



(12) **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(43) Veröffentlichungstag:  
**11.01.2006 Patentblatt 2006/02**

(51) Int Cl.:  
**B01L 3/00 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)**  
**B01F 13/00 (2006.01)**

(21) Anmeldenummer: **05105498.9**

(22) Anmeldetag: **21.06.2005**

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR  
HU IE IS IT LI LT LU MC NL PL PT RO SE SI SK TR**  
Benannte Erstreckungsstaaten:  
**AL BA HR LV MK YU**

(72) Erfinder:  
• **Streit, Wolfgang**  
**5400 Hallein (AT)**  
• **Wenczel, Gyoergy**  
**5201 Seekirchen (AT)**  
• **Lamprecht, Waltraud**  
**5020 Salzburg (AT)**  
• **Egelauer, Heribert**  
**83471 Berchtesgaden (DE)**

(30) Priorität: **08.07.2004 CH 11442004**  
**04.08.2004 DE 202004012163 U**  
**01.09.2004 US 931432**

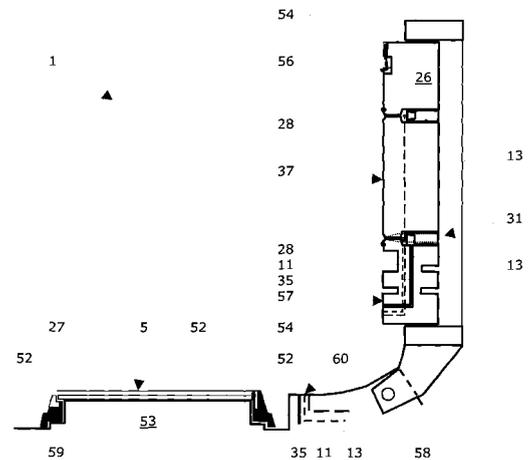
(71) Anmelder: **Tecan Trading AG**  
**8708 Männedorf (CH)**

(74) Vertreter: **OK pat AG**  
**Chamerstrasse 50**  
**6300 Zug (CH)**

(54) **System mit Einrichtung zum Verhindern von Luftblasen in einer Hybridisierkammer und entsprechendes Verfahren**

(57) Die Erfindung betrifft ein System (1) mit Hybridisierkammern (5) zum Hybridisieren von auf Objektträgern (27) immobilisierten Nukleinsäureproben, Proteinen oder Gewebeschnitten, wobei jede Hybridisierkammer (5) als ein im wesentlichen spaltförmiger, mit einer Flüssigkeit im wesentlichen befüllbarer Raum zwischen einem dieser Objektträger (27) und einem Deckel (26) definiert ist, wobei der Deckel (26) derart gegenüber dem Objektträger (27) angeordnet ist, dass die Hybridisierkammer (5) gegenüber der Umgebungsluft abgedichtet ist, und wobei das System (1) eine Agitationseinrichtung (32) umfasst, mit welcher Flüssigkeiten in den Hybridisierkammern (5) gegenüber den auf den Objektträgern (27) immobilisierten Proben bewegt werden können. Das erfindungsgemässe System ist dadurch gekennzeichnet, dass es eine Einrichtung zum Verhindern von Luftblasen in den Hybridisierkammern (5) umfasst, welche als Druckeinrichtung zum Aufbauen eines Kammer-Drucks in den Hybridisierkammern (5) ausgebildet ist, wobei dieser Kammer-Druck dadurch unabhängig von Agitationsdruckunterschieden über dem in der Umgebungsluft herrschenden, normalen atmosphärischen Druck liegt, dass das System (1) ein Federelement umfasst, welches mit dem für die Hybridisierung verwendeten Flüssigkeitsvolumen in Verbindung steht und federnd den durch die Agitationseinrichtung (32) auf den Druckraum (34) ausgeübten Agitationsdruckunterschieden entgegenwirkt.

Fig. 4



## Beschreibung

**[0001]** Die Erfindung betrifft gemäss dem Oberbegriff des unabhängigen Anspruchs 1 ein System mit Hybridisierkammern zum Hybridisieren von auf Objektträgern immobilisierten Nukleinsäureproben, Proteinen oder Gewebeschnitten. Dabei ist jede Hybridisierkammer als ein im wesentlichen spaltförmiger, mit einer Flüssigkeit im wesentlichen befüllbarer Raum zwischen einem dieser Objektträger und einem Deckel definiert. Je ein Deckel ist derart gegenüber dem Objektträger angeordnet, dass die Hybridisierkammer gegenüber der Umgebungsluft abgedichtet ist. Ein solches System umfasst eine Agitationseinrichtung, mit welcher Flüssigkeiten in den Hybridisierkammern gegenüber den auf den Objektträgern immobilisierten Proben bewegt werden können. Die Erfindung betrifft zudem, gemäss dem Oberbegriff des unabhängigen Anspruchs 14, ein entsprechendes Verfahren zum Verhindern von Luftblasen in den Hybridisierkammern eines Systems zum Hybridisieren von auf Objektträgern immobilisierten Nukleinsäureproben, Proteinen oder Gewebeschnitten. Gemäss diesem Verfahren werden alle im wesentlichen spaltförmigen, zwischen einem dieser Objektträger und einem Deckel angeordnete Hybridisierkammern mit einer Flüssigkeit im wesentlichen gefüllt. Dabei wird der Deckel derart gegenüber dem Objektträger angeordnet, dass die Hybridisierkammer gegenüber der Umgebungsluft abgedichtet ist.

**[0002]** Die Verwendung von DNA-Proben (DNA = Desoxyribosenukleinsäure) und insbesondere von Mikroarrays solcher Proben stellt der Forschung eine wichtige Technik zur gleichzeitigen bzw. simultanen Analyse von Tausenden von Genen zur Verfügung. Diese Technik umfasst die Immobilisierung von DNA-Proben aus vielen Genen auf einer festen Substrat-Oberfläche, wie z.B. auf einem gläsernen Objektträger für ein Lichtmikroskop. Die DNA-Proben werden bevorzugt in einem Array von Probenflecken oder "spots", d.h. in einem zweidimensionalen Gitter auf dem Substrat angeordnet und man kann später - ausgehend von einer bestimmten Position innerhalb eines solchen Arrays auf den Ursprung der entsprechenden DNA-Probe zurückschliessen. Die Technik umfasst typischerweise die Kontaktierung des DNA-Proben-Arrays mit RNA-Muster-Suspensionen bzw. -Lösungen (RNA = Ribosenukleinsäure) um damit spezifische Nukleotidsequenzen in den DNA-Proben nachzuweisen. Typischerweise werden auch Muster-Suspensionen verwendet, welche DNA, cDNA und/oder Proteine bzw. Polypeptide enthalten.

**[0003]** RNA-Muster können mit einem sogenannten "tag" oder "label", d.h. einem Molekül versehen sein, welches z.B. ein Fluoreszenzlicht mit einer spezifischen Wellenlänge aussendet. Immobilisierte Proben können auch aminosäurehaltige (z.B. Proteine, Peptide) oder nukleinsäurehaltige (z.B. cDNA, RNA) Proben umfassen. Zu den immobilisierten Proben zugegebene Muster können beliebige Moleküle bzw. chemische Verbindungen umfassen, welche mit den immobilisierten Proben hybridisieren oder sich sonstwie mit diesen verbinden.

**[0004]** Unter guten experimentellen Bedingungen hybridisieren bzw. binden die RNA-Muster an die immobilisierten DNA-Proben und bilden mit diesen zusammen hybride DNA-RNA-Stränge. Für jede der immobilisierten DNA-Proben und für spezielle RNA-Muster kann man Unterschiede in der Hybridisierung unter den DNA-Proben durch die Messung der Intensität und der Wellenlängenabhängigkeit der Fluoreszenz jedes einzelnen Mikroarray-Elements feststellen und so herausfinden, ob der Grad der Genexpression in den untersuchten DNA-Proben variiert. Mit der Verwendung von DNA-Mikroarrays können somit über die Expression von grossen Mengen von Genen und über deren Expressionsmuster umfassende Aussagen gemacht werden, obwohl nur geringe Mengen an biologischem Material eingesetzt werden müssen.

**[0005]** DNA-Mikroarrays haben sich als erfolgreiche Werkzeuge etabliert und die Geräte zur Durchführung der DNA-Hybridisierung wurden laufend verbessert (vgl. z.B. US 6,238,910 oder EP 1 260 265 A1 des Anmelders der aktuellen Patentanmeldung). Diese Dokumente offenbaren eine Vorrichtung zum Bereitstellen eines Hybridisiererraums für die Hybridisierung von Nukleinsäureproben auf einem Objektträger. Diese Vorrichtungen sind gegenüber dem Objektträger bewegbar ausgebildet und umfassen eine ringförmige Dichtung oder Dichtfläche zum Abschliessen des spaltförmigen Hybridisiererraums gegenüber der Umgebungsluft, wobei durch die Dichtung oder Dichtfläche eine Oberfläche dieses Objektträgers beaufschlagt wird. Zudem umfasst diese Vorrichtungen Leitungen zum Zu- bzw. Ableiten von Medien in den Hybridisiererraum hinein bzw. aus dem Hybridisiererraum heraus sowie eine Probenzuführung. Eine verbesserte Temperaturkontrolle und eine Bewegung der Flüssigkeit mit z.B. RNA-Mustern gegenüber auf dem Objektträger immobilisierten DNA-Proben ist ebenfalls offenbart.

**[0006]** Es kommt einerseits immer wieder vor, dass Luftblasen beim Einfüllen von Flüssigkeiten oder auch später in der Hybridisierkammer entstehen. Andererseits wurde versucht (vgl. z.B. US 6,186,659), Luftblasen gezielt als Agitationsmittel einzusetzen, um in der Hybridisierkammer eine gründlichere Durchmischung der Reagenzien zu erzielen. Im allgemeinen sind aber im Hybridisiermedium anwesende Luftblasen nicht erwünscht, weil diese den meist sehr dünnen Flüssigkeitsfilm über den immobilisierten Proben stören. Dies kann zu einer Inhomogenität der Verteilung von Reagenzien im Hybridisiermedium und damit zu einer Verfälschung der Hybridisier-Resultate führen; schlimmstenfalls verdrängen grössere Luftblasen sogar das Hybridisiermedium von Teilen der auf dem Objektträger immobilisierten Proben.

**[0007]** Aus dem Stand der Technik sind zudem zahlreiche Methoden bekannt, um das spontane Auftreten von Luftblasen oder das Verbleiben derselben in der Kammer zu behindern. So wurde z.B. ein nichtparalleles Anordnen der die Hybridisierkammer definierenden Objektträger und Deckel vorgeschlagen (vgl. US 5,922, 591), oder die Hybridisierme-

dien werden während dem ganzen Hybridisierprozess aus der Kammer hinaus und wieder hinein befördert. Das Beimischen von Agenzien zu dem Hybridisiermedium, welche die Oberflächenspannung reduzieren oder das Behandeln der Oberflächen der Kammer mit wasserabstossenden chemischen Verbindungen mit dem Ziel, die Bildung von Luftblasen zu behindern, ist ebenfalls bekannt.

