



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) **EP 0 846 774 A2**

(12) **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(43) Veröffentlichungstag:
10.06.1998 Patentblatt 1998/24

(51) Int. Cl.⁶: **C12Q 1/68**, B01L 3/00

(21) Anmeldenummer: **97119863.5**

(22) Anmeldetag: **13.11.1997**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC
NL PT SE**
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: **07.12.1996 DE 19650880**

(71) Anmelder:
**GSF-Forschungszentrum für Umwelt und
Gesundheit, GmbH
85764 Oberschleissheim (DE)**

(72) Erfinder:
• **Schughart, Klaus, Dr.
79341 Kenzingen (DE)**
• **Günther, Thomas
79102 Freiburg (DE)**
• **Dietz, Wolfgang
85375 Neufahrn (DE)**
• **Spörle, Ralf
80937 München (DE)**

(54) **Vorrichtung zur Durchführung von Genexpressionsanalysen**

(57) Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Durchführung von Genexpressionsanalysen bestehend aus mindestens zwei Reaktionskammern, welche auf einer Seite hermetisch verschließbar sind.

Aufgabe der Erfindung ist es, eine Vorrichtung zur Verfügung zu stellen, mit deren Hilfe routinemäßige Abläufe der ISH parallel durchgeführt werden können.

Gelöst wird diese Aufgabe durch einen Behälter und einen Deckel, einen Einsatz mit den Reaktionskammern, Böden, welche die auf der anderen Seite liegenden Öffnungen der Reaktionskammern verschließen, wobei die Böden einen ungehinderten Flüssigkeitsaustausch ermöglichen und Verschlüsse zur hermetischen Abdichtung, der den Böden gegenüber liegenden Öffnungen der Reaktionskammern.

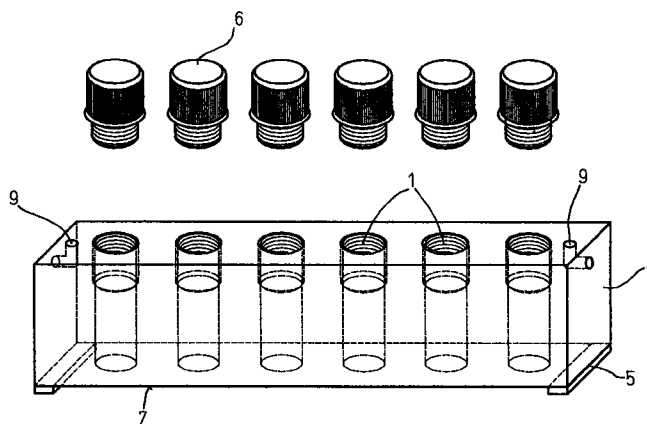


Fig. 1

EP 0 846 774 A2

Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Durchführung von Genexpressionsanalysen nach dem Oberbegriff des Patentanspruchs 1, wie sie aus Rosen, B. et al. (1993). Whole mount in situ hybridisation in the mouse embryo: gene expression in three dimensions. TIG 9 162- 167, bekannt ist.

Die Analyse von Genexpressionsmustern mit Hilfe der sogenannten In-Situ-Hybridisierung (ISH) ist zu einer der wichtigsten Methoden in der modernen Biologie geworden, und es ist abzusehen, daß diese Technik künftig auch in der Medizin eine bedeutende Rolle spielen wird. Bei einer ISH werden mit spezifischen, speziell markierten Sonden die Orte der Genaktivität in ganzen Embryonen, Organen oder Gewebeproben (hier als Probe bezeichnet) nachgewiesen.

Diese Technik ist sehr arbeitsintensiv und erstreckt sich über mehrere Tage, da viele Inkubationen und Waschschrte notwendig sind. Die einzelnen Schritte wurden bisher in Reagenzröhrchen durchgeführt, und es waren für die verschiedenen Sonden und Proben jeweils ein eigenes Röhrchen erforderlich. Aus diesem Grund war es nur mit erheblichem Aufwand möglich, eine große Anzahl von Proben mit vielen verschiedenen Sonden gleichzeitig zu hybridisieren.

