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

(10) **DE 60 2004 010 578 T2** 2008.05.21

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 502 649 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **60 2004 010 578.3**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **04 254 370.2**
(96) Europäischer Anmeldetag: **22.07.2004**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.02.2005**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **12.12.2007**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **21.05.2008**

(51) Int Cl.[8]: ***B01L 3/00*** (2006.01)
G01N 35/00 (2006.01)
C12M 1/32 (2006.01)
B01L 11/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
631845 **01.08.2003** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
CH, DE, FR, GB, LI

(73) Patentinhaber:
Genetix Ltd., New Milton, Hampshire, GB

(74) Vertreter:
derzeit kein Vertreter bestellt

(72) Erfinder:
Richmond, Stephen, Christchurch Dorset BH23 2TW, GB; Mann, Christopher, Barton-on-Sea Hampshire BH25 7JH, GB; Board, Andrew, Wimborne Dorset BH21 1BW, GB; Jiang, Yonggang, New Milton Hampshire BH25 5GG, GB

(54) Bezeichnung: **Vorrichtung und Verfahren zur Aufnahme von Tierzellenkolonien**

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

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0001] Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Aufnahme von Tierzellkolonien.

[0002] Automatisierte Vorrichtungen für verschiedenartige wiederholte Aufgaben in Bezug auf genetische und proteomische Untersuchungen haben weite Verbreitung gefunden. Beispielsweise sind seit mehreren Jahren automatisierte Vorrichtungen im Handel erhältlich, die zur Mikroanordnung von Proben, zum Aufnehmen von Bakterienkolonien oder zum Gewinnen von Gel-Kernen dienen. Beispielhaft beschreiben WO-A-92/1233A [7] und Johns et al [9] einen frühen Bakterienkolonie-Aufnahmeroboter unter Verwendung von festen Nadeln. Uber et al [8] beschreibt eine Bilddarstellung zum Identifizieren der Koordinaten von Bakterien- oder Hefe-Kolonien, sowie einen separaten Aufnahmeroboter zum Aufnehmen der Kolonien auf der Basis von mit der Bildeinrichtung erzeugten Koordinaten, wobei das Aufnehmen durch Eintauchen einer entsorgbaren Pipettenspitze in die Probenflüssigkeit ausgeführt wird. Eine Vorrichtung zum automatischen Aufnehmen von Säugetier-Zellkolonien stand jedoch bisher nicht zur Verfügung.

[0003] Proben von Säugetier-Zellkolonien liegen üblicherweise in einer von zwei Typen vor. Beim ersten Typ ist die Säugetier-Zellkolonie in einem halb-festen Medium in Suspension gehalten. Beim zweiten Typ haftet die Säugetier-Zellkolonie auf einem Substrat und ist in einem flüssigen Medium eingetaucht.

[0004] Ein Problem beim automatischen Aufnehmen von Säugetier-Zellkolonien des ersten Typs liegt im Lokalisieren, Entnehmen und Abgeben von individuellen Zell-zielkolonien aus dem halb-festen Medium. Bei anhaftenden Kolonien besteht das zusätzliche Problem, dass die Kolonie vom Substrat abgelöst werden muss, bevor sie entnommen werden kann. Die Standard Praktiken (nicht automatisiert) zum Ablösen von anhaftenden Kolonien sind ein Abkratzen mit einem Skalpell oder einer andersartigen mechanischen Klinge, und Aufschluss mit Trypsin. Keine dieser Praktiken ist für eine Automatisierung gut geeignet.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0005] Nach einem ersten Aspekt der Erfindung wird eine Vorrichtung zur Aufnahme von Tierzellkolonien zur Verfügung gestellt, die Folgendes aufweist: ein Vorrichtungsbett zum Anordnen eines Probenbehälters, welcher eine Mehrzahl von in einem Medium gehaltenen Tierzellkolonien umfasst, eine Kamera zum Aufnehmen von Bildern der Tierzellkolonien, einen Bildprozessor zum Identifizieren von Stellen von Tierzellkolonien anhand von aufgenommenen Bildern und einen Aufnahmekopf, der unter Verwendung von Positionierungsmotoren relativ zu dem Vorrichtungsbett zu Stellen von Tierzellkolonien, die durch den Bildprozessor identifiziert wurden, bewegt werden kann, wobei der Aufnahmekopf zumindest eine hohle Nadel aufweist, die durch jeweilige Fluidleitungen mit einer Drucksteuerung verbunden sind, die so betreibbar ist, dass sie Mengen des Mediums aus dem Probenbehälter in die zumindest eine hohle Nadeln einsaugt, das Medium hält und es ausstößt, wenn dies erforderlich ist, wodurch eine Aufnahme von Tierzellkolonien aus dem Medium ermöglicht wird.

[0006] Diese Vorrichtung ist vorzugsweise zum automatisierten Aufnehmen von Tierzellenkolonien so ausgebildet, dass der Aufnahmekopf zumindest eine hohle Nadel aufweist und über die Vorrichtung unter Verwendung von Positionier-Motoren bewegbar ist, wobei ein Probenbehälter einschließlich einer Vielzahl von in einem Medium gehaltener Tierzellenkolonien auf der Vorrichtung vorhanden ist, sowie auch ein Ausgabebehälter. Des Weiteren ist eine Maschinenbildaufnahmeeinrichtung zur Bildverarbeitung vorgesehen, um Tierzellenkolonieanordnungen in der Probe zu identifizieren. Mittels der Vorrichtung ist der Aufnahmekopf bzgl. des Probenbehälters ausrichtbar, wobei eine Tierzellenkolonie aufnehmbar ist, indem eine der zumindest einen hohlen Nadel bzgl. einer der Tierzellenkolonieorte ausgerichtet wird, wobei ein distales Ende dieser hohlen Nadel in das Medium einführbar ist und die Tierzellenkolonie an dem Ort in die hohle Nadel einsaugbar ist. Mittels der Vorrichtung ist die aufgenommene Tierzellenkolonie ausgebbar, indem der Aufnahmekopf über den Ausgabebehälter bewegbar ist und dort die aufgenommene Tierzellenkolonie in den Ausgabebehälter ausstoßbar ist.

[0007] Der automatisierte Prozess kann zum Sortieren oder Aufnehmen von Tierzellkolonien verwendet werden, die biologische Moleküle enthalten, ausdrücken oder absondern, wie etwa ein Protein (Eiweiß) oder einen Kohlenwasserstoff von Interesse, und die über eine Zellenabbildung erfasst werden können. Die Tierzellkolonien können optisch auf verschiedene Arten erfasst werden, z.B. mit Hilfe von fluoreszierender Färbung, nicht-fluoreszierender Färbung oder ohne jegliche Färbung; über Raman-Streuung, durch Phasenkontrast oder Verwendung von Nomarski-Interferenzabbildung.

[0008] Die Kolonien werden hauptsächlich aus Säugetier-Zellkolonien bestehen, aber auch andere Tierzellkolonien, wie Insekten-Zellkolonien können aufgenommen werden. Die Ziel-Tierzellkolonien können anhand einer Vielzahl von Eigenschaften unterschieden werden, wie etwa Form, Größe, Farbe oder mo-

lekularer Inhalt der Zelle, der Membran oder deren Ausscheidungen oder durch eine beliebige Kombination mehrerer Eigenschaften.

[0009] Der Aufnahmeschritt kann ein Wiederholen der Ausrichtungs- und Ansaugschritte für mehrere der hohlen Nadeln umfassen um mehrere der Tierzellkolonien aufzunehmen.

[0010] Der Abgabebehälter kann eine Anordnung von Titern (Mulden) umfassen, die in einem charakteristischen Abstand zueinander angeordnet sind. In diesem Fall wird es bevorzugt, dass auch die hohlen Nadeln in diesem charakteristischen Abstand zueinander angeordnet sind, damit der Abgabeschritt parallel für alle hohlen Nadeln ausgeführt werden kann. Es ist günstig, wenn die hohlen Nadeln in einem charakteristischen Abstand angeordnet sind, der mit einem Standartabstand für Titerplatten übereinstimmt. Dies vermindert die Bewegung des Aufnahmekopfes und erlaubt es den Prozess zu Parallelisieren.

[0011] Die Tierzellkolonien können mit einem fluoreszierenden Eiweiß/Protein (FP) kontaktiert sein oder dieses ausdrücken, z.B. ein grün fluoreszierendes Protein (GFP), um die Bildverarbeitung zu unterstützen. Das FP kann in den Zellen vorliegen, auf der Oberfläche der Zellen oder in das die Zellen umgebende Medium abgesondert sein. Der Prozess kann auf jedem Molekül beruhen, das mit einem Antikörper, einem Liganden oder einem Rezeptor detektierbar ist.

[0012] Der Aufnahmekopf kann in vorteilhafter Weise einen Antriebsmechanismus zur Erzeugung von seitlichen Oszillationen der distalen Enden der hohlen Nadeln umfassen, um das Ablösen von anhaftenden Tierzellkolonien zu erleichtern.

[0013] Zum Beispiel kann der Antriebsmechanismus so ausgelegt werden, dass er eine Drehbewegung der distalen Enden der hohlen Nadeln bewirkt. Andere Arten der Bewegung, etwa linear, sind auch möglich.

KURZE BESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0014] Zum besseren Verständnis der Erfindung und um zu zeigen, wie sie ausgeführt werden kann, wird beispielhaft auf die Zeichnungen verwiesen, die zeigen:

[0015] Fig. 1 ist eine perspektivische Ansicht einer Vorrichtung nach der Erfindung

[0016] Fig. 2 ist eine perspektivische Ansicht der Vorrichtung

[0017] Fig. 3 zeigt Einzelheiten eines Lichttisch-Beleuchtungssystems der Vorrichtung

[0018] Fig. 4 ist eine schematisierte Seitenansicht der optischen Anordnung der Vorrichtung

[0019] Fig. 5 ist eine perspektivische Ansicht des Aufnahmekopfes der Vorrichtung

[0020] Fig. 6 ist perspektivische Ansicht einer hohlen Nadel des Aufnahmekopfes mit dem zugehörigen Antriebsmechanismus

[0021] Fig. 7 ist ein schematisierter Schnitt durch die hohle Nadel und den Antriebsmechanismus von Fig. 6 im Betrieb

[0022] Fig. 8 stellt eine Folge von schematischen Darstellungen der Schritte bei der Aufnahme von anhaftenden Tierzellkolonien

[0023] Fig. 9 ist eine schematisierte Zeichnung der Fluid-Bauteile (fluidics) der Vorrichtung

[0024] Fig. 10 ist ein schematisches Blockdiagramm der Steuerung der Vorrichtung

[0025] Fig. 11 ist ein Flussdiagramm eines mittels der Vorrichtung durchgeführten beispielhaften Prozesses

[0026] Fig. 12 ist ein Flussdiagramm des Zellkolonieaufnahmeteils des Prozesses von Fig. 11.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG

[0027] Fig. 1 zeigt eine perspektivische Ansicht des unteren Teils einer Vorrichtung nach der Erfindung. Der obere Teil ist nicht dargestellt, um das Vorrichtungsbett **10** sichtbar zu machen. Eine Lichttischplatte **12** aus einem durchscheinenden Material, bekannt als Opalacryl, ist bündig mit dem Vorrichtungsbett **10** montiert. Die Lichttischplatte **12** könnte auch aus einem anderen durchscheinenden Akryl- oder Glasmaterial bestehen, z.B. gesandstrahltem Glas oder Perspex (Plexiglas).

[0028] Ein Satz von Stiften oder Klammern **14** (vier in dieser Figur) ist um den Umfang der Lichttischplatte **12** vorgesehen. um Behälter für biologische Proben, wie Petrischalen, die Zellkolonien enthalten, auf dem Lichttisch anzuordnen und zu fixieren. Die Kolonien könnten auch in Q-trays, omni-trays oder beliebigen anderen geeigneten Behältern bereitgestellt werden. Die Lichttischplatte **14** wird von unten her von optischen Einrichtungen beleuchtet, die unter dem Vorrichtungsbett in dem von dem Hauptbett **16** zur Verfügung gestellten Raum angeordnet sind.

[0029] Die Tierzellkolonien können menschliche Zellkolonien oder andere Säugetier-Zellkolonien oder Insektenzellkolonien sein. Die Zellen können z.B. unsterblich, embryonisch oder Stammzellen sein. Typi-

scherweise würden die Zellkolonien in Gewebekultur gezogen.

[0030] Die Vorrichtung hat einen Aufnahmekopf **18** zum Aufnehmen von Säugetier-Zellkolonien, der über das Hauptbett der Vorrichtung durch x-y- und z-Positionierungsmotoren **20**, **22** und **24** bewegbar ist. Der gezeigte Aufnahmekopf **18** umfasst eine Anordnung von hohlen Nadeln **26**, von denen jede mit einer Fluidleitung verbunden ist. In einem Beispiel hat der Aufnahmekopf **18** eine 1 × 8 Anordnung von Nadeln, wobei jede hohle Nadel **26** ihre eigene Fluidleitung **28** besitzt, zum Ansaugen und Abgeben einer Zellkolonie um die Zellkolonie aus einem Behälter zu entnehmen gefolgt von Ablegen der Zellkolonieprobe in einer Titer **29** oder einen anderen Zielort. Es dürfte klar sein, dass normalerweise mehrere Titerplatten verwendet werden, obwohl nur eine aus Gründen der Einfachheit dargestellt ist. Ein Raster von Titer-Aufnahmemulden kann auf dem Hauptbett der Vorrichtung zur Verfügung gestellt werden. Es kann auch eine Automatisierung der Handhabung der Titerplatten vorgesehen sein, z.B. als „Hotel"-System, oder einen voll-automatischen Titerplatten Stapler und Zuführer, wie aus dem Stand der Technik bekannt ist. Der Aufnahmekopf **18** wird von dem z-Positionierer getragen, der seinerseits vom y-Positionierer getragen wird und dieser wiederum vom x-Positionierer. Der Aufnahmekopf **18** ist auf einer Seite mit einer Kamera **19** für eine maschinelle Bildaufnahme versehen. Die Kamera **19** kann mit einem Zoom-Objektiv oder mit Wechselobjektiven ausgestattet sein, um verschiedene Vergrößerungen und damit Auflösungen zu erzielen. Alternativ kann eine weitere (nicht gezeigte) Kamera auf dem Aufnahmekopf **18** montiert sein, so dass zwei Kameras mit verschiedener Objektiv-Vergrößerung vorhanden sind. Eine für niedrige Auflösung und großes Gesichtfeld und die andere für ein kleines Gesichtsfeld mit hoher Auflösung. im Gebrauch wird die Kamera mit niedriger Auflösung benutzt, um die gesamte Petrischale oder anderen Behälter zu erfassen (kartieren) um die Orte von Zellkolonien zu identifizieren/ermitteln. Dann wird die Kamera mit der hohen Auflösung eingesetzt, um jede Kolonie abzubilden. Selbstverständlich kann ein ähnliches Vorgehen auch mit einer einzigen am Aufnahmekopf **18** montierten Kamera mit veränderlicher Vergrößerung durchgeführt werden.