5 **[0008]** Aus US 6,458,526 ist eine Anordnung bekannt, mit welcher in den Hybridisierraum hineinragende "Blasenhälften 140" aus einem mit Lösungsmittel gesättigten Gas erzeugt werden. Es handelt sich bei diesen "Blasenhälften" eigentlich um kalottenförmige Grenzflächen von Gasräumen mit einem definierten Krümmungsradius. Diese "Blasenhälften" befinden sich an definierten Stellen der Kammer, wo sie die Hybridisierung der Proben nicht stören können. In einem vom Hybridisierraum abgetrennten Kompartiment befindet sich ein Lösungsmittel 160, welches im Hybridisiermedium enthalten ist. Über diesem Lösungsmittel wird eine gesättigte Atmosphäre 150 aufrecht erhalten, welche konstant mit den Gasräumen hinter den "Blasenhälften 140" verbunden ist (vgl. Fig. 2 in US 6,458,526). Damit wird konstant eine mit dem Lösungsmittel gesättigte Atmosphäre an die kalottenförmigen Grenzflächen gebracht und dadurch der Partialdruck des im Hybridisiermedium anwesenden Lösungsmittel so beeinflusst, dass allenfalls vorhandene Luftblasen schrumpfen und eliminiert werden. Dieses Verfahren hat den Nachteil, dass diese kalottenförmigen Grenzflächen mittels speziellen Vorrichtungen geschaffen und aufrechterhalten werden müssen.

15 **[0009]** Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung betrifft das Bereitstellen eines alternativen Systems bzw. eines alternativen Verfahrens, mit welchem das Ausbilden von Luftblasen in einer Hybridisierkammer auf einfache Art und Weise verhindert werden kann.

20 **[0010]** Diese Aufgabe wird gemäss einem ersten Aspekt und dem kennzeichnenden Teil des unabhängigen Anspruchs 1 dadurch gelöst, dass ein eingangs beschriebenes System eine Einrichtung zum Verhindern von Luftblasen in den Hybridisierkammern umfasst, welche als Druckeinrichtung zum Aufbauen eines Kammer-Drucks in den Hybridisierkammern ausgebildet ist, wobei dieser Kammer-Druck dadurch unabhängig von Agitationsdruckunterschieden über dem in der Umgebungsluft herrschenden, normalen atmosphärischen Druck liegt, dass das System zumindest ein Federelement umfasst, welches mit dem für die Hybridisierung verwendeten Flüssigkeitsvolumen in Verbindung steht und federnd den durch die Agitationseinrichtung auf den Druckraum ausgeübten Agitationsdruckunterschieden entgegenwirkt. Diese Aufgabe wird gemäss einem zweiten Aspekt und dem kennzeichnenden Teil des unabhängigen Anspruchs 14 dadurch gelöst, dass mittels einer Druckeinrichtung in einem eingangs beschriebenen System ein mit einer Druckeinrichtung dieses Systems in den Hybridisierkammern ein Kammer-Druck ausgebildet wird, der dadurch unabhängig von Agitationsdruckunterschieden über dem in der Umgebungsluft herrschenden, normalen atmosphärischen Druck liegt, dass das System ein Federelement umfasst, welches mit dem für die Hybridisierung verwendeten Flüssigkeitsvolumen in Verbindung steht und federnd den durch die Agitationseinrichtung auf den Druckraum ausgeübten Agitationsdruckunterschieden entgegenwirkt. Zusätzliche, bevorzugte erfinderische Merkmale ergeben sich jeweils aus den abhängigen Ansprüchen.

25 **[0011]** Das erfindungsgemässe System bzw. das erfindungsgemässe Verfahren wird nun an Hand von schematischen, den Umfang der Erfindung nicht beschränkenden Zeichnungen von beispielhaften Ausführungsformen im Detail erläutert. Dabei zeigen:

35 Fig. 1 ein Schema eines zum Ausführen des erfindungsgemässen Verfahrens geeigneten, ersten Geräts bzw. Systems;

40 Fig. 2 einen der Fig. 1 von EP 1 260 265 A1 entsprechenden senkrechten Längsschnitt durch eine Anordnung mit einer Hybridisierkammer;

45 Fig. 3 eine der Fig. 2 entsprechende, schematische Ansicht einer Anordnung mit einer Hybridisierkammer, von unten gesehen;

Fig. 4 einen der Fig. 2 entsprechenden, senkrechten Längsschnitt durch eine Anordnung mit einer Hybridisierkammer, Deckel des Systems aufgeklappt;

50 Fig. 5 einen der Fig. 2 entsprechenden, senkrechten Längsschnitt durch eine Anordnung mit einer Hybridisierkammer, Deckel des Systems geschlossen.

Fig. 6 ein Schema eines zum Ausführen des erfindungsgemässen Verfahrens geeigneten, zweiten Geräts bzw. Systems;

55 Fig. 7 eine schematische Ansicht einer besonderen, ersten Anordnung eines Deckels mit einer Hybridisierkammer, von unten gesehen;

Fig. 8 eine schematische Ansicht einer besonderen, zweiten Anordnung eines Deckels mit zwei Hybridisierkammern, von unten gesehen.

5 **[0012]** Figur 1 zeigt ein Schema eines zum Ausführen des erfindungsgemässen Verfahrens geeigneten Systems 1. Auf der linken Seite dieses Schemas sind eine Anzahl Gefässe 2 für die Aufbewahrung von flüssigen Hybridisiermedien, wie Waschflüssigkeiten (W 3, W 2, W 1), Prähybridisier-Puffer (V-P), Alkohol-Reinigungsflüssigkeit (A-R), destilliertes Wasser (A.D.), sowie einen Behälter 3 mit Inertgas (N<sub>2</sub>) dargestellt. Jedem dieser Gefässe 2 ist ein individuelles Ventil 4 vorgeschaltet, über welches diese Medien den (auf der rechten Seite dargestellten) Hybridisierkammern 5 (S 1, S 2, S 3, S 4) zugeführt werden können. Die das Ventil 4 umfassenden Medienleitungen 6 münden in eine Sammelleitung 7, die wiederum in eine Förderpumpe 8 mündet, der ein Belüftungsventil 9 vorgeschaltet ist. Diese Förderpumpe 8 saugt über die Sammelleitung 7 flüssige Medien aus den Gefässen 2 an und pumpt sie über die Verteilleitung 10 in die Einlassleitungen 11, die über ein Einlassventil 12 in die Hybridisierkammern 5 münden. Die Hybridisiermedien verlassen die Hybridisierkammern 5 über eine Auslassleitung 13, welche je ein Auslassventil 14 umfasst und in eine Sammelleitung 15 einmündet. Diese Sammelleitung 15 mündet ihrerseits in eine Abfalleitung 16, welche mittels eines Abfallventils 17 verschliessbar ist. Die Verteilleitung 10 und die Sammelleitung 15 können über eine Verbindungsleitung 18 und ein Verbindungsventil 19 miteinander kommunizieren. Von dieser Verbindungsleitung 18 zweigt eine Entlastungsleitung 20 mit einem Entlastungsventil 21 ab und mündet in einen Sammelbehälter 22 mit einer Be- bzw. Entlüftungsöffnung 23. Dem Sammelbehälter 22 nachgeschaltet ist eine Förderpumpe 24, die über eine Übergangsleitung 25 mit der Abfalleitung 16 verbunden ist.

20 **[0013]** Zum besseren Verteilen der Hybridisiermedien in den Hybridisierkammern 5 ist das System 1 mit einem Agitationsmechanismus bzw. mit einer Agitationseinrichtung 32 ausgerüstet, wie diese aus der europäischen Patentanmeldung EP 1 260 265 A1 des Anmelders der aktuellen Patentanmeldung bekannt ist. Auf den Inhalt dieser Patentanmeldung EP 1 260 265 A1 wird hier ausdrücklich Bezug genommen, so dass dieser Inhalt als Teil der vorliegenden Patentanmeldung gilt.

25 **[0014]** Figur 2 zeigt einen der Fig. 1 von EP 1 260 265 A1 entsprechenden, senkrechten Längsschnitt durch eine Hybridisierkammer 5. Der Deckel 26 dieser Anordnung ist gegenüber dem Objektträger 27 bewegbar (hier um eine Achse schwenkbar ausgebildet, so dass der Hybridisierraum 5 durch eine einfache Bewegung geöffnet und geschlossen werden kann. Eine ringförmige Dichtfläche 28 dient zum Abschiessen des Hybridisierraums 5 durch Beaufschlagen einer Oberfläche 29 dieses Objektträgers 27. Diese Dichtfläche 28 kann eine abgesetzte Oberfläche des Deckels 26 sein, welche flach auf der Oberfläche 29 des Objektträgers 27 liegt; alternativ dazu kann z.B. auch eine Lippendichtung verwendet werden. Bevorzugt wird jedoch eine O-Ring-Dichtung als Dichtfläche 28. Die Anordnung umfasst Leitungen 11,13 zum Zu- bzw. Ableiten von Medien in den Hybridisierraum 5 hinein bzw. aus dem Hybridisierraum 5 heraus. Solche Medien können Reagenzien zum Durchführen der Hybridisierungsreaktion, wie z.B. Waschflüssigkeiten oder Puffer-Lösungen, aber auch inerte Gase (wie z.B. Stickstoff) zum Trocknen der Hybridisierungsprodukte auf den Objektträgern 27 bzw. zum Ausblasen der Hybridisierkammern 5 und der Medienleitungen 11,13 sein. Diese Zu- bzw. Ableitungen 11,13 für Hybridisiermedien münden bevorzugt in je einen Agitationsraum 30, 30'. Die Anordnung umfasst zudem eine verschliessbare Musterzuführung 31, durch welche von Hand RNA-enthaltende Flüssigkeiten oder andere Musterflüssigkeiten zupipettiert werden können. Die Musterzuführung 31 wird vorzugsweise mit einem Kunststoffpfropfen (nicht gezeigt) verschlossen. Alternativ dazu kann eine automatische bzw. robotisierte Musterzuführung vorgesehen werden, wie diese in unterschiedlichen Ausführungsformen in EP 1 260 265 A1 offenbart sind.

35 **[0015]** Die Anordnung umfasst eine medientrennende Agitationseinrichtung 32 zum Bewegen von Flüssigkeiten gegenüber auf der Oberfläche 29 der Objektträger 27 immobilisierten Proben von Nukleinsäuren, Proteinen oder Gewebeschnitten. In der in Figur 2 gezeigten Ausführungsform umfasst die Agitationseinrichtung 32 der Anordnung eine Membran 33. Diese Membran 33 trennt einen Druckraum 34, der über eine Druckleitung 35 mit einem Druckfluid (Gas oder Flüssigkeit) befüllbar ausgebildet ist, von einem Agitationsraum 30, der über eine Agitationsleitung 36 mit dem Hybridisierraum 5 verbunden ist. Nach dem Erreichen des thermischen Gleichgewichtes der Anordnung, dem Zugeben eines bestimmten Volumens an RNA-Musterflüssigkeit und dem Verschliessen der Musterzuführung 31 wird über die Druckleitung 35 vorzugsweise Luft oder ein anderes Gas (es könnte aber auch eine Flüssigkeit sein) stossweise in den Druckraum 34 gebracht oder daraus abgelassen, so dass sich die Membran 33 im gleichen Rhythmus durchbiegt und entsprechend den Agitationsraum 30 verkleinert bzw. vergrössert. Dadurch wird die Musterflüssigkeit im gleichen Rhythmus des Über- bzw. Unterdrucks und Entspannens im Hybridisierraum 5 gegen das eine oder das andere Ende bewegt, wo sich vorzugsweise an der gegen das Innere des Hybridisierraums 5 gerichteten Oberfläche 37 des Deckels 26 je ein Querströmkanal 38,38' befindet.

