

(12) **Österreichische Patentanmeldung**

(21) Anmeldenummer: A 50272/2014 (51) Int. Cl.: **G01N 1/42** (2006.01)  
(22) Anmeldetag: 10.04.2014 **F25D 3/10** (2006.01)  
(43) Veröffentlicht am: 15.09.2015 **B01F 13/08** (2006.01)  
**B01F 11/00** (2006.01)  
**F26B 5/10** (2006.01)

(56) Entgegenhaltungen:  
DE 3332739 A1  
DE 3712531 C1  
AT 343941 B  
FR 2997175 A1

(71) Patentanmelder:  
Universität Wien  
1010 Wien (AT)

(72) Erfinder:  
Reipert Siegfried Dr.  
1090 Wien (AT)  
Goldammer Helmuth  
1140 Wien (AT)

(74) Vertreter:  
SONN & PARTNER PATENTANWÄLTE  
WIEN

(54) **Vorrichtung und Verfahren zur Gefrier- oder Tieftemperatursubstitution**

(57) Vorrichtung (1) zur Gefrier- oder Tieftemperatursubstitution, mit einer in eine Kühlkammer (4) einsetzbaren Halterung (3) zur Anordnung eines Probenträgers (5) für eine biologische Probe und mit einer Schüttelvorrichtung (8) zum Schütteln des Probenträgers (5), wobei die Schüttelvorrichtung (8) ein außerhalb der Kühlkammer (4) vorgesehene Magnetelement (9) aufweist, welches mit einem innerhalb der Kühlkammer (4) vorgesehene Magnetelement (10) an dem Probenträger (5) zusammenwirkt, um den Probenträger (5) in eine Schüttelbewegung zu versetzen.

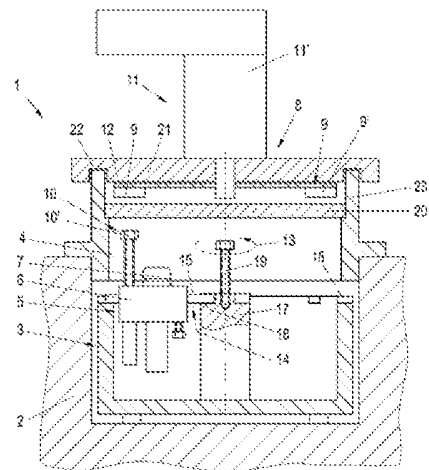


Fig. 1

**Zusammenfassung:**

Vorrichtung (1) zur Gefrier- oder Tieftemperatursubstitution, mit einer in eine Kühlkammer (4) einsetzbaren Halterung (3) zur Anordnung eines Probenträgers (5) für eine biologische Probe und mit einer Schüttelvorrichtung (8) zum Schütteln des Probenträgers (5), wobei die Schüttelvorrichtung (8) ein außerhalb der Kühlkammer (4) vorgesehenes Magnetelement (9) aufweist, welches mit einem innerhalb der Kühlkammer (4) vorgesehenen Magnetelement (10) an dem Probenträger (5) zusammenwirkt, um den Probenträger (5) in eine Schüttelbewegung zu versetzen.

(Fig. 1)

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Gefrier- oder Tieftemperatursubstitution, mit einer in eine Kühlkammer einsetzbaren Halterung zur Anordnung eines Probenträgers für eine biologische Probe und mit einer Schüttelvorrichtung zum Schütteln des Probenträgers.

Weiters betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Gefrier- oder Tieftemperatursubstitution, wobei ein Probenträger für eine biologische Probe in einer Kühlkammer angeordnet wird, wobei der Probenträger mit einer Schüttelvorrichtung geschüttelt wird.

Derartige Vorrichtungen zur automatischen Gefrier- bzw. Kryosubstitution („freeze substitution“) von biologischen Proben sind im Stand der Technik seit langem bekannt, um die Ergebnisse von elektronenmikroskopischen Untersuchungen zu verbessern (vgl. beispielsweise DE 10 2004 046 762 B4). Bei dieser Technik wird üblicherweise ein Dewar-Gefäß verwendet, welches mit flüssigem Stickstoff gefüllt ist. Der Dewarhals weist eine Kammer auf, die auf eine bestimmte Temperatur gekühlt wird. Die gewünschte Temperatureinstellung erfolgt über einen Regelkreis und eingebaute Heizelemente. Der Substitutionsprozess beginnt beim Stand der Technik bei etwa  $-90^{\circ}\text{C}$ . Die gefrorene Probe wird in die Kammer transferiert, wozu verschiedene Behälter vorgesehen sein können, mit denen die Proben in ein Substitutionsmittel, üblicherweise Aceton oder Methanol, getaucht werden. Bei dieser tiefen Temperatur erfolgt der langsame Prozess der Substitution, in dem das gefrorene Wasser der Probe durch das Lösungsmittel ersetzt wird, ohne dass es zu Rekrystallisationen kommt.

Nachteilig an den bekannten Gefriersubstitutionsanlagen ist jedoch die lange Zeitdauer, welche für die Gefriersubstitution benötigt wird.

Dieses Problem wurde bereits zum Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen gemacht. In dem Artikel „Freeze Substitution in 3 hours or less“, K.L. McDonald et al., Journal of Microscopy, Vol. 243, Pt3 2011, pp. 227-233, wird vorgeschlagen, die Plattform für den Probenaufnahmebehälter mit einer Rüttelvorrichtung auszustatten, um die Probe während der Gefriersubstitution in eine Rüttelbewegung zu versetzen. Es hat sich herausgestellt,

dass mit dieser einfachen Maßnahme die Zeitspanne für die Gefriersubstitution wesentlich verringern werden kann.

