(19) **Bundesrepublik Deutschland**
**Deutsches Patent- und Markenamt**

(10) **DE 694 33 908 T2** 2005.09.01

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 731 775 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 33 908.3**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US94/12627**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 900 518.2**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 95/013987**
(86) PCT-Anmeldetag: **02.11.1994**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **26.05.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **18.09.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **21.07.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **01.09.2005**

(51) Int Cl.[7]: **C02F 1/00**
**G01N 1/28, C09K 7/06**

(30) Unionspriorität:
**155935** **15.11.1993** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, IT, LI, NL**

(73) Patentinhaber:
**Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, Ariz., US**

(72) Erfinder:
**ZEHEB, Ron, Tucson, US; RODGERS, Marie, Paula, Tucson, US**

(74) Vertreter:
**LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München**

(54) Bezeichnung: **VERDAMPFUNG VERHINDERNDE FLÜSSIGKEIT BEI HOHER TEMPERATUR**

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

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

## Beschreibung

### Gebiet der Erfindung

**[0001]** Diese Erfindung bezieht sich auf eine verbesserte Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit für Anwendungen bei hohen Temperaturen.

### Hintergrund der Erfindung

**[0002]** In der Immunhistochemie oder bei In-situ-Hybridisierungsreaktionen muss das Verdampfen des Reaktionsgemischs auf dem Objektträger während der Inkubationszeiten verhindert werden. Dies ist besonders wichtig, wenn ein Reaktionsgemisch ein geringes Volumen aufweist, insbesondere wenn Hitze eingesetzt wird, um die Reaktionskinetik zu kontrollieren oder zu steigern. Tritt Verdampfung auf, so verändert sich die Konzentration der Reagenzien, und der Gewebeschnitt kann austrocknen. Beide dieser Bedingungen können fehlerhafte Ergebnisse verursachen.

**[0003]** Herkömmlich wird Verdampfung entweder durch Platzieren des Objektträgers in einer befeuchteten Kammer oder durch Platzieren eines Deckglases aus Glas oder Kunststoff auf den Objektträger und Abdichten der Seiten des Deckglases kontrolliert werden. Beide Verfahren sind zeitaufwendig und mühsam, und keines der beiden Verfahren kann leicht automatisiert werden. Darüber hinaus bringt der Einsatz eines Deckglases das Risiko mit sich, dass der Gewebeschnitt verletzt oder vom Objektträger entfernt wird, wenn das Deckglas entfernt wird.

**[0004]** Ein verbessertes Verfahren, das in der Internationalen Veröffentlichung Nr. WO 91/13.336 beschrieben wurde, kontrollierte Verdampfung durch Abdecken des wässrigen Reaktionsgemischs mit einer Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit, die mit der wässrigen Phase unmischbar war und eine geringere Dichte als die wässrige Phase aufwies. In einer bevorzugten Ausführungsform war die Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit ein nicht aromatischer Kohlenwasserstoff mit 6 bis 18 Kohlenstoffatomen, vorzugsweise Pentadecan (Mineralöl). Die Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit bedeckte die Oberfläche des Reaktionsgemischs und verhinderte somit die Verdampfung der Reagenzien.

**[0005]** Dieses Verfahren ist in Situationen anwendbar, in denen die umgebenden Temperaturen unter etwa 70°C liegen. Liegen die Temperaturen jedoch bei oder über 70°C, so resultiert die Verdampfung der Schutzschicht aus Mineralöl schließlich zum Verlust der Schutzfunktion. Dieser Verlust kann bei 100°C sehr rasch (in weniger als 5 Minuten) auftreten. Da bestimmte Verfahren der Nachweischemie bei diesen hohen Temperaturen (Nennwert 95°C, im Bereich von 68°C bis 110°C) durchgeführt werden müssen, ist eine schützende Deckschicht erwünscht, die bei den Betriebstemperaturen verdampfungsbeständig ist und andere vorteilhafte Eigenschaften aufweist, die benötigt werden, um die erforderlichen chemischen Vorgänge durchzuführen.

### Zusammenfassung der Erfindung

**[0006]** Die vorliegende Erfindung stellt einen flüssigen Verdampfungsinhibitor bereit, der geeignet ist, bei Anwendungen unter hohen Temperaturen, z. B. 70°C bis 110°C, eingesetzt zu werden. Die Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit umfasst ein Gemisch aus einem Alkan (unverzweigt, verzweigt, zyklisch oder Gemische davon) und einem nichtflüchtigen Silicon- oder Pflanzenöl, und, in einer bevorzugten Ausführungsform, eine Tensid. Das Alkan ist vorzugsweise ein Mineralöl oder ein Wachs mit 10 bis 20 Kohlenstoffatomen. Das nichtflüchtige Öl ist ein Siliconöl oder ein Pflanzenöl, vorzugsweise Canolaöl. Das Alkan ist im Gemisch in ausreichender Menge vorhanden, um eine Dichte bereitzustellen, die dem Gemisch ein Aufschwimmen auf der Oberfläche eines wässrigen Mediums ermöglicht. Das nichtflüchtige Öl ist im Gemisch in ausreichender Menge vorhanden, um das Verdampfen des Gemischs bei Temperaturen über 70°C zu hemmen. Sofern vorhanden, ist das Tensid im Gemisch in ausreichender Menge vorhanden, um die Kontaktoberfläche zwischen der Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit und dem wässrigen Medium zu maximieren.

### Beschreibung der Erfindung

**[0007]** Die vorliegende Erfindung stellt einen flüssigen Verdampfungsinhibitor für Anwendungen bei hohen Temperaturen bereit. Diese Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit umfasst ein Gemisch aus einem Alkan und einem nichtflüchtigen Silicon- oder Pflanzenöl. Das Alkan ist im Gemisch in ausreichender Menge vorhanden, um eine Dichte bereitzustellen, die ausreichend geringer als die Dichte von Wasser ist und somit das Aufschwimmen des Gemischs auf der Oberfläche eines wässrigen Mediums erleichtert. Das nichtflüchtige Öl ist

im Gemisch in ausreichender Menge vorhanden, um das Verdampfen des Gemischs bei einer Temperatur von 70°C oder darüber zu hemmen. In einer bevorzugten Ausführungsform ist ein Tensid im Gemisch in ausreichender Menge vorhanden, um die Kontaktoberfläche zwischen der Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit und einem wässrigen Medium zu maximieren.

**[0008]** Die Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit ist für Tests nützlich, die auf einem Objektträger durchgeführt werden, wenn ein geringes Volumen der Reagenzien bei erhöhten Temperaturen (über Raumtemperatur) aufrechterhalten wird. Die Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit ist besonders nützlich, wenn die Konzentration der Reagenzien wichtig ist und das Verfahren bei hohen Temperaturen durchgeführt wird, wie beispielsweise bei In-situ-Hybridisierungsverfahren und wärmebasierte Verfahren zur Antigen-Demaskierung. Die Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit ist jedoch auch nützlich bei Analysen, die bei 20 bis 70°C durchgeführt werden und bei denen die Reagenskonzentration von Bedeutung ist, wie beispielsweise bei ELISA-Tests, immunhistochemischen Anwendungen und bei Anwendungen der In-situ-Hybridisierung, die bei mittleren Temperaturen (z. B. Erkennung von RNA-Zielen) durchgeführt werden.