50 **[0016]** Diese Querströmkanäle 38,38' erleichtern einerseits das Querverteilen der in der Musterlösung enthaltenen RNA-Moleküle. Dadurch wird bewirkt, dass die Musterflüssigkeit bzw. die Waschflüssigkeiten homogen über das gesamte im Hybridisierraum 5 anwesende Volumen verteilt werden. Zudem dienen die Querströmkanäle 38,38' auch als Flüssigkeits-Reservoir, so dass bei der durch die in der Vorrichtung eingebauten Agitationseinrichtung 32 erzeugte Pendelbewegung (gefüllter Doppelpfeil) der Musterlösung nicht dazuführt, dass Teile des Hybridisierraums 5 unbeab-

sichtlich trocken liegen.

**[0017]** Vorzugsweise ist ein zweiter, ebenfalls mit einer Membran 33' versehener Agitationsraum 30' über eine zweite Agitationsleitung 36' mit dem Hybridisiererraum 5 verbunden. Wenn jetzt ein auf den Druckraum 34 abgegebener Druckstoss die erste Membran 33 in den ersten Agitationsraum 30 drückt, wird dieser Impuls über die erste Agitationsleitung 36 auf die Musterflüssigkeit im Hybridisiererraum 5 übertragen. Die Musterflüssigkeit weicht etwas gegen die zweite Agitationsleitung 36' aus (kann diese sogar zum Teil füllen) und erhöht den Druck im zweiten Agitationsraum 30'. Dadurch biegt sich die zweite Membran 33' nach oben und wird dabei elastisch gedehnt. Sobald der Überdruck im Druckraum 34 nachlässt, federn beide Membranen 33,33' in ihre Ruheposition zurück und bewegen die Musterflüssigkeit im Hybridisiererraum 4 in die entgegengesetzte Richtung. Durch diese Pendelbewegung kann mit der gezeigten Anordnung eine Musterflüssigkeit mit einem minimalen Volumen (im Bereich von ca. 100  $\mu$ l) in weniger als einer Minute praktisch homogen im Hybridisiererraum 5 verteilt werden. Vorzugsweise wird unmittelbar anschliessend an den Druckabbau im Druckraum 34 ein Unterdruck im Druckraum 34 erzeugt, so dass die dem vorangehenden Druckstoss entgegengesetzte Rückwärtsbewegung der Musterflüssigkeit im Hybridisiererraum 5 noch verstärkt wird.

**[0018]** Figur 3 zeigt eine Draufsicht auf die Anordnung von Figur 2, von unten gesehen. Die O-Ring-Dichtung 28 begrenzt lateral den Hybridisiererraum 5, der an seinen einander entgegengesetzten Enden je einen Querströmkanal 38,38' aufweist, welche als Vertiefung in der Oberfläche 37 des Deckels 26 vorgesehen sind. Der Objektträger 27 (hier ein Glasobjektträger für die Lichtmikroskopie) und dessen Griffeld 55 sind gestrichelt eingezeichnet. Klar ersichtlich ist auch die Abdrückfeder 56, welche auf das Griffeld 55 des Objektträgers 27 drückt. Beim Öffnen des Hybridisiererraums 5 erleichtert diese Abdrückfeder 56 die automatische Trennung des Objektträgers 27 vom Deckel 26. Ebenfalls ersichtlich ist die Linienführung der Einlassleitung 11, der Auslassleitung 13 und der Druckleitung 35 sowie die Anordnung der Agitationsräume 30,30' und der Musterzuführung 31. Die Agitationsleitungen 36,36' und die Musterzuführung 31 münden in den Querströmkanälen 38,38'.

**[0019]** Alle Leitungen 11,13,35 zum Zu- bzw. Abführen von Medien münden vorzugsweise in einer gemeinsamen Anschlussebene 57 des Deckels 26, welche im Wesentlichen parallel zum Hybridisiererraum 5 und vorzugsweise auf der gleichen Höhe wie der Hybridisiererraum 5 angeordnet ist. Die Mündungsöffnungen der Leitungen 11,13,35 können wie gezeigt versetzt zu einander oder auf einer quer zu der Vorrichtung 1 verlaufenden Linie (nicht gezeigt) angeordnet sein. Aussparungen (leere Pfeile, vgl. Fig. 2) reduzieren den Wärmefluss von oder zu dem Deckel 26.

**[0020]** Die Druckleitungen 35, von welchen für jede der Hybridisiererkammern 5 eine bestimmt ist, sind in Figur 1 gestrichelt dargestellt und gehen von einer Druckverteilung 39 aus. In diese Druckverteilung 39 münden eine Ausgleichsleitung 40 mit einem Ausgleichsventil 41, eine Überdruckzuleitung 42 mit einem Überdruckventil 43 und eine Unterdruckzuleitung 44 mit einem Unterdruckventil 45. Der Überdruck wird vorzugsweise mit einem kostengünstigen Gas (z.B. Luft) in einer Überdruckpumpe 46 erzeugt, in einem Überdruckbehälter 47 gespeichert und in die Überdruckzuleitung 42 eingespeist. Der Unterdruck wird in einer Unterdruckpumpe 48 erzeugt, in einem Unterdruckbehälter 49 gespeichert und in die Unterdruckzuleitung 44 eingespeist.

**[0021]** Der Inertgasbehälter 3 ist über ein Gasventil 50 und eine Gasleitung 51 mit der Verteilung 10 verbunden, welche über Einlassleitungen 11 und je ein Einlassventil 12 in die Hybridisiererkammern 5 münden. Mit Inertgas (z.B. mit Stickstoffgas) können je nach Ventilstellungen alle Hybridisiererkammern 5 (einzeln oder in Gruppen) via die Verteilung 10 und die Einlassleitungen 11 über die Auslassleitungen 13 und die Sammelleitung 15 ausgeblasen werden.

**[0022]** Werden nur das Gasventil 50, das Verbindungsventil 19 und das Entlastungsventil 21 geöffnet, so kann die Verteilung 10 in den Sammelbehälter 22 ausgeblasen werden. Werden nur das Gasventil 50, das Verbindungsventil 19 und das Abfallventil 17 geöffnet, so können die Verteilung 10 und die Sammelleitung 15 über die Abfallleitung 16 ausgeblasen werden.

**[0023]** Figur 4 zeigt einen der Fig. 2 entsprechenden, senkrechten Längsschnitt durch eine Anordnung mit einer Hybridisiererkammer 5, wobei der Klapprahmen 54 mit dem darin eingesetzten Deckel 26 des Systems 1 aufgeklappt ist. Bevorzugt sind die Deckel 26 parallel zueinander und in einer Vierergruppe angeordnet, weil diese Anordnung gerade ein Mass für eine Kontaktplatte 53 des Temperaturkontrollthermostaten zulässt, auf welche ein Transportrahmen 52 in der Grösse einer Mikroplatte mit vier parallel zu einander angeordneten Objektträgern 27 passt.

**[0024]** Jede dieser Vierergruppen ist einer an ein Temperatursteuergerät angeschlossenen Kontaktplatte 53 zugeordnet. Eine solche Kontaktplatte 53 ist somit zur flächigen Aufnahme der vier Objektträger 27 eines Transportrahmens 52 ausgebildet. Der Rahmen 52 umfasst Längswände, Querwände und im Wesentlichen parallel zu den Querwänden verlaufende Zwischenwände. Diese Wände umgeben Öffnungen, welche den Rahmen 52 vollständig durchdringen, wobei diese Öffnungen den direkten Kontakt zwischen der Kontaktplatte 53 des Thermostaten und den Objektträgern 27 ermöglichen. Weil die Objektträger 27 im Rahmen 52 sanft federnd gehalten sind und weil die Kontaktplatte 53 so ausgebildet ist, dass der Rahmen 52 ihr gegenüber etwas abgesenkt werden kann, liegen die Objektträger 27 direkt auf der Oberfläche der Kontaktplatte 53. Jede Vierergruppe einer Verfahrenseinheit umfasst eine um eine Achse 58 schwenkbare und gegenüber einer Grundplatte 59 verriegelbaren Klapprahmen 54 mit vier Sitzen, wobei in jeden dieser Sitze ein Deckel 26 einlegbar ist. Jede solche Verfahrenseinheit umfasst zudem eine Anschlussplatte 60 zum dichtenden Verbinden je einer Einlassleitung 11, Auslassleitung 13 und Druckleitung 35 des Systems 1 mit der Einlassleitung 11,

Auslassleitung 13 und Druckleitung 35 eines Deckels 26. Als Dichtungen für diese Verbindungen werden vorzugsweise auf der Systemseite angeordnete O-Ringe bevorzugt (nicht gezeigt).

**[0025]** Figur 5 zeigt einen der Fig. 2 entsprechenden, senkrechten Längsschnitt durch eine Anordnung mit einer Hybridisierkammer 5, wobei der in einen Klapprahmen 54 eingesetzte Deckel 26 des Systems geschlossen ist. Alle vier Hybridisierräume 5 einer durch eine Kontaktplatte 53 und einen solchen Klapprahmen 54 definierten Vierergruppe sind somit der Temperaturkontrolle eines Temperaturregergeräts zugeordnet. Jede Vierergruppe einer Verfahreenseinheit umfasst, wie oben beschrieben, eine um eine Achse 58 schwenkbare und gegenüber einer Grundplatte 59 verriegelbaren Klapprahmen 54 mit vier Sitzen, wobei in jeden dieser Sitze ein Deckel 26 einlegbar ist. Um sicherzustellen, dass die Deckel 26 planparallel zu den Objektträgern 27 platziert werden können, weist der Klapprahmen 54 zudem noch ein Mittelgelenk (nicht gezeigt) mit einer zur Achse 58 parallelen Beweglichkeit auf. Damit die Dichtungen 28 die Hybridisierräume 5 zuverlässig abschliessen, wird über den Klapprahmen 54 ein zusätzlicher Druck auf die Deckel 26 ausgeübt, dies kann über Schrauben, Kipphebel oder ähnliche bekannte Vorrichtungen (nicht gezeigt) bewerkstelligt werden.

**[0026]** Die vorliegende Erfindung beruht auf der Erkenntnis, dass mittels Erzeugen eines Überdrucks in den Hybridisierkammern 5 das spontane Auftreten von Luftblasen während dem Hybridisieren verhindert werden kann. Dabei soll der Kammer-Druck über dem in der Umgebungsluft herrschenden, normalen atmosphärischen Druck liegen. Bevorzugt wird ein Kammerdruck, der mindestens um 100 mbar bis maximal um 1.4 bar höher ist als der Umgebungsdruck. Selbst höhere Drücke in der Kammer sind möglich, falls ihnen ein genügend grosser Anpressdruck zum Dichthalten der Kammer entgegenwirkt.

**[0027]** Tatsächlich treten unter diesen Druckverhältnissen während der Hybridisierung keine Luftblasen mehr auf. Der diesem Phänomen zu Grunde liegende Funktionsmechanismus ist nicht restlos aufgeklärt. Es wird jedoch angenommen, dass der erhöhte Druck einerseits die Diffusionsrichtung im Bereich der O-Ring-Dichtung 28 bestimmt bzw. definiert, so dass keine Gasmoleküle der Umgebungsluft mehr in die Hybridisierkammer 5 diffundieren können. Andererseits findet auf Grund ihrer Druckabhängigkeit sicher auch eine Verschiebung der Phasengrenzen im Hybridisiermedium statt, so dass die spontane Luftblasenbildung unterdrückt wird. Im Zusammenhang mit dieser Erfindung werden deshalb alle Gasblasen im Hybridisiermedium - ungeachtet des Entstehungsprozesses in der Hybridisierkammer 5 - als "Luftblasen" bezeichnet.