Bei einer ISH sind eine Reihe von experimentellen Anforderungen zu erfüllen. Zunächst werden alle Proben in der gleichen Weise für die ISH vorbehandelt. Bei der eigentlichen ISH ist es dann erforderlich, Gruppen von Proben mit jeweils verschiedenen Sonden getrennt zu inkubieren. Anschließend werden alle Proben mit den gleichen Puffern gewaschen. Bei den Waschschrten ist es erforderlich, daß die einzelnen Probengruppen, die mit verschiedenen Sonden hybridisiert wurden, weiterhin getrennt bleiben.

Aufgabe der Erfindung ist es, eine Vorrichtung der e. g. Art zur Verfügung zu stellen, mit deren Hilfe routinemäßige Abläufe der ISH parallel durchgeführt werden können.

Gelöst wird diese Aufgabe durch die Merkmale des Patentanspruchs 1. die Unteransprüche beschreiben vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung erlaubt, in einem wesentlich vereinfachten Verfahren, die Hybridisierung vieler Probengruppen mit mehreren verschiedenen Sonden zur gleichen Zeit durchzuführen. Dies führt zu einer enormen Zeitersparnis, da der Experimentator nur noch einen Bruchteil der bisherigen Zeit für die einzelnen Prozeduren aufwenden muß.

Die Erfindung wird im folgenden anhand eines Ausführungsbeispiels mit Hilfe der Figuren näher erläutert. Dabei zeigt die Figur 1 den Einsatz und die Figur 2 Gehäuse mit Deckel der Vorrichtung.

Die Fig. 1 zeigt den quaderförmigen Einsatz 4 der in diesem Fall beispielsweise sechs Reaktionskammern enthält. An der Unterseite des Einsatzes 4 ist ein mit dem Boden verklebtes Kunststoffnetz 7 angedeutet, das die

Böden der Reaktionskammern 1 bildet. An der Unterseite befinden sich auch die Abstandshalter 5. Die Reaktionskammern 1 sind oben mit Gewinden versehen in die die Verschlüsse 6 eingeschraubt werden können. Die Dichtung zwischen den Verschlüssen 6 und dem Einsatz 4 erfolgt beispielsweise mit Hilfe von Dichtungen, hier nicht dargestellt. Die Oberseite des Einsatzes enthält Ausnehmungen 9 zum einsetzen von Hebegriffen.

Die Fig. 2 zeigt den Behälter 2 der eine quaderförmige Ausnehmung zur Aufnahme des Einsatzes 4 hat. Der obere Rand des Behälters 2 enthält eine Nut 10 zur Aufnahme eines Dichtrings, hier nicht dargestellt. An der Oberseite des Behälters sind an den Schmalseiten zwei Ausleger angeklebt, die Gewindebohrungen zur Befestigung des Deckels 3 tragen. Der Deckel 3 enthält ebenfalls Gewindebohrungen zur Aufnahme von hinterdrehten Rändelschrauben zum dichten Verschuß von Behälter 2 und Deckel 3.

Statt der Quaderform können für Behälter 2, Deckel 3 und Einsatz 4 auch andere Formen wie z. B. eine Kreisscheibe verwendet werden.

Die Proben werden für die ISH in einzelne Reaktionskammern 1 eines Einsatzes 4 gelegt. Da die Reaktionskammern 1 auf der Unterseite mit einem Netz 7 verschlossen sind, verbleiben die Proben in den Reaktionskammern 1, können aber alle mit derselben Lösung behandelt werden. Zur Inkubation der Proben mit den Lösungen wird der gesamte Einsatz 4 in einen Behälter 2 eingeführt, welche die entsprechende Lösung enthält. Zum Wechseln der Lösungen kann der gesamte Block 4 in ein zweiten Behälter 2 mit der neuen Lösung überführt werden, oder die Lösung im Behälter 2 ausgetauscht werden. Der Einsatz 4 kann dabei zwischenzeitlich auf die sterile Innenseite des Deckels 3 abgestellt werden. Auf diese Weise werden alle Proben in der gleichen Weise behandelt, die einzelnen Probengruppen bleiben aber getrennt.

Eine Trennung von Probengruppen (nach ihrer Herkunft und Hybridisierung mit unterschiedlichen Sonden) ist bei einer ISH besonders wichtig. So sollen z. B. Proben von Wildtyp-Embryonen (oder -Gewebe) und von Mutanten-Embryonen (oder -Gewebe) auf Unterschiede in der Genaktivität hin untersucht werden. Im Verlauf der ISH-Prozedur müssen natürlich die Wildtyp- und Mutanten-Embryonen (-Gewebe) stets getrennt bleiben, um anschließend Unterschiede zwischen beiden Gruppen festzustellen.

