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

(10) **DE 600 08 013 T2** 2004.09.02

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 226 229 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 08 013.7**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/GB00/04205**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 973 017.7**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 01/32835**
(86) PCT-Anmeldetag: **02.11.2000**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **10.05.2001**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **31.07.2002**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **28.01.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **02.09.2004**

(51) Int Cl.[7]: **C12N 1/04**
C12M 1/18

(30) Unionspriorität:
433356 **04.11.1999** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

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

(72) Erfinder:
REID, Mark, Hampshire BH25 5NN, GB

(74) Vertreter:
Dr. Weber, Dipl.-Phys. Seiffert, Dr. Lieke, 65183 Wiesbaden

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR GEFRIERTROCKNUNG VON VERSCHIEDENEN MIKROORGANISMEN**

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

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

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft das Gefriertrocknen mehrerer Proben verschiedener Mikroorganismen, wie Bakterien, in einem Mehrkammerformat, das bei Raumtemperatur gelagert und verwendet werden kann.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Gefriertrocknen wurde für viele Jahre bei verschiedenen Anwendungen eingesetzt, wie in der Nahrungsmittelindustrie und der pharmazeutischen Industrie. Gefriertrocknen wurde auch zur Präparation von Mikroorganismen, wie Bakterien, für eine Langzeitlagerung eingesetzt. Insbesondere Mikroorganismen-Hinterlegungsstellen, wie die American Type Culture Collection, gefriertrocknen häufig Kulturen für die Verteilung, da richtig gefriergetrocknete Mikroorganismen bei Raumtemperatur lebensfähig bleiben und ohne die Notwendigkeit von festem Kohlendioxid transportiert werden können.
[0003] Jedoch ist eine Gefriertrocknungsausrüstung zu teuer für eine alltägliche Verwendung durch Laborwissenschaftler, die üblicherweise Mikroorganismen entweder als Glycerinvorrat bei –80°C oder in flüssigem Stickstoff halten. Beide Formen der Lagerung sind relativ teuer und bergen auch das Risiko eines Verlusts der Lebensfähigkeit der Probe, wenn die Ausrüstung versagt. Trotzdem wird eine erhebliche Menge an Lagerraum in –80°C-Gefrierschränken für die Lagerung von Bakterienstämmen als Glycerinvorräte freigegeben, z.B. zur Lagerung von Bakterienkolonien, die bei Klonierungsverfahren selektiert wurden. Es besteht daher ein Bedarf, Laborwissenschaftlern Mittel zur Lagerung großer Zahlen verschiedener Mikroorganismen in einem leicht zugänglichen Format bereitzustellen, das keinen teuren Gefrierschrankraum erfordert.

Zusammenfassung der Erfindung

[0004] Wir haben nun herausgefunden, daß es möglich ist, mehrere Proben verschiedener Mikroorganismen in Mikrotiterplatten ohne Kreuzkontamination zu gefriertrocknen, wobei man Mikrotiterplatten"Bibliotheken" von Mikroorganismen erhält, die bei Raumtemperatur mit hoher Dichte gelagert werden können. Die resultierende Einsparung an teurem Gefrierschrankraum kompensiert voraussichtlich alle anfänglichen Auslagen für Gefriertrocknungsausrüstung. Darüber hinaus ist die Verwendung eines Raumtemperatur-Mikrotiterplattenformats besser kompatibel mit neuen Entwicklungen automatisierter Maschinen für die Durchmusterung von Bakterienbibliotheken, die maschinell abgenommen wurden.
[0005] Dementsprechend liefert die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Gefriertrocknen mehrerer Proben verschiedener lebensfähiger Mikroorganismen, welches die folgenden Stufen umfaßt:

(i) Bereitstellen eines Behälters mit mehreren Kammern,
(ii) Verteilen mehrerer flüssiger Proben, wobei jede Probe einen lebensfähigen Mikroorganismus enthält, in getrennte Kammern des Behälters,
(iii) Plazieren des Behälters in eine Gefriertrocknungsvorrichtung und
(iv) Gefriertrocknen der in den Kammern vorhandenen Proben unter Bedingungen, welche die Lebensfähigkeit der Mikroorganismen im wesentlichen aufrechterhalten.

[0006] Vorzugsweise ist der Behälter eine Mikrotiterplatte.
[0007] In einer bevorzugten Ausführungsform wurden die lebensfähigen Mikroorganismen vor dem Gefriertrocknen in einem Kulturmedium, das einen Träger enthält, gezüchtet, und die Mikroorganismen werden in dem Kulturmedium gefriergetrocknet.
[0008] Vorzugsweise sind die Kammern des Behälters mit sterilen Abdichtungen versehen. Besonders bevorzugt erlauben die Abdichtungen das Abnehmen eines Teils einer gefriergetrockneten Mikroorganismenprobe aus einer Kammer, während eine sterile Abdichtung aufrechterhalten wird.
[0009] Die vorliegende Erfindung liefert weiterhin einen Behälter mit mehreren Kammern, wobei jede Kammer eine lebensfähige, gefriergetrocknete Probe eines Mikroorganismus, erhalten nach dem Verfahren der Erfindung, enthält. Vorzugsweise ist der Behälter eine Mikrotiterplatte.
[0010] In einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt der Behälter weiterhin sterile Abdichtungen für jede Kammer. Vorzugsweise erlauben die sterilen Abdichtungen das Abnehmen eines Teils einer gefriergetrockneten Mikroorganismenprobe aus einer Kammer, während eine sterile Abdichtung aufrechterhalten wird.