**[0028]** Erfindungsgemäss kann der verlangte Überdruck in den Hybridisierkammern 5 mittels einer Flüssigkeit, wie z.B. mittels eines von der Förderpumpe 8 in die Hybridisierkammern 5 gedrücktes Hybridisiermedium aus einem der Gefässe 2 erreicht werden (vgl. Fig. 1). Falls ein diese Hybridisierkammer 5 umfassendes System 1 eine Agitationseinrichtung 32 zum Bewegen der Hybridisiermedien gegenüber den immobilisierten Proben aufweist, so umfasst dieses System bevorzugt auch ein Federelement, welches den durch die Agitationseinrichtung 32 erzeugten Druckunterschieden federnd entgegenwirkt. Ein solches Federelement kann ein elastisches Rohrstück (nicht gezeigt) in einer entsprechenden Zu- oder Ableitung zu der Hybridisierkammer 5 sein; es kann aber auch ein federnd beaufschlagtes Expansionsgefäss (nicht gezeigt) vorgesehen sein, welches über eine Leitung mit der Hybridisierkammer 5 verbunden ist.

**[0029]** Alternativ dazu kann auch Inertgas aus dem Behälter 3 in die Verteilleitung 10 und die Einlassleitungen 11 gedrückt und über je ein Einlassventil 12 der verlangte Druck in den mit Proben und Hybridisiermedien bereits gefüllten Hybridisierkammern 5 aufgebaut werden. Bevorzugt sind Inertgase wie  $N_2$  (Stickstoff), die keine chemische Wechselwirkung oder Reaktionen mit den Hybridisiermedien eingehen. Es kann zudem von Vorteil sein, wenn die Inertgase in den Hybridisiermedien nicht löslich sind. Zudem besteht die Möglichkeit, das aus einer Druckpumpe und einem Druckbehälter (ähnlich wie bei den mit 46 und 47 bezeichneten Elementen in Fig. 1) stammende Gas in die Verteilleitung 10 einzuleiten. Nach dem Druckaufbau können alle Ventile wieder geschlossen und die Hybridisierung durchgeführt werden. Dabei dient das so aufgebaute Gaskissen, welches direkt mit dem für die Hybridisierung verwendeten Flüssigkeitsvolumen in Verbindung steht, als Federelement zum federnden Entgegenwirken auf die Agitationsdruckunterschiede. Falls dies, z.B. wegen eines minimalen aber konstanten Druckverlustes über die O-Ring-Dichtungen 28, erforderlich sein sollte, kann der verlangte Kammerdruck während der zumeist viele Stunden dauernden Hybridisierung sporadisch korrigiert oder erneuert bzw. konstant gehalten werden. Zu diesem Zweck können wahlweise auch eines oder beide der Ventile 12,14 (vgl. Fig. 1) offen gehalten werden.

**[0030]** Eine weitere Alternative (in den Figuren nicht dargestellt) besteht darin, eine Druckpumpe und einen Druckbehälter (ähnlich wie die mit 46 und 47 bezeichneten Elemente in Fig. 1) oder einen Gasbehälter (wie z.B. der  $N_2$ -Behälter 3 in Fig. 1) mit der Sammelleitung 15 zu verbinden und den Druck in den Hybridisierkammern 5 über ein Öffnen der Auslassventile 14 aufzubauen. Eine zusätzliche Alternative zum Bereitstellen eines Gaskissens, das als Federelement zum federnden Entgegenwirken auf die Agitationsdruckunterschiede dient, besteht darin, das aus einer Druckpumpe und einem Druckbehälter (ähnlich wie die mit 46 und 47 bezeichneten Elemente in Fig. 1) oder aus einem Gasbehälter (wie z.B. der  $N_2$ -Behälter 3 in Fig. 1) stammende Gas in eine der Leitungen zu führen, welche in zumindest eine der Verteilleitung 10 oder Sammelleitung 15 münden. Entsprechend können eines oder beide der Ventile 12,14 (vgl. Fig. 1) offen gehalten werden.

**[0031]** Wird ein System 1 mit Anordnungen verwendet, welche (wie oben beschrieben) zwei Agitationsmembranen 33,33' umfassen, so kann während dem vorbereitenden Agitieren der Hybridisationsmedien in den Hybridisierkammern

## EP 1 614 466 A2

5 oder auch während dem Hybridisieren selbst, die Agitationseinrichtung 32 verwendet werden. Dabei muss einfach ein Agitationsdruck im Druckraum 34 erzeugt werden, der um ca. 0.5 bis 1 bar höherer ist als der gewünschte Kammerdruck von 100 mbar bis 1.4 bar über dem Umgebungsdruck. Der für die Agitation aufzuwendende Druck bewegt sich (je nach Umgebungsdruck) somit im Bereich von ca. 1.6 - 2.4 bar. Die zweite Membran 33' bildet in diesem Fall ein

**[0032]** Typischerweise wird eine Hybridisierung wie folgt durchgeführt:

a) Ausspülen von Luftblasen und Flüssigkeitsresten aus der Verteilleitung 10 und der Sammelleitung 15. Zu diesem Zweck werden nur die Ventile 4 (A.D.), 19 und 17 geöffnet und es wird mit der Förderpumpe 8 destilliertes Wasser aus dem Gefäss 2 (A.D.) über das Ventil 4 (A.D.) in die Verteilleitung 10 gepumpt. Das destillierte Wasser strömt durch das Verbindungsventil 19 in die Sammelleitung 15 und von dort über das Abfallventil 17 in die Abfalleitung 16. Gleichzeitig werden die Hybridisierkammern 5 aufgebaut. Dies geschieht durch das Auflegen von (vorzugsweise in einem Transportrahmen 52 gehaltenen) Objektträgern 27 mit darauf immobilisierten Proben auf die Kontaktplatte 53 eines Thermostats, durch das Einsetzen von Deckeln 26 in den Klapprahmen 54 des Systems 1 zum Hybridisieren von auf Objektträgern 27 immobilisierten Nukleinsäureproben, Proteinen oder Gewebeschnitten und durch das Verschliessen der Hybridisierkammern 5 mittels Herunterklappen der Deckel 26 auf die Objektträger 24 (vgl. Fig. 4 und 5). Dieses Herunterklappen verbindet die Enden der Einlassleitungen 11, der Auslassleitungen 12 und der Druckleitungen 35 der Agitationseinrichtung 32 jeder einzelnen Hybridisierkammer 5 mit den entsprechenden Leitungsenden des Systems 1. Vorzugsweise werden - entsprechend den vier in einem Transportrahmen 52 aufgenommenen Objektträgern 27 - vier Deckel 26 in einen Klapprahmen 54 eingesetzt.

b) Füllen und Thermostatisieren der Hybridisierkammern 5 mit Prähybridisier-Puffer. Zu diesem Zweck werden nur die Ventile 4 (V-P), 12, 14 und 17 geöffnet und es wird mit der Förderpumpe 8 Prähybridisier-Puffer aus dem Gefäss 2 (V-P) über das Ventil 4 (V-P) in die Verteilleitung 10 und von dort über die Einlassventile 12 in die Hybridisierkammern 5 gepumpt. Ein Teil des Prähybridisier-Puffers verlässt die Hybridisierkammern 5 über die Auslassventile 14 und die Sammelleitung 15 und gelangt über das Abfallventil 17 in die Abfalleitung 16. Dieser Vorgang verlangt besondere Beachtung, weil hier zum ersten Mal Luftblasen in die Hybridisierkammern 5 eingeschleppt werden können.

c) Ausblasen der Verteilleitung 10 und der Sammelleitung 15. Zu diesem Zweck werden nur die Ventile 9, 19 und 17 geöffnet und es wird mit der Förderpumpe 8 Luft über das Belüftungsventil 9 angesaugt und über die Verteilleitung 10, das Verbindungsventil 19 in die Sammelleitung 15 und von dort über das Abfallventil 17 in die Abfalleitung 16 gepumpt.

d) Probenzugabe in die Hybridisierkammern 5. Zu diesem Zweck werden nur die Ventile 14 und 21 geöffnet. Die Proben werden mit einer Pipette über die Musterzuführung 31 im Deckel 26 in die Hybridisierkammern 5 gepresst. Dadurch wird ein entsprechendes Volumen Prähybridisier-Puffer aus den Hybridisierkammern 5 in die Auslassleitung 13 mit den geöffneten Auslassventilen 14 verdrängt. Dies wiederum verdrängt ein entsprechende Volumen Luft aus der Sammelleitung 15. Diese verdrängte Luft strömt durch das geöffnete Entlastungsventil 21 in die Entlastungsleitung 20 und gelangt in den Sammelbehälter 22, den sie über die Entlüftungsöffnung 23 verlässt. Dieser Vorgang verlangt besondere Beachtung, weil hier zum zweiten Mal Luftblasen in die Hybridisierkammern 5 eingeschleppt werden können.

e) Gleichmässiges Verteilen der Hybridisiermedien in den Hybridisierkammern 5 und gegenüber den auf den Objektträgern 27 immobilisierten Proben. Zu diesem Zweck sind zuerst alle Ventile geschlossen. Dann wird der Kammerdruck wie schon beschrieben erhöht und die Agitationseinrichtung 32 in Betrieb genommen. Alle eventuell in den Hybridisierkammern 5 vorhandenen Luftblasen werden bei diesem Druckaufbau eliminiert.

f) Hybridisieren der Proben während beispielsweise 17 Stunden. Während der Hybridisierung können die Medien in den Hybridisierkammern 5 konstant oder intermittierend agitiert werden. Dieser Vorgang verlangt besondere Beachtung, weil hier Luftblasen spontan in den Hybridisierkammern 5 entstehen können. Um dies zu verhindern, kann der Kammerdruck während der Hybridisierung korrigierend angepasst und konstant gehalten bzw. gemäss einem individuellen Programm verändert werden. Ein solches Programm kann das Erhöhen und Erniedrigen des Kammerdruckes in bestimmten Druck- und Zeitschritten definieren, so dass ein schonendes Hybridisieren der Proben gewährleistet ist, die eine solch spezielle Behandlung verlangen.

g) Waschen der hybridisierten Proben mit Puffern. Zu diesem Zweck wird zuerst der Kammerdruck auf Normaldruck reguliert, indem die Auslassventile 14 und das Abfallventil 17 geöffnet werden. Darauf werden Waschflüssigkeiten

## EP 1 614 466 A2

mittels der Förderpumpe 8 sequentiell und je nach Bedarf aus den Gefässen 2 durch die entsprechend geöffneten Ventile 4 in die Verteilleitung 10 und von da über die geöffneten Einlassventile 12 und die Einlassleitungen 11 in die Hybridisierkammern 5 gepumpt. Die Waschflüssigkeiten und Waschabfälle verlassen die Hybridisierkammern 5 über die Auslassleitungen 13 und die bereits geöffneten Auslassventile 14, werden in der Sammelleitung 15 zusammengeführt und durch das geöffnete Abfallventil 17 in die Abfalleitung 16 abgeführt.

h) Trocknen der hybridisierten Proben auf den Objektträgern 27. Zu diesem Zweck werden nur die Ventile 12, 14 und 17 geöffnet. Darauf wird das Inertgasventil 50 geöffnet und die Verteilleitung 10, die Einlassleitungen 11, die Hybridisierkammern 5, die Auslassleitungen 13 und die Sammelleitung 15 über das geöffnete Abfallventil 17 und die Abfalleitung 16 mit Inertgas durchgespült bis die Proben trocken sind. Anschliessend könne die fertigen Proben entnommen werden.