Innerhalb einer Gruppe (Wildtyp bzw. Mutante) können weitere Sub-Gruppen gebildet werden: Z. B. eine Gruppe von Wildtyp-Embryonen, die Embryonen aus drei verschiedenen Entwicklungsstadien enthält, die alle mit einer Gensonde A hybridisiert werden. Eine zweite Gruppe könnte aus Embryonen der gleichen Entwicklungsstufen bestehen, die aber mit der Gensonde B zu hybridisieren sind.

Aus diesem Grund ist es deshalb für den Experimentator extrem wichtig, gleich zu Beginn des ISH-

Experimentes, Probengruppen zusammenstellen zu können, die im weiteren Verlauf der Analyse getrennt bleiben. Trotzdem bleibt die Notwendigkeit, alle Probengruppen auf die gleiche Weise zu behandeln, damit konstante Bedingungen (für Wildtyp und Mutanten-Embryonen und -Gewebe) geschaffen werden.

Die Vorrichtung erfüllt beide Erfordernisse und erlaubt gleichzeitig eine wesentlich einfachere und schnellere Handhabung. Da die einzelnen Schritte schneller abgewickelt werden können, bedeutet dies für den Experimentator eine enorme Zeitersparnis.

Bei dem bisherigen Arbeitsablauf mußten z.B. bei der Vorbereitung und den anschließenden Hybridisierungs- und Waschschritten von 10 Probengruppen, alle 10 Gruppen in 10 verschiedene, mit Schraubdeckeln verschlossene, Röhrchen überführt und getrennt behandelt werden. Dazu mußte jedes Röhrchen einzeln aufgeschraubt, die Lösung vorsichtig entfernt, die neue Lösung hinzugefügt und das Röhrchen wieder verschlossen werden. Diese Schritte sind nun derart vereinfacht, daß der gesamte Einsatz in einen Behälter mit neuer Lösung überführt wird, bzw. die Lösung in dem Behälter ausgetauscht wird.

Für die eigentliche ISH wird nun zu jeder Probengruppe (die sich in verschiedenen Reaktionskammern 1 befinden) eine jeweils andere Sonde hinzugegeben. Dabei dürften die Lösungen aus verschiedenen Reaktionskammern nicht miteinander vermischt werden. Zu diesem Zweck werden die oberen Öffnungen der Reaktionskammern 1 mit Verschlüssen 6 hermetisch abgedichtet, der gesamte Einsatz 4 umgedreht und umgekehrt in den Behälter 2 gesetzt. Damit befinden sich nun die mit dem Netz 7 verschlossenen Seiten der Reaktionskammern 1 oben, und zu den einzelnen Gruppen von Proben kann nun jeweils die gewünschte Sonde hinzugefügt werden, ohne daß Sonden in einer Reaktionskammer sich mit Sonden in anderen Kammern 1 vermischen.

Anschließend erfolgt die eigentliche Hybridisierung der Proben mit der Sonde bei hoher Temperatur. Hierbei ist es wichtig, daß keine Flüssigkeit verdampft und es so zu einer Konzentrierung von Salzen in der Hybridisierungslösung kommt. Dieses Problem ist bei derart gelöst, daß der Behälter 2, in dem sich der Einsatz 4 mit den Reaktionskammern 1 befindet, mit einem Verschuß abgedichtet wird. Möglich sind hier neben Rändelschrauben auch Filmschaniere, Schrauben und Klemmen mit Federbügeln oder Spannverschlüsse, die über Federdruck arbeiten. Dadurch entsteht in dem gesamten Behälter (einschließlich der Reaktionskammern) ein gasgesättigter Raum.

Die Hybridisierung erfolgt in Formaldehyd enthaltender Lösung und bei hohen Temperaturen. Dies stellt besondere Anforderungen an die verwendeten Materialien und Klebstoffe. Zur Konstruktion wurde deshalb Plexiglas verwendet, und ein spezieller Klebstoff entwickelt und verwendet, der den erforderlichen Ansprüchen genügt. Die verwendeten Materialien müssen

Temperaturen von 70°C standhalten und physiologisch unbedenklich sein. Neben Plexiglas ist hier auch die Verwendung von Edelstahl oder Teflon möglich.