[0031] Benachbart zum Aufnahmekopf **18** kann am z-Positionierer auch ein (nicht gezeigter) Greifer für Titerplatten befestigt sein, der es erlaubt Titerplatten auf dem Hauptbett der Vorrichtung herum zu bewegen.

[0032] Eine einzelne Titerplatte **29** ist beispielhaft auf dem Hauptbett der Vorrichtung dargestellt. Das Hauptbett kann mit Stationen für Titerplatten und Schalen für Kolonien von verschiedenen Standart Typen versehen sein.

[0033] Nachdem aufgenommene Zellkolonien in ihre Titer abgegeben wurden, müssen die hohlen Nadel gereinigt werden, bevor sie benutzt werden können, um weitere Zellkolonien aufzunehmen, um eine Kreuz-Kontamination zu vermeiden. Zum Reinigen der Nadeln wird eine Wasch- und Trockenstation **2** verwendet. Der Waschteil umfasst ein erste und ein zweites Bad **4** und **6**. Der Trockenteil besteht aus einer Kammer zum Geblasen der Nadeln mit Luft und bevorzugt auch aus Halogen- oder anderen Lampen. Die Lampen dienen zum Sterilisieren und Trocknen der Nadeln durch Erhitzung. Das Gebläse kann das Trocknen unterstützen, aber wenn Lampen vorhanden sind, dient er hauptsächlich zum Kühlen der Nadeln nach der Erhitzung.

[0034] Nach Beendigung eines Durchgangs bewegen die x-, y- und z-Positionierer **20**, **22** und **24** den Aufnahmekopf **18** zur Wasch- und Trockenstation **2**. Die Nadeln werden in das erste Waschbad **4** abgesenkt und eingetaucht, das Wasser oder eine Wasser/Bleichemischung enthält. Das erste Waschbad **4** kann mit aufrecht stehenden Bürsten, die in der Reinigungsflüssigkeit eingetaucht sind, versehen sein. In diesem Fall werden die x- und y-Positionierer verwendet um die Nadeln in einer drehenden Bewegung in der xy-Ebene über die Bürsten zu bewegen. Bevorzugt werden die Nadeln auch mit einer sterilisierenden Lösung, wie etwa Bleiche, durchspült. Der Aufnahmekopf **18** wird dann zu dem zweiten Bad **6** bewegt, das beispielsweise Ethanol zur weiteren Reinigung enthält. Ethanol wird im letzten Bad im Hinblick auf seine Flüchtigkeit verwendet, da dies das nachfolgende Trocknen der Nadeln unterstützt. Die bestimmten Reinigungsmittel sind lediglich erwähnt, um konkrete Beispiele zu geben. Andere Reinigungsmittel werden manchmal verwendet.

[0035] Der Aufnahmekopf wird dann über die Trocknungsstation **8** bewegt. Wenn vorhanden werden die Halogenlampen zu diesem Zeitpunkt eingeschaltet, um die nadeln zu Erwärmen/Erhitzen. Ein Luftgebläse wird dann eingeschaltet, um die Nadeln zu trocknen und/oder um sie auf Umgebungstemperatur zu Kühlen, wenn sie durch die Halogenlampe erwärmt wurden.

[0036] Das Hauptbett kann auch andere Standartausrüstungen umfassen, wie einen Abfallschacht, eine Vorrichtung zum Entfernen der Deckel von Titerplatten, einen Titerplatten-Schüttler oder ein Titerplatten-Hotel. Keine von diesen ist gezeigt. Die Vorrichtung kann auch mit einem automatischen Titerplatten-Zufuhr- und Stapelmechanismus versehen sein, desgleichen mit einem automatischen Zufuhr- und Stapelmechanismus für Schalen, die Zellkolonien enthalten. Keine von diesen ist gezeigt.

[0037] Fig. 2 ist eine perspektivische Ansicht einer Vorrichtung nach der Erfindung. Im Vergleich zu

Fig. 1 zeigt die Vorrichtung auch den oberen Teil der Maschine. Der obere Teil ist hauptsächlich aus einem licht- und gasdichten Gehäuse/Deckel **30** mit zwei Seiten **32**, einer Rückwand **34** und einem Abdeckung **36**. Eine sogenannte hochleistungs Luftpartikel (HEPA)-Filtereinheit **35** ist auch auf der Abdeckung **36** montiert. Das Arbeitsvolumen der Vorrichtung, das vom Hauptbett **10** und dem Gehäuse **30** umschlossen ist, kann in einer kontrollierten Umgebung im Wesentlichen frei von kontaminierenden Partikeln gehalten werden. Dies geschieht durch die Zufuhr von gefilterter Luft durch die HEPA-Filtereinheit **35** in das Arbeitsvolumen und durch Halten des Arbeitsvolumens unter einem geringen Überdruck, so dass ungefilterte Luft aus der Umgebung daran gehindert ist, in das Arbeitsvolumen einzudringen.

[0038] Auf der Vorderseite der Maschine befindet sich eine mit Scharnieren versehene Tür **38**, um den Zugang zu erlauben. Auf der Abdeckung **36** ist eine Detektoreinheit **40** angeordnet, die einen Matrix-Detektor, in Form eines CCD-Chips, und zugehörige Abbildungsoptik in Form eines Objektivs und geeigneter Filter enthält. Die Abbildungsoptik ist so konstruiert, dass sie die obere Fläche der Lichttischplatte als Abbildungsebene besitzt, oder eine geringfügig höhere Ebene, um die übliche Dicke der Basis einer Schale für Zellkolonien zu berücksichtigen. Der CCD-Chip kann mit einem Peltier-Kühler (nicht gezeigt) gekühlt werden um Rauschen zu reduzieren. Falls eine niedrigere Arbeittemperatur erwünscht ist, um das Rauschen noch weiter zu vermindern, könnte ein kryogenes Kühlmittel, wie flüssiger Stickstoff, verwendet werden, beispielsweise mit einem Kryostaten mit geschlossenem Kreislauf. Der Matrix-Detektor muss kein CCD sein und könnte ein beliebiger, geeigneter zweidimensionaler Matrix-Detektor sein, wie eine Vielkanalplatte (multi channel plate MCP). Der Matrix-Detektor kann gekühlt sein, z.B. mit einem Peltier-Modul oder mit einem kryogenen Kühlmittel, wie flüssigem Stickstoff.

[0039] Die Detektoreinheit **40** ist in einem zylindrischen Gehäuse enthalten, das aufrecht auf der Abdeckung der Maschine verschraubt ist, so dass die optische Hauptachse „O" der Detektoreinheit senkrecht zu der Ebene des Hauptbetts der Vorrichtung steht. Optischer Zugang zu dem darunter liegenden Lichttisch wird durch eine Öffnung im Dach ermöglicht.

[0040] Fig. 3 zeigt Einzelheiten eines Lichttisch-Beleuchtungssystems der Vorrichtung nach der Erfindung. Die Zeichnung ist eine perspektivische Ansicht von einer Seite der Maschine von einer Position, die nach unten und durch die Ebene des Hauptbetts der Maschine blickt, jedoch ohne das Hauptbett zu zeigen. Die Ebene des Hauptbetts (und die Lichttischplatte) ist mit dem Bezugszeichen **10** markiert. Der Hauptteil des Beleuchtungssystems ist eine (Licht)Quelleneinheit **50**, mit rechteckigem Grundriss und mit Abmessungen, die in etwa denjenigen der Lichttisch Beleuchtungsplatte (z.B. 300 × 200 mm) entsprechen und die eine Dicke von ungefähr 20 mm hat. In der Basis der Lichtquelleneinheit ist eine Mehrzahl von blauen Licht emittierenden Dioden (LEDs) angeordnet, die Licht mit einer nominalen mittleren Wellenlänge von 473 nm abstrahlen. (In anderen Ausführungsformen könnten LEDs mit hiervon verschiedener Farbe verwendet werden). Die LEDs sind in vier Gruppen **52** (gestrichelte Linien) angeordnet, wobei jede Gruppe eine verpackte Einheit von 100 oberflächenmontierten LEDs mit integrierter Fresnellinse umfasst. Alternativ könnten einzelne LEDs verwendet werden, die über die Fläche der Lichtquelleneinheit verteilt sind. Über den LEDs und die gesamte Fläche der Lichtquelleneinheit überdeckend befindet sich eine Filterplatte (nicht gezeigt) gefolgt von einem schichtförmigen, holographischen Diffusor **54**. Der holographische Diffusor ist eine Platte aus Kunststoffmaterial mit einer mikrostrukturierten Oberflächenreliefstruktur, die durch einen Prägeprozess unter Verwendung eines holographisch erzeugten Prägewerkzeugs hergestellt wird (vgl. hierzu US 5,534,386: Physical Optics Corporation (**6**)). Der Diffusor homogenisiert das Licht der LEDs, so dass die Intensitätsverteilung des LED-Lichts auf der Lichttischplatte ausgeglichen ist. Auf beiden Seiten der der Lichtquelleneinheit sind Lichtstreifeneinheiten **56** angeordnet, um eine Weißlichtbeleuchtung der Lichttischplatte für Kontrastabbildung bereitzustellen.

[0041] Fig. 4 stellt eine schematische Seitenansicht dar, welche die optische Auslegung zeigt. Im oberen Teil der Figur kann man die Detektoreinheit **40** sehen, welche auf der Abdeckung **36** befestigt ist. Die Detektoreinheit **40** enthält einen CCD-Chip **42** mit zugeordneter Sammeloptik **44** welche schematisch als eine einzige Objektivlinse dargestellt ist. Es versteht sich, dass jegliche geeignete Linsen(oder Spiegel)-Kombination verwendet werden kann, um die Lichttischplatte auf der aktiven Oberfläche des CCD-Chip darstellen zu können. Die optische Achse „U" der Detektoreinheit **40** ist ebenfalls gezeigt. Die Detektoreinheit **40** weist auch ein Filter **46** auf. Dies ist ein Bandpassfilter zum Filtern der LED-Emission. Eine mittlere Wellenlänge von 620 nm mit 35 nm Bandpass ist für die zuvor erwähnten blauen LED's ausgewählt. Es versteht sich, dass im Allgemeinen eine geeignete Auswahl eines Bandpasses oder eines Abtrennfilters bzgl. der Emission der LED's getroffen werden kann und die Erregungs- und Emissionsbänder der fluoreszenten Farbe zu nutzen. Darüber hinaus kann bei gewissen Anwendungen z.B. mit Kontrastdarstellung ein Filter entbehrlich sein. In der Mitte der Figur sind die Lichttischplatte **12** und Tischklammern **14** dargestellt, wobei die Lichttischplatte **12** im Allgemeinen in der Ebene des Hauptbettes der Vorrichtung liegt. Im untern Teil der Figur ist die Lichtquelleneinheit **50** mit

ihren LED's **52**, dem Filter **53** und dem Diffuser **54** gezeigt. Das Filter **53** ist ein gefärbtes Bandpasshauptfilter einer solchen Art, welche für elektrisches Leuchten verwendet wird, welches beim vorliegenden Beispiel blau ist, in welchem blaue LED's verwendet werden. Das Filter **53** ist wirksam zum Entfernen unerwünschter Bestandteile der LED-Emission. Insbesondere hat sich (im Fall von) bei blauen LED's herausgestellt, dass ein kleiner Anteil der LED's durch das Emittieren von Wellenlängenbestandteilen außerhalb des blauen in den grünen und den roten eine Fehlfunktion besitzt. Ein unterschiedliches Farbfilter kann in Abhängigkeit von den Ausgangswellenlängen der verwendeten LED's gewählt werden. Die winklig angeordneten Streifenlichteinheiten **56** sind ebenfalls klar ersichtlich.

[0042] Eine CCD-Belichtungszeit von etwa 10 Sekunden bis 3 Minuten ist normalerweise ausreichend, um Zellkolonien darzustellen. Die Belichtungszeit wird von einer Anzahl von Faktoren abhängig sein, z.B. vom verwendeten Farbtyp. Eine brauchbare Farbe ist trypan-blau. Die Belichtungszeit ist proportional der Bestrahlungsintensität, so dass die Belichtungszeit reduziert werden kann, indem eine intensivere Bestrahlung von weißen Lichtquellen, Lasern oder in LED's verwendet wird.

