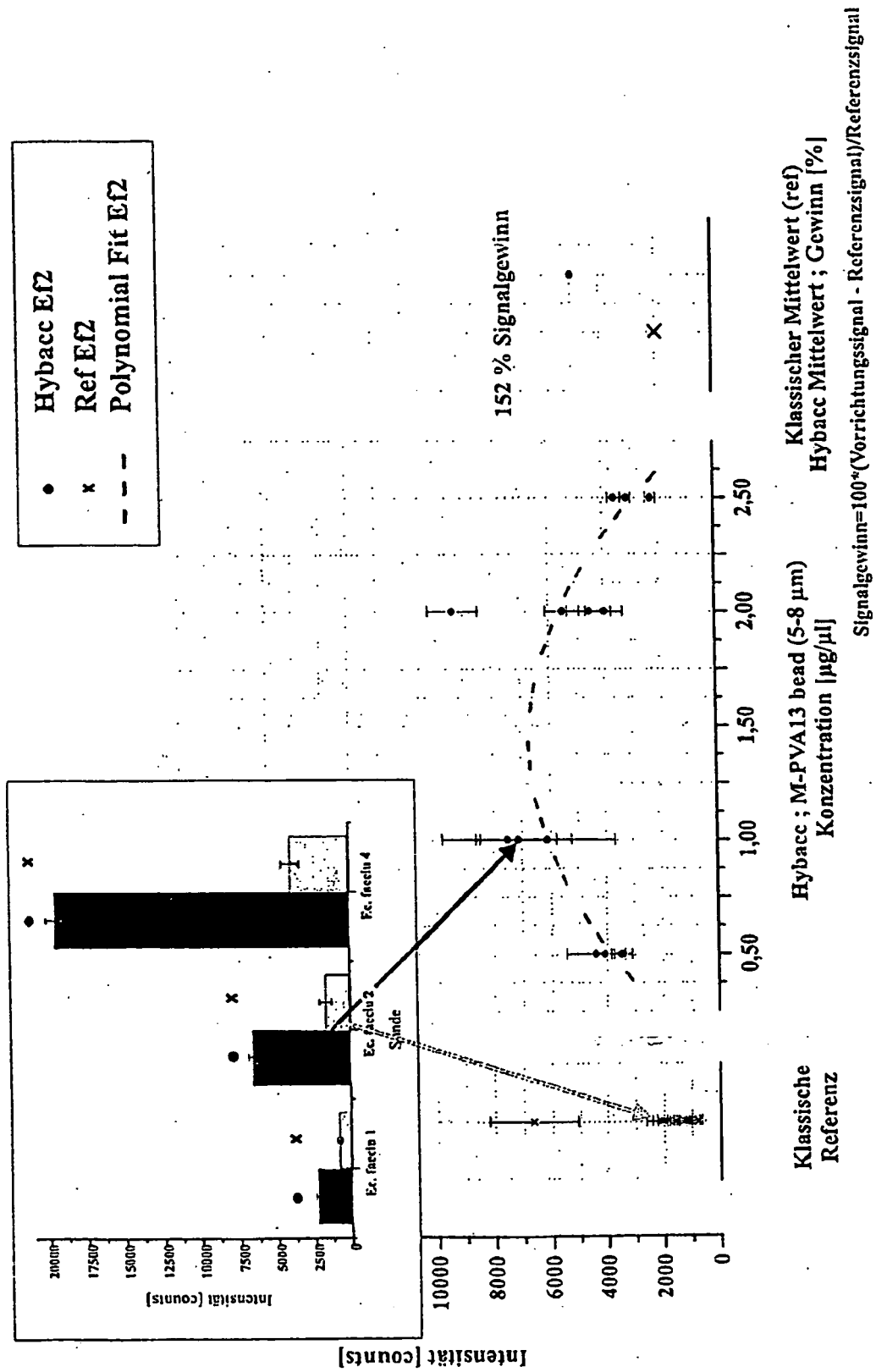


Fig. 6a

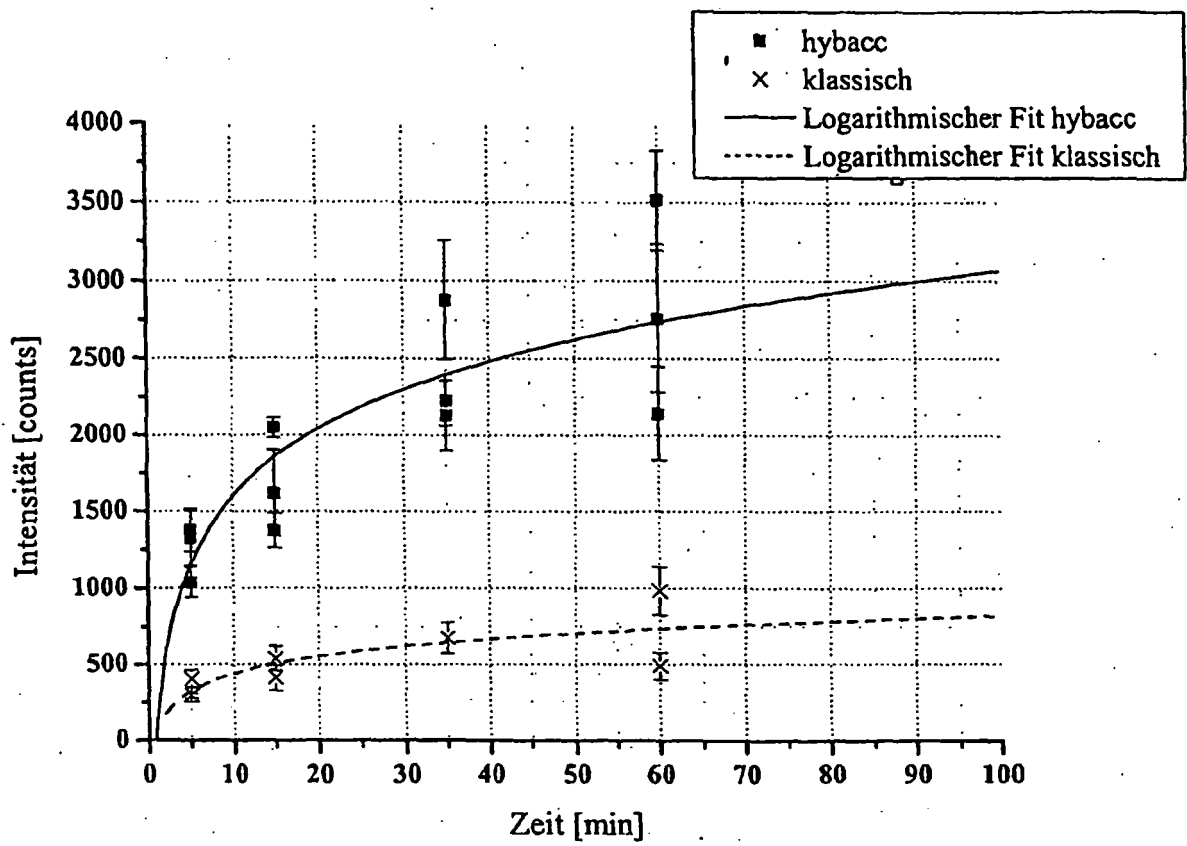


Fig. 6b

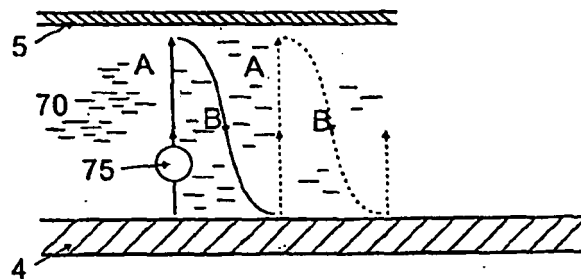


Fig. 5

IN DER BESCHREIBUNG AUFGEFÜHRTE DOKUMENTE

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde ausschließlich zur Information des Lesers aufgenommen und ist nicht Bestandteil des europäischen Patentdokumentes. Sie wurde mit größter Sorgfalt zusammengestellt; das EPA übernimmt jedoch keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

In der Beschreibung aufgeführte Patentdokumente

- WO 9426396 A [0012]
- GB 876070 A [0013] [0062]
- WO 0009991 A1 [0014] [0062]
- EP 02408A2 A1 [0015]
- WO 9702357 A1 [0016] [0062]
- US 6806050 B2 [0017] [0062]
- EP 1327473 A [0018]
- WO 9428396 A [0062]
- EP 0240862 A1 [0062]

In der Beschreibung aufgeführte Nicht-Patentliteratur

- **R. H. Liu et al.** Bubble-induced acoustic micromixing. *Lab Chip*, 2002, vol. 2, 151-157 [0011]
- **R.H. Liu.** Bubble-induced acoustic micromixing. *Lab Chip*, 2002, vol. 2, 151-157 [0062]