**[0033]** Alternativ zum eben beschriebenen Verfahrensschritt h) erfolgt das Trocknen der hybridisierten Proben auf den Objektträgern 27, indem nur die Ventile 12, 14 und 21 geöffnet werden. Darauf wird das Inertgasventil 50 geöffnet und die Verteilleitung 10, die Einlassleitungen 11, die Hybridisierkammern 5, die Auslassleitungen 13 und die Sammelleitung 15 über das geöffnete Entlastungsventil 21, die Entlastungsleitung 20, den Sammelbehälter 22 und die Entlüftungsöffnung 23 mit Inertgas durchgespült bis die Proben trocken sind.

**[0034]** Bevorzugt wird auch eine alternative Ausführungsform des erfindungsgemässen Verfahrens, bei der auf die zweite Membran 33' der Agitationseinrichtung 32 verzichtet werden kann. Zu diesem Zweck muss ein anderes Medium die Funktion dieses Federelements übernehmen. Dies wird dadurch erreicht, dass nach dem Einfüllen aller an der Hybridisierung teilnehmenden Proben und Medien in die Hybridisierkammern 5 alle Ventile geschlossen (vgl. Schritte a-d) und darauf die Auslassventile 13 wieder geöffnet werden. Damit wird das mit Luft gefüllte Volumen der Sammelleitung 15 sowie der direkt anschliessende Teil der Abfalleitung 16 mit den mit Flüssigkeit gefüllten Volumina der Hybridisierkammern 5 verbunden. Die zwischen den geschlossenen Ventilen 17, 19 sowie 21 und den Musterflüssigkeiten in den Hybridisierkammern 5 eingeschlossene Luft ist elastisch komprimierbar und bildet nun das gewünschte Federelement.

**[0035]** Alternativ kann der Schritt c) mit einem Inertgas (z.B.  $N_2$ ) ausgeführt werden: In diesem Fall können chemische Wechselwirkungen zwischen dem gasförmigen Federelement  $N_2$  und den Proben ausgeschlossen werden.

### Physikalisches Ausführungsbeispiel

**[0036]** In einer ersten Versuchsreihe wurde die physikalischen Grundlagen untersucht. Dazu wurden mehrere 100 Objektträger ohne Proben bearbeitet. Die vorzugsweise aus einem Elastomer bestehenden O-Ring-Dichtungen 28 aus z.B. Neopren, Silikon, gedrehtem PTFE, Polyethylen oder Viton verhinderten alle erfolgreich einen Flüssigkeitsverlust. Grundvoraussetzung ist selbstverständlich, dass der Anpressdruck auf den Deckel 26, den O-Ring 28 und den Objektträger 27 genügend gross, d.h. deutlich höher als der erzeugte Kammerdruck ist. Die verwendeten Hybridisierkammern 5 umfassten zwischen dem Deckel 26 und dem Objektträger 27 eine Fläche von 21 x 65 mm. Der Kammerdruck wurde um 1 bar, d.h. um  $10^5$  N/m<sup>2</sup> über den Normaldruck der Umgebung angehoben. Bei einer aktuellen, wirksamen Fläche von 13.65 cm<sup>2</sup> oder  $1.365 \times 10^{-3}$  m<sup>2</sup> musste somit eine Kraft von mehr als 136.5 N bzw. von ca. 13.9 kp pro Hybridisierkammer 5 aufgewendet werden, damit sich diese nicht spontan öffnen konnten. Es wird angenommen, dass auch andere Dichtungsformen und Dichtungsmaterialien genügen und einen Flüssigkeitsaustritt verhindern, falls eine entsprechend dem Überdruck in der Hybridisierkammer 5 gewählte Schliesskraft auf den Deckel 26, die Dichtung 28 und den Objektträger 27 ausgeübt wird.

**[0037]** Während beim Standardgerät SN22 im Laufe des Bearbeitens von Slides bzw. Objektträgern mit hydrophoben Oberflächen regelmässig Luftblasen zu beobachten waren, wurden beim erfindungsgemässen Prototypen keinerlei Luftblasen festgestellt.

### Biologisches Ausführungsbeispiel

**[0038]** Zum Durchführen eines Beispiels einer erfindungsgemäss unter erhöhtem Druck durchgeführten Hybridisierung wurden zwei Systeme zeitparallel und unabhängig voneinander eingesetzt. Es handelt sich dabei um ein Standardgerät des Anmelders (Tecan HS 400, Seriennummer 22; kurz SN22 genannt), welches bei Normaldruck betrieben wurde und um einen erfindungsgemässen Prototypen (kurz PT3 genannt), der bei einem um 0.8 bis 1.0 bar erhöhtem Kammerdruck betrieben wurde. Beide Geräte waren mit einem einander entsprechenden Agitationsmechanismus ausgerüstet, wie er grundsätzlich weiter oben beschrieben wurde. Diese Agitationseinrichtung 32 in SN22 wurde mit ca. 0.5 bar, diejenige in PT3 mit einem Agitationsdruck von ca. 1.5 bar betrieben. Bei beiden Geräte wurde das Einhalten der genauen Temperatur vorher überprüft; sie wurden (abgesehen von den erwähnten, testbedingten Unterschieden) mit genau gleichen Parametern (z.B. Temperaturen) betrieben. Dadurch wurde ermöglicht, dass von den erzielten Resultaten direkte Rückschlüsse auf die Ursachen gezogen werden konnten.

## EP 1 614 466 A2

**[0039]** Die Hybridisierungsprozedur (Pufferzubereitung, Musterinjektion, Programmdefinierung an den verwendeten Hybridisier-Systemen) wurde gemäss den technischen Instruktionen von Alopex (ALOPEX GmbH, Fritz-Hornschuch-Str. 9, D-95326 Kulmbach, Bundesrepublik Deutschland) durchgeführt. In die Hybridisier-Systeme SN22 und PT3 wurden jeweils je zwei Objektträger 27 eingesetzt und bei 43 °C bzw. bei 61 °C prozessiert. Von den folgenden bearbeiteten Proben werden die Resultate besprochen:

<b>43 °C</b>	<b>43 °C</b>
HS 400 SN22	HS 400 PT3
Objektträger #29, #31	Objektträger #24, #27

<b>61 °C</b>	<b>61 °C</b>
HS 400 SN22	HS 400 PT3
Objektträger #33, #34	Objektträger #35, #37

Verwendet wurde ein Testkit "HybCheck" von Alopex mit der Kit-Chargennummer: 040524). Dieser Testkit dient zur Überprüfung der Hybridisier-Systeme und ist so ausgelegt, dass die Hybridisiertemperaturen vordefiniert sind und dass die "OK" Signale nur bei exaktem Einhalten der vorgesehenen Temperaturen sowie der relevanten Testparameter in Bezug auf Waschen, Agitieren und Trocknen abgegeben werden. Bei den auf den Objektträgern 27 immobilisierten Proben handelt es sich hier um Oligonukleotide, deren Empfindlichkeit auf Temperaturdifferenzen bekannt ist.

**[0040]** Das ausgeführte Programm für jeden Probelauf lautet im Detail:

- Zubereitung der "HybCheck Waschpuffer 1 und 2 lt. Herstellerangaben;
- Lösen von lyophilisierten, fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden in 250 µl auf eine Hybridisiertemperatur (43 °C bzw. 61 °C) vorgewärmtem HybCheck Puffer für die Hybridisierung;
- Einlegen von je 2 Objektträgern (mit je 6 Sub Arrays) auf Position 1 und 2 in das Hybridisier-System, Verwendung der grossen Hybridisierungskammern (63,5 mm x 20 mm);
- Schliessen der Hybridisierungskammern und Starten des Hybridisierungsprogrammes;
- Hybridisierungsprogramm:

- Erstes Waschen bei 43 °C bzw. 61 °C, Dauer 30 sec;
- Injektion von 105 µl der Oligonukleotidlösung bei 43 °C bzw. 61 °C in jede Kammer;
- Hybridisierung bei 43 °C bzw. 61 °C; bei starker Agitation und während 60 min;
- Waschschritt 1 bei 23 °C (Kanal 1) während 30 sec; Absaugen während 30 sec; 2 Wiederholungen;
- Waschschritt 2 bei 23 °C (Kanal 2) während 30 sec; Absaugen während 30 sec; 2 Wiederholungen;
- Trocknen der objektträger während 3 min bei 23 °C;

f) Nach Beendigung der Hybridisierung wurden beide Objektträger herausgenommen und in einen Laser Scanner (Tecan LS400) eingelegt;

g) Messeinstellung des Laser Scanners:

- |                         |                       |
|-------------------------|-----------------------|
| 1. Scan Mode:           | einzelne Wellenlänge  |
| 2. Laserwellenlänge:    | 543 nm (grün)         |
| 3. Filterwellenlänge:   | 590 nm                |
| 4. Gain:                | 165                   |
| 5. Autofokus Modus:     | HS Autofokus, Ebene 1 |
| 6. Scan Resolution:     | 10 µm                 |
| 7. Pinhole:             | klein                 |
| 8. Oversampling Faktor: | 1                     |

h) Nach Messung im Laser Scanner wurden die erhaltenen Rohdaten ausgewertet wie folgt:

### Hybridisierung bei 43 °C:

- 6 Sub Arrays (6x9 Spots) auf einem Objektträger (Microslide)
- Perfect Match (PM) bei 43 °C: 24 Spots pro Slide (4 pro Sub Array)
- Mismatch 1 (MM1) bei 43 °C: 24 Spots pro Slide (4 pro Sub Array)

## EP 1 614 466 A2

4. Mismatch 2 (MM2) bei 43 °C: 24 Spots pro Slide (4 pro Sub Array)
5. Negative Controls: 36 Spots pro Slide (6 pro Sub Array)
6. Von allen PM's und MM1's pro Microslide (24 Einzelwerte) wurde der Mittelwert, die Standardabweichung und der CV berechnet. Dabei gilt:  $CV = (\text{Standardabweichung}/\text{Mittelwert}) \times 100$
7. Diskriminierung PM:MM1 (1:5) sowie Diskriminierung PM:MM2 (1:20) berechnet
8. Die CV-Wert und die Diskriminierungs-Werte als "OK" (falls CV über ein ganzes Slide < 18%) oder "failed" angegeben.

### Hybridisierung bei 61 °C:

1. 6 Sub Arrays (6x9 Spots) auf einem Objektträger (Microslide)
2. Perfect Match (PM) bei 61°C: 24 Spots pro Slide (4 pro Sub Array)
3. Mismatch 1 (MM1) bei 61°C: 24 Spots pro Slide (4 pro Sub Array)
4. Mismatch 2 (MM2) bei 61°C: 24 Spots pro Slide (4 pro Sub Array)
5. Negativkontrollen: 36 Spots pro Slide (6 pro Sub Array)
6. Von allen PM's und MM1's pro Microslide (24 Einzelwerte) wurde der Mittelwert, die Standardabweichung und der CV berechnet. Dabei gilt:  $CV = (\text{Standardabweichung}/\text{Mittelwert}) \times 100$
7. Diskriminierung PM:MM1 (1:5) sowie Diskriminierung PM:MM2 (1:20) berechnet
8. Die CV-Werte und die Diskriminierungs-Werte als "OK" (falls CV über ein ganzes Slide < 18%) oder "failed" angegeben.