[0043] Fig. 5 ist eine perspektivische Ansicht, welche einen Teil des Aufnahmekopfes **18** mit größerem Detail zeigt. Die Endabschnitte der hohlen Nadeln **26** sind sichtbar, indem sie durch den Boden ihrer Gehäuseteile hindurch dringen. Das hohle Innere der Nadeln erstreckt sich nach oben und dann durch eine rechtwinklige Biegung, um an Zapfen **27** zum Anschluss flexibler Fluidleitungen (in Fig. 5 nicht gezeigt, jedoch angedeutet in Fig. 1). Es soll ebenfalls festgestellt werden, dass der Aufnahmekopf **18** mit den Nadeln als ein einziges Stück entfernt und in einem Autoklav zur Sterilisation behandelt werden. Ein automatisierter Kopfaustausch kann ebenfalls vorgesehen sein, wie z.B. in US 10/144,763 von Ruddock beschrieben, dessen Inhalt hier durch Bezugnahme eingeschlossen ist. Zahlreiche Mehrfachkopfanordnungen werden in Betracht gezogen. Um z.B. die Geschwindigkeit zu erhöhen, können zwei Köpfe ähnlich dem in Fig. 5 gezeigten, vorgesehen sein. Während einer dieser Köpfe angewendet wird, kann der andere in einer automatisierten Wasch-/Trocknungsstation gereinigt werden, wodurch Totzeit eliminiert wird, welche ansonsten während der Kopfsterilisation auftreten würde, wie es in US 10/298, 948 von Elverd, Haslam und Ruddock beschrieben ist, dessen Inhalt hier durch Bezugnahme eingefügt wird. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, ein Speziallistenbildkopf zum Tragen der Kamera (oder Kameras) vorzusehen. Indem ein separater Bildkopf vorgesehen wird, wird das Gewicht der Köpfe reduziert, wodurch die Geschwindigkeit erhöht wird, mit welcher sie gescannt werden können und wodurch Überlastprobleme verhindert werden. Dies kann besonders nützlich sein, wenn der Bildkopf weitere Teile enthält wie z.B. sein eigenes Spektrometer oder mehrere Kameras.

[0044] Fig. 6 stellt eine perspektivische Ansicht von einer der Nadeln **26** in größerem Detail dar. Sowie die Nadel ist auch ein Elektromotor **60** gezeigt, welcher längs der Nadel **26** angebracht ist. Die hohle Nadel **26** weist sowohl äußere als auch innere Nadeln **62** und **64** auf, wobei die innere Nadel **64** koaxial im Innern der äußeren Nadel **62** angeordnet ist. Beide Nadeln sind aus nicht rostendem Stahl hergestellt. Die innere Nadel **62** bildet das Ende des Fluidweges, welcher die flexible Leitung enthält. Der Elektromotor **60** ist mit der inneren Nadel **64** über einen Verbindungsstab **66** verbunden, welches mittels einer an dem Motor **60** montierten Kurbel angetrieben wird. Der Motor treibt somit die innere Nadel **62** an, sodass sie eine Drehbewegung ausführt, wobei die Bewegung durch Biegen der inneren Nadel **64** aufgenommen wird.

[0045] Bei dem vorliegenden Ausführungsbeispiel weist die innere Nadel **64** einen Innendurchmesser von 0,7 mm und einen Außendurchmesser von 1,07 mm auf. Die äußere Nadel **62** ist 35 mm lang und hat einen 5 mm Außendurchmesser, wobei sie sich auf 4,2 mm an ihrem Ende verjüngt, sowie einen Innendurchmesser von 3,2 mm. Diese Abmessungen sind geeignet zum Aufnehmen von Zellkolonien einer mittleren Größe von etwa 0,5 mm.

[0046] Fig. 7 ist ein schematischer Schnitt der Nadel **26** und des Motors **60**, wobei die Nadel im Gebrauch zum Aufnehmen benachbarter Zellkolonien gezeigt ist. Die innere und die äußere Nadel **64** und **62** sind zu sehen, sowie der Motor **60** und der Verbindungsstab **66**. Wie ersichtlich ist das Ende der inneren Nadel **64** axial im Inneren des Endes der äußeren Nadel **62** um einen Abstand d1 zurückgesetzt. Bei dem vorliegenden Ausführungsbeispiel sind Werte von d1 = 0,25 – 0,5 mm verwendet worden. Weitere Werte im Bereich von 0, 1 bis 2 mm sind anwendbar, und zwar in Abhängigkeit von den relevanten Parametern wie z.B. mittlerer Koloniegröße und Flüssigkeitsviskosität. Die Figur zeigt die Nadel **26** abgesenkt in Position zur Aufnahme einer benachbarten Zellkolonie **74**. Die Nadel **26** ist derart abgesenkt, dass das distale Ende der äußeren Nadel **62** in die Flüssigkeit **72** eingetaucht und um einen kleinen Betrag d2 von der oberen Oberfläche der Probenbehälterbasis (Substrat) **76** versetzt, auf welchen die Zellkolonien wachsen. Bei vorliegenden Ausführungsbeispiel ist d2 zwischen etwa 0 (d.h. Antreffen gegen die Platte **76**) und 0,5 mm variiert, obwohl größere Versetze in Betracht gezogen werden können, z.B. bis zu 2 mm. Dabei sind Werte von 0 (d.h. Antreffen), 0,1 mm und 0,2 mm üblich. Die Nadel **26** ist auch mit der Zellkolonie **74** ausgerichtet, wie es durch die xy-Ko-

ordinaten der Kolonie bestimmt ist, welche durch das Bild der mit der Kamera **40** aufgenommenen und der nachfolgenden Bildverarbeitung bestimmt wurde.

[0047] In der dargestellten Position ist der Motor **60** so betätigt, dass das Ende der inneren Nadel **64** oszilliert, wodurch eine Turbolenz in der Flüssigkeit **72** erzeugt wird. Eine Oszillationsfrequenz von etwa 100 Hz ist erfolgreich verwendet worden. Andere Frequenzen dürften wahrscheinlich auch funktionieren. Die durch diese Bewegung erzeugten Kräfte haben sich als ausreichend herausgestellt, um die Zellkolonie zu entnehmen und ein Einsaugen der entnommenen Zellkolonie in die hohle Nadel zu ermöglichen, welche, wie zuvor erwähnt, das Ende der Kapillare **70** bildet. Die innere Nadel **64** ist durch einen Flansch **68** gehalten, welcher in die Oberseite der äußeren Nadel **62** passt und eine mittige Durchgangsbohrung aufweist, durch welche die innere Nadel **64** in in einem Schiebegleitsitz hindurchläuft.

[0048] Im Fall von nicht benachbarten Kolonien, welche in einem halbfesten Wachstumsmedium sind, versteht es sich, dass die Kolonien nicht an der Platte haften, sodass keine Notwendigkeit zum Vibrieren der Nadel gegeben ist.

[0049] Fig. 8 stellt eine Reihe von schematischen Darstellungen A-E dar, welche die verschiedenen Schritte beim Aufnehmen einer ausgewählten Säugetierzellkolonie veranschaulicht. In der Darstellung A ist die Nadel **70** über einer benachbarten Zielkolonie **74** abgesenkt, welche in einer Flüssigkeit **72** eingetaucht ist, und zwar nach Ausrichtung der xy-Koordinaten. In der Darstellung B ist die Nadelspitze direkt über der Kolonie bereit zum Ausführen des Aufnahmevorganges eingetaucht. Die Darstellung C zeigt die Situation nach der vibrationsinduzierten Aufnahme, bei welcher das Einsaugen stattfindet. Eine Flüssigkeitssäule, in welcher die Kolonie in Suspension ist, wird nach oben in die Nadel gezogen, indem der Druck in der Nadel abgesenkt wird. Die Darstellung D zeigt die Situation, nachdem die Nadel aus dem Probenbehälter angehoben worden ist. Die Kolonie wird unter einem Druck, welcher geringer als der Atmosphärendruck ist, welcher in der Nadel aufrecht erhalten wird, gehalten. Der Aufnahmekopf kann dann über eine Titerplatte zum Ausgegeben werden. Die Darstellung E zeigt die Situation, in welcher das Ende der Nadel in einen Titer einer Titerplatte abgesenkt worden ist und die Kolonie aus der Nadel durch Anheben des Druckes in der Nadel ausgestoßen worden ist, wodurch der Zellaufnahmevorgang beendet wird.

[0050] Die obige Beschreibung bezieht sich auf ein Beispiel einer benachbarten Kolonie. Es versteht sich, dass, wenn eine Kolonie in Suspension, eine vereinfachte Form desselben Prozesses ausgeführt werden kann, bei welchem die mit der Entnahme einer benachbarten Kolonie verbundenen Schritte ausgelassen sind. Es versteht sich auch, dass einige der Teile der Vorrichtung im Fall der Aufnahme von Zellkolonie aus einer Suspension redundant sind und weggelassen werden können, falls die Maschine nicht die Fähigkeit zum Handling benachbarter Kolonien benötigt. Z.B. kann die äußere Nadel wie auch der Motor und damit verbundene Antriebsteile weggelassen werden.

[0051] Fig. 9 ist eine schematische Zeichnung der für die Flüssigkeit vorgesehene Elemente der Vorrichtung. Eine der Nadeln **26** ist verbunden mit seiner Flüssigkeitsleitung **28** gezeigt, welche aus einer flexiblen Leitung hergestellt ist, welche zu einer an dem Gehäuse einer für die Flüssigkeiten benötigten Einheit **86** montiert ist. (Die Sammelleitung **81** wird zum Aufnehmen sämtlicher Fluidleitung **28** verwendet, obwohl nur eine einzige gezeigt ist.) Die Sammelleitung **81** nimmt auch eine weitere Fluidleitung **101** von einem Flüssigkeitszufuhrgefäß **103** über eine Fluidleitung **101** auf, welche die Flüssigkeit in das Zufuhrgefäß **103** über einen abgedichteten oberen Flansch **105** einleitet. Die Flüssigkeit in dem Behälter **103** kann unter Druck gehalten sein. Im Innern der die Flüssigkeit betreffenden Einheit **86** ist die Flüssigkeitszufuhr von der Sammelleitung **81** über eine Fluidleitung **99** zu einem normalerweise offenen (NO) Anschluss **93** eines Ventils **85** verbunden, und die andere Seite des Fluidweges, welcher zu der Nadel **26** führt, ist von der Sammelleitung **81** über eine Fluidleitung **97** zu einem normalerweise geschlossenen (N.C.) Anschluss **89** des Ventils **85** verbunden. Die für die Flüssigkeiten vorgesehene Einheit **86** schließt auch eine Pumpe **83** ein, welche eine hin- und hergehende Kolben/Zylinderpumpe welche eine Verbindung über eine Fluidleitung **95** zu einem gemeinsamen Anschluss (COM) **87** des Ventils **85** herstellt. Das Ventil **85** sowie auch die Pumpe **83** sind mit einer für die Flüssigkeiten vorgesehenen Steuereinheit **84** mittels elektrischer Steuerleitungen verbunden. Die für die Flüssigkeiten vorgesehene Steuereinheit **84** ihrerseits ist mit einem Steuercomputer verbunden und durch diesen angetrieben (nicht in dieser Figur gezeigt).

[0052] Im Gebrauch wird das Ventil **85** wie folgt gesteuert. Wenn das Ventil **85** in seiner Ruhezustand ohne Inputs ist, ist der NO-Anschluss **93** offen, und der N.C.-Anschluss **89** ist geschlossen. Dies verbindet die hin- und hergehende Pumpe mit dem Fluidgefäß **103**, sodass es Flüssigkeit aus dem Reservoir mittels einer geeigneten Abwärtsbewegung des Pumpenkolbens in seinem Zylinder ziehen kann. Andererseits, wenn das Ventil **85** in seinem betätigten Zustand mit einem energetisierenden Input-Signal ist, ist der NO-Anschluss **93** geschlossen, und der N.C.-Anschluss **89** ist offen. Dies verbindet die hin- und hergehende Pumpe **83** mit der Nadel **26**, was es der Flüssigkeitssäule in dem Fluidweg, welcher

durch die Elemente **26**, **28**, **97** und **95** erlaubt, die jeweilige Richtung durch die Bewegung des Pumpenzylinders bewegt zu werden. Dies gewährleistet die Feinsteuerung zum Einsaugen und Ausstoßen von Tierzellenkolonien, was schematisch in Fig. 8, wie zuvor beschrieben, gezeigt ist. Das Anheben des Kolbens ermöglicht auch ein Durchspülen des Fluidweges während des Reinigens. Zum Reinigen können die Fluidgefäße von Hand ausgetauscht werden. Alternativ kann ein automatisiertes Schalten zwischen verschiedenen Fluidbehältern unter Verwendung zusätzlicher computergesteuerter Ventile vorgesehnen sein. Gegebenenfalls kann ein unter Druck stehender Gasbehälter als ein Fluidgefäß (z.B. zum Reinigen mit Druckgas) vorgesehen sein, sodass die Fluidgefäße nicht notwendigerweise Flüssigkeit enthalten müssen. Es versteht sich, dass die Gefäße **103** von einer Vielzahl von Nadeln genutzt werden können und dass nicht für jede Nadel ein separates Gefäß vorgesehen sein muss. Individuelle Pumpen können auch von zwei oder mehr Ventilen genutzt werden, um Kosten zu reduzieren.