Kurze Beschreibung der Figuren

[0011] **Fig.** 1 ist ein Diagramm, welches das prozentuale Überleben von E. coli-Stämmen, die in verschiede-

nen Trägern gefriergetrocknet sind, zeigt.
[0012] **Fig.** 2 ist ein Diagramm, welches Bakterienwachstum in verschiedenen Trägern als einen Prozentwert von demjenigen in LB zeigt.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

A. Behälter

[0013] Ein für die Verwendung gemäß der vorliegenden Erfindung geeigneter Behälter umfaßt mehrere Kammern, in welche im wesentlichen flüssige Proben abgegeben werden können. "Mehrere" bedeutet zwei oder mehr, aber vorzugsweise beträgt die Anzahl an Kammern wenigstens 6, 12 oder 24, besonders bevorzugt wenigstens 96, wie beispielsweise 384. Beispiele für geeignete Behälter umfassen Mikrotiterplatten und Mehrkammer-Gewebekulturplatten. Mikrotiterplatten sind vorzugsweise von steifer Art, eher als von flexibler Art. Spezielle Beispiele für Mikrotiterplatten umfassen Platten mit 96 und 384 Kammern, hergestellt von Nunc, Costar und Greiner, und Platten mit 96, 384 und 1536 Kammern, hergestellt von Genetix. Die "Kammer" soll z.B. eine Vertiefung in einem im wesentlichen planaren festen Substrat umfassen, die zur Aufnahme eines Volumens an Flüssigkeit geeignet ist, so daß die Flüssigkeit von den Inhalten einer benachbarten Kammer physisch getrennt gehalten werden kann.
[0014] Der Behälter ist typischerweise aus einem einzelnen Stück Kunststoff, wie Polycarbonat, durch Extrusionsformen ausgebildet. Der Behälter kann optional einen separaten Deckel aufweisen, wie es z.B. für Gewebekultur-Mehrkammerplatten üblich ist. Vorzugsweise ist der Behälter nicht im wesentlichen aus Glas hergestellt.
[0015] Nachdem die Gefriertrocknung abgeschlossen ist, wird der Behälter typischerweise abgedichtet, um zu verhindern, daß Feuchtigkeit von der gefriergetrockneten Probe absorbiert wird, und typischerweise, um die gefriergetrocknete Probe steril zu halten. Beispiele für Verfahren zum Abdichten der Behälter umfassen die Anwendung von vakuumabgedichteter Kunststoffverpackung oder Abdichten des Behälters mit Kunststoff oder einer Folie und Plazieren des abgedichteten Behälters in einem Kunststoffbeutel, vorzugsweise mit einem Trocknungsmittel, wie Silicagel. Schrumpffolienverpackung kann ebenfalls geeignet sein. Wenn der Behälter einen vorgeformten Deckel hat, kann die Lücke zwischen dem Deckel und der Basis des Behälters typischerweise mit einem elastischen Material, wie Parafilm™ oder Nescofilm™ abgedichtet sein. Darüber hinaus kann es erwünscht sein, den Behälter in einer inerten Atmosphäre, wie Stickstoff, abzudichten.
[0016] Es ist bevorzugt, sterile Abdichtungen zu verwenden, die das Abnehmen eines Teils einer Probe aus irgendeiner bestimmten Kammer erlauben, während die Integrität der verbleibenden Probe in der Kammer bewahrt wird. Zum Beispiel kann die sterile Abdichtung ein im wesentlichen für Feuchtigkeit nicht permeables Material umfassen, welches erlaubt, daß eine Nadel oder eine Spitze durch die Membran und in Kontakt mit der gefriergetrockneten Probe eingeführt wird, welches aber, wenn die Nadel oder Spitze entfernt wird, erneut so abdichtet, daß eine zusammenhängende, für Feuchtigkeit im wesentlichen nicht permeable Abdichtung erneut ausgebildet wird. Das Material wird typischerweise elastische Eigenschaften haben. Ein geeignetes Material umfaßt Gummi, wie den Gummi, der zum Abdichten von Gefäßen für gefriergetrocknete pharmazeutische Produkte verwendet wird. Die Abdichtung kann als eine zusammenhängende Lage, die mehrere Kammern abdichtet, oder für jede Kammer individuell bereitgestellt werden.

