

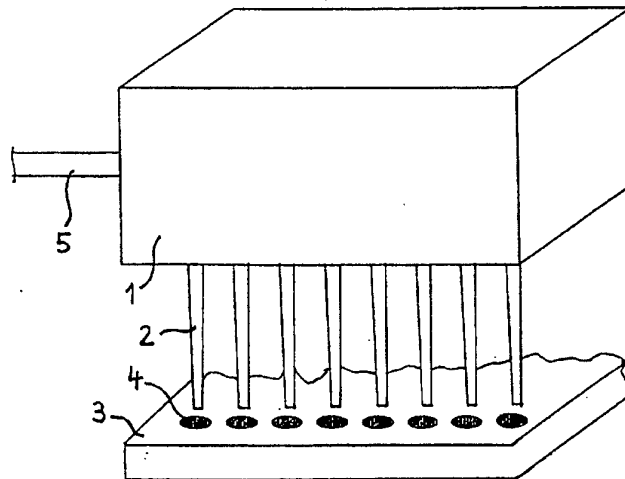


**PCT**  
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
 Internationales Büro  
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation<sup>5</sup>: <b>B01F 13/02</b></p>	<p><b>A1</b></p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 94/19097</b>           (43) Internationales          Veröffentlichungsdatum: 1. September 1994 (01.09.94)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE94/00139          (22) Internationales Anmeldedatum: 10. Februar 1994 (10.02.94)           (30) Prioritätsdaten:          P 43 06 085.4 26. Februar 1993 (26.02.93) DE           (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-          PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER          WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Bunsenstrasse 10,          D-37073 Göttingen (DE).           (72) Erfinder; und          (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FISCHER, Gunter, Siegfried          [DE/DE]; Otto-Kanning-Strasse 11, D-06120 Halle (DE).          KÜLLERTZ, Gerhard, Peter, Wilhelm [DE/DE]; Richard-          Paulick-Strasse 14, D-06124 Halle (DE).           (74) Anwälte: VIERING, Hans-Martin usw.; Steinsdorfstrasse 6, D-          80538 München (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE,          CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,          SE).   <b>Veröffentlicht</b>  <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>  <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen</i>  <i>Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen</i>  <i>eintreffen.</i></p>	

(54) Title: PROCESS AND DEVICE FOR MIXING LIQUIDS IN MICROTITRATION PLATES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUM DURCHMISCHEN VON FLÜSSIGKEITEN IN MIKROTITRATIONSPLATTEN



(57) Abstract

Process and device for mixing liquids. According to the invention, with a suitable type of gas, frequency, strength, direction and cross-section, a periodically pulsating stream of gas acting on a quantity of liquid in a microtitration plate compartment causes rapid mixing of said liquid therein without the formation of bubbles in the liquid which could interfere with the subsequent optical concentration measurement process.

**(57) Zusammenfassung**

Verfahren und Vorrichtung zum Durchmischen von Flüssigkeiten wobei ein periodisch pulsierend auf eine Flüssigkeitsmenge in einer Mikrotiterplattenkavität einwirkender Gasstrom bei geeigneter Gasart, Frequenz, Stärke, Richtung und geeignetem Querschnitt ein schnelles Durchmischen der Flüssigkeit in der Mikrotiterplattenkavität bewirkt, ohne dass es zu Blasenbildung in der Flüssigkeit kommt, welche das nachfolgende lichtoptische Konzentrationsmessverfahren stören könnte.

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Verfahren und Vorrichtung zum Durchmischen von Flüssigkeiten in Mikrotiterplatten

5 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum berührungsfreien Durchmischen von Lösungen in den Kavitäten von Mikrotiterplatten.

10 Homogene Lösungen in Mikrotiterplatten sind nötig, wenn chemische Reaktionen mit Messungen der optischen Dichte in den einzelnen Kavitäten einer Mikrotiterplatte definiert ablaufen müssen.

15 Diese Messungen werden in großem Umfang für diagnostische Verfahren benutzt. In solchen Fällen kann ein verbessertes Mischverfahren von Bedeutung sein.

20 Verfahren zum berührungsfreien Mischen von Flüssigkeiten sind in umfangreichem Maße bekannt. Die angewendeten Verfahren stützen sich zum einen auf die Übertragung von Schwingungen auf die Flüssigkeit enthaltenden Gefäße oder nutzen strömende Flüssigkeiten oder Gase, um durch Verwirbelung ein Vermischen zu erreichen. Verfahren zur Herstellung homogener Lösungen in Mikrotiterplatten gründen sich auf die mechanische Übertragung  
25 von beschleunigten Bewegungen auf die Mikrotiterplatte.