[0041] Die folgenden Ergebnisse wurden erzielt:

#### 43 °C / HS 400 SN22

##### [0042]

CV Perfect Match	OK
CV Mismatch 1	OK
Diskriminierung Perfect Match and Mismatch 1	OK
Diskriminierung Perfect Match and Mismatch 2	OK
Spotqualität	OK
Negativkontrollen	OK
Es wurde kein Gradient beobachtet	

#### 43 °C / HS 400 PT3

##### [0043]

CV Perfect Match	OK
CV Mismatch 1	OK
Diskriminierung Perfect Match and Mismatch 1	OK
Diskriminierung Perfect Match and Mismatch 2	OK
Spotqualität	OK
Negativkontrollen	OK
Es wurde kein Gradient beobachtet	

#### 61 °C / HS 400 SN22

##### [0044]

CV Perfect Match	OK
CV Mismatch 1	OK
Diskriminierung Perfect Match and Mismatch 1	OK
Diskriminierung Perfect Match and Mismatch 2	OK

## EP 1 614 466 A2

Tabelle fortgesetzt

Spotqualität	#33 failed, #34 OK
Negative Controls	OK
Es wurde kein Gradient beobachtet	

5

### 61°C / HS 400 PT3

#### [0045]

10

CV Perfect Match	OK
CV Mismatch 1	OK
Diskriminierung Perfect Match and Mismatch 1	OK
Diskriminierung Perfect Match and Mismatch 2	OK
Spotqualität	failed
Negativkontrollen	OK
Es wurde kein Gradient beobachtet	

15

20

**[0046]** Die gezeigten Resultate belegen nicht nur, dass beide verwendeten Geräte sehr brauchbare Resultate liefern. Vielmehr sind die in den beiden Geräten SN22 und PT3 erzielten Resultate (nach Temperaturen geordnet) einander so ähnlich, dass ein Einfluss des erhöhten Druckes auf die Hybridisierung ausgeschlossen werden kann.

25

**[0047]** Das erfindungsgemässe Verfahren ist nicht auf den Einsatz in Hybridisierungskammern beschränkt. Es kann auch in anderen Geräten angewendet bzw. eingesetzt werden, um dort das Auftreten von unerwünschten Luftblasen zu verhindern. Solche Geräte oder Instrumente können z.B. aus dem Bereich der Microfluidics-Technologie stammen, wie etwa "Lab on a Chip" - Systeme.

30

**[0048]** Die Figur 6 zeigt ein Schema eines zum Ausführen des erfindungsgemässen Verfahrens geeigneten, zweiten Geräts bzw. Systems. Dieses System 1' unterscheidet sich von dem in Figur 1 dargestellten System 1 im wesentlichen dadurch, dass jedem Deckel 26 zwei Hybridisierungskammern 5A,5B zugeordnet sind. Diese beiden Hybridisierungskammern 5A,5B können über einem einzelnen Objektträger mit beispielsweise zwei identischen DNA-Mikroarrays angeordnet werden. Es können aber auch zwei kleinere Objektträger 27 eingesetzt werden, von welchen jedes mit dem einen Deckel 26 zusammen nur jeweils eine Hybridisierungskammer 5 definiert (nicht gezeigt). Jede Hybridisierungskammer 5A,5B wird von der Verteilleitung 10 über je ein individuelles Einlassventil 12A,12B und je eine individuelle Einlassleitung 11A,11B mit Flüssigkeiten, wie Waschpuffer oder Hybridisierungsmedien versorgt. Somit können alle Hybridisierungskammern wahlweise autark, d.h. unabhängig voneinander oder aber gemeinsam, d.h. simultan betrieben werden.

35

**[0049]** Um die in den beiden Hybridisierungskammern 5A,5B unter jeweils einem Deckel 26 anwesenden Flüssigkeiten gegenüber den auf den Objektträgern immobilisierten Proben bewegen zu können, verfügt jeder Deckel 26 dieses besonders bevorzugten Systems 1' für jede einzelne Hybridisierungskammer 5A,5B über einen eigenen, mit je einer Membran 33 versehenen Agitationsraum 30. Dieser Agitationsraum 30 ist jeweils mit einer Agitationsleitung 36 mit der Hybridisierungskammer 5A,5B verbunden, wobei die Membran 33 den Agitationsraum 30 von einem Druckraum 34 trennt. Diese Druckräume 34 werden über die Druckleitung 35 mit einem Druckfluid befüllt und sporadisch, z.B., pulsierend mit dem Agitationsdruck beaufschlagt. In Figur 6 erfolgt die Beaufschlagung der Membranen 33 der Hybridisierungskammern 5A,5B in Serie, d.h. synchron. Dies hat den Vorteil einer vereinfachten Bauweise, bei der nach dem Überdruckventil 43 keine weiteren Ventile oder Steuerelemente in der Druckverteilung 39 oder in den zu den Druckräumen 34 führenden Druckleitungen 35 vorgesehen werden müssen. Es kann jedoch auch vorgesehen sein, dass jede Membran 33 mit einer separaten Druckleitung 35 (parallel) unter Druck gesetzt wird (nicht gezeigt).

40

45

**[0050]** Die Auslässe 13A,13B eines Deckels 26 münden in die Auslassleitung 13 desselben und werden, wie bereits bei Figur 1 beschrieben, über das Auslassventil 14 der Sammelleitung 15 zugeführt. Gemäss einer bevorzugten Ausführungsform dieses Systems 1' weist die Auslassleitung 13 einen vergrösserten Durchmesser auf und stellt so den Raum bereit, in welche ein als Federelement dienendes Gaskissen Platz findet. Dieses Federelement steht - direkt über eine durchgängige Fluidleitung, oder indirekt (durch ein Membran getrennt) - mit dem für die Hybridisierung verwendeten Flüssigkeitsvolumen in Verbindung. Dieses Federelement wirkt federnd den durch die Agitationseinrichtung 32 auf den Druckraum 34 ausgeübten Agitationsdruckunterschieden entgegen (ähnlich wie bereits im Zusammenhang mit Figur 1 beschrieben). Damit wird erreicht, dass der Kammer-Druck, der mittels einer Druckeinrichtung zum Verhindern von Luftblasen in den Hybridisierungskammern 5 aufgebaut wird, unabhängig von Agitationsdruckunterschieden über dem in der Umgebungsluft herrschenden, normalen atmosphärischen Druck gehalten werden kann. Als Federelemente können auch Membranen dienen, welche direkt mit den Medien in den Hybridisierungskammern 5 beaufschlagt werden, oder welche

50

55

durch ein Flüssigkeitskissen oder ein Gaskissen von diesen Medien getrennt sind. Ein Federelement - egal wie es ausgebildet ist - ist vorzugsweise elastisch bzw. komprimierbar oder dehnbar ausgebildet und gleicht die Agitationsdruckunterschiede in den Hybridisierkammern 5 aus, so dass der Kammerdruck über eine bestimmte Zeit, z.B. während des ganzen Hybridisiervorgangs, so weit über dem in der Umgebungsluft herrschenden, normalen atmosphärischen Druck liegt, dass sich im Hybridisiermedium keine Gasblasen bilden können.

**[0051]** Zusätzlich zum dort beschriebenen System 1, umfasst das hier vorgestellte, bevorzugte System 1' eine Blasleitung 62, welche über ein Blasventil 63 vorzugsweise gerade zu der Stelle führt, wo der Auslass 13B in die Auslassleitung 13 mündet.

**[0052]** Mit dieser Blasleitung 62 wird wie folgt verfahren:

Zuerst wird jede Hybridisierkammer 5A,5B mit Waschpuffer gefüllt. Dabei werden die Einlassleitungen 11A,11B sowie die Auslässe 13A,13B und die Auslassleitung 13 ebenfalls mit Waschpuffer gefüllt. Nach dem Einpipetieren der Musterflüssigkeiten werden die Musterzuführungen 31 und die Einlassventile 12A,12B wieder geschlossen. Die Auslassventile 14 bleiben geöffnet. Werden nun die Blasventile 63 geöffnet, so dringt Gas aus einem Kompressor oder einem Druckspeicher über die individuellen Blasleitungen 64 in die Auslassleitungen 13 ein und verdrängt den Waschpuffer aus diesen Auslassleitungen 13. Dieses Gas bildet dann das Gaskissen in der Auslassleitung 13. Durch deren vergrößerten Durchmesser, weist das Gaskissen das notwendige Volumen auf, um erfolgreich als Federelement dienen zu können. Durch die beim Agitieren auftretenden Druckspitzen wird das Gas in den Auslassleitungen entsprechend komprimiert und federt beim Nachlassen des Agitationsdruckes zurück. Dadurch entsteht die gewünschte Pendelbewegung der Medien in den Hybridisierkammern 5. In dieser eben beschriebenen Ausführungsform kann das Federelement als Teil des Agitationsmechanismus betrachtet werden; tatsächlich erübrigt sich hier das Anbringen einer zweiten Membran 33'. Ist allerdings der Querschnitt der Auslassleitung 13 zu klein, um den ganzen für die Federelement-Wirkung benötigten Raum zur Verfügung zu stellen, so kann ergänzend doch eine zweite Membran 33' (vgl. z.B. Fig. 1) vorgesehen werden.

**[0053]** Figur 7 zeigt eine schematische Ansicht einer besonderen, ersten Anordnung eines Deckels 26 mit einer Hybridisierkammer 5, von unten gesehen. Der wesentliche Unterschied zu der in Figur 3 bereits gezeigten Ausführungsform liegt hier in der Auslassleitung 13 mit dem vergrößerten Durchmesser, wodurch der Raum für ein als Federelement dienendes Gaskissen bereit gestellt wird. In diese Auslassleitung 13 mündet in der Nähe ihres Endes der individuelle Auslass 13' der Hybridisierkammer 5. In dem gleichen Bereich mündet auch die dieser Hybridisierkammer 5 zugeordnete, individuelle Blasleitung 64. Alle Medienleitungen weisen je eine Anschlussöffnung auf, die in der gemeinsamen Anschlussebene 57 des Deckels 26 liegt. Diese fünf Öffnungen sind bevorzugt auf einer Linie angeordnet, sie können aber auch beliebig angeordnet sein. Alle anderen Teile entsprechen der Ausführungsform von Fig. 3. In diesem Ausführungsbeispiel ist eine zweite Membran 33' vorgesehen, welche einen zweiten Agitationsraum 30' verschliesst. Die zweite Membran 33' dient in diesem Fall zur Unterstützung des als Gaskissen in der Auslassleitung 13 angeordneten Federelements. Der zweite Agitationsraum 30' ist hier als geschlossener Raum ausgebildet und enthält ein Gaskissen, welches über die Membran 33' zusammendrückbar und wieder expandierbar ausgebildet ist. Falls die Auslassleitung 13 ein genügend grosses Gaskissen bereitstellt, kann auf die zweite Membran 33' und den zweiten Agitationsraum 30' verzichtet werden (vgl. Fig. 8).