B. Mikroorganismen

[0017] Der Begriff "Mikroorganismus" umfaßt Prokaryonten und Eukaryonten, wie Hefe, Pilze und Tier- und Pflanzenzellen, die in der Lage sind, in Kultur vermehrt zu werden, wie immortalisierte Zellinien. Beispiele für Prokaryonten umfassen Eubakterien und Archaebakterien. Eubakterien umfassen Gram-negative Bakterien, wie Escherichia sp. (z.B. E. coli), Neisseria sp., Campylobacter sp., Haemophilus sp., Streptococcus sp. und Staphylococcus sp., und Gram-positive Bakterien, wie Bacillus sp. (z.B. B. subtilis). Vorzugsweise ist der Mikroorganismus ein Eubakterium.
[0018] Mikroorganismen werden typischerweise vor dem Gefriertrocknen in Standardkulturmedium, das für den speziellen Typ von Mikroorganismus geeignet ist, wie LB-Medium für E. coli, gezüchtet. In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden die Mikroorganismen in der Gegenwart eines Trägers, der zur Erhöhung des Glasübergangspunktes (Tg) der Probe verwendet wird, gezüchtet, wie es nachfolgend diskutiert wird. Da diese Träger häufig das osmotische Potential des Wachstumsmediums auf ungeeignete Niveaus erhöhen, kann es notwendig sein, die Zusammensetzung des Wachstumsmediums zum Ausgleich einzustellen, z.B. durch Erniedrigung des Salzgehaltes.

C. Gefriertrocknung

[0019] Gefriertrocknung umfaßt das Entfernen von Wasser oder anderem Lösungsmittel aus einem gefrorenen Produkt mittels eines Verfahrens, das als Sublimation bezeichnet wird. Sublimation findet statt, wenn eine gefrorene Flüssigkeit direkt in den gasförmigen Zustand übergeht, ohne die flüssige Phase zu durchlaufen. Gefriertrocknung ist eine Routinetechnik, die auf dem Gebiet angewendet wird, und geeignete Ausrüstung ist von kommerziellen Anbietern, wie Labconco (Kansas City, Missouri, USA) erhältlich. Der Vollständigkeit halber wird jedoch nachfolgend eine kurze Beschreibung des Gefriertrocknungsprozesses angegeben, von der ein Teil auf der Information beruht, die in "A Guide to Freeze-drying for the Laboratory", einer Industrie-Service-Veröffentlichung von Labconco, 1998, angegeben wird. Siehe auch Franks, F. (1994), Effective freeze-drying: a combination of physics, chemistry, engineering and economics, Proc. Inst. Refrigeration 91: 32–39.

[0020] Das Gefriertrocknungsverfahren besteht aus drei Stufen: Vorfrieren, primäres Trocknen und sekundäres Trocknen.

[0021] Vorfrieren: Das Material, welches gefriergetrocknet werden soll, muß in geeigneter Weise vorgefroren werden. Beim Gefriertrocknen ist es wichtig, das Produkt unterhalb des Glasübergangspunktes (Tg) vorzufrieren. Während die Temperatur der Probe erniedrigt wird, gefriert das Wasser in der Probe, wobei die Konzentration an gelösten Stoffen in der Probe und die Viskosität des Gemisches erhöht werden. Während die Viskosität steil erhöht wird, vermindert sich die Gefrierrate und stoppt möglicherweise gänzlich. Das zurückbleibende Gemisch, einschließlich des Eises, durchläuft einen Glasübergang, wobei die Viskosität um viele Größenordnungen in einem engen Temperaturintervall erhöht wird. Strukturell liegt die Probe dann in der Form eines amorphen Feststoffs vor und wird als ein Glas beschrieben. Dieser Übergang von einer übersättigten, gefrorenen wäßrigen Lösung sehr hoher Viskosität zu einem brüchigen Feststoff wird in der Praxis durch eine Glasübergangstemperatur (T_g) gekennzeichnet. Die T_g für eine Probe kann nach Methoden, die auf dem Gebiet bekannt sind, wie differentielle Abtastkalorimetrie oder thermomechanische Analyse, bestimmt werden.

[0022] Die T_g für Proben von Mikroorganismen in Standardkulturmedium ist jedoch häufig zu niedrig für praktische Zwecke und muß durch die Zugabe von Trägern erhöht werden. Geeignete Träger umfassen Glucose, Sucrose, Maltose, Lactose, Trehalose, Raffinose, Maltotriose, Stachyose und Dextran. Andere geeignete Träger sind auf dem Gebiet bekannt. Vorzugsweise wird der Träger in solch einer Menge hinzugefügt, daß die T_g auf etwa –20 bis –40°C erhöht wird. Die Mengen können zwischen Arten von Proben variieren, aber sie können von dem Fachmann auf dem Gebiet einfach bestimmt werden. Eine geeignete Menge beträgt typischerweise von 5 bis 15% w/v, wie beispielsweise von 7,5 bis 12,5% w/v.

[0023] Primäres Trocknen: Nach dem Vorfrieren der Probe müssen Bedingungen eingestellt werden, bei welchen Eis aus dem gefrorenen Produkt durch Sublimation entfernt werden kann. Proben werden typischerweise deutlich unter ihre T_g vorgefroren, und dann wird die Temperatur unmittelbar unter die T_g erhöht. Die Proben werden dann verminderem Druck in einer Vakuumkammer ausgesetzt. An diesem Punkt beginnt der Gefriertrocknungsprozeß.

[0024] Sekundäres Trocknen: Nachdem das primäre Einfrieren abgeschlossen ist, ist das gesamte gefrorene Wasser sublimiert. Jedoch ist nicht gefrorene, gebundene Feuchtigkeit nach wie vor in dem Produkt vorhanden. Fortgesetztes Trocknen bei einer höheren Temperatur ist erforderlich, um die Restfeuchtigkeit durch Verdampfen auszutreiben.