Die Vorrichtung von McDonald et al. ist jedoch für eine Verwendung mit den eingangs beschriebenen automatischen Substitutionsvorrichtungen nicht geeignet. Beispielsweise ließe sich die Rüttelvorrichtung (in Form eines Laborschüttlers) für die Plattform nicht in das Dewar-Gefäß integrieren, welches bei den automatischen Substitutionsvorrichtungen anstelle des von McDonald et al. verwendeten Trockeneisbehälters vorgesehen wird. Zudem hat die Anordnung von McDonald et al. den Nachteil, dass die Bewegung der Probenbehälter in vertikaler Richtung realisiert wird. Dies birgt Risiken bei der Verwendung toxischer Zusätze zu den Substitutionsmitteln, wie Osmiumtetroxide (beispielsweise durch eine Kontamination der Deckel der Reaktionsgefäße bzw. undichten Verschluss der Probenbehälter).

Demnach besteht die Aufgabe der vorliegenden Erfindung darin, die Nachteile des Standes der Technik zu beseitigen bzw. zumindest zu lindern. Die Erfindung setzt sich daher insbesondere zum Ziel, eine Vorrichtung und ein Verfahren, wie eingangs angegeben, zu schaffen, welches in Verbindung mit bekannten automatischen Substitutionsvorrichtungen verwendet werden kann, um biologische Proben bei der Gefriersubstitution einer Schüttelbewegung auszusetzen, mit welcher die Zeitspanne für die Gefriersubstitution verringert werden kann.

Zur Lösung dieser Aufgabe sind eine Vorrichtung mit den Merkmalen von Anspruch 1 und ein Verfahren mit den Merkmalen von Anspruch 19 vorgesehen.

Erfindungsgemäß weist die Schüttelvorrichtung ein außerhalb der Kühlkammer vorgesehene Magnetelement auf, welches mit einem innerhalb der Kühlkammer vorgesehenen Magnetelement an dem Proben-träger zusammenwirkt, um den Probenträger in eine Schüttelbewegung zu versetzen.

Demnach erfolgt die Anregung der biologischen Probe während der Gefriersubstitution über eine veränderliche magnetische Wechselwirkung zwischen einem Magnetelement der Schüttelvorrichtung au-

Berhalb der Kühlkammer und einem Magnetelement an dem Probenträger innerhalb der Kühlkammer. Durch die veränderliche magnetische Wechselwirkung wird der beweglich gelagerte Probenträger in eine Schüttel- bzw. Rüttelbewegung versetzt, mit welcher die Gefriersubstitution, d.h. der Austausch des gefrorenen Probenwassers durch ein Lösungsmittel wie Aceton, deutlich beschleunigt wird. Die erfindungsgemäße Schüttelvorrichtung hat insbesondere den Vorteil, dass die Schüttelbewegung mittels der Magnetelemente in dem Probenträger außerhalb der Kühlkammer berührungslos angeregt werden kann. Dadurch kann die Kühlkammer wie bei herkömmlichen Gefriersubstitutionsgeräten einfach ausgestaltet sein, wobei insbesondere eine Verwendung mit einem Dewar-Gefäß ermöglicht wird. Besonders vorteilhaft ist es, dass die erfindungsgemäße Schüttelvorrichtung bei bestehenden automatischen Gefriersubstitutionsgeräten ohne Veränderung der Kühlkammer nachgerüstet werden kann.

Gemäß einer ersten bevorzugten Ausführung ist ein Antrieb zur Erzeugung einer Relativbewegung zwischen dem Magnetelement außerhalb der Kühlkammer und dem Magnetelement an dem Probenträger innerhalb der Kühlkammer vorgesehen. Vorteilhafterweise bewirkt die Relativbewegung eine veränderliche Magnetkraft zwischen dem Magnetelement außerhalb der Kühlkammer und dem Magnetelement an dem Probenträger, wobei diese Relativbewegung in eine Schüttelbewegung des Probenträgers umgewandelt wird. Zu diesem Zweck ist es günstig, wenn der Probenträger an einer Lagereinrichtung der insbesondere wannen- bzw. beckenförmigen Halterung beweglich gelagert ist, so dass die veränderliche Magnetwirkung aufgrund der Relativbewegung eine Schüttelbewegung an dem Probenträger bewirkt. Diese Ausführung ist vorteilhafterweise konstruktiv einfach und zuverlässig.

Gemäß einer alternativen bevorzugten Ausführung ist das Magnetelement außerhalb der Kühlkammer mit einer Stromquelle zur Erzeugung eines veränderlichen Magnetfeldes verbunden. Bei dieser Ausführung kann daher das Magnetelement der Schüttelvorrichtung, beispielsweise eine Magnetspule, stationär angeordnet sein, wobei das Magnetfeld mit Hilfe der Stromquelle veränderlich ist. Aufgrund des veränderlichen Magnetfeldes kann der Probenträger in Schüttelbewegung versetzt werden.

Um eine Schüttelbewegung des Probenträgers durch ein veränderliches Magnetfeld zwischen den Magnetelementen hervorzurufen, ist es günstig, wenn das Magnetelement außerhalb der Kühlkammer an einer Magnethalterung vorgesehen ist, welche mit dem Antrieb zur Erzeugung der Relativbewegung zwischen den Magnetelementen verbunden ist. Demnach ist der Antrieb außerhalb der Kühlkammer mit der Magnethalterung, an welcher das Magnetelement montiert ist, verbunden, um die Magnethalterung in Bewegung zu versetzen und dadurch ein veränderliches Magnetfeld zu erzeugen. Vorteilhafterweise kann somit eine berührungslose Kraftübertragung auf den Probenträger innerhalb der Kühlkammer erzielt werden, mit welcher die Schüttelbewegung zur Beschleunigung der Kryosubstitution erzeugt wird. Somit werden vorteilhafterweise keine Stromdurchführungen in die Kühlkammer benötigt, welche anderenfalls extremen Temperaturschwankungen ausgesetzt wären und die Temperaturverteilung in der Kühlkammer negativ beeinflussen könnten. Als Antrieb können verschiedene im Stand der Technik übliche Motoren, beispielsweise Gleichstrommotoren, verwendet werden.