[0053] Fig. 10 ist ein schematisches Blockdiagramm, welches das Steuersystem der Vorrichtung zum Koordinieren der verschiedenen Komponenten zur Ausführung des zuvor beschriebenen Prozesses zeigt. Ein Computer (PC **90**) wird als eine grundlegende Steuerkomponente verwendet und ist mittels elektronischer Verbindungen unter Verwendung standardisierter Interface-Protokolle mit verschiedenen Komponenten verbunden, welche Teil des automatisierten Steuersystems sind. Die Steuerung wird durch eine Steuersoftware **91** bewirkt, welche im PC **90** vorliegt. Eine Bildverarbeitungssoftware **92** liegt ebenfalls im PC **90** vor und ist mit der Steuersoftware **91** verbunden. Die Bildverarbeitung kann als Software, wie zuvor beschrieben, Hardware oder Firmware, je nach Wunsch, ausgeführt werden. Die Detektoreinheit **40** in der Form einer CCD-Kamera ist mit dem PC **90** zum Empfangen von digitalen Bildern verbunden, welche mit der Kamera aufgenommen wurden. Eine Beleuchtungs- und Filtersteuereinrichtung **80** ist mit dem PC **90** verbunden. Diese Steuereinrichtung wird verwendet, um die LED's **52** und die Weißlichtquelleneinheit **56** zu steuern, welche benutzt wird, um die Lichttischplatte **12** zu beleuchten und auch um einen geeigneten Filter **46** aus einem motorgetriebenen Filterrad auszuwählen. Eine Steuereinrichtung **82** für einen Wäscher/Trockner ist mit dem PC **90** verbunden und wird verwendet, um das Gebläse und die Halogenlampen des Trockners zu steuern. Die Positionierer **20**, **22**, **24** zum Bewegen des Aufnahmekopfes **18** sind mit dem PC **90** verbunden. Die kopfmontierte Kamera **19** ist mit dem PC **90** zum Empfangen der Digitalbilder verbunden, welche durch die kopfmontierte Kamera **19** aufgenommen werden. Diese werden verwendet zum Ausrichten der Nadeln des Aufnahmekopfes mit den verschiedenen Teilen der Wasch- und Trocknungsstation **4**, **6**, **8**, der Titerplatten **29**, Kolonien etc. Die Fluidleitungen **70** sind mit der für Flüssigkeiten vorgesehenen Einheit **86** verbunden, welche durch die für die Flüssigkeiten vorgesehene Steuereinheit **84** gesteuert wird, welche mit dem PC **90** verbunden ist. Die für Flüssigkeiten vorgesehene Steuereinheit **84** wird verwendet, um den Druck in den Fluidleitungen zu steuern, um ein Einsaugen, ein Halten und ein Ausstoßen der Flüssigkeit aus der Probe zu steuern. Die für die Flüssigkeiten vorgesehene Steuereinheit **84** steuert ebenfalls den Waschzyklus der Nadeln und der Fluidleitungen, wobei ein Reinigungsfluid aus den Bädern **4**, **6** eingesaugt und von den Enden der Nadeln während des eingesaugt und von den Enden der Nadeln während des Reinigungszykluses ausgestoßen wird.

[0054] Fig. 11 ist ein Flussdiagramm, welches einen beispielhaften Prozess zeigt, welcher durch die Vorrichtung ausgeführt wird. Der Prozess hat die folgenden Schritte:
S1 Plaziere die Zellschalen in einen Bildbereich, d.h. auf einer Lichttischplatte **12**.
S2 Beleuchte den Bildbereich **12** unter Verwendung von entweder einer farbigen Lichtquelle **52** (typischerweise zum Detektieren gefärbter Zellkolonien unter Verwendung von Fluoreszenz) oder der Weißlichtquelle **56** (typischerweise für ungefärbte Kolonien)
S3 Nimm ein Bild/Bilder unter Verwendung einer CCD-Kamera **40** auf
S4 Führe eine Software basierte Analyse zum Detektieren der Zellkolonien aus, um eine „Aufnahmeliste" zu schaffen.
S5 Zuordnen der Robotervorrichtung zum Auswählen von Zellkolonien aus der Aufnahmeliste (detaillierter nachfolgend beschrieben)
S6 Speichern aller Bilder und Daten
S7 Entfernen der Titerplatten, welche die aufgenommenen Kolonien enthalten

[0055] Bzgl. der Schritte S2 bis S4 werden die Zellkolonien unter Verwendung von Fluoreszenz sichtbar gemacht. Z.B. kann ein fluoreszenzmarkierter Antikörper benutzt werden, welcher sich an ein gewünschtes Protein bindet, das abgesondert wurde von den Zellkolonien, an der Oberfläche davon ausgedrückt oder in dieser enthalten ist. Während des Darstellens der Fluoreszenz erscheinen die Zellkolonien als hell emittierende Punkte, wenn sie mit einer geeigneten Anregungswellenlänge (z.B. mit blauen LEDs) bestrahlt werden. Eine Abreicherung der fluoreszenten Antikörper in der unmittelbaren Nähe der Zellkolonien tritt ebenfalls auf, was den Effekt des Erzeugens einer „inversen Halo" hat, d.h. eines dunkleren Bereiches um jede helle Kolonie, was die Bildverarbeitung unterstützt.

[0056] Alternativ werden, im Falle des Einfärbens, die Zellkolonien durch Zumischen einer geeigneten Farbe in die Suspension sichtbar gemacht. Es soll je-

doch festgestellt werden, dass es möglich ist, viele Kolonien ohne Einfärben oder Fluoreszenz sichtbar zu machen.

[0057] Fig. 12 ist ein Flussdiagramm, das im größeren Detail Schritt S5 zeigt, den Zellkolonie aufnehmenden Teil des Prozesses. Schritt S5 des Prozesses hat die folgenden Unterschritte:
S5.1 Auswählen eines Elementes aus der Aufnahmeliste zum Aufnehmen
S5.2 • Bewegen einer ungenutzten Nadel bis über die zugeordnete xy-Koordinate der aufzunehmenden Zellkolonie
• „Feuern" (d.h. absenken) der Nadel in die Kolonieaufnahmeposition, wobei das Ende der Nadeln in das Medium über der Zielkolonie um einen Versatz d2 eingeführt ist
• Lediglich für angesaugte Kolonien – Bewegen des Nadelendes zum Entfernen der Zielzellkolonie
• Ansaugen eines definierten Volumens
• Zurückziehen der Nadel und Halten der Probe, während andere Nadeln gefeuert werden.
S5.3 Sofern nicht alle Nadeln verwendet werden oder alle Kolonien in der Aufnahmeliste aufgenommen worden sind, Wiederholen von Schritt S5.2
S5.4 Bewegen des Aufnahmekopfes über die Titerplatte und Ausrichten der Nadeln bzgl. der Titer – dann Ausgeben aller Proben gleichzeitig in die Titerplatte (Mikrotiterplatte)
S5.5 Reinigen aller Nadeln unter Verwendung der Wasch- und Trocknungsstation **2**
S5.6 Sofern nicht alle Kolonien in der Aufnahmeliste aufgenommen worden sind, Bewegen des Aufnahmekopfes zurück in den Probenbereich und zurück zu Schritt S5.1.

Dies vervollständigt Schritt S5.

[0058] Dies beendet die Beschreibung des Hauptausführungsbeispiels. Verschiedene mögliche Alternativen werden nachfolgend erwähnt.

[0059] Das Einsaugen ist beschrieben worden in Form von Hindurchlassen einer Flüssigkeitssäule durch die Fluidleitungen und in die Nadeln. Eine Alternative wäre, eine Flüssigkeitssäule in der Mehrheit jeder Flüssigkeitsleitung zu halten, jedoch einen Verschluss mit Luft oder mit Inertgas, wie z.B. Helium und Stickstoff in der Nadelspitze zu haben. Die Probe könnte eingesaugt werden durch ein Nach-oben-ziehen von Flüssigkeitssäule und Luftverschluss zusammen, sodass der Luftverschluss die Probenflüssigkeit oder das halbfeste Medium vom Hauptkörper der Flüssigkeitssäule separiert. Die Verwendung eines Gasverschlusses bietet eine verbesserte Sterilität, da die Probenflüssigkeit von der Hauptflüssigkeitssäule durch den Gasverschluss isoliert ist.

[0060] Alternative optische Konfigurationen sind möglich. So kann z.B. eine Laserquelle verwendet, wie z.B. ein Ionenlaser anstelle von Licht emittierenden Dioden. Der Laserstrahl kann über die untere Oberfläche der Lichtplatte gescannt werden. In diesem Fall kann ein einzelner Kanaldetektor verwendet werden. Geeignete Ionenlaser schließen Argonionen- und Kryptonionenquellen ein. Es versteht sich, dass das Strahlscanning mit geeigneten Scanspiegel-Optiken ausgeführt werden kann. Emissionswellenlängen über einen weiten Bereich können verwendet werden, z.B. 200 nm bis 1,6 µm, oder außerhalb dieses Bereiches.

[0061] Die Vorrichtung kann mit einer Vielzahl von optisch basierten Verfahren verwendet werden. Einfache Kontrastbilddarstellung kann verwendet werden, oder höher entwickelte spektroskopische Verfahren auf der Basis von optischer Dichte, Lumineszenz oder Raman-Scattering. Sofern höher entwickelte Spektralanalyse benötigt wird, wie z.B. für Resonanz-Raman-Scattering, die Sammeloptik kann ein Spektrometer oder kontinuierlich einstellbare Bandpassfilter aufweisen, welche vor dem Detektor angeordnet sind. Um bedeutende optische Dichteänderungen zu erhalten, müssen hohe Farbkonzentrationen verwendet werden, und viele Zellen werden benötigt, um signifikante Änderungen in der optischen Dichte zu erzielen. Vorzugsweise verwenden die optisch basierten Verfahren Fluoreszenz und/oder Lumineszenz, welche empfindlichere Untersuchungsmethoden sind verglichen mit der optischen Dichte.

[0062] Es wird auch herausgestellt, dass, obwohl das Hauptausführungsbeispiel eine Illumination eines Lichttisches von unten zeigt, eine Illumination von oben kann ebenfalls anstelle oder in Kombination mit einer Illumination von unten verwendet werden.

[0063] In einigen Fällen kann die kopfmontierte Kamera (oder Kameras) ausschließlich verwendet werden, und die abdeckungsmontierte Kamera wäre dann nicht erforderlich.

[0064] Lumineszente Substrate schließen ein, sind aber nicht beschränkt darauf, Luziferase, Luziferin (Anal Biochem (1994) 219, 169-181), Aequorin (Methods Enzymol. (1978) 57, 271-291), und alkaline Phosphatase (Clin. Chem (1996) 42, 1542-1546).

[0065] Fluoreszente Substrate können ein sehr helles Signal ergeben, was es ermöglicht, dass sie leicht auf dem einzigen Zellniveau detektiert werden können. Ein bevorzugtes Fluoreszentprotein ist grünes Fluoreszenzprotein – wie z.B. ein modifiziertes (z.B. mutiertes) GFP. Lediglich beispielhaft kann ein GFP an ein oder mehrere Antikörper zur Detektierung eines Proteins von Interesse konjugiert sein.

[0066] Die GFP der Quallenart Aequorea victoria ist ein Protein mit einem Erregungsmaximum mit 395

nm und einem Emissionsmaximum bei 510 nm und benötigt keinen exogenen Faktor. Die Eigenschaften und Anwendungen von GFP für das Studium von Genausdruck (gene expression) und Proteinlokalisation sind beispielsweise in Nat Cell Biol (2002) 4, E15-20; Biochemistry (1974) 13, 2656-2662; Photochem. Photobiol. (1980) 31, 611-615; Science (1994) 263, 12501-12504; Curr. Biology (1995) 5, 635-642; und US 5,491,084, diskutiert worden.

[0067] Demgemäß kann die Vorrichtung der vorliegenden Erfindung mit verschieden fluoreszenten und nicht fluoreszenten Proteinen und Farben verwendet werden.

[0068] Da weitere Arten von Licht emittierenden Dioden kommerziell verfügbar werden (wie z.B. Ultraviolett), können weitere Gruppen vorgesehen sein, sodass die Vorrichtung so ausgebildet sein kann, dass ein größerer Bereich möglicher Wellenlängenanregung vorgesehen ist. Die Vorrichtung kann auch als multifunktionelle Vorrichtung vorgesehen sein, in dem Licht emittierende Dioden unterschiedlicher Arten wie z.B. eine erste Gruppe zum Ausgeben in einem ersten Wellenlängenband (z.B. Blau) und eine zweite Gruppe zum Ausgeben in einem zweiten Wellenlängenband (z.B. Grün, Rot) vorgesehen sein.

[0069] Eine Vielzahl von fluoreszenten Farben ist verfügbar, welche emittieren über sichtbares Licht von Ultraviolett bis Blau, Grün, Orange und Rot. Es versteht sich, dass der vorgeschlagene Entwurf leicht modifiziert werden kann, um ihn mit jeder Art von gewünschter fluoreszenter Farbe, Protein mit geeigneter Anpassung an die optischen Quellen, Filter und Detektoren verwendet werden kann. Insbesondere kann die Erfindung auf cy3 und cy5 Farben angewendet werden, welche von Amersham Biosciences verfügbar sind. Nicht fluoreszente Farben, auf welche die Erfindung angewendet werden kann, schließen Trypanblau ein.

[0070] Es versteht sich auch, dass, obwohl der Begriff Licht emittierende Diode im Stand der Technik gewöhnlich verwendet wird, um lediglich eine Art einer Lichtquelle auf der Basis von Diodenemission zu beschreiben, dass der Begriff Licht emittierende Dioden breiter in den Ansprüchen des vorliegenden Dokumentes anzusehen ist, um jegliche Form von Licht emittierenden Diodenquellen einschließlich Diodenlaser, wie z.B. Halbleiter-Diodenlaser und superlumineszente Dioden abzudecken.

[0071] Nachfolgend sind Wege, in welchen eine Kolonie von Interesse identifiziert werden kann, und zwar unter Verwendung der Vorrichtung, detaillierter beschrieben.

[0072] Der automatisierte Prozess welcher hier beschrieben ist kann verwendet werden, um eine oder mehrere Zellkolonien von Interesse auf der Basis von Kontrastbilddarstellung zu sortieren, aufzunehmen oder zu identifizieren.

[0073] Daher kann die vorliegende Erfindung zum Identifizieren und Analysieren biologischer Moleküle verwendet werden, welche in Zellkolonien vorhanden sind, einschließlich z.B. Peptiden, Polypeptiden, Nukleinsäuren und glycosilierte und nicht-glycosilierte Proteine (Oligosaccharide, Lipide und Ähnliches).