**[0009]** Die Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit weist folgende Eigenschaften auf: Die Flüssigkeit wirkt nicht störend auf Reaktionen, die in der wässrigen Phase stattfinden. Die Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit weist einen Siedepunkt auf, der signifikant über der Temperatur liegt, bei der die Reaktionen durchgeführt werden. Vorzugsweise hat die Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit einen Siedepunkt über 150°C, noch bevorzugter über 200°C. Vorzugsweise weist die Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit eine geringe Viskosität auf, um leicht aufgetragen werden zu können.

Alkan

**[0010]** Hierin bezieht sich die Bezeichnung "Alkan" auf eine Klasse aliphatischer Kohlenwasserstoffe, die durch eine unverzweigte Kette (mit der generischen Formel $C_nH_{2n+2}$, ein n-Paraffinkohlenwasserstoff) oder durch eine verzweigte Kette oder eine zyklische Kohlenstoffkette gekennzeichnet sind, wobei jede von 1 bis mehr als 50 Kohlenstoffatome aufweist. Alkane, die in dieser Erfindung nützlich sind, haben zumindest etwa 6 Kohlenstoffatome. Bevorzugte unverzweigte Alkane umfassen die C6- bis C17-Kohlenwasserstoffe, die im Allgemeinen als Mineralöle bezeichnet werden, und die C18- bis C20-Kohlenwasserstoffe, die bei Raumtemperatur fest sind und im Allgemeinen als Wachse bezeichnet werden. Noch bevorzugtere, unverzweigte Alkane sind mittelkettige Alkane mit 10 (Decan) bis 20 (Icosan) Kohlenstoffatomen, vorzugsweise das Wachs Octadecan (C18). Bevorzugte Alkane haben mehr als 20 Kohlenstoffatome, wenn das Alkan verzweigt oder zyklisch ist. Gemische aus Alkanen werden auch in Betracht gezogen. Ein besonders bevorzugtes Alkan ist ein Gemisch aus C15- bis C20-Alkanen, das etwa 2/3 verzweigte Alkane und 1/3 Cycloalkane umfasst und im Handel unter dem Handelsnamen ISOPAR V (CAS-Nr. 64742-46-7; Exxon Chemical Americas, Houston, TX) erhältlich ist.

**[0011]** Diese Alkane weisen die folgenden Eigenschaften auf, die nützlich sind, um bei Immunhistochemie- und In-situ-Hybridisierungsreaktionen vor Verdampfung zu schützen. Die Alkane sind praktisch inert und in wässrigen Reaktionsgemischen, die in der Immunhistochemie und bei In-situ-Hybridisierung eingesetzt werden, unmischbar. Somit stören diese Alkane die chemische Reaktion in der wässrigen Phase nicht. Die Alkane haben Dichten, die signifikant unter jener von Wasser liegen, und zwar im Bereich von 0,73 bis 0,86 und somit leicht auf der wässrigen Phase aufschwimmen können. Diese Alkane haben Siedepunkte, die weit über dem Bereich der Temperaturen liegen, die für immunhistochemische Reaktionen und zur In-situ-Hybridisierung benötigt werden, wobei die Siedepunkte im Bereich von 174°C bis 320°C liegen.

**[0012]** Zusätzlich zu den erforderlichen Eigenschaften haben all diese Alkane weitere Eigenschaften, die für den Einsatz bei solchen Reaktionen wünschenswert sind. Die flüssigen Alkane haben Schmelzpunkte unter Raumtemperatur, was eine leichte Verteilung ermöglicht. Diese Alkane weisen ebenfalls relativ geringe Viskosität auf, was einfaches Verteilen erleichtert. Die Wachse werden so eingesetzt, dass das Wachs erhitzt wird, bis es schmilzt, und dann mit dem Öl vermischt wird. Das resultierende Gemisch (getestet bei bis zu 40 Gew.-% Wachs) bleibt bei Raumtemperatur bei geeigneter Viskosität flüssig. Diese Alkane sind außerdem nicht teuer und in hohem Reinheitsgrad erhältlich.

**[0013]** Werden jedoch Alkane einzeln eingesetzt, rauchen sie bei Temperaturen von 90°C oder darüber. Dieses Rauchen zeigt auf, dass die Alkan-Schutzschicht bei erhöhten Temperaturen verdampft, was schließlich zum Verlust des Schutzes führt.

Nichtflüchtiges Öl

**[0014]** Die Bezeichnung "nichtflüchtiges Öl" wird hierin verwendet, um auf Silicon- oder Pflanzenöle Bezug zu nehmen, die auf den Siedepunkt von Wasser erhitzt werden können, ohne nennenswert zu verdampfen (z. B. weniger als 1% Verlust über einen Zeitraum von 30 Minuten bei 100°C). Nichtflüchtige Öle sind Siliconöle und Pflanzenöle, die Eigenschaften aufweisen, die nachstehend genauer besprochen und in Tabelle 1 illustriert werden. Am meisten bevorzugt sind Pflanzenöle.

**[0015]** Die Bezeichnung "Pflanzenöl" wird hierin in ihrer alltäglichen Bedeutung verwendet und bezieht sich auf Öle jeglicher Pflanzen, unabhängig davon, ob das Öl aus einem Gemüse oder einer Frucht gewonnen wird. Pflanzenöl ist vorzugsweise ein raffiniertes Speisepflanzenöl und kann aus beispielsweise aus Raps (Canola), Sojabohnen, Saflor, Sonnenblumen, Mais, Baumwollsamen und Oliven gewonnen werden. Jedes Pflanzenöl also, das die nachstehend beschriebenen Eigenschaften bereitstellt, ist geeignet. Noch bevorzugter ist das Pflanzenöl auch eines, das zum Frittieren geeignet ist. Am meisten bevorzugt ist Canolaöl mit niedrigem Erucasäuregehalt, da dieses Öl einen ausgezeichneten Beständigkeit gegen Oxidation und gegen thermischen Abbau aufweist.

**[0016]** Wie bereits oben erwähnt müssen geeignete nichtflüchtige Öle auf den Siedepunkt von Wasser erhitzbar sein, ohne nennenswert zu verdampfen. Vorzugsweise verliert nichtflüchtiges Öl weniger als 1% seines Ausgangsgewichts durch Verdampfen, wenn es 30 Minuten lang auf 100°C erhitzt wird. Das nichtflüchtige Öl weist vorzugsweise einen Siedepunkt über 200°C auf. Das nichtflüchtige Öl ist fähig, ein gleichförmiges Gemisch mit dem Alkan bilden zu können.