Besonders bevorzugt ist eine Ausführung, bei welcher die Magnethalterung der Schüttelvorrichtung mit einem Drehantrieb zur drehbaren Lagerung der Magnethalterung verbunden ist. Demnach wird die Magnethalterung mittels des Drehantriebs in Drehung versetzt, wodurch das Magnetelement an der Magnethalterung entlang einer kreisförmigen Bahn geführt wird. Somit wird das Magnetelement an der Magnethalterung insbesondere periodisch an dem Magnetelement des Probenträgers vorbeigeführt, wobei der Probenträger durch die magnetische Wechselwirkung zwischen den Magnetelementen in die gewünschte Schüttel- bzw. Rüttelbewegung versetzt wird. Bevorzugt ist die Magnethalterung an einer vertikalen Drehachse gelagert, so dass das Magnetelement in einer horizontalen Ebene rotierbar ist. Bevorzugt sind die Magnetelemente bei jeder Umdrehung der Magnethalterung in einer Anregungsstellung übereinander angeordnet. Wenn das an der Magnethalterung vorgesehene Magnetelement in der Anregungsstellung das entsprechende Magnetelement an dem Probenträger passiert, wird der Probenträger durch die anziehende bzw. abstoßende Wirkung zwischen den Magnetelementen abrupt angeregt. Danach schwillt die Bewegung des Probenträgers allmählich ab, bevor der nächste Durchgang des Magnetelements an der Magnethalterung die Schüttelbewe-

gung wieder anregt. Diese Ausführung hat daher insbesondere den Vorteil, dass selbst mit einer periodischen Drehbewegung der Magnethalterung eine unregelmäßige Schüttelbewegung des Probenträgers erzeugt werden kann. In der Praxis hat sich gezeigt, dass die Gefriersubstitution aufgrund der unregelmäßigen Anregung des Probenträgers wesentlich rascher durchgeführt werden kann.

Besonders bevorzugt ist die Verwendung eines Drehantriebs mit variabler Drehzahl, welcher an die Bedürfnisse des Substitutionsprozesses sowie nachfolgender Prozessschritte, wie die Erwärmung und Infiltration der Proben mit Kunstharz, angepasst werden kann.

Um die Schüttelbewegung des Probenträgers periodisch anzustoßen, ist es von Vorteil, wenn das Magnetelement an einem freien Endbereich der Magnethalterung vorgesehen ist, wobei bevorzugt je ein Magnetelement an gegenüberliegenden Endbereichen der Magnethalterung vorgesehen ist. Je nach Ausführung kann die Magnethalterung auch mehr als zwei Endbereiche mit Magnetelementen aufweisen, um die Frequenz der Anregung des Probenträgers zu erhöhen. Beispielsweise kann die Magnethalterung zwei kreuzförmig angeordnete Halteplatten aufweisen, welche an den Enden jeweils mit einem Magnetelement versehen sind.

Um die biologische Probe in dem Probenträger in Schwingung zu versetzen, ist es günstig, wenn der Probenträger mittels einer Lagerachse verschwenkbar an einer Lagereinrichtung gelagert ist. Vorzugsweise wird eine Kreisbewegung der Magnethalterung außerhalb der Kühlkammer in eine Kippbewegung des Probenträgers um die Lagerachse an der Lagereinrichtung der Halterung umgewandelt. Die Bedienung der Vorrichtung kann besonders einfach gestaltet werden, wenn die Lagereinrichtung zumindest eine nutförmige Vertiefung zum Auflegen der Lagerachse für den Probenträger aufweist. Demnach kann der Probenträger über die Lagerachse auf der nutförmigen Vertiefung der Lagereinrichtung abgelegt werden. Vorteilhafterweise kann der einzelne Probenträger somit besonders einfach aus der Halterung genommen werden. Vorzugsweise sind gegenüberliegende Endabschnitte der Lagerachse in entsprechenden nutförmigen Vertiefungen der Lagereinrichtung angeord-

net.

Die Lagerachse kann im Wesentlichen verschleißfrei und mit geringer Reibung gelagert sein, wobei zu diesem Zweck bevorzugt eine Rolllagerung oder eine Messerlagerung vorgesehen ist. Damit die Lagerachse an der nutförmigen Vertiefung der Lagereinrichtung abrollen kann, ist es günstig, wenn die nutförmige Vertiefung breiter als der Durchmesser der Lagerachse ist. Diese Ausführung zeichnet sich durch geringen konstruktiven Aufwand und geringen Verschleiß aus.

Zur Gefriersubstitution mehrerer biologischer Proben ist es günstig, wenn die Lagereinrichtung mehrere, vorzugsweise entlang einer kreisförmigen Lagerfläche angeordnete, nutförmige Vertiefungen für die Lagerachsen mehrerer Probenträger aufweist. Demnach können mehrere Probenträger platzsparend in der Kühlkammer angeordnet werden, wobei die Auflage auf den nutförmigen Vertiefungen eine unkomplizierte Entnahme einzelner Probenträger ermöglicht.

Bei dieser Ausführung ist es zudem günstig, wenn die Lagereinrichtung ein in einem Zentralbereich der Halterung angeordnetes inneres Lagerelement mit nutförmigen Vertiefungen für die einen Enden der Lagerachsen der Probenträger und ein am Umfang der Halterung angeordnetes äußeres Lagerelement mit nutförmigen Vertiefungen für die anderen Enden der Lagerachsen der Probenträger aufweist. Demnach können die Probenträger sternförmig zwischen dem inneren Lagerelement und dem äußeren Lagerelement angeordnet werden. Dadurch kann vorteilhafterweise eine große Anzahl von Probenträgern bei geringem Platzbedarf in der Kühlkammer platziert werden. Das Funktionsprinzip ist auch dann gewährleistet, wenn nicht alle Probenträgerpositionen entlang der kreisförmigen Lagerfläche besetzt sind. Bei Bedarf kann auf diese Weise Platz zum Vorkühlen von Austauschmedien und zur Probenmanipulation innerhalb der Kühlkammer geschaffen werden.

Um die Halterung aus einer Kühleinrichtung, insbesondere aus einem Dewar-Gefäß heben zu können, ist es vorteilhaft, wenn das innere Lagerelement ein Halteelement zum Anheben der Halterung aufweist. Als Halteelement kann beispielsweise eine senkrecht

vom inneren Lagerelement hochstehende Haltestange vorgesehen sein.