[0025] Mehrere Arten von Gefriertrocknungsverfahren sind derzeit in der Anwendung, einschließlich des Verteilerverfahrens, des Batch-Verfahrens und des Masse-Verfahrens. Gemäß der vorliegenden Erfindung ist es bevorzugt, eine Vorrichtung zu verwenden, die für das Batch-Verfahren geeignet ist, wie beispielsweise einen Kolonnentrockner.

[0026] Proben von Mikroorganismen können vor dem Gefriertrocknen in dem Behälter gezüchtet werden, oder sie können in einem separaten Gefäß gezüchtet und in die Kammern des Behälters verteilt werden. Jede Kammer des Behälters kann einen anderen Mikroorganismus enthalten, wie beispielsweise einen unterschiedlichen Klon aus einer Bibliothek, ohne ein signifikantes Risiko von Kreuzkontamination.

[0027] Wenn ein geeigneter Träger noch nicht hinzugefügt wurde, dann wird er nun zu den Proben in den Kammern oder vor der Übertragung in die Kammern zu der Probe hinzugefügt und gemischt. Wenn der Träger hinzugefügt wurde, wenn er nicht bereits hinzugefügt war, kann der Behälter bei einer Temperatur unterhalb der T_g (z.B. in einem –80°C-Gefrierschrank) eingefroren und bei dieser Temperatur gehalten werden, bis er gefriergetrocknet wird, wenn er nicht unmittelbar gefriergetrocknet werden kann. Der Behälter wird dann in die Gefriertrocknungsvorrichtung gestellt und unter Anwendung von Standardtechniken gefriergetrocknet. Wenn die Gefriertrocknung abgeschlossen ist, wird der Behälter typischerweise abgedichtet, wie es oben beschrieben ist. Der Behälter kann dann bei Raumtemperatur oder, je nach Anforderung, unterhalb von Raumtemperatur gehalten werden, so daß die Lebensfähigkeit der Mikroorganismen erhalten bleibt.

[0028] Der Begriff "Lebensfähigkeit" bezeichnet die Fähigkeit einer Kultur von Mikroorganismen zu wachsen. Zum Beispiel besteht eine "lebensfähige" Probe aus lebenden Organismen, die zu Metabolismus und Wachs-

tum in der Lage sind. Folglich ist eine gefriergetrocknete Probe lebensfähig, wenn sie beispielsweise durch Rehydratisierung wiederbelebt und in einem geeigneten Medium gezüchtet werden kann. Vorzugsweise bleibt die Probe für wenigstens einen Monat, vorzugsweise wenigstens zwei, drei oder sechs Monate, besonders bevorzugt wenigstens ein Jahr bei Raumtemperatur (hierin zu Zwecken der Erfindung als 18°C definiert) lebensfähig.

[0029] Im allgemeinen sind Frostschutzmittel, wie DMSO und Glycerin, die häufig zum Schutz der Zellen vor Beschädigung während des Einfrierprozesses verwendet werden, bei dem Verfahren der Erfindung nicht erforderlich, sie können aber hinzugefügt werden, wenn es notwendig ist. Vorzugsweise sind Frostschutzmittel in dem Probenmedium enthalten, besonders bevorzugt ist Glycerin vor dem Einfrieren in dem Probenmedium enthalten. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist wenigstens 0,1% Glycerin v/v, vorzugsweise wenigstens 0,2%, enthalten. Typischerweise werden nicht mehr als 10% Glycerin hinzugegeben, vorzugsweise nicht mehr als 5 oder 1% Glycerin.

D. Anwendungen

[0030] Das Verfahren der Erfindung kann dazu verwendet werden, mehrere Proben von Mikroorganismen, wie Bibliotheken von Klonen, die von einer Agar-Platte für eine Verwendung zu einem späteren Zeitpunkt abgenommen wurden, zu gefriertrocknen. Es ist abzusehen, daß das Verfahren der Erfindung zum Erhalt von gefriergetrockneten Bibliotheken von Mikroorganismen, die durch Klonierungstechniken erhalten wurden, die auf dem Gebiet der Molekularbiologie eingesetzt werden, geeignet sein wird. Die Bibliotheken können anschließend in weiteren Durchmusterungstechniken eingesetzt werden. Zum Beispiel können Bakterienkolonien auf der Grundlage dessen, daß sie ein rekombinantes Plasmid enthalten, welches ein Antibiotikaresistenzgen codiert, von Antibiotikum enthaltenden Agar-Platten abgenommen, in Mikrotiterplatten gezüchtet und dann gefriergetrocknet werden. Die gefriergetrockneten Proben können dann anschließend beispielsweise durch Rehydratisierung wiederbelebt und in Nukleinsäuredetektionsverfahren zur Identifizierung spezieller Klone eingesetzt werden. Alternativ oder zusätzlich können ausgewählte Klone kultiviert und für spätere molekulare Charakterisierung gefriergetrocknet werden.

[0031] Teilweise oder vollständig vorselektierte Bibliotheken von Klonen, die in einem Mehrkammerplattenformat gefriergetrocknet sind und welche lebensfähig bleiben, wenn sie bei Raumtemperatur gelagert werden, können ein äußerst zweckmäßiges Mittel zum Verteilen von Bibliotheken von Klonen auf einer kommerziellen und/oder nicht-kommerziellen Basis gegenüber einem einfachen Bereitstellen von nicht vorselektierten Bibliotheken in einem einzelnen Gefäß, das der Forscher dann selbst durchmustern müßte, sein.