Die Herstellung der ISH-Sonden ist verhältnismäßig teuer, und die Volumina der Waschlösungen sollten nur so groß sein, wie es für den entsprechenden Versuch erforderlich ist. Deshalb ist es notwendig, daß bei der Hybridisierung nicht zu große Volumina eingesetzt wird. Vorrichtung ist so konstruiert, daß die gleiche Menge an Hybridisierungslösung einsetzbar ist, wie dies zuvor mit einzelnen Reagenzgefäßen erforderlich war. Dies wird dadurch erreicht, daß der Durchmesser der Bohrungen (Reaktionskammern 1) dem der üblicherweise verwendeten Reagenzgefäßen von 12mm entspricht.

Je nach Bedarf kann die Konstruktion aber so variiert werden, daß für größere Proben der Durchmesser vergrößert, bzw. für kleineren Proben verringert wird. Die Vorrichtung kann je nach Bedarf in verschiedenen Größen angefertigt werden. Hierzu wurden Apparaturen mit 6, 12 oder 24 Reaktionskammern als Prototypen getestet. Beim Einsatz in Screening-Prozessen sind auch Größen mit mehr Reaktionskammern möglich. Bei Verwendung zur individuellen Hybridisierung können auch Einsätze mit lediglich 2 Reaktionskammern verwendet werden. Auf diese Weise ist es möglich, die Volumina der verwendeten Lösungen auf ein Minimum zu begrenzen und Kosten einzusparen. Ferner kann neben der hier verwendeten rechteckigen auch rotationssymmetrische oder andere Formen verwendet werden.

Nach der Hybridisierung müssen die Proben gewaschen werden, um nicht spezifisch gebundene Sonde zu entfernen. Dabei werden wieder alle Proben jeweils mit denselben Waschlösungen behandelt. Hierfür wird der gesamte Einsatz 4 aus dem Behälter 2 genommen und umgekehrt (die mit den Netzen 7 verschlossenen Öffnungen nach unten) in einen Behälter mit Waschlösung gesetzt. Um einen guten Austausch der Waschlösung mit den Proben zu erreichen, kann der Einsatz 4 mit Behälter 2 auf einen Schüttler gestellt und schwach bewegt werden, oder von Zeit zu Zeit kurz angehoben und wieder abgesenkt werden. Um Waschlösungen zu wechseln, wird die Lösung in dem Behälter 2 ausgetauscht oder der gesamte Einsatz 4 in einen Behälter mit neuer Waschlösung überführt.

Die Vorrichtung ist so konstruiert, daß ein optimaler Austausch zwischen dem zu hybridisierenden Material und der Umgebung erfolgen kann, ohne daß das Gewebe zerstört wird. Zu diesem Zweck wurde der Einsatz mit den Reaktionskammern auf kleine Füßchen gesetzt.

Je nach der Größe der verwendeten Proben können Netze mit verschiedenen Maschengrößen verwendet werden. Vor allem die Verwendung eines feinmaschigeren Netzes erlaubt so auch die Verarbeitung kleinerer Gewebestücke, Organe und Embryonen.

Außerdem kann bei der Konstruktion der Durch-

messer der Bohrlöcher den jeweiligen Anforderungen angepasst werden.

Die Vorrichtung kann nicht nur für ISH, sondern in der gleichen Weise für Antikörper-Färbungen an ganzen Embryonen, Organen oder Gewebestücken verwendet werden. 5