Dabei werden zwei Grundprinzipien genutzt:

30 A. Lineare beschleunigte Bewegungen:

Die Mikrotiterplatte wird durch einen Schwingungsgeber in rüttelnde Bewegungen versetzt. Durch Ausnutzen der Trägheit der Flüssigkeit wird bei geeigneter Schüttelfrequenz eine solche Bewegung in der Flüssigkeit erreicht, die ein Durchmischen zur  
35 Folge hat. Schwingungsgeber ist üblicherweise eine Schüttelmaschine, wie sie in chemischen Laboratorien auch für das Durchmischen größerer Flüssigkeitsmengen benutzt wird, oder auch eine extra als "Mikroplattenschüttler" vertriebene

Vorrichtung. Schwingungsgeber kann aber auch ein über eine Steuerung beeinflussbarer, zielgerichtet linear bewegter Wagen sein, auf den die Mikrotiterplatte gestellt wird, wie dies beispielsweise im Mikrotiterplatten-Auswertesystem (MR 7000) 5 der Firma Dynatech (14340, Sylllyfield Circle, Chantilly, VA 22021, USA) realisiert wird.

#### B. Kreisförmig beschleunigte Bewegung

10 Die Mikrotiterplatte wird kreisförmig so beschleunigt, daß die Flüssigkeit in den einzelnen Kavitäten auf Grund ihrer Trägheit in kreisende Bewegung versetzt wird. Durch diese kreisende Bewegung soll ein Durchmischen erreicht werden. Bewegungsgeber ist üblicherweise eine Schüttelmaschine, wie sie in chemischen 15 Laboratorien auch für das Durchmischen größerer Flüssigkeitsmengen benutzt wird.

Beide unter A und B angeführten Verfahren nutzen die Trägheit der Flüssigkeit bei einer auf sie wirkenden beschleunigten 20 Bewegung aus.

Diese Verfahren sind für größere Flüssigkeitsmengen sehr gut geeignet. Infolge der kleinen Volumina der Kavitäten in Mikrotiterplatten und deren Geometrie treten aber hier die 25 Nachteile dieser Verfahren zutage. Da die Trägheit direkt proportional zur Masse ist, muß bei kleinen Flüssigkeitsmengen eine besonders hohe Beschleunigung angewendet werden, um eine solche Flüssigkeitsbewegung zu erreichen, die ein Durchmischen zur Folge hat. Von weiterem Nachteil sind die Adhäsion der 30 Flüssigkeit an der Mikrotiterplatte. In zylindrischen Gefäßen verhalten sich die mit der Flüssigkeit wechselwirkenden Oberflächen umgekehrt proportional zur Flüssigkeitsmenge. Kleinere Flüssigkeitsmengen sind, bezogen auf das Volumen, größeren Adhäsionskräften ausgesetzt als größere 35 Flüssigkeitsvolumina. Ebenso verhält es sich mit der Oberflächenspannung.

Um dennoch mit dem angewendeten Wirkungsprinzip eine exakte

reproduzierbare Durchmischung der Lösungen in allen 96 Kavitäten einer Mikrotiterplatte zu erreichen, müßte eine unpraktikabel hohe Beschleunigung angewendet werden. Diese notwendigen hohen Beschleunigungen können ihrerseits zu Resonanzerscheinungen der Titerplatte führen, in deren Ergebnis es zu Zonen auf der Titerplatte kommen kann, in denen die Durchmischung sehr langsam erfolgt, und zu Bereichen, in denen Flüssigkeit aus den Kavitäten herausspritzt.

Die oben angeführte Möglichkeit, durch strömendes Gas eine Durchmischung zu erreichen, wird beim Mischen von Flüssigkeiten in Mikrotiterplatten bisher nicht angewendet, da sie in der bisher beschriebenen Art das nachfolgende lichtoptische Meßverfahren durch Einbringen von Gasblasen stören würde. So wurde beispielsweise in der DE-OS 28 37 002 eine Technik beschrieben, in der ein Propeller Luft auf eine Flüssigkeitsoberfläche in der Art bläst, daß die Flüssigkeit gemischt wird und Gasblasen in die Flüssigkeit eingetragen werden. Dieses Einbringen von Gasblasen wurde auch in den DE-OS'en 30 07 842 und 33 13 382 beschrieben, die ebenfalls Gas zum Vermischen nutzen. Gemäß der DE-OS 32 46 791 wird zum Umrühren von Flüssigkeiten unter Vakuum, insbesondere von viskosen Zuckerrohprodukten, Luft kontinuierlich oder impulsartig in den die Flüssigkeit enthaltenden Behälter eingeblasen, der in seiner Behälterwand oder seinem Innenraum eine oder mehrere Injektordüsen aufweist. Aber auch in dieser Anwendungsart werden Gasblasen in die Flüssigkeit eingebracht, die die Anwendung in Mikrotiterplatten verbieten.