Um hohe Kippmomente an dem Probenträger vorzusehen, ist es günstig, wenn der Probenträger ein im Ruhezustand insbesondere im Wesentlichen vertikal angeordnetes Stangenelement aufweist, an welchem das Magnetelement vorgesehen ist. Das Stangenelement ist daher als Hebelarm ausgebildet, an welchem die Magnetkraft zwischen den Magnetelementen angreift. Vorteilhafterweise kann so die Kraftübertragung auf den Probenträger verbessert werden. Durch die Wechselwirkung der Magnetelemente wird das Stangenelement und damit der Aufnahmebehälter für die biologische Probe in eine Kippbewegung bezüglich dem im Wesentlichen vertikalen Ruhezustand versetzt.

Um den Probenträger in die Ruhe- bzw. Ausgangsstellung rückzuführen, ist es vorteilhaft, wenn der Probenträger bezüglich der Lagerachse gegenüberliegend des Magnetelements ein Gewichtelement aufweist. Demnach wirkt das Gewichtelement als Gegengewicht für das Magnetelement, so dass der Probenträger mit einer abklingenden Kippbewegung in den Ruhezustand zurückkehrt, wenn die magnetische Wechselwirkung zwischen den Magnetelementen aufhört.

Zur stabilen Anordnung der Schüttelvorrichtung an der Halterung ist es vorteilhaft, wenn die Schüttelvorrichtung ein insbesondere ein transparentes Sichtfenster aufweisendes Montageelement zur lösbaren Verbindung mit einer insbesondere ein weiteres transparentes Sichtfenster aufweisenden Abdeckung der Kühlkammer aufweist, wobei an dem Montageelement bevorzugt eine umlaufende Haltenut zum Aufsetzen auf die Abdeckung der Kühlkammer vorgesehen ist. Demnach kann das Montageelement, beispielsweise eine Platte, insbesondere aus durchsichtigem Material, auf die Abdeckung der Kühlkammer aufgesetzt werden, welche bei bekannten Gefriersubstitutionsanlagen bereits vorhanden ist. Vorzugsweise ist die Magnethalterung mit dem Magnetelement in dieser Stellung zwischen dem Montageelement und der Abdeckung der Kühlkammer angeordnet. Die transparente Ausführung sowohl der Abdeckung der Kühlkammer als auch des Montageelementes ermöglicht die Beobachtung des Probenträgers während des gesamten Prozesses.

Gemäß einer bevorzugten Ausführung weist das Magnetelement an der Magnethalterung einen Magneten, insbesondere einen Permanentmagneten, und das Magnetelement an dem Probenträger ein Element aus einem magnetisierbaren Material aufweist. Selbstverständlich kann auch die Magnethalterung ein Element aus einem magnetisierbaren Material und der Probenträger einen Magneten aufweisen. Zudem können sowohl die Magnethalterung als auch der Probenträger Magnete aufweisen. In einer vorteilhaften Ausführung weist das Element aus magnetisierbarem Material eine Eisenmutter auf.

Wie bei herkömmlichen Anlagen zur Gefriersubstitution üblich, ist die Halterung vorzugsweise in der Kühlkammer eines Gefäßes, insbesondere eines Dewar-Gefäßes, angeordnet. Das Dewar-Gefäß kann flüssigen Stickstoff enthalten, mit welchem die Kühlkammer auf den für die Gefriersubstitution erforderlichen Temperaturen gehalten werden kann. Bevorzugt ist die Halterung mit der Kühlkammer im Flaschenhals des Dewar-Gefäßes angeordnet. Zum besseren Kältekontakt kann die Kältekammer mit dem darin befindlichen Probenträger mit Ethanol aufgefüllt werden, so dass der Probenaufnahmebehälter partiell in gekühltes Ethanol eintaucht.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wirkt ein außerhalb der Kühlkammer vorgesehene Magnetelement mit einem innerhalb der Kühlkammer vorgesehenen Magnetelement an dem Probenträger zusammen, um den Probenträger in eine Schüttelbewegung zu versetzen. Die Vorteile und technischen Effekte dieses Verfahrens wurden bereits vorstehend in Verbindung mit der Vorrichtung beschrieben, so dass auf diese Ausführungen verwiesen werden kann.

Besonders bevorzugt ist es, wenn das Schütteln der Probe mit den Magnetelementen als Verfahrensschritt in einem automatisierten Gefriersubstitutionsverfahren durchgeführt wird, bei dem der Probenaufnahmebehälter mit der Probe allein oder zusammen mit dem Probenträger für den Medienwechsel automatisch entnommen und für die Fortsetzung des Prozesses wieder in den Probenträger bzw. in die Probenhalterung zurückgeführt wird.

Bei Testversuchen hat sich überraschend als vorteilhaft herausgestellt, dass die Gefriersubstitution beschleunigt werden kann,

wenn der Probenträger durch das Zusammenwirken der Magnetelemente in eine aperiodische Schüttelbewegung versetzt wird. Die beschleunigte Substitution wirkt vorteilhafterweise dem zeitlichen Rekristallisationsprozess entgegen, so dass Substitutionen auch bei höheren Temperaturen, beispielsweise bei Temperaturen von  $-60^{\circ}$  Celsius bis  $-70^{\circ}$  Celsius, durchgeführt werden können. Die unregelmäßige Schüttelbewegung kann beispielsweise dadurch erzielt werden, dass mit einem rotierenden Magnetelement außerhalb der Kühlkammer der Probenträger innerhalb der Kühlkammer periodisch angeregt wird.