Patentansprüche

1. Vorrichtung zur Durchführung von Genexpressionsanalysen bestehend aus mindestens zwei Reaktionskammern, welche auf einer Seite hermetisch verschließbar sind, gekennzeichnet durch
 - a) einen Behälter (2) und einen Deckel (3), wobei Deckel (3) und Behälter (2) dicht verschließbar sind, 15
 - b) einen Einsatz (4), welcher die Reaktionskammern (1) enthält, wobei die Reaktionskammern (1) senkrecht angeordnet an einer Seite offen sind, 20
 - c) Böden (7), welche die auf der anderen Seite liegenden Öffnungen der Reaktionskammern (1) verschließen, wobei die Böden (7) einen ungehinderten Flüssigkeitsaustausch ermöglichen, und das zu analysierende Material in der Reaktionskammer zurückhalten, und 25
 - d) Verschlüsse (6) zur hermetischen Abdichtung, der den Böden gegenüberliegenden Öffnungen der Reaktionskammern. 30
2. Vorrichtung nach Anspruch 1 gekennzeichnet durch Abstandhalter (5) an dem Einsatz an der Seite der Böden (7). 35
3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2 dadurch gekennzeichnet, daß die Böden (7) durch ein einziges, alle Öffnungen überdeckendes Element gebildet werden. 40
4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3 gekennzeichnet durch Ausnehmungen (9) im Einsatz (4) zur Aufnahme von Hebegriffen. 45
5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4 dadurch gekennzeichnet, daß das alle Öffnungen überdeckende Element ein aufgeklebtes Nylonnetz ist, 50
6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5 dadurch gekennzeichnet, daß das Material des Deckels (3), der Kammer (2) und des Einsatzes (4) aus Plexiglas bestehen. 55