**[0017]** Ein bevorzugtes, nichtflüchtiges Öl mit diesen Eigenschaften ist Siliconöl. Siliconöle sind im Handel aus zahlreichen Quellen, so auch bei Sigma Chemical Company, Saint Louis, MO (Produkt-Nr.: M6884, CAS-Nr.: 8020-83-5), erhältlich.

**[0018]** Ein noch bevorzugteres, nichtflüchtiges Öl ist ein Pflanzenöl oder ein Gemisch aus Pflanzenölen. Eigenschaften nichtflüchtiger Öle, die sie für den Einsatz als Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeitsgemische geeignet machen, sind nachstehend in Tabelle 1 aufgezählt. Mit Ausnahme der Dichte und Viskosität des Öls weisen Siliconöle dieselben Eigenschaften auf.

Tabelle 1

| Eigenschaft | Geeigneter Bereich | Bevorzugter Bereich |
|---|---|---|
| Flammpunkt | 250-350 °C | >300 °C |
| Rußpunkt | 175-250 °C | >225 °C |
| Dichte | 0,89-0,96 g/ml | <0,92 g/ml |
| Viskosität | 15-19 Centipoise | <17 Centipoise |
| Wasserlöslichkeit | unlöslich | unlöslich |
| Fähigkeit, wässriges Medium zu bedecken | teilweise bis vollständig | vollständig |
| Löslichkeit in Alkan | teilweise bis löslich | löslich |

**[0019]** Bevorzugte Pflanzenöle weisen eine hohe Konzentration an Tocopherol oder anderen geeigneten Antioxidanzien auf, um vor Zersetzung des Öls bei hohen Temperaturen zu schützen. Die tatsächliche chemische Zusammensetzung des Pflanzenöls ist jedoch nicht besonders bedeutend, solange die Zusammensetzung die notwendigen physikalischen Eigenschaften bereitstellt. Ein weiterer Vorteil von Pflanzenölen ist, dass sie beinahe völlig sicher (nicht toxisch) sind und so Probleme ausklammern, die bei anderen Verbindungen mit ähnlichen physikalischen Eigenschaften Faktoren sein könnten. Pflanzenöle sind auch in großen Mengen leicht erhältlich und relativ günstig. Die ungefähre chemische Zusammensetzung bevorzugter Pflanzenöle ist in Tabelle 2 beschrieben.

TABELLE 2

| Fettsäuren (als Triglyceride) | Prozent Bereich |
|---|---|
| 16:0 | 3 (1–12) |
| 18:0 | 1 (0,5–6) |
| 18:1 | 60 (10–70) |
| 18:2 n-6 | 20 (10–70) |
| 18:3 n-3 | 13 (0,5–15) |
| 20:0 | 1 (0,5–15) |
| 20:1 | 1 (0,5–10) |
| 22:0 | < 1 (< 1–5) |
| 22:1 | < 1 (< 1–50) |
| Sterole | 0,5 (0–4) |
| | mg/kg (Bereich) |
| Tocopherole | 873 (50–1.500) |

Tensid

**[0020]** Wie bereits erwähnt enthält das Gemisch vorzugsweise ein Tensid. Andere Bezeichnungen, die verwendet werden, um Tenside zu beschreiben, umfassen beispielsweise Netzmittel, Detergenzien, Lösungsvermittler und Seifen. Die Eigenschaften des Tensids werden teilweise durch das Gesamtgleichgewicht zwischen dem hydrophilen Anteil des Moleküls und dem lipophilen Anteil des Moleküls beeinflusst, was als ein Gesamtzahlenwert (HLB-Wert) beschrieben werden kann, der als Richtlinie für das Verhalten von Tensiden in wässrigen oder Öllösungen dient. Tenside mit HLB-Werten über 10 sind vorwiegend hydrophil, jene mit Werten unter 10 (jedoch über Null) sind vorwiegend lipophil.

**[0021]** Für diese Erfindung werden Tenside mit Eigenschaften, die mit einem mittleren HLB-Wert übereinstimmen, vorzugsweise mit einem HLB-Wert zwischen etwa 5 und 15, bevorzugt. Dennoch ist jedes Tensid, das die erwünschte Wirkung der Abtrennung an der Wasser/Öl-Grenzfläche produziert, für die Zwecke dieser Erfindung geeignet.

**[0022]** Das Tensid sollte mit Reagenzien zur In-situ-Hybridisierung, mit immunhistochemischen Färbereagenzien und immunochemischen Reagenzien im Allgemeinen kompatibel sein und kann jegliches nichtionisches biologisches Detergens sein, der von Biochemikern zur Solubilisierung von Proteinen und Membrankomponenten eingesetzt wird. Polyoxyethylensorbitane und Polyoxyethylenether werden bevorzugt. Am meisten bevorzugt werden Tenside, die unter dem Handelsnamen BRIJ erhältlich sind. Am meisten bevorzugt ist Polyoxyethylen-10-oleylether (erhältlich unter dem Handelsnamen BRIJ 96, CAS-Nr. 9004-98-2, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO), das einen HLB-Wert von etwa 12,4 aufweist.

Das Gemisch

**[0023]** Die Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit ist ein Gemisch aus einem Alkan, einem nichtflüchtigen Öl und, vorzugsweise, einem Tensid. Das Alkan ist im Gemisch in ausreichender Menge vorhanden, um für eine Dichte zu sorgen, die das Vermischen mit dem wässrigen Medium unter Rühren verhindert und das wässrige Medium bedeckt. Das nichtflüchtige Öl ist im Gemisch in ausreichender Menge vorhanden, um das Verdampfen des Gemischs bei erhöhten Temperaturen zu verhindern. Das Verhindern des Verdampfens bei erhöhten Temperaturen bedeutet, dass das nichtflüchtige Öl in solch einer ausreichender Konzentration vorhanden ist, dass nicht mehr als 35%, vorzugsweise nicht mehr als 25%, des Gemischs nach 30 Minuten bei 95°C verdampfen (für die Bedingungen für diese Bestimmung siehe Beispiel 4).

**[0024]** Wird das Alkan einzeln als Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit eingesetzt, so hat dies den Nachteil, dass es bei erhöhten Temperaturen raucht und verdampft. Die Probleme des Verdampfens treten bei Temperaturen von über 70°C auf, sind aber bei Temperaturen von 90°C oder darüber problematischer. Rauchen ist ein sichtbares Zeichen, dass Öl durch Verdampfen verloren geht. Es ist jedoch kein Hinweis darauf, dass das Öl brennt. Das nichtflüchtige Öl reduziert in hohem Maße jeglichen sichtbaren Rauch bei Betriebstemperaturen von 20°C bis 100°C. Bei hohen Temperaturen dehnt sich das nichtflüchtige Öl in zweckmäßiger Zeit aus, während die Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit eine kontinuierliche, nicht unterbrochene Schicht über dem wässrigen Medium bildet.