[0032] Die Erfindung wird nun unter Bezugnahme auf die Beispiele, welche nur erläuternd und nicht beschränkend sind, beschrieben.

BEISPIELE

Untersuchung der Lebensfähigkeit von gefriergetrockneten Bakterien

Methoden

[0033] Vier Stämme von E. coli (DH10B, JM109, XL2 und XL10), transformiert mit pUC18/19, wurden in LB-Medium, das Ampicillin (50 µg × ml^{-1}) enthielt, gezüchtet. Ein aliquoter Teil jeder Kultur wurde auf 8% Glycerin gebracht und bei –80°C als eine Positivkontrolle gelagert. Aliquote Teile von 5 ml der Zellen wurden durch Zentrifugieren bei 4000 × g für 5 Minuten pelletiert und in 5 ml LB-Medium resuspendiert. Geeignete Verdünnungen in LB-Medium der resuspendierten Zellen wurden auf LB-Agar, der Ampicillin (50 µg × ml^{-1}) enthielt, zur Bestimmung der überlebensfähigen Zellzahl ausplattiert.

[0034] Aliquote Teile von 5 ml von jedem der E. coli-Stämme wurden durch Zentrifugation bei 4000 × g für 5 Minuten pelletiert, in 5 ml LB, versetzt mit jeweils einem von 13 Trägern (Diagramm 1), resuspendiert, und aliquote Teile von 50 µl wurden in 384-Kammer-Platten unter Verwendung einer separaten Platte für jeden Stamm pipettiert. Als eine Kontrolle für eine Kontamination von Kammer zu Kammer wurden 50 µl LB, versetzt mit jeweils einem Träger, in eine Kammer pipettiert, die zu einer benachbart war, die eine Kultur enthielt. Eine Negativkontrollplatte wurde mit aliquoten Teilen von 50 µl LB, versetzt mit jeweils einem Träger, die in einer Reihe von Kammern als eine Kontrolle für bakterielle Kontamination der Trägerlösung pipettiert wurden, hergestellt. Die Platten wurden bei –80°C eingefroren und zur Gefriertrocknung zu einer Gefriertrocknungseinrichtung transportiert. Nach dem Gefriertrocknen wurden die Platten bei 4°C in abgedichteten Beuteln für 17 Tage vor der Untersuchung der Überlebensfähigkeit gelagert.

[0035] Für jede Platte wurden 50 µl steriles H_2O zu einer Kammer für jedes Experiment hinzugefügt, zuzüglich zwei der Kontrollkammern von jeder der Bakterien enthaltenden Platten, und bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert, um die gefriergetrocknete Kultur zu rehydratisieren. Die Kulturen wurden in LB-Medium, das

Ampicillin (50 µg × ml^{-1}) enthielt, in Reihe verdünnt, und 100 µl der geeigneten Verdünnung wurde auf LB-Agar, der Ampicillin (50 µg × ml^{-1}) enthielt, ausplattiert, um die überlebensfähige Zellzahl zu bestimmen.

Ergebnisse

[0036] **Fig.** 1 (siehe auch Tabellen 1 und 2) zeigt den Prozentsatz an Überleben für jeden Stamm von Bakterien in jedem der Träger. Unter den acht Kontrollen für eine Kontamination von Kammer zu Kammer waren alle bis auf eine negativ, und alle Proben von der Negativkontrollplatte waren negativ.

Schlußfolgerungen

[0037] Obwohl ein gewisses Maß an experimentellem Fehler in den Ergebnissen vorlag, ist klar, daß PVP als ein Träger für die getesteten E. coli-Stämme nicht geeignet ist. Die Träger, welche die besten Ergebnisse für alle Bakterienstämme lieferten, waren 10% Sucrose + 0,5% Glycerin und 10% Trehalose + 0,25% Glycerin.

[0038] Die Bakterien wurden anfänglich in Standardmedium kultiviert und nicht in dem Träger, in dem sie gefriergetrocknet werden sollten, weil frühere Arbeiten gezeigt hatten, daß bakterielles Wachstum in LB + 10% Sucrose oder 10% Trehalose gehemmt wurde. Dies kann auf osmotische Effekte zurückzuführen sein. Jedoch weisen die in **Fig.** 2 gezeigten Ergebnisse darauf hin, daß tatsächlich zufriedenstellendes bakterielles Wachstum in der Gegenwart aller drei getesteter Träger, Lactose, Sucrose und Trehalose stattfindet. Insbesondere wurde das Wachstum nicht besonders durch LB + 10% Lactose beeinflußt, wahrscheinlich weil die Gegenwart eines intakten lacZ-Gens auf dem pUC18/19-Plasmid es den Bakterien erlaubte, Lactose zu metabolisieren, obwohl das lacZ-Gen typischerweise in der Praxis, wenn man mit rekombinanten Plasmiden arbeitet, zerstört ist. Es sollte jedoch möglich sein, die osmotischen Effekte des Trägers auszugleichen, indem man das Standardmedium zum Ausgleich modifiziert.