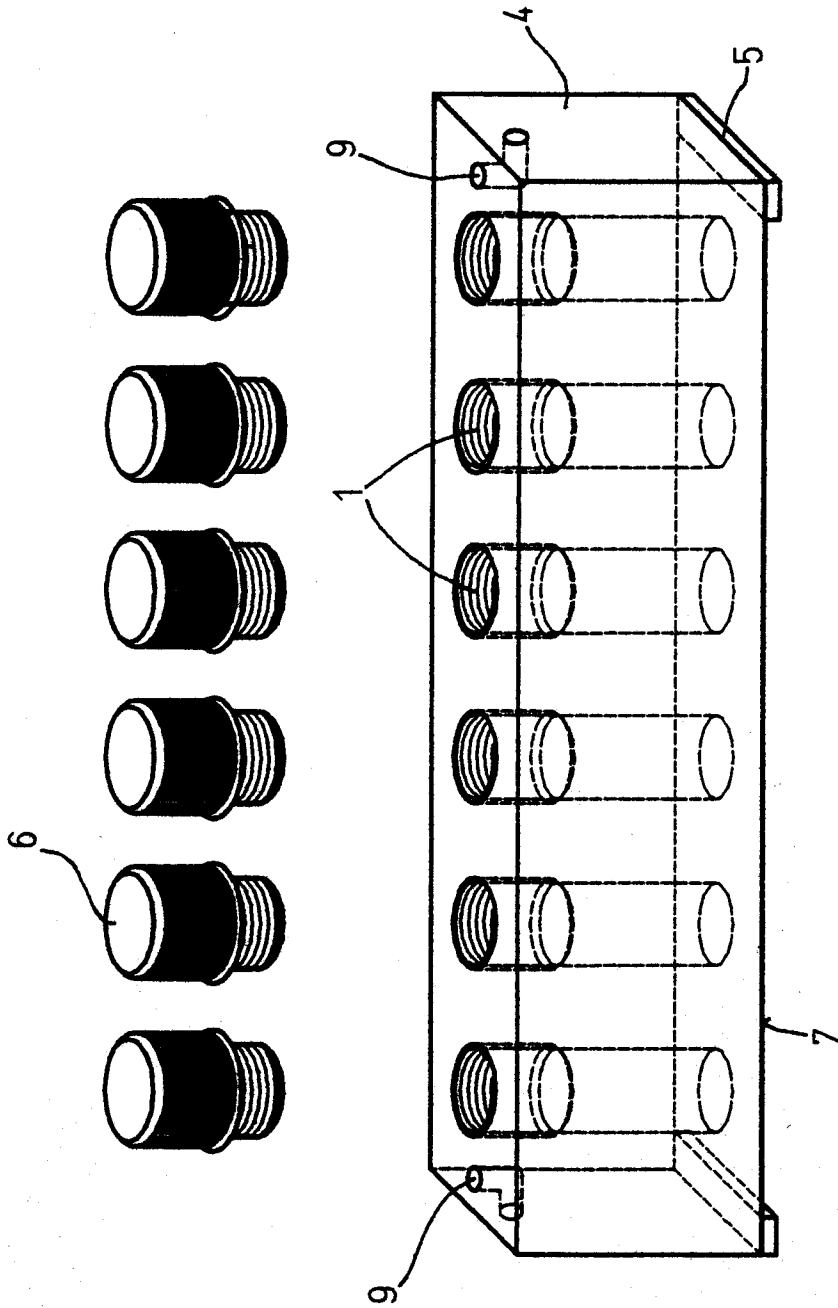


Fig. 1

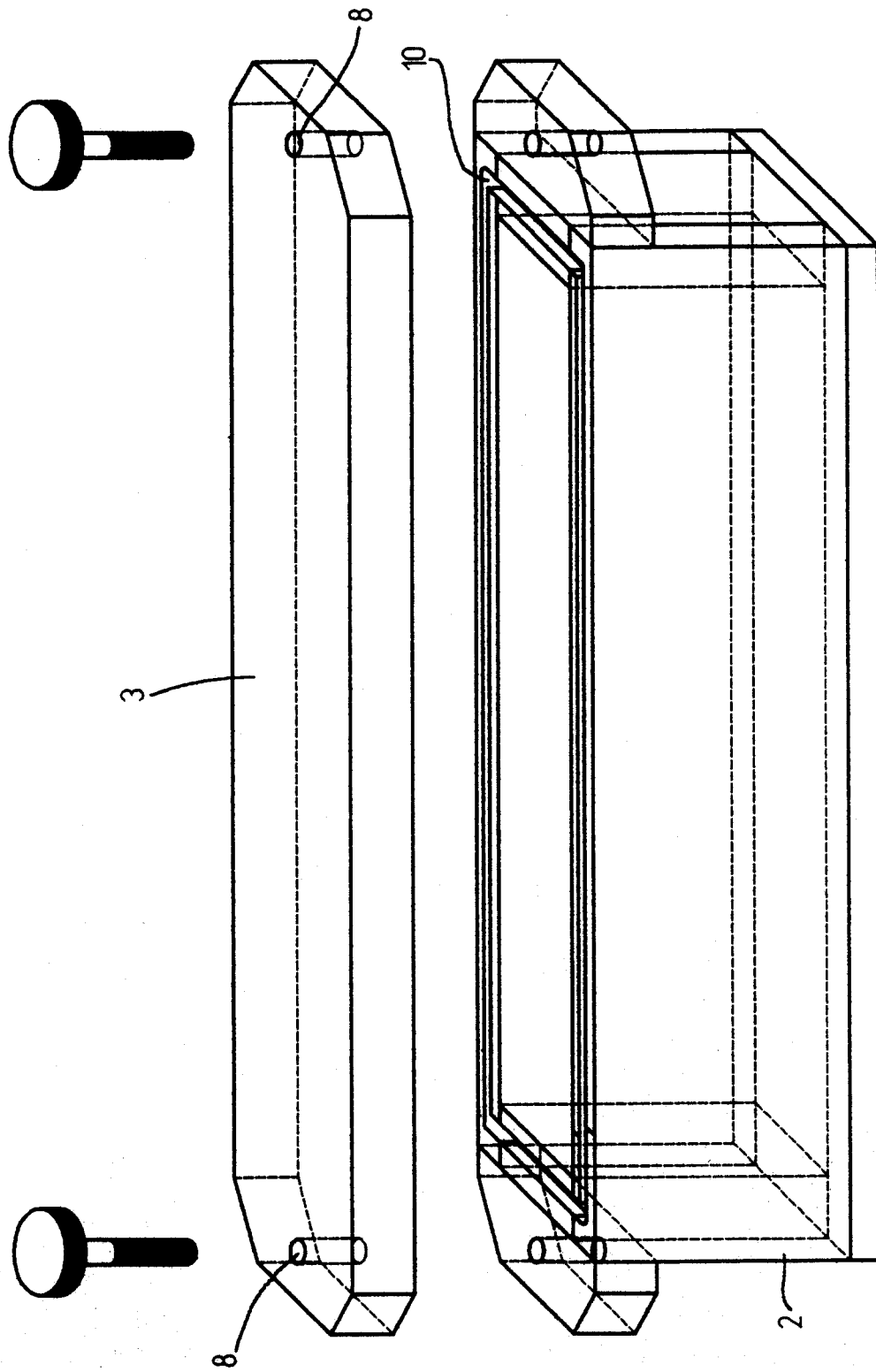


Fig. 2