Die Erfindung wird nachstehend anhand eines bevorzugten Ausführungsbeispiels, auf das sie jedoch nicht beschränkt sein soll, noch weiter erläutert. In der Zeichnung zeigt:

Fig. 1 schematisch eine Schnittansicht einer erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Gefrier- bzw. Tieftemperatursubstitution einer biologischen Probe, bei welcher ein außerhalb der Kühlkammer vorgesehene Magnetelement mit einem innerhalb der Kühlkammer vorgesehenen Magnetelement an einem die Probe enthaltenden Probenträger zusammenwirkt, um den Probenträger in eine Schüttelbewegung zu versetzen;

Fig. 2 schematisch eine schaubildliche Ansicht der Vorrichtung gemäß Fig. 1 bei abgenommenem Deckelelement, wobei die verschwenkbare Anordnung mehrerer Probenträger in der Kühlkammer ersichtlich ist;

Fig. 3 schematisch eine Ansicht des Probenträgers gemäß Fig. 1, 2.

Fig. 1 zeigt eine Vorrichtung 1 zur Gefrier- oder Tieftemperatursubstitution. Die Vorrichtung 1 weist ein mit flüssigem Stickstoff befüllbares Dewar-Gefäß 2 auf, welches im Stand der Technik hinlänglich bekannt ist und daher nur schematisch angedeutet ist. Im Halsbereich des Dewar-Gefäßes 2 ist eine wannenförmige Halterung 3 mit einem Boden 3' und einem umlaufenden Mantel herausnehmbar angeordnet. Die Halterung 3, in welcher ein oder mehrere Probenträger 5 angeordnet sind, befindet sich in einer Kühlkammer 4. Der Probenträger 5 weist ein Tragelement 6

auf, in welchem ein Probenaufnahmebehälter 7 für eine biologische Probe lösbar angeordnet ist. In der Halterung 3 können insbesondere mehrere solcher Probenträger 5 angeordnet werden. Bei der Gefriersubstitution wird das gefrorene Probenwasser der Probe im Probenaufnahmebehälter 7 bei Substitutionstemperaturen durch ein Lösungsmittel, wie Aceton, ersetzt.

Wie aus Fig. 1 weiters ersichtlich, weist die Vorrichtung 1 zudem eine Schüttelvorrichtung 8 zum Schütteln des Probenträgers 5 während der Gefriersubstitution auf. In der gezeigten Ausführung weist die Schüttelvorrichtung 8 außerhalb der Kühlkammer 4 angeordnete Magnetelemente 9 auf, welche mit innerhalb der Kühlkammer 4 angeordneten Magnetelementen 10 an dem Probenträger 5 zusammenwirken, um den Probenträger 5 in eine Schüttelbewegung zu versetzen. Zu diesem Zweck ist ein Antrieb 11 zur Erzeugung einer Relativbewegung zwischen den Magnetelementen 9 außerhalb der Kühlkammer 4 und den Magnetelementen 10 an dem Probenträger 5 innerhalb der Kühlkammer 4 vorgesehen. Die Magnetelemente 9 sind an den Enden einer Magnethalterung 12 vorgesehen, welche mit dem Antrieb 11 zur Erzeugung der Relativbewegung zwischen den Magnetelementen gekoppelt ist. In der gezeigten Ausführung weist das Magnetelement 9 außerhalb der Kühlkammer 4 einen Magneten 9', insbesondere einen Permanentmagneten, und das Magnetelement 10 an dem Probenträger 5 ein Element 10' aus einem magnetisierbaren Material, hier eine Eisenmutter, auf.

Wie aus Fig. 1 weiters ersichtlich, weist der Antrieb 11 in der gezeigten Ausführung einen Drehantrieb 11' auf, um die Magnethalterung 12 mit den daran befestigten Magnetelementen 9 in eine Drehbewegung um eine vertikale Drehachse (vgl. Pfeil 13) zu versetzen. Dadurch wird der Probenträger 5 bei der Gefriersubstitution in eine aperiodische bzw. unregelmäßige Schüttelbewegung versetzt, welche einerseits die Zeitdauer der Gefriersubstitution verkürzt. Zudem kann die Temperatur in der Kühlkammer höher als bei bekannten Anlagen, beispielsweise bei  $-60^{\circ}$  Celsius bis  $-70^{\circ}$  Celsius, liegen. Vorteilhafterweise können so die Kosten für die Kühlung verringert werden.

Die Schüttelvorrichtung 8 weist ein plattenförmiges, transparentes Montageelement 21 mit einer umlaufende Haltenut 22 zum Auf-

setzen auf eine die Kühlkammer 5 verschließende Abdeckung 23 mit eingebautem durchsichtigen Glasfenster 20 auf.

Wie aus Fig. 1 ersichtlich, weist die Vorrichtung 1 zudem eine Lagereinrichtung 14 auf, mit welcher der Probenträger 5 verschwenkbar gelagert ist. Dafür weist der Probenträger 5 eine in Betrieb horizontal angeordnete Lagerachse 15 auf, welche in nutförmige Vertiefungen 16 der Lagereinrichtung 14 eingelegt wird.

Wie aus Fig. 2 ersichtlich, sind die nutförmigen Vertiefungen 16 etwas breiter als der Durchmesser der Lagerachsen 15, so dass die Lagerachse 15 bei der Gefriersubstitution in den nutförmigen Vertiefungen 16 abrollen kann. In der gezeigten Ausführung weist die Lagereinrichtung 14 ein in einem Zentralbereich der Halterung 3 angeordnetes inneres Lagerelement 17 mit nutförmigen Vertiefungen 16 für die einen Enden der Lagerachsen 15 der Probenträger 5 und ein am Umfang der Halterung 3 angeordnetes äußeres Lagerelement 18 mit nutförmigen Vertiefungen 16 für die anderen Enden der Lagerachsen 15 der Probenträger 5 auf. Das innere Lagerelement 17 weist zudem ein Halteelement 19 zum Anheben der Halterung 3 auf. In der gezeigten Ausführung können acht Probenträger 5 in der Kühlkammer 4 angeordnet werden, wobei gemäß Fig. 2 lediglich zwei Probenträger 5, davon ein Probenträger 5 mit einem Probenaufnahmebehälter 7, gezeigt sind. Zur Aufnahme des Probenaufnahmebehälters 7 weist das Tragelement 6 eine Bohrung zum Einhängen des Probenaufnahmebehälters 7 auf.