[0039] Die in **Fig.** 1 gezeigten Ergebnisse demonstrieren, daß alle vier getesteten Bakterienstämme ein Gefriertrocknen in 384-Kammer-Platten überleben können. Darüber hinaus ist dieses Format, obwohl es eine relativ hohe Dichte an verschiedenen Proben aufweist, in der Lage, die Probenintegrität beizubehalten (Kreuzkontamination zu vermeiden).

Tabelle 1

Stamm	Träger*	Verdünnung	Kolonienzahl	Zellen/ml	% Überleben
JM109	1	1,00E-06	0	0,00E+01	0,00
JM109	3	1,00E-06	0	0,00E+01	0,00
JM109	5	1,00E-06	0	0,00E+01	0,00
JM109	7	1,00E-06	0	0,00E+01	0,00
JM109	9	1,00E-06	80	8,00E+08	40,00
JM109	11	1,00E-06	86	8,60E+08	43,00
JM109	13	1,00E-06	82	8,20E+08	41,00
JM109	15	1,00E-06	127	1,27E+09	63,50
JM109	17	1,00E-06	181	1,81E+09	90,50
JM109	19	1,00E-06	159	1,59E+09	79,50
JM109	21	1,00E-06	92	9,20E+08	46,00
JM109	23	1,00E-06	157	1,57E+09	78,50
JM109	24	1,00E-06	124	1,24E+09	62,00
JM109	+ve	1,00E-06	184	2,19E+09	109,50
JM109 -veC	1	1,00E-01	0	0,00E+01	
JM109 -veC	9	1,00E-01	0	0,00E+01	
XL2	1	1,00E-06	0	0,00E+01	0,00
XL2	3	1,00E-06	0	0,00E+01	0,00
XL2	5	1,00E-06	0	0,00E+01	0,00
XL2	7	1,00E-06	0	0,00E+01	0,00
XL2	9	1,00E-06	88	8,80E+08	67,69
XL2	11	1,00E-06	110	1,10E+09	84,62
XL2	13	1,00E-06	105	1,05E+09	8ß,77
XL2	15	1,00E-06	125	1,25E+09	96,15
XL2	17	1,00E-06	122	1,22E+09	93,85
XL2	19	1,00E-06	111	1,11E+09	85,38
XL2	21	1,00E-06	134	1,34E+09	103,08
XL2	23	1,00E-06	119	1,19E+09	91,54
XL2	24	1,00E-06	130	1,30E+09	100,00
XL2	+ve	1,00E-06	91	1,08E+09	83,08
XL2 -veC	11	1,00E-01	0	0	
XL2 -veC	15	1,00E-01	0	0	
XL10	1	1,00E-06	0	0,00E+01	0,00
XL10	3	1,00E-06	0	0,00E+01	0,00
XL10	5	1,00E-06	0	0,00E+01	0,00
XL10	7	1,00E-06	0	0,00E+01	0,00
XL10	9	1,00E-06	39	3,90E+08	32,50
XL10	11	1,00E-06	76	7,60E+08	63,33
XL10	13	1,00E-06	66	6,60E+08	55,00
XL10	15	1,00E-06	75	7,50E+08	62,50
XL10	17	1,00E-06	67	6,70E+08	55,83
XL10	19	1,00E-06	74	7,40E+08	61,67
XL10	21	1,00E-06	52	5,20E+08	43,33

XL10	23	1,00E-06	78	7,80E+08	65,00
XL10	24	1,00E-06	64	6,40E+08	53,33
XL10	+ve	1,00E-06	96	1,14E+09	95,00
XL10 -veC	13	1,00E-01	0	0,00E+01	
XL10 -veC	23	1,00E-01	2	2,00E+02	
DH10B	1	1,00E-06	0	0,00E+01	0,00
DH10B	3	1,00E-06	0	0,00E+01	0,00
DH10B	5	1,00E-06	0	0,00E+01	0,00
DH10B	7	1,00E-06	0	0,00E+01	0,00
DH10B	9	1,00E-06	10	1,00E+08	18,18
DH10B	11	1,00E-06	17	1,70E+08	30,91
DH10B	13	1,00E-06	12	1,20E+08	21,82
DH10B	15	1,00E-06	14	1,40E+08	25,45
DH10B	17	1,00E-06	24	2,40E+08	43,64
DH10B	19	1,00E-06	54	5,40E+08	98,18
DH10B	21	1,00E-06	16	1,60E+08	29,09
DH10B	23	1,00E-06	39	3,90E+08	70,91
DH10B	24	1,00E-06	15	1,50E+08	27,27
DH10B	+ve	1,00E-06	66	7,86E+08	142,91
DH10B -veC	9	1,00E-01	0	0	
DH10B -veC	11	1,00E-01	0	0	

*Zusammensetzung des Trägers ist in Tabelle 2 angegeben.