[0074] Es versteht sich für einen Durchschnittsfachmann, dass ein biologisches Molekül, wie z.B. ein Protein von Interesse, auf eine Vielzahl von Arten detektiert werden kann. Lediglich beispielhaft kann das biologische Molekül wie folgt detektiert werden:

1. Das Expressierungssystem, das verwendet wird, um das Protein von Interesse zu Tage treten zu lassen, kann eines sein, welches bewirkt, dass das Protein von Interesse aus der Zellkolonie in das umgebende Medium sekretiert wird. Wenn das expressierte Protein in das Kulturmedium sekretiert wird, dann wird der Expressionsvektor typischerweise eine geeignete Signalsequenz enthalten, welche die Sekretion des Proteins in das Kulturmedium richtet. Ein Fluoreszenz-Antikörper beispielsweise, welcher spezifisch für das Protein von Interesse ist, kann dann verwendet werden für die nachfolgende Identifikation der Zellkolonien, welche das Protein von Interesse expressieren.
2. Das Expressierungssystem, welches verwendet wird, um das Protein von Interesse in Erscheinung treten zu lassen zu expressieren, kann eines sein, in dem das Expressieren des Proteins von Interesse an der Oberfläche einer Zelle, wie z.B. der Zellmembran, erfolgt. Für den Durchschnittsfachmann ist es verständlich, das Vektoren – wie z.B. Expressionsvektoren – Kodiersequenzen enthalten, welche mit Signalsequenzen ausgestattet sind, welche die Sekretion der kodierenden Sequenzen durch eine spezielle Zellmembran richten. Ein Fluoreszenz-Antikörper beispielsweise kann dann für die nachfolgende Identifikation von Zellkolonien verwendet werden, welche das Protein von Interesse expressieren.
3. Die Zellkolonie könnte permeabel gemacht werden unter Verwendung einer Zellpermeabilisierungssubstanz der Gestalt, dass beispielsweise ein fluoreszenter Antikörper in die Zellenkolonie eintreten kann und sich mit dem Protein von Interesse verbinden kann, während die Lebensfähigkeit der Zellkolonie dennoch erhalten bleibt.
4. Die Zellkolonie kann einen Expressionsvektor aufweisen, in welchem ein Protein von Interesse mit einem Reporter oder einem „tag" – wie z.B. GFP verbunden wird. Auf diese Weise, erfolgt eine Expression des Proteins von Interesse auch bei der Expression des Reporters, der die Identifikation der Zellenkolonie schafft. Die einzigartige

Tag-Sequenz wird der Nukleotid-Sequenz zugefügt, welche das Protein durch rekombinante DNA-Techniken kodiert, was ein Protein schafft, das durch einen Antikörper erkannt werden kann, welcher spezifisch für beispielsweise das Tag-Peptid ist. Eine große Vielfalt von Reportern kann in die Übereinstimmung der vorliegenden Erfindung verwendet werden, wobei bevorzugte Reporter zweckmäßigerweise erkennbare Signale bereitstellen (z.B. durch Fluoreszenz). Beispielsweise kann ein Reporter-Gen ein Enzym kodieren, welches eine Reaktion katalysiert, welche die Lichtabsorptionseigenschaften verändert. Beispiele von Reporter-Molekülen schließen ein, sind jedoch nicht auf β-Galactosidase, Invertase, grünes fluoreszentes Protein, Luziferase, Chloramphenicol, Acetyltransferase, β-Glucoronidase, Exo-Glucanase und Glucoamylase. Beispielsweise können fluoreszent gekennzeichnete Biomoleküle, welche spezifisch mit speziellen chemischen Eigenschaften des Bindens oder Andockens synthetisiert wurden, als fluoreszente Reportermoleküle verwendet werden. Fluoreszenz gekennzeichnete Antikörper sind besonders nützliche Reportermoleküle infolge ihres hohen Grades an Spezifizität zum Anhaften an einem einzigen molekularen Ziel in einem Gemisch von Molekülen als Komplex als eine Zelle, Gewebe oder einem Extrakt von beiden.

[0075] Es gibt eine große Zahl von Wegen, um Fluoreszenz zu messen. Beispielsweise bewirken einige fluoreszente Reportermoleküle eine Änderung in Anregungs- oder Emissionsspektren, einige weisen eine Resonanzenergieübertragung auf, bei welcher ein fluoreszenter Reporter Fluoreszenz verliert, während ein zweiter an Fluoreszenz gewinnt, einige bewirken eine Unterdrückung oder ein Auftreten von Fluoreszenz, während andere Rotationsbewegungen veranlassen. Eine multi-spektrale Bildgebung kann ebenfalls verwendet werden.

Anwendungsbeispiele

[0076] Einige spezifische Beispiele davon, wie die Vorrichtung gemäß der Erfindung verwendet werden kann, werden nachfolgend angegeben.

Auswahl von Zellen für biopharmzeutische Herstellung

[0077] Die vorliegende Erfindung kann auch geeignet sein für ein automatisches Sortieren von Zellkolonien, welche erhöhte Niveaus eines Proteins von Interesse expressieren oder sekretieren. Bei einem bevorzugten Ausführungsbeispiel ist das Protein von Interesse ein biopharmazeutisches Protein wie z.B. ein Protein, das zweckmäßig bei der Behandlung oder Diagnose von Krankheiten ist.

[0078] Derartige Zellen können gemäß einem Beispiel entsprechend der Helligkeit der Fluoreszenz der Zellenkolonie detektiert werden, welche mit der Menge von Protein korreliert, welches expressiert wird. Die hellsten Zellkolonien können dann zur weiteren Analyse/Verarbeitung aufgenommen werden.

[0079] Wie zuvor beschrieben, könnte die vorliegende Erfindung auch für die Gewinnung von Zellkolonien verwendet werden, welche Membrane und sekretierte Proteine produzieren.

Stammzellen

[0080] Differentiation ist ein Prozess, wodurch Strukturen und Funktionen von Zellen progressiv realisiert werden, um spezialisiertere Zellen zu erhalten. Deshalb, wenn die Zellen mehr spezifiziert sind, werden sie mehr spezialisiert. Bei der Mehrzahl der Säugetierzellarten ist die Zelldifferentiation ein Einwegprozess, welcher ultimativ zu schließlich differenzierten Zellen führt. Obwohl einige Zellarten während des gesamten Lebens ohne Teilung und ohne, dass sie ersetzt werden, fortbestehen, setzen jedoch viele Zellarten ein Teilen während der Lebenszeit des Organismus fort und unterliegen einer Erneuerung. Dies kann durch einfache Teilung, wie im Falle von Zellen – wie z.B. blutbildenden Zellen und epidermischen Zellen – durch Teilung von relativ undifferenzierten Stammzellen geschehen, welchem sich ein Programm nachfolgender irreversibler Differenzierung von einer der Tochterzellen anschließt.

[0081] Da die vorliegende Erfindung besonders geeignet ist für die Identifikation von Zellen auf der Basis von Unterschieden in der Zellgröße, der Form und/oder der Replikationsrate, kann dies verwendet werden, um eine oder mehrere Stammzellen zu identifizieren und/oder zu isolieren, sobald sie in einen gegebenen Zelltyp differenziert worden sind.

RNAi

[0082] Post-transskriptionale Genstilllegung (PTGS) bewirkt durch doppelsträngige RNA (dsRNA) ist ein konservierter Zellenverteidigungsmechanismus zum Steuern der Expression von Fremdgenen. Man nimmt an, dass die zufällige Integration von Elementen, wie z.B. Transposonen oder Viren die Expression der dsRNA bewirkt, was eine sequenz-spezifische Degradation von homologen einsträngigen mRNA oder viralen genomischen RNA bewirkt. Der Stilllegungseffekt ist bekannt als RNA-Interferenz (RNAi). Der Mechanismus des RNAi schließt das Verarbeiten von langen dsRNAs in Dopplungen von 21 bis 25 Nukleotiden (nt) RNAs. Diese Produkte werden als kleininterferierende oder stilllegende RNAs (siRNAs) genannt, welche die sequenz-spezifischen Mediatoren der mRNA-Degradation sind.

[0083] In differenzierten Säugetierzellen sind dsRNA > 30bp gefunden worden, um die Interferonantwort zu aktivieren, welche zu einer Beendigung der Proteinsynthese und der nicht-spezifischen mRNA-Degradation führt. Diese Antwort kann jedoch unter Verwendung von 21 ntsiRNA-Dopplungen umgangen werden, indem es erlaubt wird, dass eine Genfunktion in kultivierten Säugetierzellen analysiert wird.

[0084] In Säugetieren kann RNAi durch das Liefern von entweder kurzen dsRNA-Molekülen (siRNAs) direkt in die Zelle oder durch Liefern von DNA-Konstrukten ausgelöst werden, welche die dsRNA innerhalb der Zelle produzieren.

[0085] Der Prozess und die Vorrichtung können verwendet werden, um Zellen zu identifizieren und aufzunehmen, bei einem geänderten Phänotyp zur weiteren Analyse, da die RNAi morphologische Veränderung in den Zellen induzieren.

Zelltransformationsuntersuchungen

[0086] Unterschiede zwischen transformierten und nicht-transformierten Zellen können auch gemäß der vorliegenden Erfindung detektiert werden.

[0087] Derartige Untersuchungen können verwendet werden, um beispielsweise die Transformationsfähigkeiten von Viren oder Chemikalien zu untersuchen.

[0088] Derartige Untersuchungen stellen ein Verfahren zum Untersuchen von Änderungen dar, welche in Übereinstimmung sind mit Tumorigenese ohne die Kenntnis der genetischen Natur der Beschädigung, welche die Änderung veranlasst hat. Nach einem Ausplatieren bei niedriger Dichte, können transformierte Zellen, welche einen geänderten Phänotyp haben, unter Verwendung morphologischer Kriterien identifiziert werden, wobei die Zellen in einem automatisierten Prozess unter Verwendung der Bildgebungsfähigkeit der Vorrichtung gemäß der Erfindung identifizierbar sind.

[0089] Zelltransformationsuntersuchungen testen deshalb nach genetischer Veränderung, welche an einem veränderten Phänotyp aufgetreten sind, welche leicht durch das morphologische Erscheinungsbild der transformierten Zellen identifiziert werden.

Gewinnung von Viren

[0090] Das Vorhandensein eines Virus gibt oft Anlass für morphologische Veränderungen in einer Wirt-Zelle. Jegliche detektierbare Veränderungen in der Wirt-Zelle in Folge einer Infektion sind bekannt als ein zytopatischer Effekt. Zytopatische Effekte können bestehen in Form von Zellabrundung, Fehlorientierung, Anschwellen oder Schrumpfen, Tod, Lösen von der Oberfläche etc.

[0091] Die zytopatischen Effekte, welche durch verschiedene Viren erzeugt worden sind, hängen vom Virus und den Zellen ab, an welchen er gewachsen ist. Das kann in den klinischen Virologie-Laboratorien verwendet werden, um eine Identifizierung eines isolierten Virus zu unterstützen.

[0092] Derartige zytopatische Effekte können die Morphologie der Zelle ändern, welche unter Verwendung des automatisierten Prozesses, welcher hier beschrieben ist, detektiert werden können.

Transfektion von Genen

[0093] Im Allgemeinen benötigt das Einfügen eines Gens in eine Zelle einen dominanten selektiven Marker, wie z.B. Neomyzin-Resistenz. Die hohe Wirksamkeit eines automatisierten Systems, welches hier beschrieben ist, kann einen derartigen Marker überflüssig machen, da Zellen in begrenzten Lösungen ausplatiert und Kolonien zur weiteren Analyse aufgenommen werden könnten.

Immortalisierung von Zellen

[0094] Die Transformation mit Chemikalien oder Viren kann einen immortalen Phänotyp induzieren. Die Vorrichtung und das Verfahren, welche hier beschrieben sind, erlauben es, dass derartige Zellen zu selektieren.

Selektion von Zellklonen, welche post-translationale modifizierte Proteine erzeugen

[0095] Therapeutische Proteine wie z.B. ein Erythro-Protein oder Gewebeplasminogen-Aktivator verdanken ihre Serum-Halbwertzeit Zuckerrückständen am Protein. Klonen von Zellen welche eine gewünschte Modifikation erzeugen, können mit kennzeichnenden Lektin detektiert und dann aufgenommen werden.

IN BEZUGGENOMMENE DOKUMENTE

[1] US 6,198,107: Clare Chemical Research, Inc
[2] JP 07-260742: Sanyo Electric Co Ltd
[3] WO 98/23950: Oxford Glycoscience (UK) Ltd.
[4] US 5,587,062: Shimadzu Corporation
[5] WO 99/051977: Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften
[6] US 5,534,386: Physical Optics Corporation
[7] WO 92/12233: Medical Research Council
[8] Uber et al: Bio Techniques, vol. 11, no 4 (1991), pages 642-647
[9] Jones et al: Nucleic Acids Research, vol. 20, no. 17 (1992), Pages 4599-4606

Patentansprüche

1. Verfahren für das automatisierte Aufnehmen von Tierzellkolonien unter Verwendung einer Vorrichtung, wobei das Verfahren folgendes umfaßt:
a. Bereitstellen eines Aufnahmekopfs (**18**), welcher wenigstens eine hohle Nadel (**26**) umfaßt, wobei der Aufnahmekopf unter Verwendung von Positionierungsmotoren (**20**, **22**, **24**) über die Vorrichtung bewegt werden kann,
b. Anordnen eines Probenbehälters (**13**), welcher eine Mehrzahl von in einem Medium gehaltenen Tierzellkolonien (**74**) beinhaltet, sowie eines Abgabebehälters (**29**) auf der Vorrichtung,
c. Verwendung einer Bilderkennung (**40**) und einer Bildverarbeitung (**90**), um Stellen von Tierzellkolonien in der Probe zu identifizieren,
d. Ausrichten des Aufnahmekopfs mit dem Probenbehälter,
e. Aufnehmen einer Tierzellkolonie durch Ausrichten der wenigstens einen hohlen Nadel an einer der Stellen der Tierzellkolonien, Einführen eines distalen Endes der hohlen Nadel in das Medium, und Einsaugen der Tierzellkolonie an dieser Stelle in die hohle Nadel und
f. Absetzen der aufgenommenen Tierzellkolonie durch Bewegen des Aufnahmekopfs über den Abgabebehälter und Ausstoßen der aufgenommenen Tierzellkolonie in den Abgabebehälter.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Stufe des Aufnehmens das Wiederholen der Stufen des Ausrichtens und des Einsaugens für die wenigstens eine hohle Nadel umfaßt, um mehrere der Tierzellkolonien aufzunehmen.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die wenigstens eine hohle Nadel eine Mehrzahl hohler Nadeln umfaßt.