Wie aus Fig. 2 schematisch ersichtlich, weist die Halterung 3 an dem umlaufenden Mantel in der Nähe des Bodens 3' Öffnungen 3'' zur Durchflutung mit gekühltem Alkohol auf.

Wie aus Fig. 3 ersichtlich, weist der Probenträger 5 ein im Ruhezustand insbesondere im Wesentlichen vertikal angeordnetes Stangenelement 24 auf, an welchem das Magnelement 10 vorgesehen ist. Zudem weist der Probenträger 5 bezüglich der Lagerachse 15 gegenüberliegend dem Magnelement 10 ein Gewichtelement 25 auf.

## Patentansprüche:

1. Vorrichtung (1) zur Gefrier- oder Tieftemperatursubstitution, mit einer in eine Kühlkammer (4) einsetzbaren Halterung (3) zur Anordnung eines Probenträgers (5) für eine biologische Probe und mit einer Schüttelvorrichtung (8) zum Schütteln des Probenträgers (5), dadurch gekennzeichnet, dass die Schüttelvorrichtung (8) ein außerhalb der Kühlkammer (4) vorgesehenes Magnetelement (9) aufweist, welches mit einem innerhalb der Kühlkammer (4) vorgesehenen Magnetelement (10) an dem Probenträger (5) zusammenwirkt, um den Probenträger (5) in eine Schüttelbewegung zu versetzen.
2. Vorrichtung (1) nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass ein Antrieb (11) zur Erzeugung einer Relativbewegung zwischen dem Magnetelement (9) außerhalb der Kühlkammer (4) und dem Magnetelement (10) an dem Probenträger (5) innerhalb der Kühlkammer (4) vorgesehen ist.
3. Vorrichtung (1) nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Magnetelement (9) außerhalb der Kühlkammer (4) mit einer Stromquelle zur Erzeugung eines veränderlichen Magnetfeldes verbunden ist.
4. Vorrichtung (1) nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Magnetelement (9) außerhalb der Kühlkammer (4) an einer Magnethalterung (12) vorgesehen ist, welche mit dem Antrieb (11) zur Erzeugung der Relativbewegung zwischen den Magnetelementen (9, 10) verbunden ist.
5. Vorrichtung (1) nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Magnethalterung (12) der Schüttelvorrichtung (11) mit einem Drehantrieb (11') zur drehbaren Lagerung der Magnethalterung (12) verbunden ist.
6. Vorrichtung (1) nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Magnetelement (9) an einem freien Endbereich der Magnethalterung (12) vorgesehen ist, wobei bevorzugt je ein Magnetelement (9) an gegenüberliegenden Endbereichen der Magnethalterung (12) vorgesehen ist.

7. Vorrichtung (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass der Probenträger (5) mittels einer Lagerachse (15) verschwenkbar an einer Lagereinrichtung (14) gelagert ist.

8. Vorrichtung (1) nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Lagereinrichtung (14) zumindest eine nutförmige Vertiefung (16) zum Auflegen der Lagerachse (15) für den Probenträger (5) aufweist.

9. Vorrichtung (1) nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die nutförmige Vertiefung (16) breiter als der Durchmesser der Lagerachse (15) ist.

10. Vorrichtung (1) nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Lagereinrichtung (14) mehrere, vorzugsweise entlang einer kreisförmigen Lagerfläche angeordnete, nutförmige Vertiefungen (16) für die Lagerachsen (15) mehrerer Probenträger (5) aufweist.

11. Vorrichtung (1) nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Lagereinrichtung (14) ein in einem Zentralbereich der Halterung (3) angeordnetes inneres Lagerelement (17) mit nutförmigen Vertiefungen (16) für die einen Enden der Lagerachsen (15) der Probenträger (5) und ein am Umfang der Halterung (3) angeordnetes äußeres Lagerelement (18) mit nutförmigen Vertiefungen (16) für die anderen Enden der Lagerachsen (15) der Probenträger (5) aufweist.

12. Vorrichtung (1) nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass das innere Lagerelement (17) ein Halteelement (19) zum Anheben der Halterung (3) aufweist.

13. Vorrichtung (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass der Probenträger (5) ein im Ruhezustand insbesondere im Wesentlichen vertikal angeordnetes Stangenelement (24) aufweist, an welchem das Magnelement (10) vorgesehen ist.

14. Vorrichtung (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass der Probenträger (5) bezüglich der Lager-

achse (15) gegenüberliegend dem Magnetelement (10) ein Gewichtselement (25) aufweist.

15. Vorrichtung (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Halterung (3) an einem umlaufenden Mantel, vorzugsweise benachbart eines Bodens (3'), Öffnungen zur Durchflutung mit gekühltem Alkohol aufweist.

16. Vorrichtung (1) nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Schüttelvorrichtung (8) ein insbesondere ein transparentes Sichtfenster aufweisendes Montageelement (21) zur lösbaren Verbindung mit einer insbesondere ein weiteres transparentes Sichtfenster (20) aufweisenden Abdeckung (23) der Kühlkammer (5) aufweist, wobei an dem Montageelement (21) bevorzugt eine umlaufende Haltenut (22) zum Aufsetzen auf die Abdeckung (23) der Kühlkammer (5) vorgesehen ist.

17. Vorrichtung (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass das Magnetelement (9) an der Magnethalterung (12) einen Magneten (9'), insbesondere einen Permanentmagneten, und das Magnetelement (10) an dem Probenträger (5) ein Element (10') aus einem magnetisierbaren Material aufweist.

18. Vorrichtung (1) nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Halterung (3) in der Kühlkammer eines Gefäßes, insbesondere eines Dewar-Gefäßes (2), angeordnet ist.

19. Verfahren zur Gefrier- oder Tieftemperatursubstitution, wobei ein Probenträger (5) für eine biologische Probe in einer Kühlkammer (4) angeordnet wird, wobei der Probenträger (5) mit einer Schüttelvorrichtung (8) geschüttelt wird, dadurch gekennzeichnet, dass ein außerhalb der Kühlkammer (4) vorgesehenes Magnetelement (9) mit einem innerhalb der Kühlkammer (4) vorgesehenen Magnetelement (10) an dem Probenträger (5) zusammenwirkt, um den Probenträger (5) in eine Schüttelbewegung zu versetzen.