Tabelle 2

Träger		DH109B	JM109	XL2	XL10
1	10% PVP	0,00	0,00	0,00	0,00
3	10% PVP + 1% Glycerin	0,00	0,00	0,00	0,00
5	5% PVP	0,00	0,00	0,00	0,00
7	5% PVP + 0,25% Glycerin	0,00	0,00	0,00	0,00
9	10% Lactose	18,18	40,00	67,69	32,50
11	10% Lactose + 0,5% Glycerin	30,91	43,00	84,62	63,33
13	5% Lactose	21,82	41,00	80,77	55,00
15	5% Lactose + 0,125% Glycerin	25,45	63,50	96,15	62,50
17	10% Sucrose	43,64	90,50	93,85	55,83
19	10% Sucrose + 0,5% Glycerin	98,18	79,50	85,38	61,67
21	10% Trehalose	29,09	46,00	103,08	43,33
23	10% Trehalose + 0,25% Glycerin	70,91	78,50	91,54	65,00
24	5% Trehalose	27,27	62,00	100,00	53,33
+ve	+veC	142,91	109,50	83,08	95,00

Patentansprüche

1. Verfahren zum Gefriertrocknen mehrerer Proben verschiedener lebensfähiger Mikroorganismen, welches die folgenden Stufen umfaßt:
(i) Bereitstellen eines Behälters mit mehreren Kammern,
(ii) Verteilen mehrerer flüssiger Proben, wobei jede Probe einen lebensfähigen Mikroorganismus enthält, in getrennte Kammern des Behälters,
(iii) Plazieren des Behälters in eine Gefriertrocknungsvorrichtung und
(iv) Gefriertrocknen der in den Kammern vorhandenen Proben unter Bedingungen, welche die Lebensfähigkeit der Mikroorganismen im wesentlichen aufrechterhalten.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Behälter eine Mikrotiterplatte ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Proben einen Träger enthalten.

4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei der Träger aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Lactose, Sucrose und Trehalose besteht.

5. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die lebensfähigen Mikroorganismen vor dem Gefriertrocknen in einem Kulturmedium, das den Träger enthält, gezüchtet wurden und die Mikroorganismen in dem Kulturmedium gefriergetrocknet werden.

6. Verfahren nach Anspruch 1, welches weiterhin Bereitstellen der Kammern des Behälters mit sterilen Abdichtungen umfaßt.

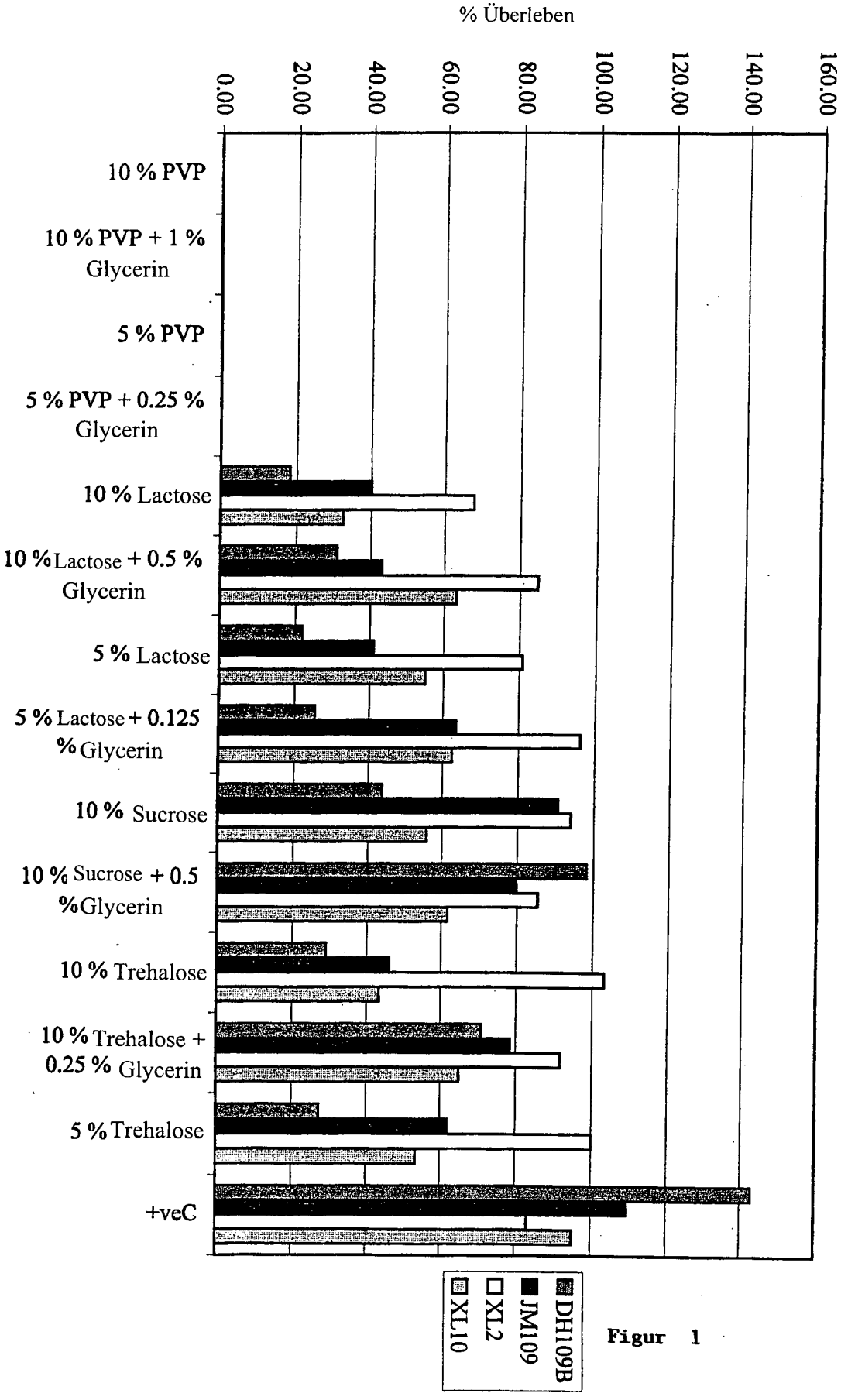
7. Behälter mit mehreren Kammern, wobei jede Kammer eine nach dem Verfahren gemäß Patentanspruch 1 erhaltene lebensfähige, gefriergetrocknete Probe eines Mikroorganismus enthält.