**[0025]** Werden nichtflüchtige Öle einzeln eingesetzt, so bilden sie über einem wässrigen Medium tendenziell

kleine Löcher im Film. Darüber hinaus haben nichtflüchtige Öle eine relativ hohe Dichte (etwa 0,92 bis 0,96 g/ml), was der Dichte eines wässrigen Mediums ausreichend nahe kommt, sodass das Öl weitere Zugabe wässriger Reagenzien zu einem Objektträger verhindert, der bereits ein wässriges Medium, bedeckt mit nichtflüchtigem Öl, enthält. Weiters weisen nichtflüchtige Öle eine Viskosität auf (etwa 15 bis etwa 19 Centipoise für Pflanzenöle und etwa 175–225 Centipoise für die Siliconöle bei 25°C), die die Anwendung des Öls schwieriger gestaltet.

**[0026]** Wird es in einem angemessenen Anteil eingesetzt, so senkt das Alkan die Dichte des nichtflüchtigen Öls und sorgt somit im Gemisch für eine Dichte, die ein gleichmäßiges Verteilen der Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit über der wässrigen Phase unterstützt. Weiters erleichtert die Zugabe von Alkan das spätere Auftragen zusätzlicher wässriger Medien auf den Gewebeschnitt durch die Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit. Das Alkan reduziert auch die Viskosität des Gemischs und erleichtert dadurch das Auftragen dieses Gemischs. Das nichtflüchtige Öl sorgt im Gemisch für die Fähigkeit, Verdampfung bei Temperaturen über 70°C und bis zu 100 oder 110°C standzuhalten. Zusammengefasst trägt das Alkan in Verbindung mit dem nichtflüchtigen Öl zur Reduktion der Gesamtviskosität und der Gesamtdichte bei und verbessert, im Vergleich zu einem nichtflüchtigen Öl, das kein zugesetztes Alkan enthält, die Fähigkeit des Gemischs, sich über einem wässrigen Medium auszubreiten.

**[0027]** Eine andere Eigenschaft des Gemischs ist die Neigung der Deckschicht, das darunterliegende wässrige Medium dazu zu bringen, sich auszubreiten, sodass das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen des wässrigen Mediums stark vergrößert wird.

**[0028]** Dieser Effekt wird durch die Gegenwart des Tensidadditivs verbessert. Diese Eigenschaft ist nützlich, da, wie beim herkömmlichen Verfahren des Anbringens eines Deckglases auf den Objektträger, die Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit das wässrige Medium vor dem Verdampfen schützt und (durch die Wirkung des Tensids) einen sehr geringen Anteil des wässrigen Mediums dazu bringt, eine große Oberfläche des Objektträgers abzudecken. Dies kann aufgrund der Kosten für das wässrige Reagens zu merklichen Kosteneinsparungen führen.

**[0029]** Vorzugsweise werden das Alkan und das nichtflüchtige Öl in einem Verhältnis von 80 Vol.-% Alkan bis 80 Vol.-% nichtflüchtigem Öl vermischt. Solche Gemische weisen eine Dichte im Bereich von etwa 0,80 bis etwa 0,89 g/ml auf. Vorzugsweise beläuft sich der Alkananteil des Gemischs auf von etwa 30% bis etwa 70%, noch bevorzugter von etwa 40% bis etwa 60%. Am meisten bevorzugt ist ein Gemisch mit im Wesentlichen gleichem Volumen von Alkan und dem nichtflüchtigen Öl (d. h. 1 : 1 Alkan : nichtflüchtigem Öl), das eine Dichte von etwa 0,87 g/ml bei 25°C aufweist.

**[0030]** Wird ein Tensid eingesetzt, so ist es im Gemisch in ausreichender Menge vorhanden, um die Kontaktoberfläche zwischen der Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit und dem wässrigen Medium zu maximieren. Das Tensid fördert dies aufgrund von zwei vorhandenen Domänen innerhalb eines einzelnen Tensidmoleküls. Eine Domäne ist hydrophil und verteilt sich daher im wässrigen Medium. Die andere Domäne ist lipophil und verteilt sich daher in der Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit. Das Ergebnis ist, dass jedes Tensidmolekül gleichzeitig von der Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit und der darunterliegenden, wässrigen Phase angezogen wird. Dieses chemische Anziehungsvermögen bringt die zwei Flüssigkeiten in engen Kontakt. Diese Wirkung fördert die Bildung einer glatten, ununterbrochenen Schutzschicht über das gesamte wässrige Medium und bringt das wässrige Medium dazu, sich in einem dünnen Film mit einer großen Oberfläche auszubreiten. Vorzugsweise ist das Tensid mit von 0,01 bis 3,0 Gew.-% vorhanden. Noch bevorzugter ist das Tensid mit von 0,05 bis 0,5 Gew.-% vorhanden. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Tensid im Gemisch mit 0,1 Gew.-% vorhanden (0,1 g zu 100 ml Gemisch aus Alkan/nichtflüchtigem Öl zugesetzt).

**[0031]** Das Gemisch der zwei Öltypen in geeignetem Verhältnis verleiht dem Gemisch günstige Eigenschaften wie Resistenz gegenüber Verdampfung bei den erwünschten erhöhten Temperaturen, geringe Dichte und gute Oberflächeneigenschaften, die die Bildung einer gleichförmigen, ununterbrochenen, schützenden Ölschicht ermöglicht, welche die wässrige Phase bedeckt. Diese günstigen Eigenschaften werden über einen weiten Temperaturbereich aufrechterhalten, sodass dieses neue Gemisch bei niedrigen (z. B. 20 bis 40°C) und mittleren Temperaturen (z. B. 41 bis 69°C) sowie bei hohen Temperaturen (z. B. 70 bis 100°C) eingesetzt werden kann. Unter Zusatz eines Tensids weisen Gemische verbesserte Oberflächeneigenschaften auf.

Herstellung der Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit

**[0032]** Die Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit wird durch Vermischen von geeigneten Anteilen Alkan und

nichtflüchtigem Öl hergestellt. Sollte das Gemisch auch ein Tensid enthalten, so wird dieses in geeigneter Menge zugegeben und weiter vermischt, bis das Tensid vollständig im Gemisch aus Alkan und nichtflüchtigem Öl gelöst ist. Nach dem Vermischen kann die Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit bei Raumtemperatur in entweder durchsichtigen oder undurchsichtigen Glas- oder Kunststoffflaschen aufbewahrt werden.

Einsatz der Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit

**[0033]** Die Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit wird durch Verteilen einer ausreichenden Menge der Flüssigkeit auf einem Objektträger oder einer anderen Testoberfläche eingesetzt, um das wässrige Medium oder den Gewebeschnitt zu bedecken. Der Einsatz von etwa 800 µl ist für In-situ-Anwendung geeignet. Für immunhistochemische Färbeanwendungen können Volumina von 500–800 µl oder weniger ausreichend sein, um die wässrigen Reagenzien über dem Gewebeschnitt zu bedecken.