Aus den angeführten Gründen ist es mit den genannten Methoden nur schwer möglich, innerhalb weniger Sekunden eine Durchmischung von Flüssigkeiten in Mikrotiterplatten zu erreichen, die das in Mikrotiterplatten angewandte spezielle lichtoptische Meßverfahren nicht nachteilig beeinflussen.

Übliche Mischungen mit Hilfe eines Magnetrührers können nicht durchgeführt werden, da der Lichtstrahl durch den Rührer gestört werden kann.

Ziel der Erfindung ist die schnelle Durchmischung von Flüssigkeitsmengen in Mikrotiterplatten mit einer berührungsfreien Methode, welche sich insbesondere für die nachfolgende, auch zeitabhängige lichtoptische Konzentrationsbestimmung in den Flüssigkeiten eignet.

Aufgabe der Erfindung ist es, ein neuartiges Verfahren sowie eine Vorrichtung zur schnellen berührungsfreien Durchmischung von Flüssigkeiten in Mikrotiterplatten zu schaffen.

Überraschend wurde gefunden, daß ein periodisch intermittierend auf eine Flüssigkeitsmenge in einer Mikrotiterplattenkavität geblasener Gasstrom bei geeigneter Gasart, Frequenz, Stärke, Richtung und geeignetem Querschnitt ein schnelles Durchmischen der Flüssigkeit in der Mikrotiterplattenkavität verursacht, ohne daß es zur Blasenbildung in der Flüssigkeit kommt, die das nachfolgende lichtoptische Konzentrationsmeßverfahren stören könnte.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird ein Gasstrom so auf die Flüssigkeitsoberfläche gelenkt, daß nur ein Teil der Flüssigkeitsoberfläche von dem Gasstrom getroffen wird. Dadurch wird die Flüssigkeit, die dem Gasstrom ausgesetzt wird verdrängt. Läßt der Gasdruck nach, kann die Flüssigkeit wieder zurückströmen. Durch mehrmaliges Wiederholen dieses Vorganges wird die Flüssigkeit in der Mikrotiterplatte in der gewünschten Art und Weise durchmischt.

Als Gasart sind alle Gase oder Gasgemische geeignet, die keine unerwünschten Wechselwirkungen mit der in der Mikrotiterplatte vorhandenen Flüssigkeit zeigen. Als besonders geeignet für wässrige Lösungen erwies sich Luft, aber auch Stickstoff und Argon.

Die Frequenz des intermittierenden oder pulsierenden Gasstroms muß so klein sein, daß zumindest ein Teil der verdrängten Flüssigkeit zurückfließen kann. Dies ist abhängig von der Viskosität der Flüssigkeit. Die Frequenz muß andererseits so

groß sein, daß das Mischen der Flüssigkeiten in den Mikrotiterplatten in einer für den Anwender ausreichend schnellen Zeit erfolgt und wird vorzugsweise zu etwa 6 Stößen je Sekunde gewählt. Allgemein kann man aber sagen, daß eine  
5 Frequenz von 1 bis 10 geeignet ist.

Die Stärke des pulsierenden Gasstroms muß so gewählt werden, daß er stark genug ist, um einen Teil der Flüssigkeit, die dem Gasstrom ausgesetzt ist, zu verdrängen. Er darf aber nicht so  
10 stark sein, daß Flüssigkeit aus der einzelnen Mikrotiterplattenkavität herausgedrückt wird. Die Stärke muß weiterhin so gewählt werden, daß es auf Grund sich ausbildender Turbulenzen an der dem Gasstrahl ausgesetzten Flüssigkeitsoberfläche nicht zur Bildung von Gasblasen kommt.  
15

Die Richtung des Gasstrahls ist vorzugsweise senkrecht auf die Flüssigkeitsoberfläche gerichtet. Diese Verfahrensweise führt zu einem pulsierenden Mischungsverhalten der Flüssigkeit. Es kann aber auch von Vorteil sein, den Gasstrahl schräg auf die  
20 Flüssigkeitsoberfläche zu richten. Bei geeigneter schräger Anordnung des pulsierenden Gasstrahls auf die Randzone der Flüssigkeitsoberfläche kann es zu kreisenden Bewegungen der Flüssigkeit kommen und eine Durchmischung erreicht werden. Der Winkel mit dem der Gasstrahl bei einer nicht senkrechten  
25 Anordnung auf die Flüssigkeitsoberfläche trifft, muß so gewählt werden, daß keine Flüssigkeit aus der einzelnen Mikrotiterplattenkavität durch den Gasstrom herausgerissen wird.