8. Behälter nach Anspruch 7, welcher eine Mikrotiterplatte ist.

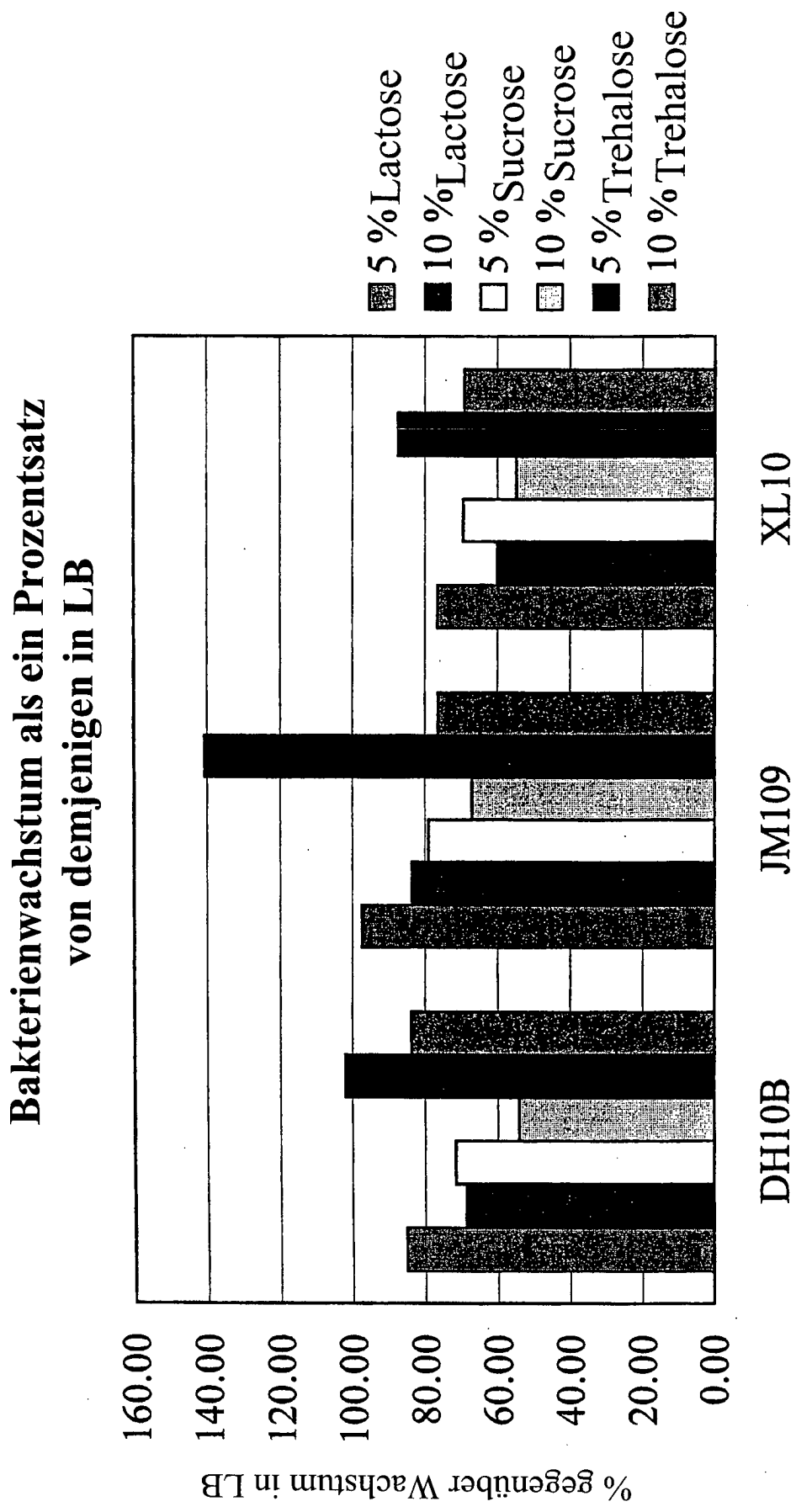
9. Behälter nach Anspruch 7, welcher weiterhin für jede Kammer sterile Abdichtungen umfaßt.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



Figur 1


Bakterienwachstum als ein Prozentsatz von demjenigen in LB
% gegenüber Wachstum in LB
160.00
140.00
120.00
100.00
80.00
60.00
40.00
20.00
0.00
DH10B
JM109
XL10
5 % Lactose
10 % Lactose
5 % Sucrose
10 % Sucrose
5 % Trehalose
10 % Trehalose

Figur 2