**[0034]** Für Anwendungen, die ein wässriges Medium mit einem Volumen von über etwa 300 µl erfordern, kann jedoch der Einsatz von 1000 µl oder mehr erforderlich sein, um die Oberfläche zu bedecken. Im Allgemeinen kann man nicht zu viel der Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit einsetzen. Sind jedoch Gewebeschnitt und Reagenzien bedeckt, so wurde ausreichend Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit aufgetragen.

**[0035]** Der Einsatz einer Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit ist effizienter und angenehmer als Verfahren nach dem Stand der Technik, die unter Einsatz von Glas- oder Kunststoffdeckgläsern oder befeuchteter Kammern arbeiten. Die Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit kann durch einfaches Auftragen weniger Tropfen der Flüssigkeit auf den Objektträger leicht auf der wässrigen Phase aufschwimmen. Die Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit kann auch leicht durch Waschen des Objektträgers mit etwas Wasser wieder entfernt werden. Aufgrund der dynamischen Eigenschaft der Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeitsphase können darüber hinaus die Reagenzien der wässrigen Phase in jeglicher Abfolge zugegeben werden, da die wässrige Phase durch die Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeits-Phase absinkt und somit sicherstellt, dass keine Verdampfung vor Zugabe des Deckglases oder Platzieren in der Kammer stattfindet, wie dies bei Verfahren nach dem Stand der Technik der Fall ist.

**[0036]** Die wässrige Phase kann mit der vorhandenen Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit vermischt werden. Die wässrige Phase kann durch Anbringen des Objektträgers an einem herkömmlichen Rührwerk vermischt werden. Eine bevorzugte automatische Vorrichtung, die im Handel unter dem Namen VENTANA 320 (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) erhältlich ist, vermischt die wässrige Phase durch Richten von Luftstrahlen auf den Objektträger. Die Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit hält die Reagenzien der wässrigen Phase wirksam auf ihrem Platz am Objektträger während des Mischverfahrens zurück.

**[0037]** Es gilt anzumerken, dass für Reaktionen der In-situ-Hybridisierung die DNA typischerweise bei etwa 95°C denaturiert wird. Die Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit ist bei 95°C voll wirksam. Feuchtkammern, die in Reaktionen nach dem Stand der Technik eingesetzt wurden, um Verdampfung zu verhindern, sind nicht wirksam, da der Dampfdruck innerhalb der typischen Kammer nicht hoch genug ist, um Verdampfung zu verhindern.

**[0038]** Diese Erfindung wird weiters durch die folgenden spezifischen, jedoch nicht einschränkenden Beispiele illustriert. Verfahren, die konstruktiv auf praktische Anwendungen reduziert sind, werden im Präsens, und Verfahren, die im Labor durchgeführt wurden, werden im Imperfekt beschrieben.

BEISPIEL 1

Herstellung der Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit

**[0039]** In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wurde eine Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit dieser Erfindung wie nachstehend beschrieben hergestellt.

**[0040]** 50 ml eines bevorzugten Alkans, ISOPAR-V-Öl (CAS-Nr. 64742-46-7; Exxon Chemical Americas, Houston, TX), wurden mit 50 ml eines bevorzugten nichtflüchtigen Öls, Canolaöl (CAS-Nr. 8002-13-9; Hunt-Wesson, Inc., Fullerton, CA), vermischt. Das Präparat wurde bei Raumtemperatur in braunen HD-Polyethylenflaschen aufbewahrt.

BEISPIEL 2

Herstellung der Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit

**[0041]** In einer anderen bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wurde eine Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit dieser Erfindung wie nachstehend beschrieben hergestellt.

**[0042]** Ein Gemisch aus ISOPAR-V-Öl und Canolaöl wurden wie in Beispiel 1 beschrieben hergestellt. Nach dem Vermischen wurden 0,1 Gramm des Tensids Polyoxyethylen-10-oleylether (CAS-Nr. 9004-98-2, erhältlich unter dem Handelsnamen BRIJ 96; Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) dem Gemisch aus Alkan und nichtflüchtigem Öl zugegeben und weiter bei Raumtemperatur vermischt, bis das Tensid vollständig gelöst war (etwa 10 Minuten). Das Präparat wurde bei Raumtemperatur in braunen HD-Polyethylenflaschen aufbewahrt.

BEISPIEL 3

In-situ-Hybridisierungs-Test

**[0043]** Die Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit wurde wie in Beispiel 1 hergestellt.

**[0044]** Das folgende Verfahren wurde wie nachstehend beschrieben durchgeführt, um menschliche Papillomaviren in formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten aus menschlichen Zervixbiopsien nachzuweisen.

1. Etwa 17-stündiges Backen der Objektträger bei 58 ± 2°C und anschließendes Abkühlen auf Raumtemperatur.
2. Entparaffinieren des Gewebeschnitts in zwei Mengen Xylol jeweils 5 Minuten lang.
3. Waschen der Gewebeschnitte in zwei Mengen absolutem Ethanol je 5 Minuten.
4. Lufttrocknen der Gewebeschnitte (etwa 5–10 Minuten).
5. Verteilen von 200 µl der Verdaulösung (50% Propylenglykol; 0,025 M Tris/HCl, pH 7,4; 0,3 mM Natriummetabisulfit; 5 mM Calciumchlorid 0,05% Thimerosal; 0,025 u/ml alkalische Protease Typ VIII) auf jeden Objektträger.
6. Verteilen von 600 µl der Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit auf jeden Objektträger.
7. Erhöhen der Objektträger-Temperatur auf 37°C und 15-minütiges Inkubieren.
8. Entfernen der Verdaulösung und Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit von jedem Objektträger.
9. Zugabe von 200 µl 1 × SSC (150 mM Natriumchlorid, 15 mM Natriumcitrat) und 600 µl Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit auf jeden Objektträger und vierminütiges Inkubieren bei 37°C.
10. Entfernen der Flüssigkeit von den Objektträgern.
11. Dreimaliges Wiederholen der Schritte 9 und 10.
12. Verteilen von 200 µl Prä-Hybridisierungslösung [für eine 5,0-ml-Lösung sind einzusetzen: 2,5 ml Formamid (Sigma Nr. 7508), 1,5 ml 25%iges Dextransulfat (Sigma Nr. D-8906), 0,5 ml 20 × SSC, 0,5 ml PBS] und 600 µl Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit und vierminütiges Inkubieren bei 37°C.
13. Entfernen der Flüssigkeit von den Objektträgern.
14. Wiederholen der Schritte 12 und 13.
15. Verteilen von 100 µl Sondenlösung (HPV OmniProbe Set, Digene Diagnostics, Inc., Katalog-Nr. 4206-1032) und 600 µl Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit pro Objektträger.
16. Anheben der Objektträger-Temperatur auf 95°C, fünfminütiges Aufrechterhalten der Temperatur.
17. Reduzieren der Objektträger-Temperatur auf 37°C, zweistündiges Aufrechterhalten der Temperatur
18. Entfernen der Flüssigkeit von den Objektträgern.
19. Verteilen von 800 µl der Waschlösung Nr. 2 (1 × SSC, 2% (Gew./Vol.) Rinderserumalbumin (BSA), 0,05% PROCLIN-300-Antibiotikum (Supelco, Katalog-Nr. 4-8127, pH 7), vorgewärmt auf 37°C, und vierminütiges Inkubieren.
20. Entfernen der Flüssigkeit von den Objektträgern.
21. Viermaliges Wiederholen der Schritte 19 und 20.
22. Verteilen von 200 µl Detektionsmittel [0,5 M Trizma-Base, 0,3% (Gew./Vol.) Ziegenglobuline (Sigma Chemical Co., Katalog-Nr. G5640), 0,05 Vol.-% PROCLIN-300-Antibiotikum, 0,014% (Gew./Vol.) $ZnCl_2$, 0,125 Vol.-% Streptavidin-Alkalische Phosphatase (TAGO Katalog-Nr. 6567)] und 600 µl Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit pro Objektträger.
23. 30-minütiges Inkubieren der Objektträger bei 37°C.
24. Entfernen der Flüssigkeit von den Objektträgern.
25. Verteilen von 800 µl Substratpuffer (100 mM Tris, 100 mM NaCl, 50 mM $MgCl_2$, pH 9,5) und vierminütiges Inkubieren bei 37°C.