Der Gasstrom sollte so beschaffen sein, daß etwa 30-60 % der Flüssigkeitsoberfläche dem Gasstrom ausgesetzt werden. Es kann aber auch von Vorteil sein, mehr als 60 % oder aber weniger als  
30 % der Flüssigkeitsoberfläche dem Gasstrom auszusetzen. Wird der Querschnitt zu klein gewählt, kann es neben einer Verminderung der Mischgeschwindigkeit zu unerwünschter  
35 Blasenbildung kommen. Der Querschnitt des Gasstrahls soll vorzugsweise kreisförmig sein. Starke Abweichungen von dieser Kreisförmigkeit können ebenfalls zum Einschluß von Gasblasen in

das Flüssigkeitsmedium führen.

Legenden zu den Figuren:

- 5 Fig. 1: Schema der Mischvorrichtung für Mikrotiterplatten
- Fig. 2: Einfluß des Mischvorgangs auf die Extinktion einer  
Lösung von 10 µl Haemoglobinlösung, die mit 200 µl  
Puffer versetzt wurde, gemäß Beispiel 1.  
10 Ordinate jeder einzelnen Kavität: 1.2-2.2 E bei  
405 nm Abszisse jeder einzelnen Kavität: 10-753  
Sekunden (Zeit, nach Zugabe der Pufferlösung)  
Die Kavitäten von Spalte A1 bis H1 ohne Verwendung  
der Mischeinrichtung.  
15 Die Kavitäten von Spalte A2 bis H2 unter Verwendung  
der Mischeinrichtung.  
Mischzeit: 2 Sekunden nach Zugabe der Pufferlösung.
- Fig. 3: Einfluß des Mischvorgangs auf die Geschwindigkeit der  
20 durch die Peptidyl Prolyl cis/trans Isomerase  
katalysierten Reaktion gemäß Beispiel 2.  
Ordinate jeder einzelnen Kavität: 0.73-0.9 E bei  
390 nm Abszisse jeder einzelnen Kavität: 81 - 637  
Sekunden Die Kavitäten der Zeilen A1 bis A12, B1 bis  
25 B12 und C1 bis C12 unter Verwendung der  
Mischeinrichtung.  
Die Kavitäten der Zeile D1 bis D12 waren leer.  
Die Kavitäten der Zeilen E1 bis E12, F1 bis F12, G1  
bis G12 und H1 bis H12 wurden nicht gemischt.  
30 Gemischt wurde unmittelbar nach Zugabe der letzten  
Lösung durch den eingebauten automatischen Dosierer  
des Dynatechgerätes. Die Mischzeit betrug 7 Sekunden.
- 35 Beispiel 1:

Um das Gas erfindungsgemäß auf die Flüssigkeitsoberfläche  
richten zu können, wurde die in Fig. 1 dargestellte Anordnung

gewählt. Aus einer handelsüblichen Druckflasche mit Stickstoff wurde ein Gasstrom mit einem Druck von 5 bar über eine 1 m lange Schlauchleitung ( $d = 100$  mm) zu einer Wälzschlauchpumpe geleitet. Der Pumpenschlauch 5 besitzt einen Innendurchmesser von 80 mm. Der Pumpenschlauch wurde dann direkt zu dem Gasverteiler 1 der in Fig. 1 dargestellten Mischeinrichtung geführt. Der Preßdruck des Pumpenschlauchs an die Pumpenrollbügel und die Fördergeschwindigkeit wurden so eingestellt, daß der Gasstrom stoßweise mit einer Frequenz von etwa 6 Gasstößen je Sekunde aus den 8 Düsen 2 auf die Flüssigkeitsoberfläche auftreffen konnte.

Mit dieser Anordnung wurden mit den im weiteren beschriebenen Verfahrensweisen und Lösungen die in Fig. 2 dargestellten Ergebnisse erhalten. Folgende Lösungen wurden verwendet:

Pufferlösung: 0,035 m HEPES Puffer Ph 7,6

Stammlösung A: Die Stammlösung A ist eine Lösung von menschlichem Haemoglobin

20

In 8 Kavitäten 4 einer Mikrotiterplatte 3 wurden  $10 \mu\text{l}$  der Stammlösung A pipettiert. Unmittelbar vor dem Mischen wurden mit einer 8 Kanalpipette  $200 \mu\text{l}$  der Pufferlösung in einem Schritt zu den vorgelegten  $10 \mu\text{l}$  pipettiert. Anschließend wurden die Extinktionen dieser 8 Kavitäten über einen Zeitraum von 600 Sekunden in Intervallen von etwa 10 Sekunden bei  $390 \text{ nm}$  mit einem handelsüblichen Mikrotiterplattenreader bei  $6^\circ\text{C}$  gemessen.