4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei der Abgabebehälter eine Anordnung von Wells beinhaltet, die durch einen charakteristischen Abstand voneinander getrennt sind, und auch die hohlen Nadeln mit dem charakteristischen Abstand angeordnet sind, so daß die Stufe des Ausstoßens für alle hohlen Nadeln parallel ausgeführt werden kann.

5. Verfahren nach Anspruch 1, 2, 3 oder 4, wobei die Tierzellkolonien an dem Probenbehälter anhaften und wobei nach der Stufe des Einführens das distale Ende der Nadel relativ zu dem Probenbehälter bewegt wird, um vor der Stufe des Einsaugens die Tierzellkolonie an dieser Stelle abzulösen.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Tierzellkolonien mit einem kontrastverstärkenden Mittel eingefärbt werden, um die Bildverarbeitung zu unterstützen.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Tierzellkolonien mit einem fluoreszierenden Mittel eingefärbt werden, um die Bildverarbeitung zu unterstützen.

8. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die Mehrzahl der Tierzellkolonien ein interessierendes biologisches Molekül enthält oder exprimiert.

9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei das interessierende biologische Molekül aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus einem Peptid, einem Polypeptid, einer Nukleinsäure oder einem glycosylierten oder unglycosylierten Protein.

10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei das interessierende Protein ein biopharmazeutisches Protein ist.

11. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die Stufe des Einführens das Bewegen der hohlen Nadel in eine Kolonieaufnahmeposition, in der das distale Ende der hohlen Nadel in das Medium eingetaucht wird und von einem Boden des Probenbehälters um einen Versatzabstand versetzt ist, umfaßt, und die Stufe des Einsaugens in der Kolonieaufnahmeposition durchgeführt wird.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei der Versatzabstand in einem Bereich zwischen 0,1 mm und 4,0 mm liegt.

13. Verfahren nach Anspruch 11, wobei der Versatzabstand in einem Bereich zwischen 0,25 mm und 1,0 mm liegt.

14. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, welches folgendes umfaßt:
(i) die Verwendung einer Bilderkennung, um ein Bild der Probe aufzunehmen,
(ii) das Durchführen einer Analyse des Bildes mit der Bildverarbeitung, um diejenigen Tierzellkolonien zu erfassen, die aufgenommen werden sollen, wodurch eine Aufnahmeliste von Zielkolonien erzeugt wird, und
(iii) das Anweisen der Vorrichtung derart, daß sie die Zielkolonien von der Aufnahmeliste sammelt, wobei die Zielkolonien durch wiederholtes Ausführen der Stufen des Ausrichtens, des Aufnehmens und des Absetzens aufgenommen werden.

15. Vorrichtung zum Aufnehmen von Tierzellkolonien, welche folgendes umfaßt:
ein Vorrichtungsbett (**10**) zum Anordnen eines Probenbehälters (**13**), welcher eine Mehrzahl von in einem Medium (**72**) gehaltenen Tierzellkolonien (**74**) umfaßt,
eine Kamera (**40**) zum Aufnehmen von Bildern der Tierzellkolonien,

einen Bildprozessor (**90**) zum Identifizieren von Stellen von Tierzellkolonien anhand von aufgenommenen Bildern und
einen Aufnahmekopf (**18**), der unter Verwendung von Positionierungsmotoren (**20**, **22**, **24**) relativ zu dem Vorrichtungsbett zu Stellen von Tierzellkolonien, die durch den Bildprozessor identifiziert wurden, bewegt werden kann, wobei der Aufnahmekopf wenigstens eine hohle Nadel (**26**) beinhaltet, die durch jeweilige Fluidleitungen (**28**) mit einer Drucksteuerung (**84**) verbunden sind, die so betreibbar ist, daß sie Mengen des Mediums aus dem Probenbehälter in die wenigstens eine hohle Nadel einsaugt, das Medium hält und es ausstößt, wenn dies erforderlich ist, wodurch eine Aufnahme von Tierzellkolonien aus dem Medium ermöglicht wird.

16. Vorrichtung nach Anspruch 15, wobei die Vorrichtung weiterhin einen Antriebsmechanismus (**60**, **66**) aufweist, um eine seitliche Oszillation distaler Enden der wenigstens einen hohlen Nadel zu bewirken, um das Ablösen anhaftender Tierzellkolonien zu vereinfachen.

17. Vorrichtung nach Anspruch 16, wobei der Antriebsmechanismus so ausgestaltet ist, daß er eine Drehbewegung der distalen Enden der wenigstens einen Nadel bewirkt.

18. Vorrichtung nach Anspruch 16, wobei der Antriebsmechanismus zum Bewirken der seitlichen Oszillation der hohlen Nadeln in dem Aufnahmekopf angeordnet ist.

19. Vorrichtung nach Anspruch 16, wobei der Antriebsmechanismus zum Bewirken der seitlichen Oszillation der hohlen Nadeln nicht durch die Positionierungsmotoren bereitgestellt wird.

20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 15 bis 19, wobei der Aufnahmekopf eine Mehrzahl der hohlen Nadeln umfaßt.

21. Vorrichtung nach Anspruch 20, wobei die hohlen Nadeln in einem charakteristischen Abstand angeordnet sind, der zu dem Standardabstand einer Wellplatte paßt.

22. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 15 bis 21, welche weiterhin einen Antrieb umfaßt, der so betreibbar ist, daß er jede der hohlen Nadeln zu einer Kolonieaufnahmeposition bewegt, in welcher das distale Ende der hohlen Nadel von einem Boden des Probenbehälters, der auf dem Vorrichtungsbett angeordnet ist, um einen Versatzabstand versetzt ist, und wobei der Aufnahmekopf so betreibbar ist, daß er das Einsaugen von Tierzellkolonien in der Kolonieaufnahmeposition durchführt.

23. Vorrichtung nach Anspruch 22, wobei der Versatzabstand in einem Bereich zwischen 0,1 mm und 4,0 mm liegt.

24. Vorrichtung nach Anspruch 22, wobei der Versatzabstand in einem Bereich zwischen 0,25 mm und 1,0 mm liegt.

25. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 15 bis 24, welche weiterhin einen Steuerungscomputer umfaßt, der so betreibbar ist, daß er die Vorrichtung für die Aufnahme von Tierzellkolonien wie folgt steuert:
(i) Verwenden der Kamera, um ein Bild von Tierzellkolonien in einem auf dem Vorrichtungsbett angeordneten Probenbehälter aufzunehmen,
(ii) Durchführen einer Analyse des Bildes mit dem Bildprozessor, um diejenigen Tierzellkolonien zu identifizieren, die aufgenommen werden sollen, wodurch eine Aufnahmeliste von Zielkolonien erzeugt wird, und
(iii) Anweisen der Vorrichtung derart, daß sie die Zielkolonien aus der Aufnahmeliste wiederholt aufnimmt, Ausrichten einer der wenigstens einen hohlen Nadel mit einer Stelle von Tierzellkolonien, Bewegen der hohlen Nadel zu einer Kolonieaufnahmeposition, in welcher ein distales Ende der hohlen Nadel von einem Boden des Probenbehälters um einen Versatzabstand versetzt ist, und Einsaugen der Tierzellkolonie an dieser Stelle in die hohle Nadel, während das distale Ende der holen Nadel in der Kolonieaufnahmeposition gehalten wird.

26. Verwendung der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 15 bis 25 zum Identifizieren einer Tierzellkolonie, die ein interessierendes biologisches Molekül umfaßt oder exprimiert.

27. Verwendung nach Anspruch 26, wobei das interessierende biologische Molekül aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus einem Peptid, einem Polypeptid, einer Nukleinsäure oder einem glycosylierten oder unglycosylierten Protein.

28. Verwendung nach Anspruch 26, wobei das interessierende glycosylierte oder unglycosylierte Protein ein biologisches Molekül ist.