26. Entfernen der Flüssigkeit von den Objektträgern.
27. Dreimaliges Wiederholen der Schritte 25 und 26.
28. Verteilen von 200 µl Substratlösung [40 ml Substratpuffer, der je 0,1 ml von Substrat 1 (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-Farbstoff in Dimethylformamidlösung) und Substrat 2 (Nitroblau-Tetrazolium-Farbstoff in Dimethylformamidlösung; Digene Kit Katalog-Nr. 4206-0100)] und 600 µl Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit pro Objektträger.
29. 30-minütiges Inkubieren bei 37°C.
30. Entfernen aus der Wärme und Entfernen der Flüssigkeit von den Objektträgern.
31. Verteilen von 800 µl Waschpuffer und vierminütiges Inkubieren bei 37°C.
32. Entfernen der Flüssigkeit von den Objektträgern.
33. Dreimaliges Wiederholen der Schritte 31 und 32.
34. Verteilen von 200 µl Kontrastfärbemittel (Kernechtrot) und 600 µl Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit.
35. Einminütiges Inkubieren.
36. Entfernen der Flüssigkeit von den Objektträgern.
37. Verteilen von 800 µl Waschlösung und vierminütiges Inkubieren.
38. Entfernen der Flüssigkeit von den Objektträgern.
39. Dreimaliges Wiederholen der Schritte 37 und 38.
40. Eintauchen der Objektträger in einen Behälter mit Waschpuffer (100 mM Trizma-Base, die 0,05% PROCLIN-300-Antibiotikum enthält).
41. Einminütiges Dehydrieren der Gewebeschnitte in 95%igem Ethanol und anschließendes einminütiges Dehydrieren in absolutem Ethanol.
42. Einminütiges Klären der Gewebeschnitte mit Xylol.
43. Aufspannen der Gewebeschnitte auf ein permanentes Aufspannmedium und Betrachten der Resultate mittels eines Lichtmikroskops.

## BEISPIEL 4

### RNA-In-situ-Hybridisierungs-Test

**[0045]** Die Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit wurde wie in Beispiel 2 beschrieben hergestellt.

**[0046]** Das folgende Verfahren wurde wie nachstehend beschrieben durchgeführt, um für Epstein-Barr-Virus (EBV) kodierende RNAs in einem formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitt eines menschlichen B-Zellen-Lymphoms nachzuweisen, das in einer SCID-Maus (SCID = schweres kombiniertes Immundefizienz-Syndrom) gezüchtet wurde.

1. Objektträger wurden in einem Ofen bei 58 ± 2°C zumindest 1 Stunde lang gebacken und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt.
2. Die Objektträger wurden in zwei Mengen Xylol jeweils 5 Minuten lang entparaffiniert und anschließend in zwei Mengen absolutem Ethanol je 5 Minuten lang gewaschen.
3. Die Objektträger wurden luftgetrocknet (etwa 5–10 Minuten lang).
4. Die Gewebeschichten wurden mit 500 µl 1 × SSC (150 mM NaCl, 15 mM Natriumcitrat, pH 7,0) benetzt, wonach das überflüssige SSC durch sanftes Klopfen am Rand jedes Objektträgers auf ein absorbierendes Papierhandtuch entfernt wurde.
5. 400 µl Verdaureagens [0,1 M Trizma-Base, 5 mM EDTA, pH 7,5, umfassend 2 µg/ml Proteinase K (Stratagene Katalog-Nr. 300140)] und 800 µl Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit wurden auf jeden Objektträger aufgetragen, und die Objektträger wurden auf 40°C fünf Minuten lang erwärmt.
6. Die Objektträger wurden dreimal mit etwa 3,0 ml 1 × SSC pro Waschvorgang gewaschen.
7. Die Flüssigkeit wurde durch sanftes Klopfen am Rand jedes Objektträgers auf ein absorbierendes Papierhandtuch entfernt.
8. 200 µl Prä-Hybridisierungslösung (für 10,0 ml: 2,5 ml Formamid, 2,0 ml 20 × SSC, 0,5 ml 1 M Natriumphosphat, 0,5 ml 200 mM EDTA, 3,33 ml 30%iges Dextransulfat, 0,52 ml steriles entionisiertes Wasser, 0,1 ml 100 µg/ml Lachssperma-DNA, 1,0 ml 50 × Denhardt-Lösung [50 × Denhardt-Lösung wird durch Zugabe von 5 g Ficoll, 5 g Polyvinylpyrrolidon und 5 g BSA zu 500 ml entionisiertem Wasser und durch Mischen bis zur Auflösung dieser Bestandteile hergestellt]) wurden jedem Objektträger zugegeben, und die Objektträger wurden 4 Minuten lang bei 40°C inkubiert.
9. Die Flüssigkeit wurde wie in vorangehend beschriebenem Schritt 7 entfernt.
10. 200 µl Hybridisierungs-Lösung (Prä-Hybridisierungslösung, der ein Digoxigenin-markiertes, einzelsträngiges EBER-2-spezifisches Oligonucleotid zu einer Endkonzentration von 1 µg/ml zugegeben wurde) und 800 µl Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit wurden jedem Objektträger zugegeben, und die Objektträger wurden auf 75°C 5 Minuten lang erhitzt.