**[0054]** Figur 8 zeigt eine schematische Ansicht einer besonderen, zweiten Anordnung eines Deckels 26 mit zwei Hybridisierkammern 5A,5B, von unten gesehen. Wie die in Figur 7 gezeigte Ausführungsform, weist hier der Deckel 26 eine Auslassleitung 13 mit dem vergrößerten Durchmesser auf, wodurch der Raum für ein als Federelement dienendes Gaskissen bereit gestellt wird. In diesem Fall genügt der bereitgestellte Hohlraum, um die Wirkung als Federelement zu garantieren, deshalb weisen beide hinter einander liegenden Hybridisierkammern 5A,5B keine zweite Membran 33' und keinen zweiten Agitationsraum 30' auf. Die beiden individuellen Auslässe 13A,13B münden in diese Auslassleitung 13, wobei eine Mündung nahe dem Ende und die andere Mündung irgendwo in einem Mittenbereich der Auslassleitung 13 liegt. Die Agitation in den Hybridisierkammern 5A,5B wird über eine gemeinsame Agitationsleitung 35 betrieben.

**[0055]** Alternativ kann auch je eine individuelle Agitationsleitung zu den Agitationskammern 30 der beiden Hybridisierkammern 5A,5B führen (nicht gezeigt). In diesem alternativen Falle könnte sich die Druckleitung 35 innerhalb des Deckels verzweigen, so dass nur ein gemeinsamer Anschluss für die individuellen Druckleitungen auf der gemeinsamen Anschlussebene 57 des Deckels 26 notwendig wäre. Es könnte aber auch vorgesehen sein, die beiden Hybridisierkammern 5A,5B mit je einer individuellen und unabhängigen Agitationseinrichtung 32 zu versehen. Dies wäre mit einer zusätzlichen Druckleitung 42' und Druckverteilung 39' sowie mit einer, pro Hybridisierkammer 5A,5B über einen zusätzlichen Anschluss in der gemeinsamen Anschlussebene 57 des Deckels 26 befüllbaren, individuellen Agitationsleitung 35' zu bewerkstelligen (nicht gezeigt).

**[0056]** Sinngemäss könnten auch mehr als zwei, z.B. drei Hybridisierkammern 5 pro Deckel 26 angeordnet werden. Die Anzahl der Hybridisierkammern 5 pro Deckel 26 ist lediglich durch die Praktikabilität der Anordnung der dazu notwendigen Zu- und Ableitungen, Dichtungen und Agitationsvorrichtungen limitiert. Dabei kann wahlweise ein einziger Objektträger 27 mehrere vorzugsweise mit einem Nukleotidarray versehene Bereiche aufweisen, so dass mit einem unterteilten Deckel 26 (vgl. z.B. Fig. 8) mehrere Hybridisierkammern 5 pro Deckel 26 und Objektträger 27 betrieben werden können. Es können aber auch kleinere Objektträger 27' vorgesehen sein, welche im wesentlichen gerade eine

einzelne, kleinere Hybridisierkammer 5 definieren, so dass die mehrere Hybridisierkammern 5 pro Deckel 26, jedoch auf mehreren Objektträgern 27 betrieben werden können.

## 5 Patentansprüche

1. System (1) mit Hybridisierkammern (5) zum Hybridisieren von auf Objektträgern (27) immobilisierten Nukleinsäureproben, Proteinen oder Gewebeschnitten, wobei jede Hybridisierkammer (5) als ein im wesentlichen spaltförmiger, mit einer Flüssigkeit im wesentlichen befüllbarer Raum zwischen einem dieser Objektträger (27) und einem Deckel (26) definiert ist, wobei der Deckel (26) derart gegenüber dem Objektträger (27) angeordnet ist, dass die Hybridisierkammer (5) gegenüber der Umgebungsluft abgedichtet ist, und wobei das System (1) eine Agitationseinrichtung (32) umfasst, mit welcher Flüssigkeiten in den Hybridisierkammern (5) gegenüber den auf den Objektträgern (27) immobilisierten Proben bewegt werden können, **dadurch gekennzeichnet, dass** das System eine Einrichtung zum Verhindern von Luftblasen in den Hybridisierkammern (5) umfasst, welche als Druckeinrichtung zum Aufbauen eines Kammer-Drucks in den Hybridisierkammern (5) ausgebildet ist, wobei dieser Kammer-Druck **dadurch** unabhängig von Agitationsdruckunterschieden über dem in der Umgebungsluft herrschenden, normalen atmosphärischen Druck liegt, dass das System (1) zumindest ein Federelement umfasst, welches mit dem für die Hybridisierung verwendeten Flüssigkeitsvolumen in Verbindung steht und federnd den durch die Agitationseinrichtung (32) auf den Druckraum (34) ausgeübten Agitationsdruckunterschieden entgegenwirkt.
2. System (1) gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Druckeinrichtung zum Aufbauen eines Kammer-Drucks in einem Bereich zwischen 100 mbar bis 1.4 bar über dem normalen atmosphärischen Druck in der Umgebungsluft ausgebildet ist.
3. System (1) gemäß Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Druckeinrichtung eine Druckquelle (8,3) umfasst, welche über unter Druck setzbare Leitungen (9,51) mit den Hybridisierkammern (5) verbindbar ist.
4. System (1) gemäß Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Druckquelle eine Förderpumpe (8) oder eine Druckgasflasche (3) umfasst.
5. System (1) gemäß Anspruch 3 oder 4, **dadurch gekennzeichnet, dass** die unter Druck setzbaren Leitungen (9,51) ein Verbindungsventil (19), eine Verteilleitung (10), eine Sammelleitung (15) sowie für jede der Hybridisierkammern (5) ein Einlassventil (12) und ein Auslassventil (14) umfassen.
6. System (1) gemäß Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet, dass** die unter Druck setzbaren Leitungen (9,51) zudem eine Abfalleitung (16) mit einem Abfallventil (17) und eine Entlastungsleitung (20) mit einem Entlastungsventil (21) umfasst.
7. System (1) gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Agitationseinrichtung (32) eine Überdruckpumpe (46) und einen Überdruckbehälter (47) umfasst, welche mit je einem Druckraum (34) eines Deckels (26) verbindbar sind, wobei der Deckel (26) zudem eine Membran (33) umfasst, welche den Druckraum (34) von einem Agitationsraum (30) trennt.
8. System (1) gemäß Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Agitationseinrichtung (32) eine Unterdruckpumpe (48) und einen Unterdruckbehälter (49) umfasst, welche mit je einem Druckraum (34) eines Deckels (26) verbindbar sind, wobei der Deckel (26) zudem eine Membran (33) umfasst, welche den Druckraum (34) von einem Agitationsraum (30) trennt.
9. System (1) gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Federelement als eine im Deckel (26) angeordnete, zweite Membran (33') ausgebildet ist.
10. System (1) gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Federelement ein mit einer Hybridisierkammer (5) während dem Hybridisiervorgang in Verbindung stehendes Gaskissen ist.
11. System (1) gemäß Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Federelement als in der Auslassleitung (13) im Deckel (26) angeordnetes, in Verbindung mit der Hybridisierkammer (5) stehendes Gaskissen ausgebildet ist.
12. System (1) gemäß Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Federelement als in der Sammelleitung

(15) zwischen dem Abfallventil (17), dem Verbindungsventil (19) und dem Entlastungsventil (21) angeordneter Luftraum ausgebildet ist.

- 5
13. System (1) gemäss einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** es Deckel (26) umfasst, die zwei oder mehr Hybridisierkammern (5A,5B) definieren.
- 10
14. Verfahren zum Verhindern von Luftblasen in den Hybridisierkammern (5) eines Systems (1) zum Hybridisieren von auf Objektträgern (27) immobilisierten Nukleinsäureproben, Proteinen oder Gewebeschnitten, gemäss welchem jede im wesentlichen spaltförmige, zwischen einem dieser Objektträger (27) und einem Deckel (26) angeordnete Hybridisierkammer (5) mit einer Flüssigkeit im wesentlichen gefüllt wird, wobei der Deckel (26) derart gegenüber dem Objektträger (27) angeordnet ist, dass die Hybridisierkammer (5) gegenüber der Umgebungsluft abgedichtet ist, und wobei das System (1) eine Agitationseinrichtung (32) umfasst, mit welcher Flüssigkeiten in den Hybridisierkammern (5) gegenüber den auf den Objektträgern (27) immobilisierten Proben bewegt werden können, **dadurch gekennzeichnet, dass** mit einer Druckeinrichtung dieses Systems (1) in den Hybridisierkammern (5) ein Kammer-Druck ausgebildet wird, der **dadurch** unabhängig von Agitationsdruckunterschieden über dem in der Umgebungsluft herrschenden, normalen atmosphärischen Druck liegt, dass das System (1) ein Federelement umfasst, welches mit dem für die Hybridisierung verwendeten Flüssigkeitsvolumen in Verbindung steht und federnd den durch die Agitationseinrichtung (32) auf den Druckraum (34) ausgeübten Agitationsdruckunterschieden entgegenwirkt.
- 15
- 20
15. Verfahren gemäss Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet, dass** ein Kammer-Druck erzeugt wird, der um mindestens 100 mbar bis maximal um 1.4 bar höher ist als der normale Umgebungsdruck.
- 25
16. Verfahren gemäss Anspruch 14 oder 15, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Kammer-Druck mittels einer Flüssigkeit oder mittels eines Gases erzeugt wird.
- 30
17. Verfahren gemäss Anspruch 16, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Flüssigkeit zum Erzeugen des Kammer-Drucks ein von einer Förderpumpe (8) in eine Verteilleitung (10) und über Einlassventile (12) gegen die Flüssigkeit in den Hybridisierkammern (5) gedrücktes Hybridisiermedium ist.
- 35
18. Verfahren gemäss Anspruch 16, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Gas zum Erzeugen des Kammer-Drucks von einer Förderpumpe (8) über ein Belüftungsventil (9) angesogene Luft oder ein in einem Behälter (3) gespeichertes Inertgas ist, wobei dieses Gas über eine Verteilleitung (10) und über Einlassventile (11) gegen die Flüssigkeit in den Hybridisierkammern (5) gedrückt wird.
- 40
19. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 14 bis 18, **dadurch gekennzeichnet, dass** in einem im Deckel (26) angeordneten und gegenüber einem Agitationsraum (30) mit einer Membran (33) abgetrennten Druckraum (34) ein Agitationsdruck aufgebaut wird, der um 0.5 bis 1 bar höherer ist als der gewünschte Kammer-Druck
- 45
- 50
- 55
20. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 14 bis 19, **dadurch gekennzeichnet, dass** eine zweite, im Deckel (26) angeordnete Membran (33'), oder ein mit einem Gas gefülltes Volumen einer Sammelleitung (15) oder einer Auslassleitung (13) als Federelement verwendet werden, welches diesen Agitationsdruckunterschieden entgegenwirkt.