Es folgen 10 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

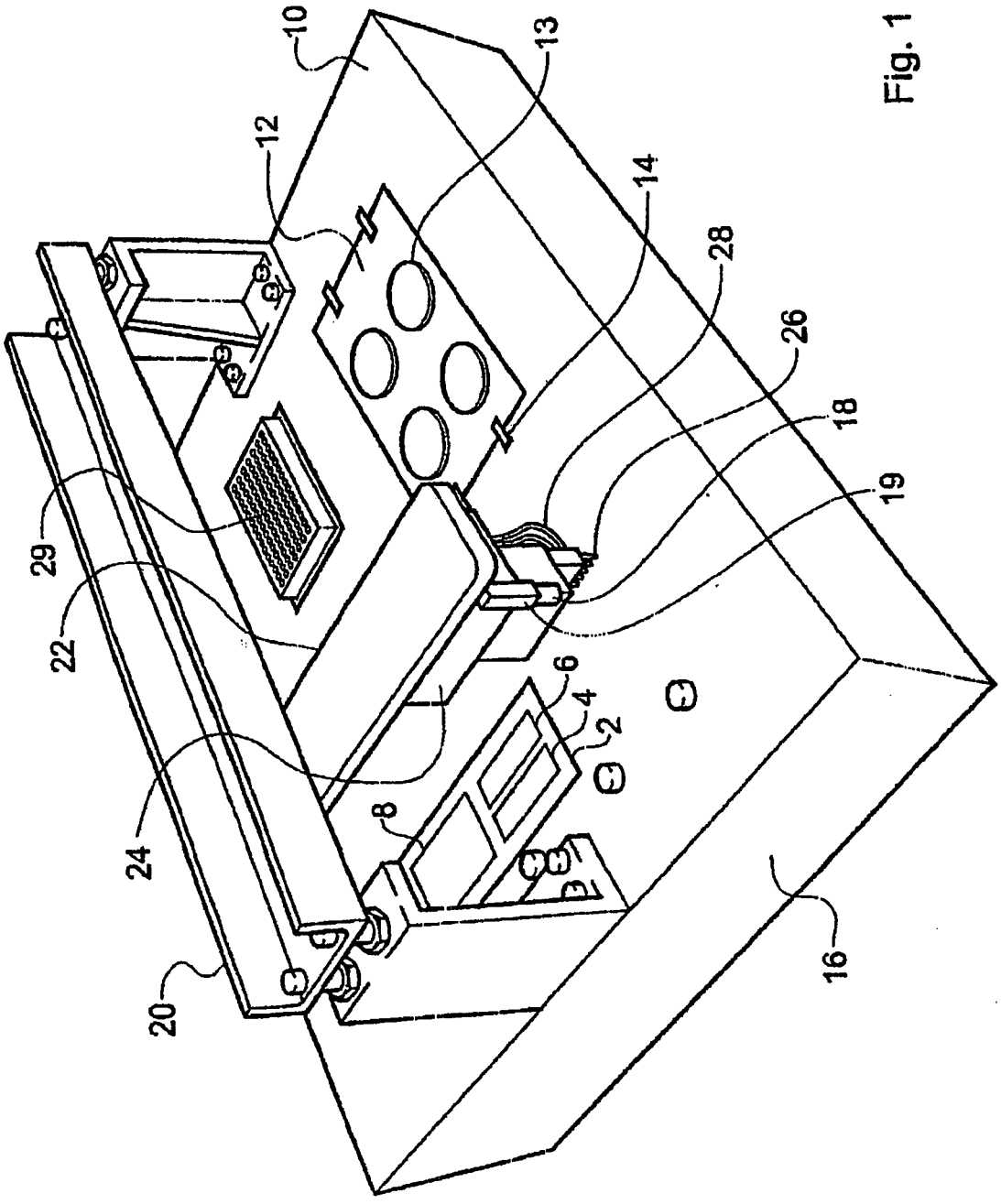


Fig. 1

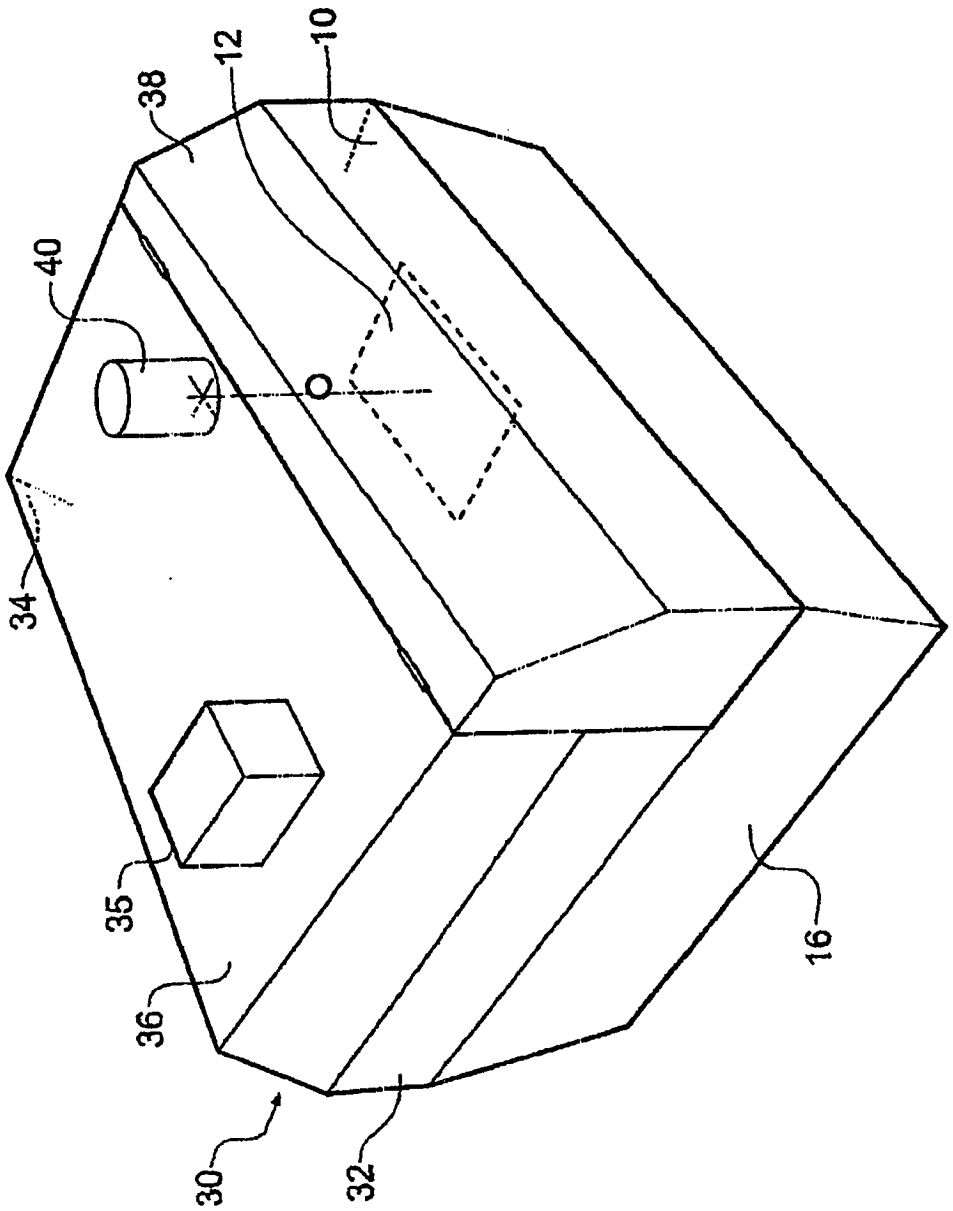


Fig. 2

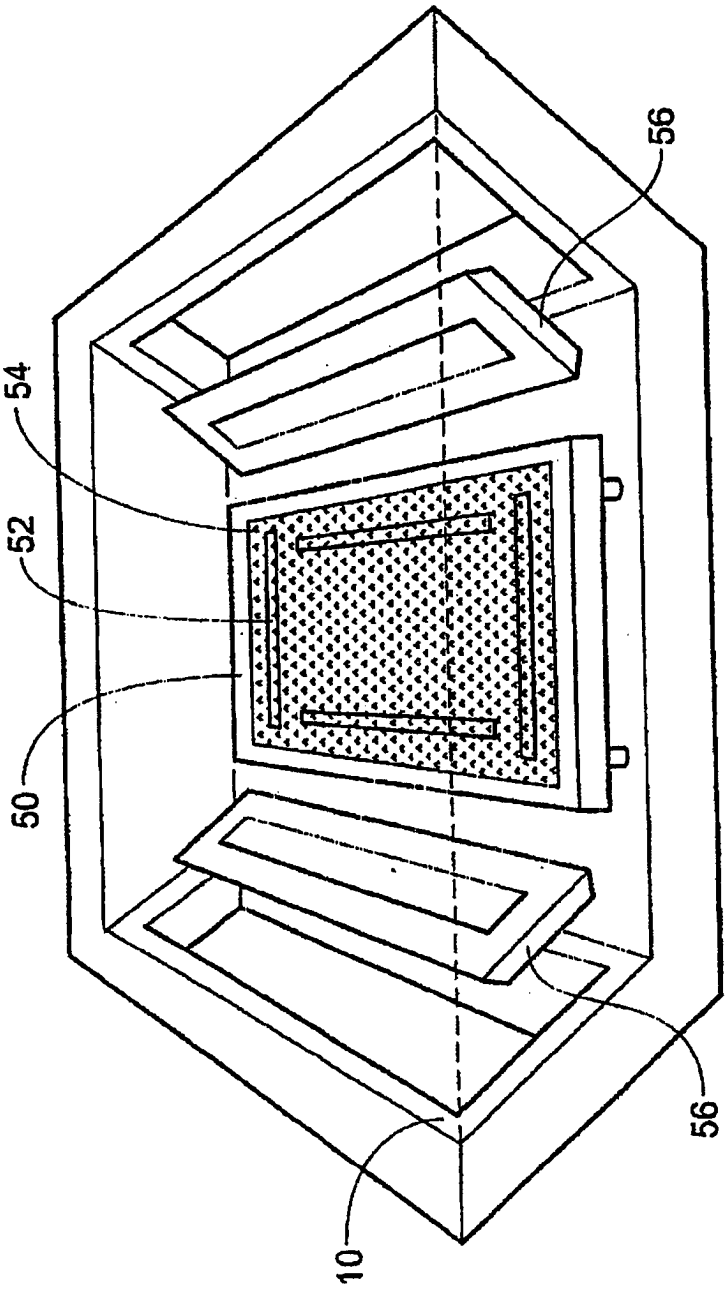


Fig. 3

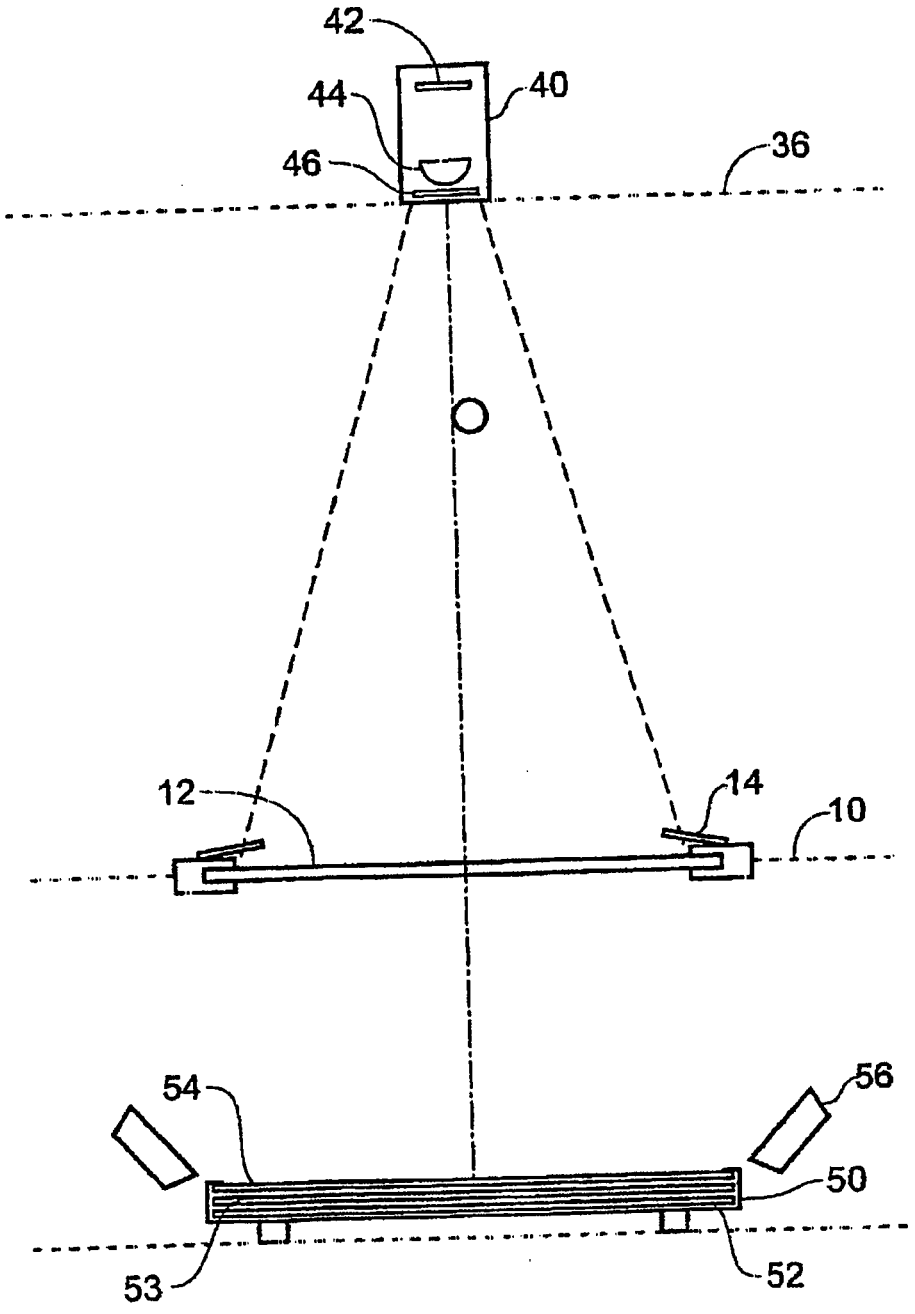


Fig. 4

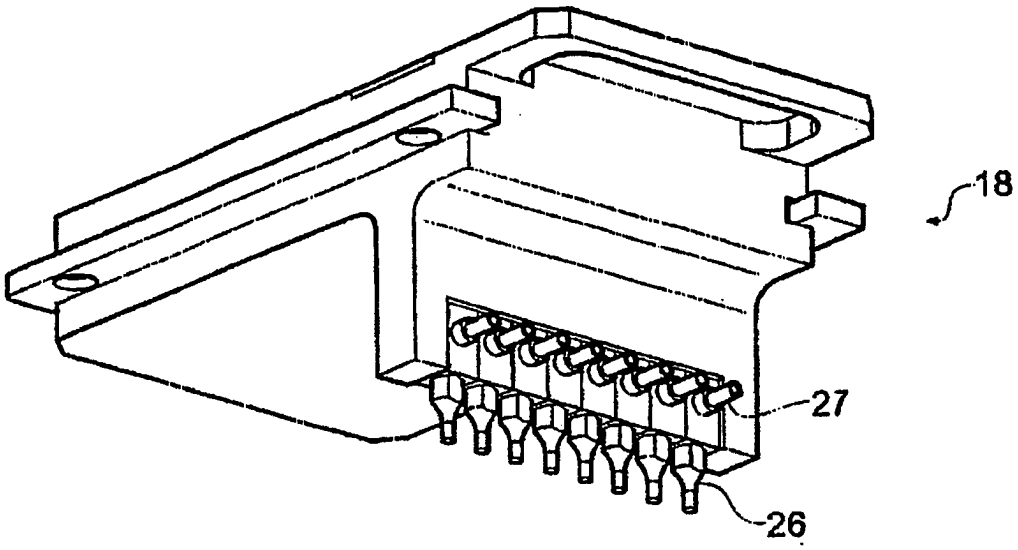


Fig. 5

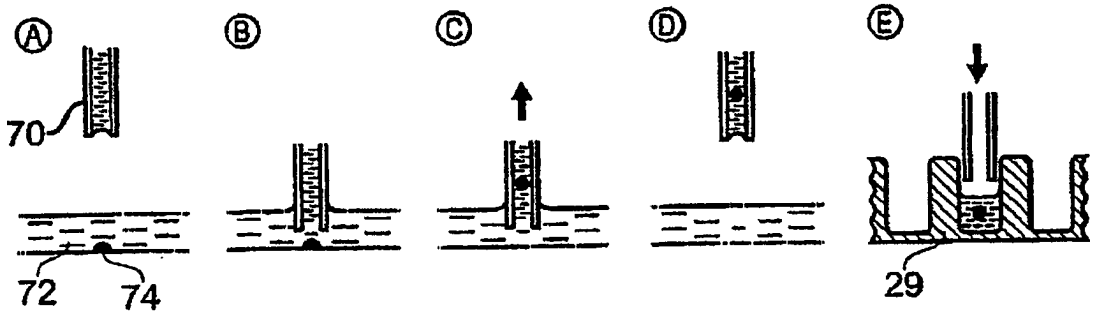


Fig. 8

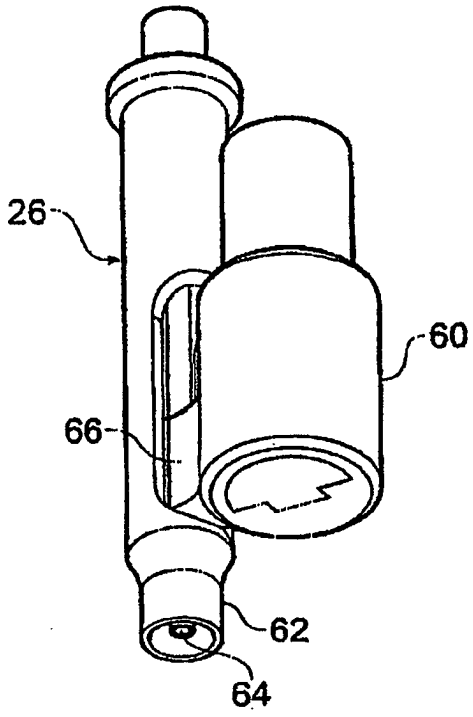


Fig. 6

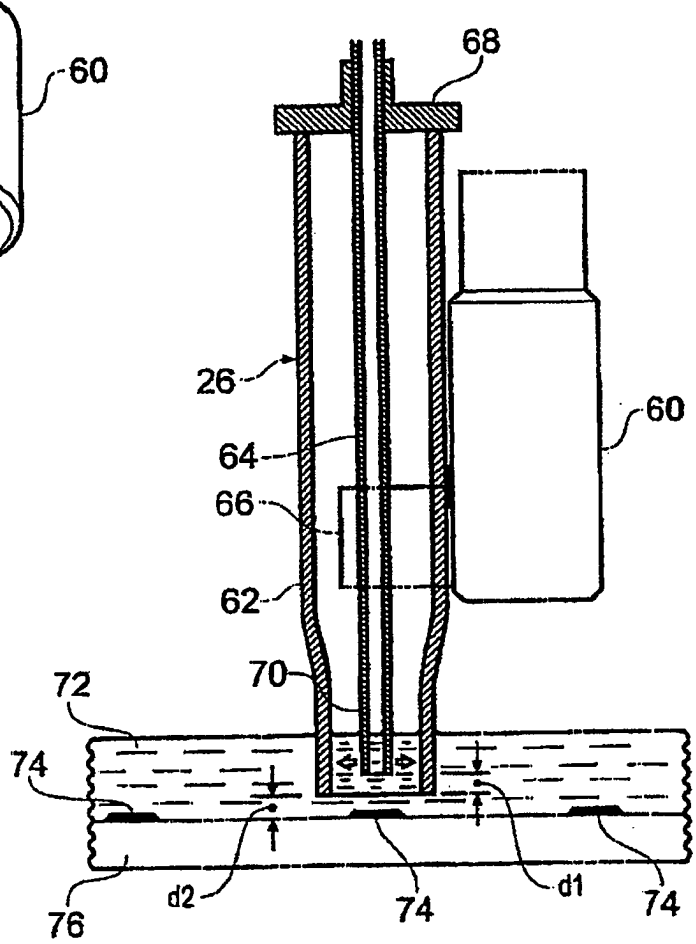


Fig. 7

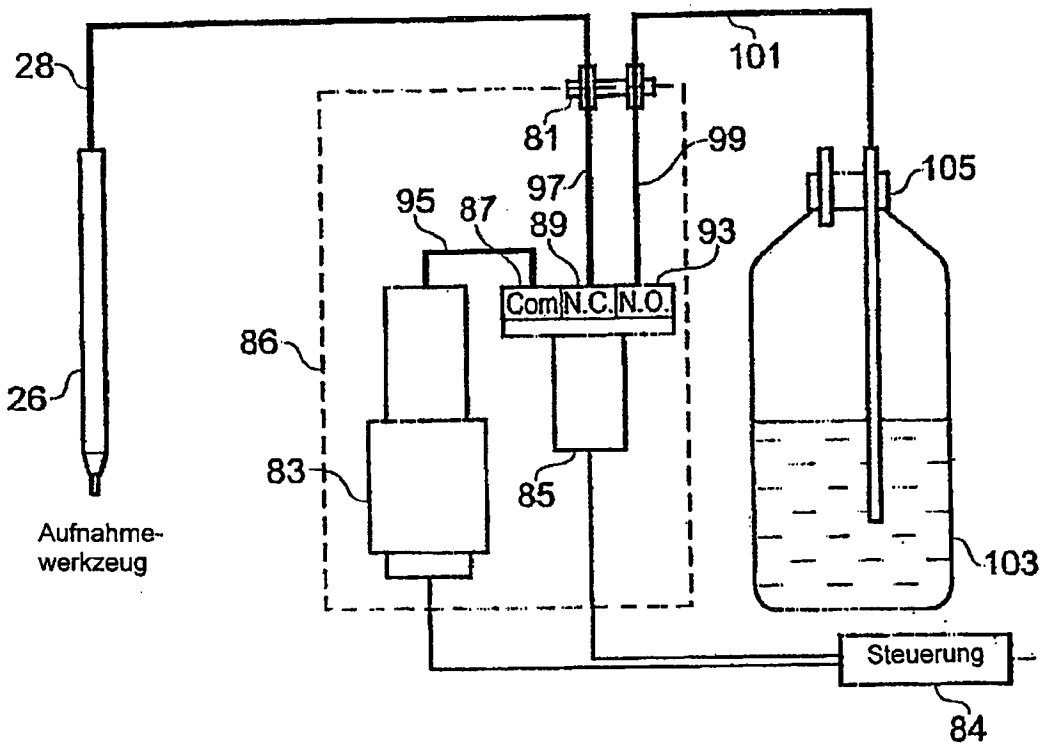

28
26
Aufnahme-
werkzeug
101
81
99
97
105
95
87
89
93
Com
N.C.
N.O.
86
83
85
103
Steuerung
84

Fig. 9

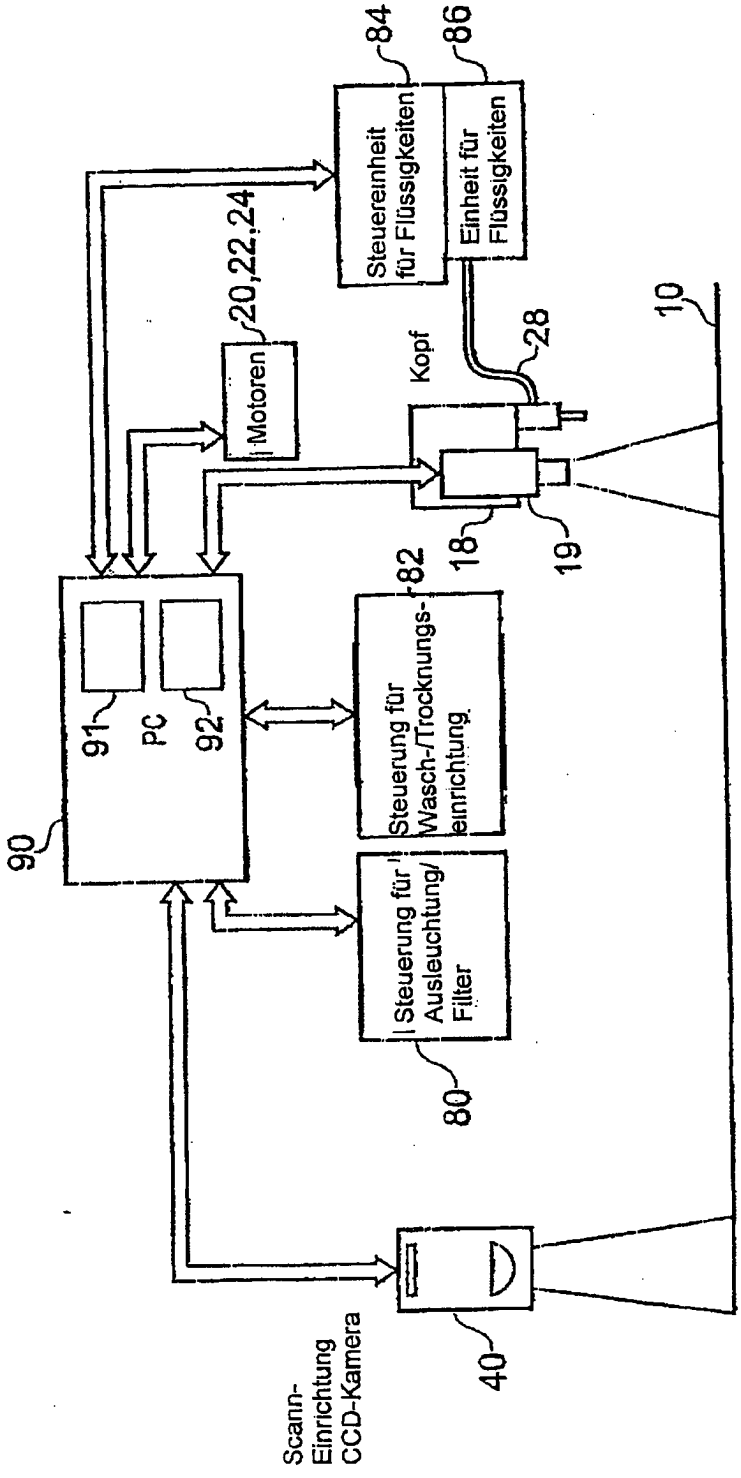

84
86
Steuereinheit für Flüssigkeiten
Einheit für Flüssigkeiten
20,22,24
Motoren
Kopf
28
10
18
19
82
Steuerung für Wasch-/Trocknungs-einrichtung
91
PC
92
90
Steuerung für Ausleuchtung/ Filter
80