11. Die Objektträger wurden auf 40°C gebracht und 15 Minuten lang inkubiert.
12. Die Flüssigkeit wurde wie in Schritt 7 entfernt.
13. 400 µl Puffer Nr. 2 (Boehringer Mannheim, Katalog-Nr. 1175-041) wurden jedem Objektträger zugegeben und die Objektträger 4 Minuten lang bei 40°C inkubiert.
14. Die Flüssigkeit wurde wie in Schritt 7 entfernt.
15. 400 µl Detektionsmittel (Puffer Nr. 2 mit 0,33%iger alkalischer Anti-Digoxigenin-Phosphatase [Boehringer Mannheim, Katalog-Nr. 1175-041]) und 800 µl Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit wurden jedem Objektträger zugegeben, und die Objektträger wurden 15 Minuten lang bei 40°C inkubiert.
16. Die Flüssigkeit wurde wie in Schritt 7 entfernt.
17. Die Objektträger wurden dreimal mit etwa 3,0 ml 1 × SSC pro Waschvorgang gewaschen. Nach dem letzten Anwenden von 1 × SSC wurden 800 µl Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit auf jeden Objektträger aufgetragen, und die Objektträger wurden 4 Minuten lang bei 40°C inkubiert.
18. Schritt 17, wie oben beschrieben, wurde wiederholt.
19. Die Flüssigkeit wurde wie in Schritt 7 entfernt.
20. 400 µl Puffer Nr. 3 (Boehringer Mannheim, Katalog-Nr. 1175-041) und 800 µl Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit wurden jedem Objektträger zugegeben, und die Objektträger wurden 4 Minuten lang bei 40°C inkubiert.
21. Die Flüssigkeit wurde wie in Schritt 7 entfernt.
22. 400 µl Substratlösung (Puffer Nr. 3, der 35 µl X-Phosphat und 45 µl NBT [Boehringer Mannheim, Katalog-Nr. 1175-041] enthielt) und 800 µl Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit wurden jedem Objektträger zugegeben, und die Objektträger wurden bei 40°C 30 Minuten lang inkubiert.
23. Die Flüssigkeit wurde wie in Schritt 7 entfernt.
24. Die Objektträger wurden wie in Schritt 17 gewaschen.
25. Die Objektträger wurden wie in Schritt 6 gewaschen.
26. Die Objektträger wurden in 95%igem Ethanol 1 Minute lang und anschließend 1 Minute lang in absolutem Ethanol dehydriert.
27. Die Gewebeschnitte wurden mittels einminütigen Eintauchens der Objektträger in Xylol geklärt.
28. Die Gewebeschnitte wurden auf ein permanentes Aufspannmedium aufgespannt und mittles eines Lichtmikroskops untersucht.

## BEISPIEL 4

### Untersuchung der Verdampfung

**[0047]** Diese Untersuchung stellt die durch den Einsatz eines Gemischs aus einem Alkan und einem nichtflüchtigem Öl bereitgestellte Verbesserung im Vergleich zum Einsatz eines dieser Bestandteile allein dar.

**[0048]** 500 µl bevorzugtes nichtflüchtiges Öl, Canolaöl, oder ein Alkan, Pentadecan, oder ein Gemisch aus dem Öl und Alkan (Canola : Pentadecan 1 : 1) wurden auf einen vorgewogenen Standard-Glasmikroskopobjektträger gegeben. Die Objektträger wurden dann erneut gewogen und das Ausgangsgewicht des Öls durch Abziehen des Objektträgergewichts vom Gesamtgewicht bestimmt. Die Objektträger wurden dann auf eine Heizplatte gegeben, die im Vorhinein auf die angegebene Temperatur angeglichen worden war. Die Objektträger wurden 30 Minuten lang bei der angegebenen Temperatur auf der Heizplatte stehen gelassen, dann entfernt, auf Raumtemperatur abkühlen gelassen und erneut gewogen. Die Menge des verbleibenden Öls wurde durch Abziehen des Objektträgergewichts vom Gesamtgewicht nach Erhitzen bestimmt. Der Verlust (in Prozent) wurde mittels Vergleich des Ausgangsölgewicht und des Gewichts des verbleibenden Öls nach Erwärmen berechnet. Alle Tests wurden dreimal durchgeführt, und die Daten sind als durchschnittlicher Gewichtsverlust (in Prozent) ± Standardabweichung dargestellt. Der Verlust an Öl (in Gewichtsprozent) ist nachstehend in Tabelle 4 dargestellt.

TABELLE 4

| | PROBE | | |
|---|---|---|---|
| | Pentadecan | Canolaöl | Gemisch |
| Temperatur (°C) | | | |
| 40 | 1,9 ± 0,9 | 0,1 ± 0,1 | 1,4 ± 0,4 |
| 60 | 7,7 ± 1 | 0,4 ± 0,1 | 3,3 ± 0,5 |
| 80 | 25,4 ± 5 | 0,7 ± 0,2 | 7,9 ± 0,6 |
| 100 | 50,6 ± 6 | 0,4 ± 0,1 | 25,7 ± 0,7 |
| 110 | 83 ± 9 | 0,1 ± 0 | 32 ± 2 |

**[0049]** Wie in Tabelle 4 dargestellt reduziert die Zugabe eines nichtflüchtigen Öls zum Alkan das Verdampfen des Gemischs bei erhöhten Temperaturen signifikant.

BEISPIEL 5

Einsatz eines Tensids

**[0050]** Eine Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit wurde wie in Beispiel 1 beschrieben hergestellt. Wurde die Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit (500 µl) auf ein wässriges Medium (100 µl 1 × SCC) auf einem Objektträger aufgebracht, so zog sich das wässrige Medium um sich selbst zusammen und bildete so ein kleines, rundes, ballartiges Tröpfchen, das an allen Seiten (außer an der Unterseite, wo das Tröpfchen Kontakt mit dem Objektträger hatte) von der Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit umgeben war. Das wässrige Medium wurde vor dem Verdampfen geschützt. Diese Tendenz jedoch, eine ballartige Struktur zu bilden, führte dazu, dass eine fixierte Menge des wässrigen Mediums nur einen geringen Anteil des Gewebeschnitts bedeckte.

**[0051]** 0,1 g des Tensids Polyoxyethylen-10-oleylether (CAS-Nr. 9004-98-2, erhältlich unter dem Handelsnamen BRIJ 96; Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) wurden der Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit, die wie in Beispiel 1 hergestellt wurde, zugegeben. Das Tensid-hältige Gemisch wurde auf das wässrige Medium wie vorangehend beschrieben aufgebracht. Unter Einsatz des Tensid-hältigen Gemischs reagierte das wässrige Medium sehr unterschiedlich. Anstatt sich zusammenzuballen glättete sich das wässrige Medium zu einer dünnen, flachen, scheibenartigen Form. Dies ist sehr stark erwünscht, da durch solch eine Form eine fixierte Menge wässrigen Mediums eine viel größere Fläche des Gewebes abdecken kann, während es stets durch die Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit vollständig geschützt bleibt.