Fig. 1

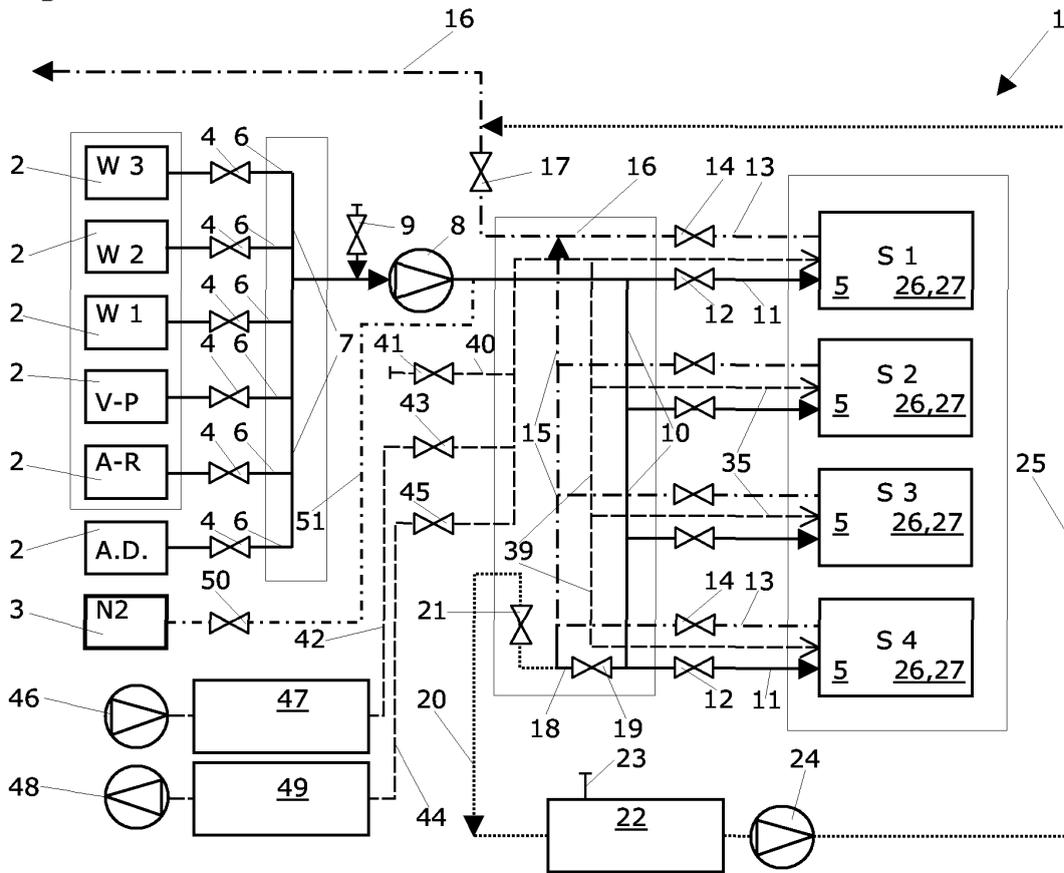


Fig. 2

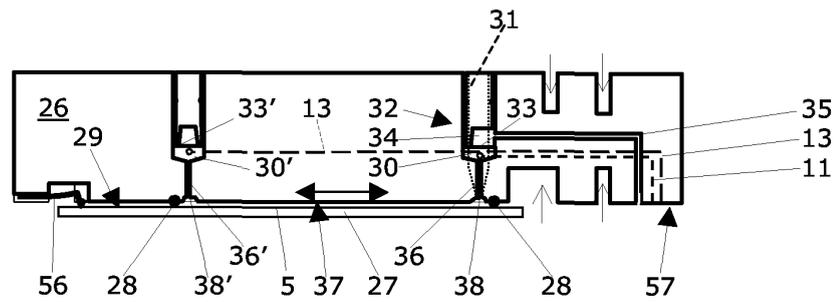


Fig. 3

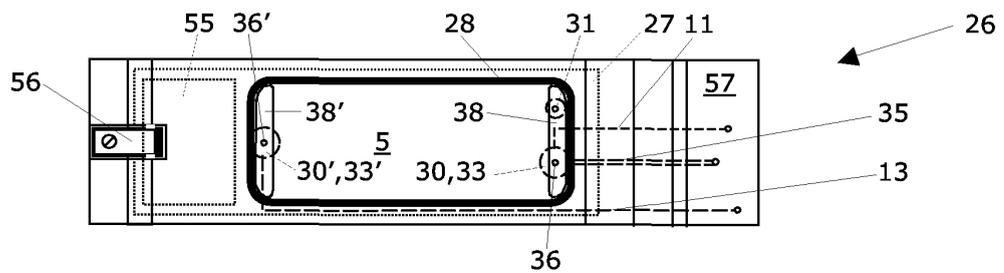


Fig. 4

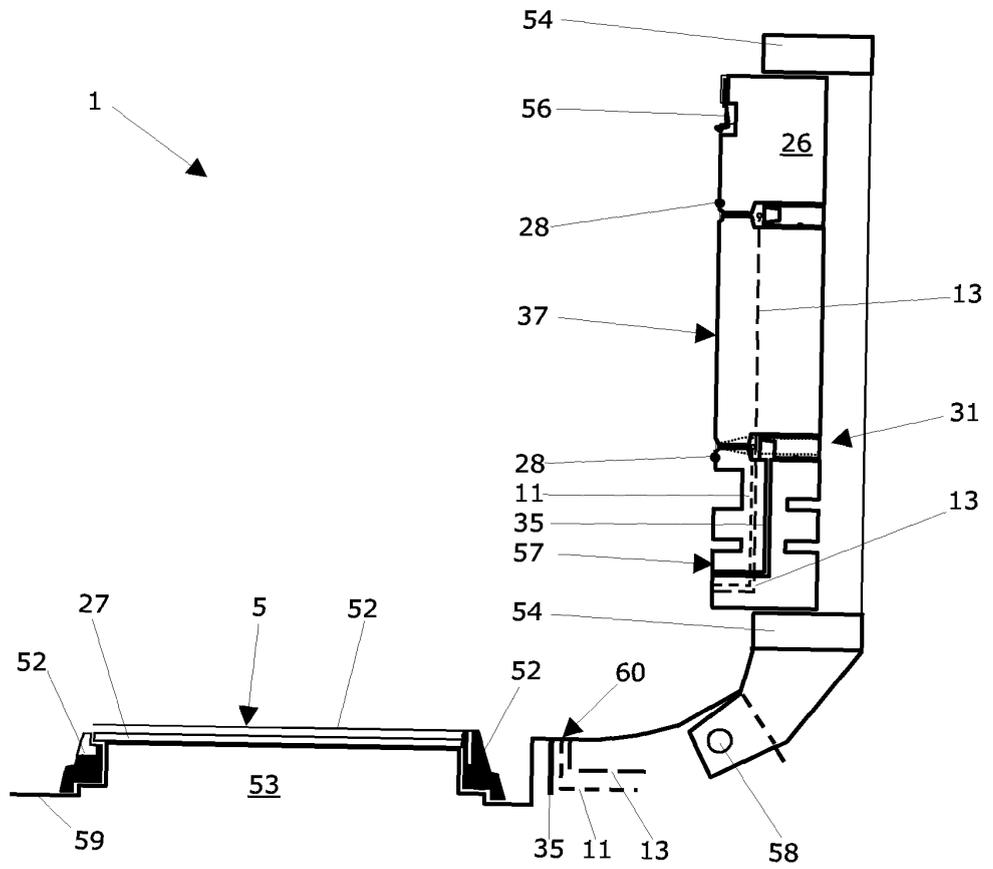


Fig. 5

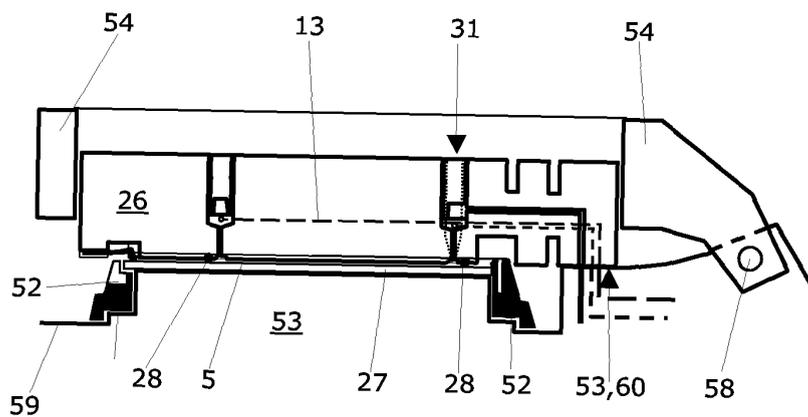


Fig. 6

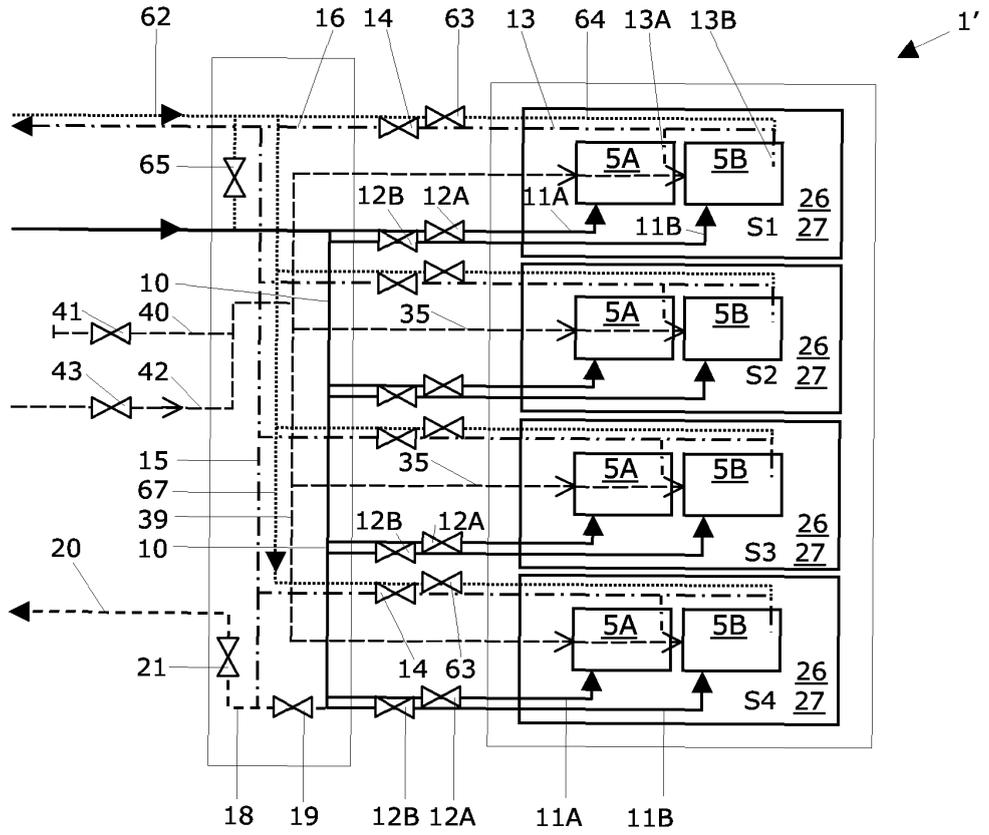


Fig. 7

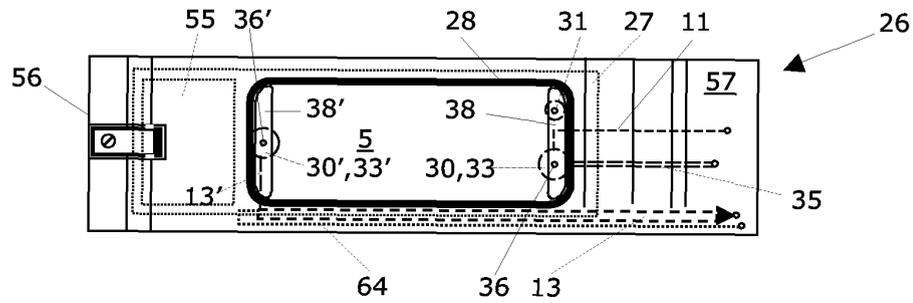


Fig. 8