20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass der Probenträger (5) durch das Zusammenwirken der Magnetelemente (9, 10) in eine aperiodische Schüttelbewegung versetzt wird.

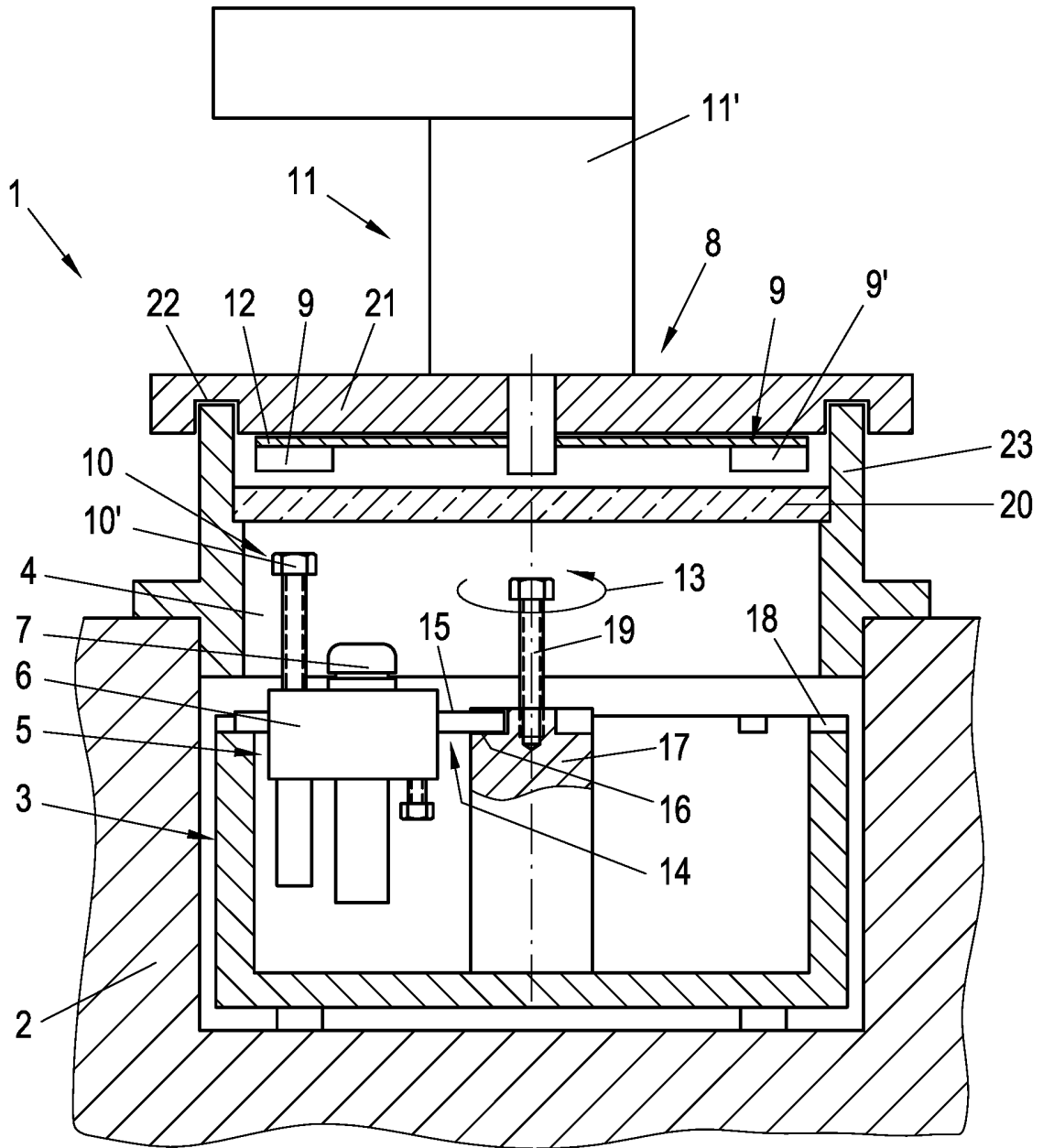


Fig. 1

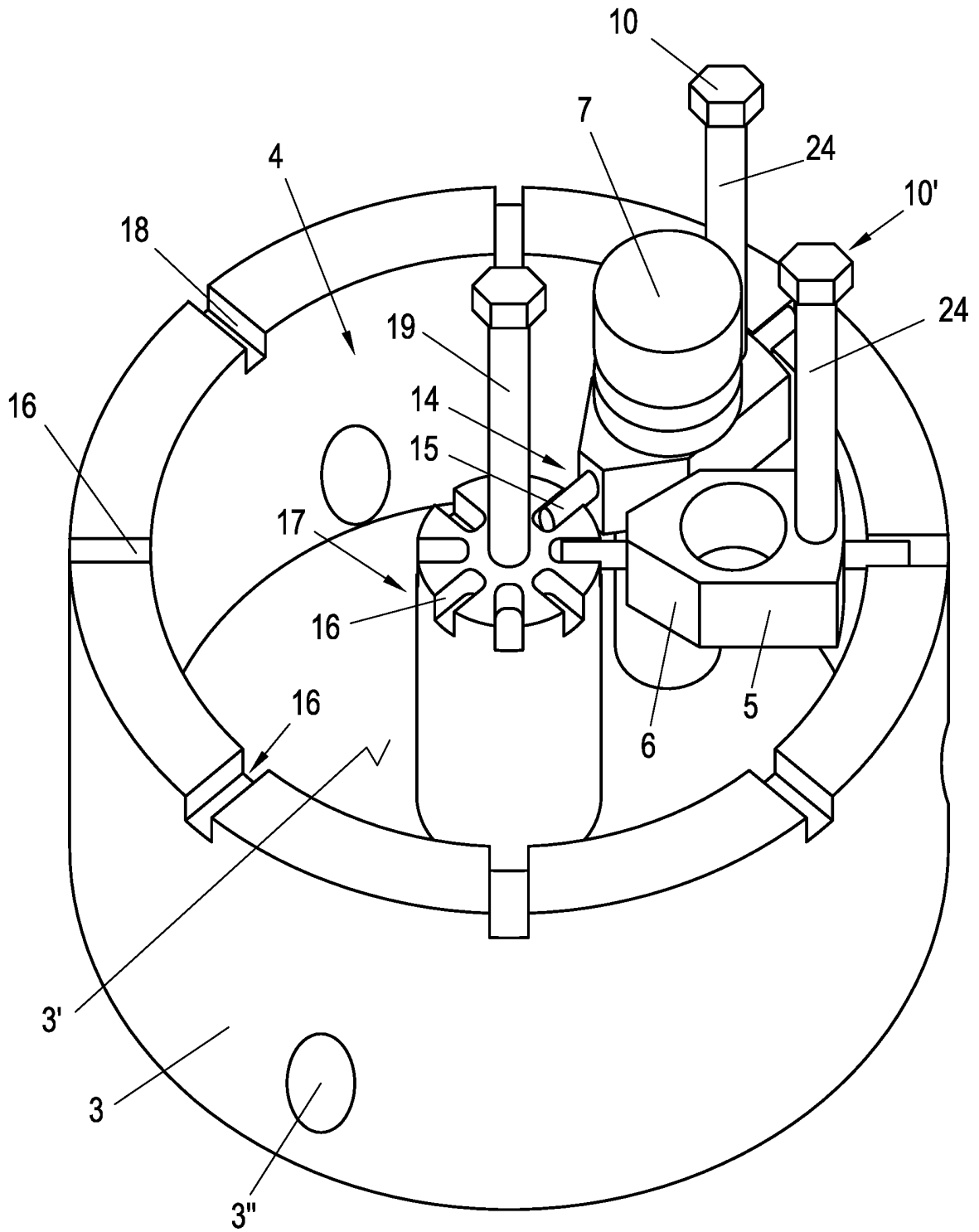


Fig. 2

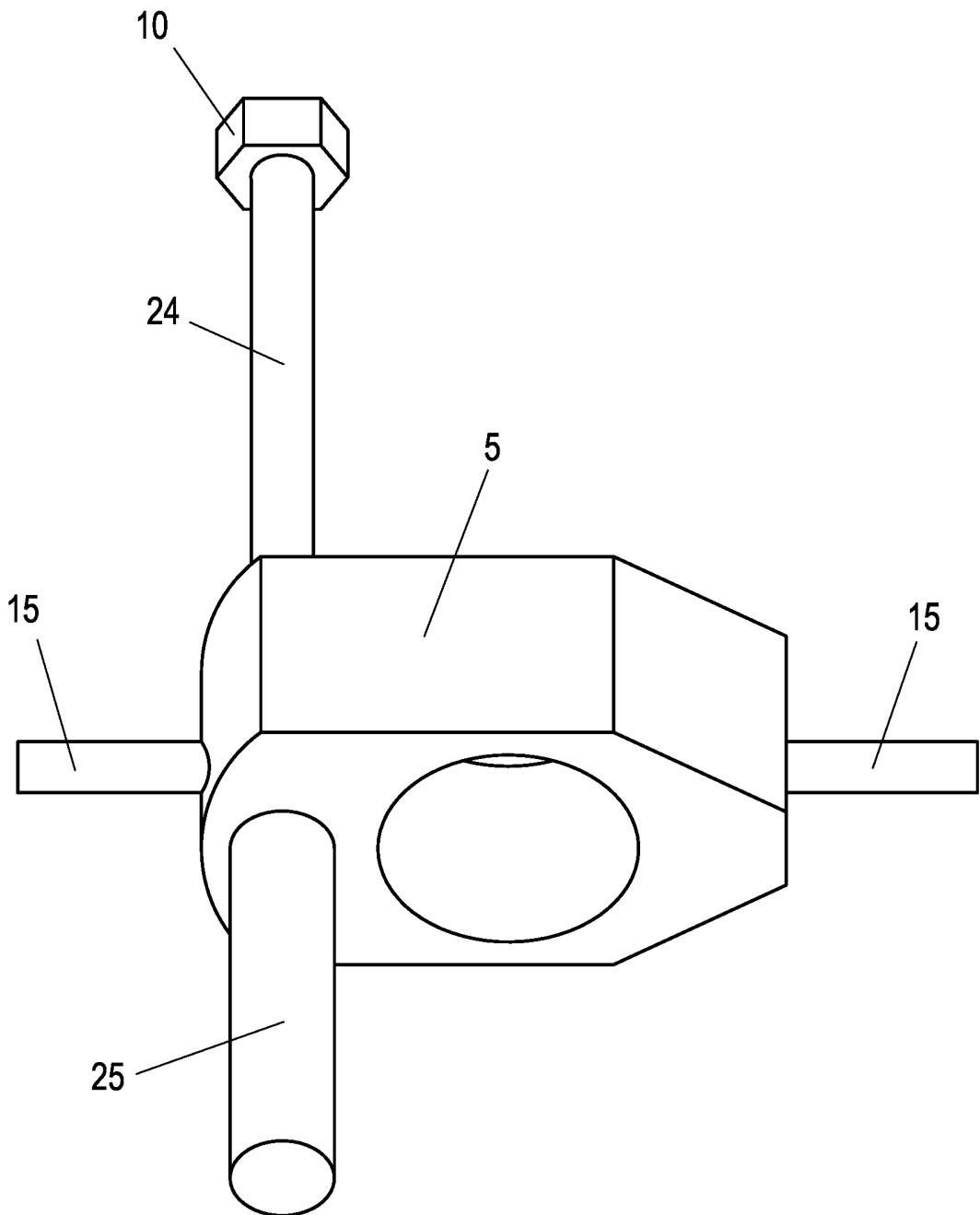


Fig. 3