30 In einem anderen Meßansatz wurde zu Vergleichszwecken die oben angeführte Prozedur mit Ausnahme des Mischens wiederholt. Die in der Fig. 2 zusammengefaßten Ergebnisse zeigen zwei Spalten einer Mikrotiterplatte mit den Kavitäten A1 bis H1 (Spalte 1) und A2 bis H2 (Spalte 2). Die Extinktions-Zeitverläufe in Spalte 2 wurden unter Einbeziehen eines zwei Sekunden dauernden Mischschrittes erhalten. Die Extinktions-Zeitverläufe in Spalte 1 wurden ohne Mischen erhalten. Als Zeit  $t=0$  wurde der Zeitpunkt der Zugabe der Haemoglobin-Stammlösung benutzt.

Die Endextinktionen der ungemischten Proben erreichen auch nach mehr als 10 Minuten nicht den exakten Endwert. Visuell lassen sich auch nach 20 Minuten noch Inhomogenitäten in den einzelnen Kavitäten beobachten. Alle gemischten Proben weisen nach der  
5 Mischzeit gleiche Endextinktionen auf.

Beispiel 2:

Als Mischgas wurde Druckluft verwendet, die mittels eines  
10 handelsüblichen Laborradiallüfters hergestellt wurde. Die Fördermenge betrug 9 m<sup>3</sup>/h bei einer Druckhöhe von 450 mm Wassersäule. Entsprechend Fig. 1 wird die Druckluft über eine Schlauchzuführung 5 von 100 cm Länge mit einem Innendurchmesser von 90 mm zu einem Gasverteiler 1 geführt.

15

Die Taktfrequenz des im Gasverteiler befindlichen motorgetriebenen 12-Kanalventils ist über die Motorgeschwindigkeit steuerbar. Die vom Ventil ausgehende Druckluft wird über Düsen 2 auf die Flüssigkeitsoberfläche der  
20 einzelnen Kavitäten 4 gelenkt. Die Düsen 2 waren 30 mm lang und wiesen einen kreisförmigen Querschnitt auf. Die Düsen 2 wiesen Durchmesser von 2 mm am verjüngten Ende und 5 mm an der Lufteintrittsöffnung auf.

25 Die Frequenz des Luftstroms je Einzeldüse wurde zu 3 Luftimpulsen je Sekunde eingestellt. Der Abstand der Düsen 2 der in Fig. 1 abgebildeten Kammer zur Mikrotiterplatte 3 betrug 5 mm.

30 Die nachfolgend beschriebene Messung wurde mit folgenden Lösungen vorgenommen:

Reaktionslösung A:

25 mg Chymotrypsin gelöst in 25 ml 0,035 m HEPES Puffer Ph 7,6

35 Probelösung:

gleiche Konzentrationen von biologischen Rohhomogenaten, die Peptidyl Prolyl cis/trans Isomeraseaktivität gegenüber dem Substrat Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-p-Nitroanilid aufwiesen

## Reaktionslösung B:

1 mg/ml Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-p-Nitroanilid gelöst in einer Lösung von 1 ml 0.035 m HEPES Puffer Ph 7,6 plus 10 µl Dimethylsulfoxid

5

## Durchführung der Messung:

Mit Hilfe einer automatischen Pipettierstation der Firma GILSON/USA wurden jeweils 10 µl der einzelnen Probe in jede einzelne Kavität pipettiert. Die Kavitäten D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8, D9, D10, D11 und D12 wurden nicht mit Probenlösung versehen. Alle weiteren Meß- und Pipettiervorgänge wurden mit Hilfe eines programmierbaren kommerziellen Mikrotiterplattenreaders "MR 7000" der Firma Dynatech/USA mit den oben  
15 aufgeführten Lösungen, mit folgenden Einzelschritten vorgenommen:

1. Mit der 8-fach-Pipettierung werden automatisch je 120 µl Reaktionslösung A in jede Kavität pipettiert. In die Kavitäten D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8, D9, D10, D11 und D12 wurde  
20 keine Reaktionslösung pipettiert.

2. Innerhalb von 7 Sekunden werden mit der 8-fach-Pipettierung automatisch je 20 µl Substratlösung je Kavität pipettiert. In die Kavitäten D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8, D9, D10, D11 und D12 wurde keine Substratlösung pipettiert.  
25

3. Für 7 Sekunden wird die Mikrotiterplatte in "Warteposition" gefahren.  
30

4. Während dieser 7 Sekunden wird die Mikrotiterplatte in der oben angegebenen Weise gemischt.

5. Danach wird die Extinktion aller Kavitäten der Mikrotiterplatte im Zeittakt von etwa 9 Sekunden 70 mal gemessen.  
35

Die erhaltenen Extinktionsänderungen, deren Kurve einer Reaktion erster Ordnung entspricht, lassen sich graphisch darstellen. In Fig. 3 ist das Ergebnis einer solchen Messung abgebildet. Um die Wirkung der Mischeinrichtung einschätzen zu können, wurden nur die ersten drei Reihen in der angegebenen Weise gemischt. Das "Nicht mischen" wurde durch die Unterbrechung der entsprechenden Düsen erreicht.

Die Meßkurven lassen sich wie unter EP 0 360 029 A1 beschrieben, auswerten. Die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten, die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Geschwindigkeitskonstanten gleicher Enzymkonzentrationen, mit und ohne Mischung, sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

15

Tab. 1:

Einfluß des Mischvorganges auf die Geschwindigkeitskonstante (k) der Peptidyl Prolyl cis/trans Isomeraseaktivität<sup>a)</sup>.  
 20 Statistische Auswertung der in Fig. 3 abgebildeten Meßkurven

Reihe	k (s <sup>-1</sup> ) [Mittelwert]	Δk(s <sup>-1</sup> ) [Standardabweichung]	Mischart
A1 - A12	0,0162	.0008	patentgemäß
B1 - H12	0,0161	.0010	patentgemäß
C1 - C12	0,0162	.0009	patentgemäß
E1 - E12	0,0137	.0050	Dynatech <sup>b)</sup>
30 F1 - F12	0,0158	.0019	Dynatech <sup>b)</sup>
G1 - G12	0,0214	.0097	Dynatech <sup>b)</sup>
H1 - H12	0,0147	.0064	Dynatech <sup>b)</sup>

35 <sup>a)</sup> Berechnung nach EP 0 360 029 A1

<sup>b)</sup> Mischung mit dem internen Mischer des Mikrotiterplattenreaders

"MR7000" der Firma Dynatech für 7 Sekunden

## Patentansprüche

1. Verfahren zum berührungsfreien Durchmischen von Flüssigkeiten in Kavitäten einer Mikrotiterplatte, bei welchem ein Gasstrom mit einem Querschnitt, der kleiner ist als der lichte Querschnitt der jeweiligen Kavität, mit niedriger Frequenz intermittierend in die Kavität geblasen wird, derart, daß eine Teilflüssigkeit in der Kavität unter dem Druck des auftreffenden Gasstroms blasenfrei verdrängt und durch Absenken des Druckes für das Zurückfließen wieder freigegeben wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, bei welchem eine Frequenz im Bereich von 1 bis 10 Hz, vorzugsweise von 6 Hz angewendet wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, bei welchem der Querschnitt des Gasstroms 30 bis 60 % des lichten Querschnittes der Kavität beträgt.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, bei welchem der Gasstrom senkrecht zu der Flüssigkeitsoberfläche ausgerichtet ist.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, bei welchem der Gasstrom schräg zur Flüssigkeitsoberfläche ausgerichtet und auf eine Stelle im Abstand von der Achse der Kavität gerichtet wird.
6. Vorrichtung zum Durchmischen von Flüssigkeiten in Kavitäten einer Mikrotiterplatte, mit einem Gasverteiler (1), der eine entsprechende Mehrzahl von Gasdüsen (2) aufweist, die jeweils auf eine der Kavitäten (4) ausgerichtet sind und deren Düsenmündung einen kleineren Durchmesser als der Durchmesser der Kavitäten (4) aufweisen, einer an den Gasverteiler (1) angeschlossenen Druckluftquelle und einer den Gasdüsen (2) zugeordneten Steuerung, mit welcher eine mit niedriger Taktfrequenz von 1 bis 10 Hz intermittierende Gaszufuhr zu den Gasdüsen (2) einsteuerbar ist.

1/2

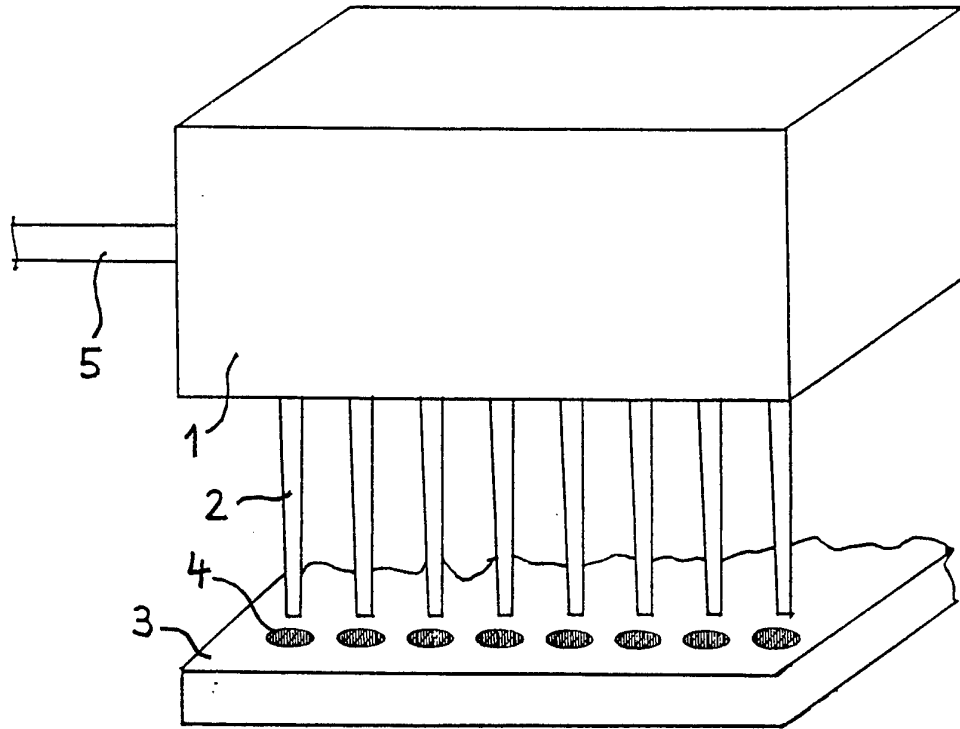


Fig. 1

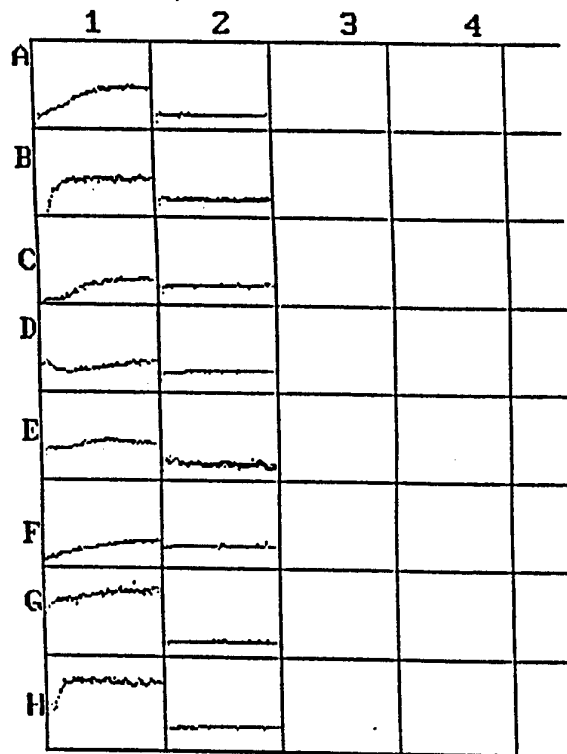


Fig. 2

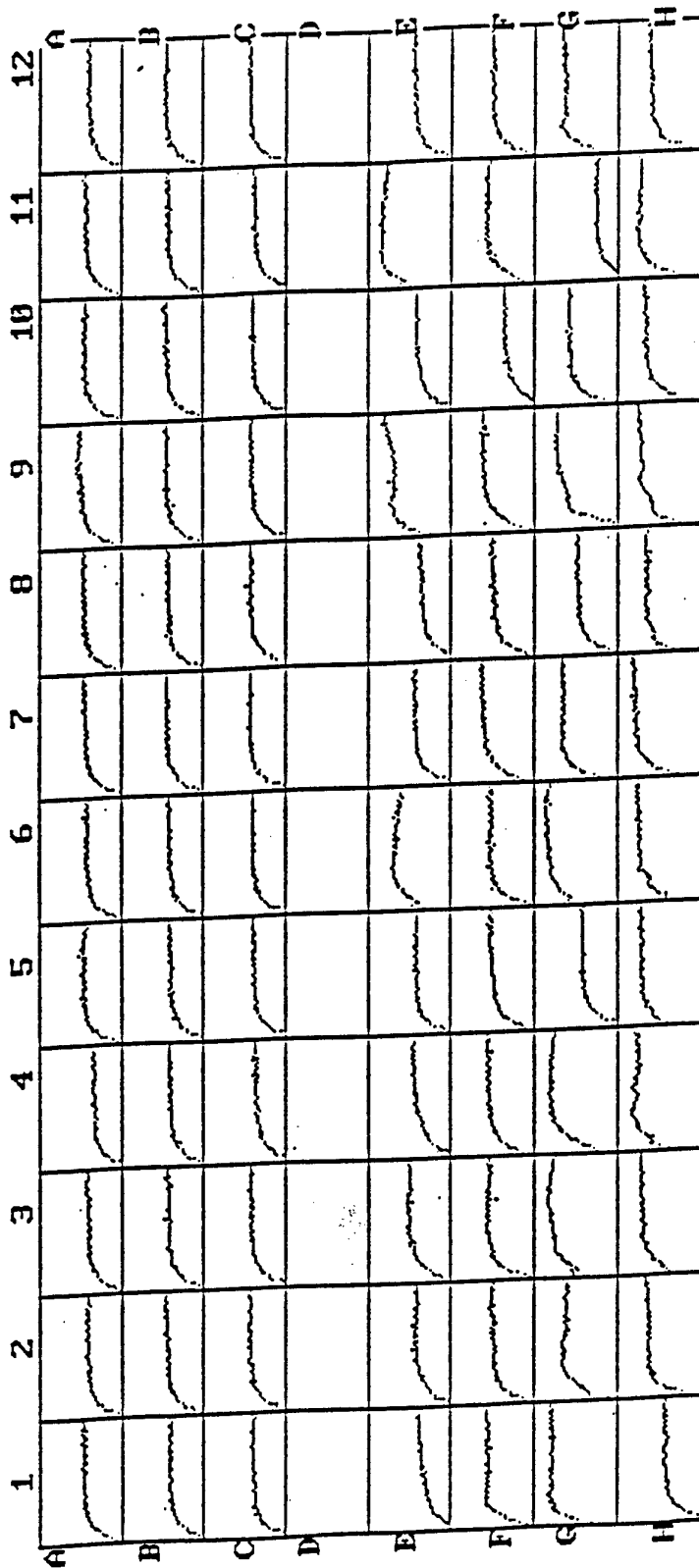


Fig. 3

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int:  National Application No  
PCT/DE 94/00139

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 5 B01F13/02

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

**B. FIELDS SEARCHED**  
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 5 B01F

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

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

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP,A,0 176 014 (EPPENDORF) 2 April 1986 ---	1-6
A	EP,A,0 281 958 (HOECHST) 14 September 1988 ---	6
A	US,A,3 087 840 (SHAW) 30 April 1963 ---	
A	DE,B,12 99 507 (KAWASAKI) 17 July 1969 ---	
A	DE,A,17 82 092 (INSTYTUT CHEMII OGOLNEJ) 8 July 1971 -----	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

**\* Special categories of cited documents :**

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 May 1994

Date of mailing of the international search report

27-06-1994

Name and mailing address of the ISA

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

Authorized officer

Peeters, S

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 94/00139

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0176014	02-04-86	DE-A- 3434931 JP-A- 61080026 US-A- 4664526	27-03-86 23-04-86 12-05-87
-----			
EP-A-0281958	14-09-88	DE-A- 3707368 AU-A- 1264588 JP-A- 63242335	15-09-88 08-09-88 07-10-88
-----			
US-A-3087840		US-A- 3348814	
-----			
DE-B-1299507		NONE	
-----			
DE-A-1782092	08-07-71	NONE	
-----			

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/DE 94/00139

**A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
IPK 5 B01F13/02

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

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikations symbole )  
IPK 5 B01F

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

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

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP,A,0 176 014 (EPPENDORF) 2. April 1986 ----	1-6
A	EP,A,0 281 958 (HOECHST) 14. September 1988 ----	6
A	US,A,3 087 840 (SHAW) 30. April 1963 ----	
A	DE,B,12 99 507 (KAWASAKI) 17. Juli 1969 ----	
A	DE,A,17 82 092 (INSTYTUT CHEMII OGOLNEJ) 8. Juli 1971 -----	

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- \* 'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \* 'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- \* 'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \* 'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \* 'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- \* 'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- \* 'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- \* 'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- \* '&' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

20. Mai 1994

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

27 -06- 1994

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

Bevollmächtigter Bediensteter

Peeters, S

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 94/00139

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A-0176014	02-04-86	DE-A- 3434931 JP-A- 61080026 US-A- 4664526	27-03-86 23-04-86 12-05-87
EP-A-0281958	14-09-88	DE-A- 3707368 AU-A- 1264588 JP-A- 63242335	15-09-88 08-09-88 07-10-88
US-A-3087840		US-A- 3348814	
DE-B-1299507		KEINE	
DE-A-1782092	08-07-71	KEINE	