40
Scann-Einrichtung CCD-Kamera

Fig. 10

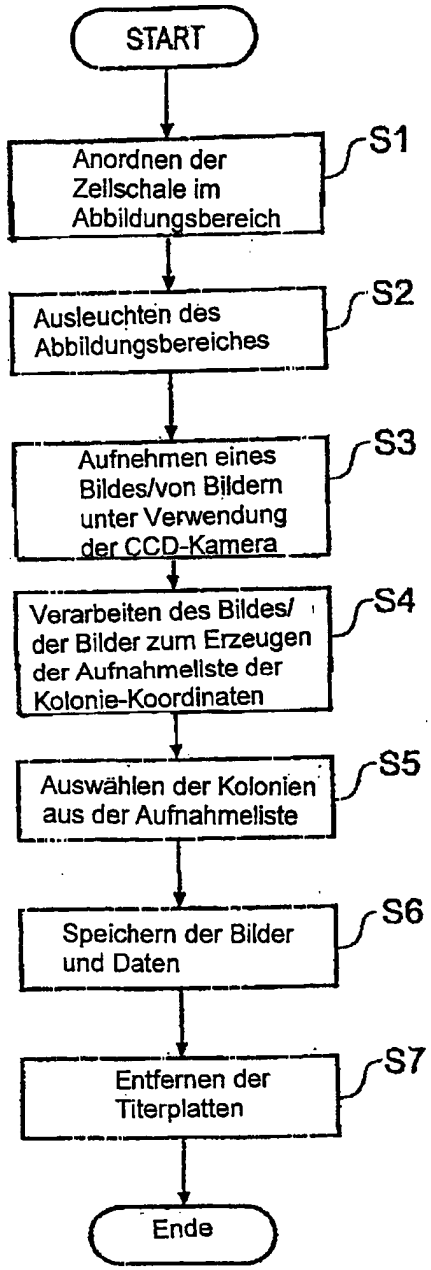

START
Anordnen der Zellschale im Abbildungsbereich
S1
Ausleuchten des Abbildungsbereiches
S2
Aufnehmen eines Bildes/von Bildern unter Verwendung der CCD-Kamera
S3
Verarbeiten des Bildes/ der Bilder zum Erzeugen der Aufnahmeliste der Kolonie-Koordinaten
S4
Auswählen der Kolonien aus der Aufnahmeliste
S5
Speichern der Bilder und Daten
S6
Entfernen der Titerplatten
S7
Ende

Fig. 11

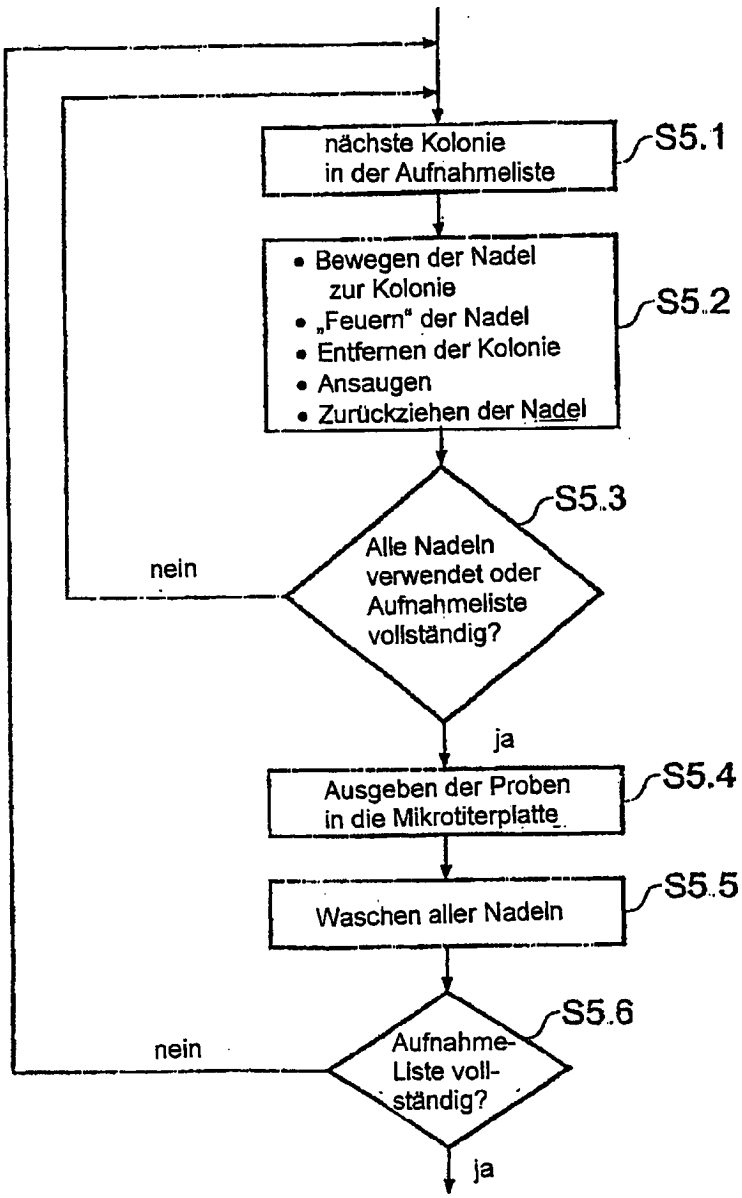

nächste Kolonie in der Aufnahmeliste
S5.1
• Bewegen der Nadel zur Kolonie
• „Feuern" der Nadel
• Entfernen der Kolonie
• Ansaugen
• Zurückziehen der Nadel
S5.2
Alle Nadeln verwendet oder Aufnahmeliste vollständig?
S5.3
nein
ja
Ausgeben der Proben in die Mikrotiterplatte
S5.4
Waschen aller Nadeln
S5.5
Aufnahme-Liste voll-ständig?
S5.6
nein
ja

Fig. 12