**Patentansprüche**

1. Verfahren zur Hemmung des Verdampfens eines wässrigen Reaktionsmediums, umfassend das Bedecken des wässrigen Reaktionsmediums mit einer Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit, umfassend ein Gemisch aus einem Alkan mit zumindest sechs Kohlenstoffatomen und einem nichtflüchtigen Öl, ausgewählt aus der aus Siliconöl und Pflanzenöl bestehenden Gruppe, wobei das nichtflüchtige Öl bis zum Siedepunkt von Wasser erhitzbar ist, ohne nennenswert zu verdampfen, wobei das Alkan in diesem Gemisch in ausreichender Menge vorhanden ist, um für eine Dichte zu sorgen, die dem Gemisch ein Aufschwimmen auf der Oberfläche eines wässrigen Mediums erleichtert, wobei das nichtflüchtige Öl in diesem Gemisch in ausreichender Menge vorhanden ist, um das Verdampfen des Gemischs bei einer Temperatur von 70°C und darüber zu hemmen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, worin das Alkan 10 bis 20 Kohlenstoffatome aufweist.

3. Verfahren nach Anspruch 1, worin das Alkan Octadecan ist.

4. Verfahren nach Anspruch 1, worin das Alkan ein Gemisch aus Alkanen mit 15 bis 20 Kohlenstoffatomen ist.

5. Verfahren nach Anspruch 4, worin das Alkangemisch aus verzweigten Alkanen und Cycloalkanen besteht.

6. Verfahren nach Anspruch 5, worin das Alkangemisch aus etwa 2/3 verzweigten Alkanen und etwa 1/3 Cycloalkanen besteht.

7. Verfahren nach Anspruch 6, worin das nichtflüchtige Öl ein raffiniertes Speisepflanzenöl ist.

8. Verfahren nach Anspruch 7, worin das Öl aus der aus Canola, Sojabohnen, Saflor, Sonnenblumen, Mais, Baumwollsamen und Olein bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

9. Verfahren nach Anspruch 8, worin das Pflanzenöl Canolaöl ist.

10. Verfahren nach Anspruch 1, worin das Alkan in einem Mengenbereich von etwa 20 bis etwa 80% des Gemischs vorhanden ist und das nichtflüchtige Öl in einem Mengenbereich von etwa 80 bis etwa 20% des Gemischs vorhanden ist.

11. Verfahren nach Anspruch 1, worin das Alkan zu etwa 40 bis etwa 60% vorhanden ist und das nichtflüchtige Öl zu etwa 40 bis etwa 60% im Gemisch vorhanden ist.

12. Verfahren nach Anspruch 11, worin das Alkan und das nichtflüchtige Öl in im Wesentlichen gleichen Mengen vorhanden sind.

13. Verfahren nach Anspruch 1, worin die Dichte der Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit nicht mehr als etwa 0,90 g/ml beträgt.

14. Verfahren nach Anspruch 13, worin die Dichte der Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit nicht mehr als etwa 0,88 g/ml beträgt.

15. Verfahren nach Anspruch 1, worin das Gemisch zusätzlich ein Tensid umfasst, das in einer zur Maximierung der Kontaktoberfläche zwischen der Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit und dem wässrigen Medium ausreichenden Menge vorhanden ist.

16. Verfahren nach Anspruch 15, worin das Tensid ein Polyoxyethylenether ist.

17. Verfahren nach Anspruch 16, worin das Tensid Polyoxyethylen-10-oleylether ist.

18. Verfahren nach Anspruch 1, worin die Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit etwa 40% bis etwa 60% eines Alkans, ausgewählt aus der aus Octodecan und einem Gemisch aus Alkanen mit 15 bis 20 Kohlenstoffatomen, das etwa 2/3 verzweigte Alkane und etwa 1/3 Cycloalkane umfasst, bestehenden Gruppe, und etwa 40% bis etwa 60% eines Pflanzenöls sowie ein Tensid umfasst, das in einer zur Maximierung der Kontaktoberfläche zwischen der Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit und dem wässrigen Medium ausreichenden Menge vorhanden ist.

19. Verfahren nach Anspruch 18, worin das Pflanzenöl Canolaöl ist.

20. Verfahren nach Anspruch 19, worin das Gemisch im Wesentlichen aus etwa gleichen Mengen von Alkan und Canolaöl besteht und etwa 0,1% Polyoxyethylen-10-oleylether enthält.

21. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin das nichtflüchtige Öl, wenn es 30 Minuten lang auf 100°C erhitzt wird, weniger als 1% seines Ausgangsgewichts durch Verdampfung verliert.

22. Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit zur Hemmung des Verdampfens eines wässrigen Reaktionsmediums, umfassend ein Gemisch aus einem Alkan mit zumindest 6 Kohlenstoffatomen und einem nichtflüchtigen Öl, ausgewählt aus der aus Siliconöl und Pflanzenöl bestehenden Gruppe, wobei das nichtflüchtige Öl bis zum Siedepunkt von Wasser erhitzbar ist, ohne nennenswert zu verdampfen, wobei das Alkan im Gemisch in ausreichender Menge vorhanden ist, um für eine Dichte zu sorgen, die dem Gemisch ein Aufschwimmen auf der Oberfläche eines wässrigen Mediums erleichtert, wobei das nichtflüchtige Öl im Gemisch in ausreichender Menge vorhanden ist, um das Verdampfen des Gemischs bei einer Temperatur von 70°C und darüber zu hemmen, worin das Gemisch zusätzlich ein Tensid umfasst, das in einer zur Maximierung der Kontaktoberfläche zwischen der Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit und dem wässrigen Medium ausreichenden Menge vorhanden ist.

23. Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit nach Anspruch 22, worin das Tensid ein Polyoxyethylenether ist.

24. Verfahren nach Anspruch 23, worin das Tensid Polyoxyethylen-10-oleylether ist.

25. Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit nach Anspruch 22, 23 oder 24, umfassend 40% bis etwa 60% eines Alkans, ausgewählt aus der aus Octodecan und einem Gemisch aus Alkanen mit 15 bis 20 Kohlenstoffatomen, das etwa 2/3 verzweigte Alkane und etwa 1/3 Cycloalkane umfasst, bestehenden Gruppe, und etwa 40% bis etwa 60% eines Pflanzenöls sowie ein Tensid, das in einer zur Maximierung der Kontaktoberfläche zwischen der Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit und dem wässrigen Medium ausreichenden Menge vorhanden ist.

26. Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit nach Anspruch 25, worin das Pflanzenöl Canolaöl ist.

27. Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit nach Anspruch 26, worin das Gemisch im Wesentlichen aus etwa gleichen Mengen von Alkan und Canolaöl besteht und etwa 0,1% Polyoxyethylen-10-oleylether enthält.

28. Verdampfungsinhibitor-Flüssigkeit nach einem der Ansprüche 22 bis 27, worin das nichtflüchtige Öl, wenn es 30 Minuten lang auf 100°C erhitzt wird, weniger als 1% seines Ausgangsgewichts durch Verdampfung verliert.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen