

(19)



(11)

EP 2 189 219 A1

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
26.05.2010 Patentblatt 2010/21

(51) Int Cl.:
B01L 3/00 (2006.01)

(21) Anmeldenummer: **10153162.2**

(22) Anmeldetag: **24.01.2005**

(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**

(30) Priorität: **23.01.2004 EP 04001498**

(62) Dokumentnummer(n) der früheren Anmeldung(en)
nach Art. 76 EPÜ:
05701140.5 / 1 708 813

(71) Anmelder: **QIAGEN GmbH
40724 Hilden (DE)**

(72) Erfinder:
• **Rothmann, Thomas
40764 Langenfeld (DE)**
• **Sprenger-Haussels, Markus
40822 Mettmann (DE)**

• **Benkel, Petra
42781 Haan (DE)**
• **Hermes, Sabine
40699 Erkrath (DE)**
• **Wilmer, Friederike
45133 Essen (DE)**

(74) Vertreter: **Reinhard - Skuhra - Weise & Partner
GbR
Patent- und Rechtsanwälte
Friedrichstrasse 31
80801 München (DE)**

Bemerkungen:

Diese Anmeldung ist am 10-02-2010 als
Teilanmeldung zu der unter INID-Code 62 erwähnten
Anmeldung eingereicht worden.

(54) **Kontaminationsbarriere**

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft eine Kontaminationsbarriere zur Vermeidung von Verunreinigungen wässriger Lösungen in offenen und/oder automatisierten Systemen, wobei die Kontaminationsbarriere aus mindestens einem Silikonöl besteht, oder ein Gemisch mindestens eines Silikonöls mit zumindest einem mit Wasser nicht mischbaren Kohlenwasserstoff oder mit einem Kohlenwasserstoffgemisch aufweist.

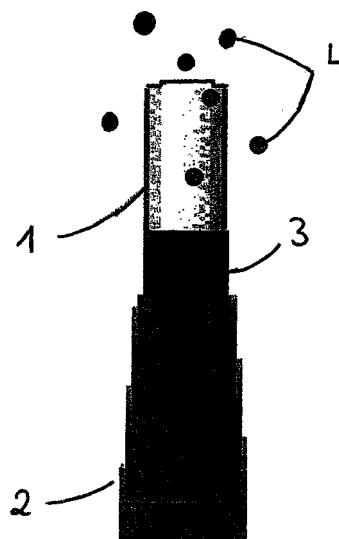


Fig. 1

EP 2 189 219 A1

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft eine Kontaminationsbarriere sowie ein Verfahren zur Vermeidung von Verunreinigungen wässriger Lösungen, welche insbesondere durch Verschleppungen und/oder Aerosolbildung beispielsweise beim Pipettieren auf offenen Systemen entstehen.

[0002] Gerade im Bereich der Biotechnologie wurde in den letzten Jahren verstärkt nach Automationslösungen, zum sicheren und effizienten Abarbeiten, insbesondere bei einer großen Anzahl von Proben, wie sie beispielsweise beim HIV-Virus-Monitoring anfallen, gesucht. Vorzugsweise sind hierbei mehr und mehr vollautomatische Hochdurchsatz-Arbeitsstationen gefragt, die in kürzester Zeit eine sehr hohe Probenanzahl abarbeiten, wobei zudem immer mehr auf einen zusätzlichen manuellen Einsatz verzichtet wird, zugleich aber auch geringste Mengen an biologischem Material nachgewiesen werden sollen.

[0003] Derzeit gängige Robotersysteme weisen jedoch beim Arbeiten mit biologischem Material speziell im Bereich der Molekularbiologie und/oder der Diagnostik ein grundlegendes Problem auf. Da die Proben üblicherweise in einem plattenförmigen Körper (wie beispielsweise einem Rack) aufgearbeitet werden, wobei die einzelnen Probengefäße offen nebeneinander stehen, kommt es, vornehmlich durch Aerosolbildung, aber auch immer wieder durch mechanische Verschleppung von Probenmaterial, bei der Bearbeitung zu Kontaminationen vorwiegend benachbarter Proben.

[0004] Zur Vermeidung derartiger (Kreuz-) Kontaminationen sind im Stand der Technik bereits einige Zusatzmodule und/oder Verbrauchsmaterialien für Robotersysteme bekannt. So werden beispielsweise Hauben oder, wie in der Gebrauchsmusterschrift DE 200 06 546 U1 dargestellt, Abdeckmatten zum Schutz mehrerer in einem plattenförmigen Körper ausgebildeter und nach oben offener Reaktionsgefäße offenbart. Diese Art der Abdeckung schützt jedoch nur die Proben eines Racks beispielsweise beim Transport- und/oder im Lagerzustand. Bei der Bearbeitung der einzelnen Proben auf dem Rack treten jedoch weiterhin Kontaminationen auf.

[0005] Ferner kann auch durch die im Stand der Technik bekannte Verwendung von sterilem Verbrauchsmaterial wie beispielsweise speziell beschichteten Einmalpipetten und/oder Einmalfiltertips die Kreuzkontaminationsrate nur reduziert, nicht jedoch vollständig beseitigt werden. So sind Kontaminationen vor allem im ppm-Bereich auch weiterhin (zum Beispiel im Bereich der PCR-Diagnostik, wo Einzelmoleküle nachgewiesen werden) ein grundlegendes Problem.

[0006] Des weiteren sind Verfahren bekannt, bei denen, wie beispielsweise in der europäischen Patentschrift EP 0011327 B1 dargestellt, der wässrigen Lösung wasserlösliche Verbindungen zur Vermeidung von Aerosolbildung einverleibt werden. Da diese sich jedoch mit der Probenflüssigkeit vermischen und diese gegebenenfalls sogar verändern bzw. zu unerwünschten Nebenreaktionen führen könnten, ist deren Einsatz äußerst nachteilig und insbesondere in der PCR-Diagnostik nicht denkbar.

[0007] Weiterhin wurden zum Schutz vor Kontamination der Proben die unterschiedlichsten Verschlussmöglichkeiten, wie beispielsweise verschiedene Deckel, Septen und/oder Filter etc. für einzelne oder mehrere Probengefäße entwickelt. Diese weisen jedoch Nachteile im Handling, insbesondere im Bereich der Automatisierung auf, da beispielsweise das Öffnen und Schließen von Verschlussdeckeln etc., insbesondere einzelner Proben, sehr zeitaufwendig und je nach Verschlussystem maschinell kaum realisierbar ist. Zudem besteht weiterhin die Gefahr, dass die im Probengefäß entstandenen Aerosole beim Bearbeiten entweichen und dadurch im nachfolgenden Schritt beim Öffnen des nebenstehenden Probengefäßes dessen Probe mit Probenmaterial kontaminiert werden kann.

[0008] Zudem sind Probengefäße mit Septen und/oder dünnen Filtermaterialien nicht in jedem Roboter- beziehungsweise automatischen Pipetiersystem variabel einsetzbar, da sich nur wenige Pipettenspitzen und/oder Pipettennadeln für den Gebrauch derartiger Probengefäße eignen.

[0009] Da der Stand der Technik keine bekannten Vorrichtungen und/oder kein bekanntes Verfahren, die/das in befriedigender Weise zur Vermeidung von Kontaminationen, insbesondere im Bereich der automatisierten PCR-Diagnostik, eingesetzt werden könnte, offenbart und sich eine solche Vorrichtung beziehungsweise ein solches Verfahren auch nicht daraus herleiten lässt, liegt der vorliegenden Erfindung die **Aufgabe** zugrunde, eine effiziente und reproduzierbare Abarbeitung einer hohen Probenanzahl unter Vermeidung von Kontaminationen in den zu analysierenden Lösungen in offenen und/oder automatisierten Systemen zu ermöglichen.

[0010] Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die Bereitstellung einer Kontaminationsbarriere zur Vermeidung von Verunreinigungen wässriger Lösungen in offenen und/oder automatisierten Systemen gelöst, die zumindest einen mit Wasser nicht mischbaren Kohlenwasserstoff und/oder ein Kohlenwasserstoffgemisch aufweist. Mithin wird die Aufgabe der vorliegenden Erfindung durch die Bereitstellung eines Verfahrens zur Vermeidung von Kontaminationen dadurch gelöst, dass zur Bearbeitung wässriger Lösungen in offenen und/oder automatisierten Systemen, diese mit zumindest einem mit Wasser nicht mischbaren Kohlenwasserstoff oder einem Kohlenwasserstoffgemisch überschichtet werden.

[0011] Die erfindungsgemäße Kontaminationsbarriere zeichnet sich insbesondere durch ihren flexiblen Einsatz in den unterschiedlichsten Probengefäßen aus. Besonders vorteilhaft ist, dass die erfindungsgemäße Kontaminationsbarriere einfach und schnell auch in sehr kleinen Probengefäßen ausgebildet und wieder entfernt werden kann. Insbesondere kann auf einen erhöhten zeit- und kostenaufwendigen, manuellen oder gar maschinellen Einsatz von Verschlusskappen und/oder Septen etc. verzichtet werden. Ein weiterer Vorteil der erfindungsgemäßen Kontaminationsbarriere ist deren

flexible Einbringung in das Probengefäß, wodurch im Gegensatz zum Einsatz von Septen und/oder Filtermaterialien, die fest im Probengefäß angeordnet sind, das Volumen der wässrigen Lösung jederzeit variiert werden kann, ohne dass sich ein Hohlraum bildet, in dem es zu einer kontaminationsbedingenden Aerosolbildung kommt. Ganz besonders vorteilhaft ist auch der Einsatz bei sehr kleinen Volumina der wässrigen Lösungen (z. B. im ppm-Bereich und kleiner).

[0012] Ferner ergibt sich für die Übersichtung der erfindungsgemäßen Kontaminationsbarriere aufgrund der mit Wasser nicht mischbaren Kohlenwasserstoffe oder Kohlenwasserstoffgemische ein vorteilhaftes Einsatzgebiet auf nahezu jeglichen wässrigen Lösungen.

[0013] Um bei der Bearbeitung wässriger Lösungen in offenen und/oder automatisierten Systemen Kontaminationen zu vermeiden wird auf die zu analysierende Lösung zumindest ein mit Wasser nicht mischbarer Kohlenwasserstoff, durch Übersichtung aufgebracht. Die derart auf die wässrige Lösung aufgebrachte erfindungsgemäße Kontaminationsbarriere legt sich wie ein Film vollständig auf die wässrige Lösung und verhindert somit das Durchdringen sowie die Bildung von wässrigen Aerosolen. Vorteilhafterweise weist die erfindungsgemäße Kontaminationsbarriere vorzugsweise zumindest einen substituierten oder unsubstituierten, verzweigten oder unverzweigten Kohlenwasserstoff auf. Des Weiteren kann die erfindungsgemäße Kontaminationsbarriere aus einem cyclischen, gesättigten oder ungesättigten Kohlenwasserstoff (wie z. B. Cyclohexan etc.) oder aus einem aromatischen Kohlenwasserstoff (wie z. B. Benzol oder Toluol etc.) bestehen beziehungsweise gebildet werden, wobei jedoch ausschließlich solche Kohlenwasserstoffe verwendet werden, die nicht mit Wasser mischbar sind. Zudem können die erfindungsgemäß eingesetzten Kohlenwasserstoffe als Substituenten beispielsweise ein oder mehrere Halogenatom(e), Nitrogruppe(n) und/oder Aminogruppe(n) tragen.

[0014] Alle vorgenannten (Kohlenwasserstoff-) Verbindungen können einzeln oder auch in Mischungen (z. B. ein Kohlenwasserstoffgemisch wie Mineralöl) vorliegen.

[0015] Unter Mineralöl im Sinne der vorliegenden Erfindung werden die aus mineralischen Rohstoffen, wie beispielsweise Erdöl, Braun- und Steinkohlen, Holz oder Torf gewonnenen flüssigen Destillationsprodukte verstanden, die im wesentlichen aus Gemischen von langkettigen, aliphatischen und gesättigten Kohlenwasserstoffen bestehen. Besonders geeignet sind Destillationsprodukte beziehungsweise Kohlenwasserstoffgemische, wie beispielsweise Weißöl und/oder andere Paraffinöle, die hauptsächlich langkettige Alkane, mit vorzugsweise 13 bis 20, besonders bevorzugt 14 bis 16 Kohlenstoffatome enthalten.

[0016] Unter Kohlenwasserstoffen werden im Sinne der Erfindung in erster Linie verzweigte oder unverzweigte Kohlenwasserstoffe verstanden, die 5 bis 20, vorzugsweise 6 bis 16, besonders bevorzugt 8 bis 12 Kohlenstoffatome aufweisen. Ganz besonders bevorzugt werden verzweigte oder unverzweigte Alkane mit 8 bis 12 Kohlenstoffatomen verwendet, worunter wiederum Oktan, Nonan, Dekan und/oder Dodekan sowie Mischungen daraus besonders bevorzugt werden.

[0017] Gemäß einer alternativen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann/können der erfindungsgemäßen Kontaminationsbarriere ein oder mehrere mit Wasser nicht mischbare(s) Additiv(e) zugemischt werden. Als Additive im Sinne der Erfindung werden hydrophobe Substanzen verstanden, die zusätzlich zur Minderung bzw. zur Verhinderung von Aerosolbildung beitragen. Besonders bevorzugt ist hierbei die Zugabe von Siliconölen in verschiedensten Zusammensetzungen und Viskositäten. Eine wichtige Eigenschaft der Siliconöle ist in diesem Zusammenhang ihr inertes Verhalten gegenüber anderen Substraten. Charakteristisch ist auch ihr hohes Spreitungsvermögen, mit der die Ausbildung besonderer Eigenschaften, beispielsweise Hydrophobie, einhergeht.

[0018] Unter Siliconölen im Sinne der Erfindung werden in erster Linie Syntheseöle auf Basis halborganischer Polymere und Copolymere aus Silizium-Sauerstoff-Einheiten mit organischen Seitenketten verstanden. Hierbei haben diese unverzweigten wechselweise aus Silizium- und Sauerstoffatomen aufgebauten Ketten bevorzugt eine Kettenlänge von 10 bis 1000 Silizium-Atomen, besonders bevorzugt von 30 bis 500 Silizium-Atomen, ganz besonders bevorzugt von 50 bis 150 Silizium-Atomen.

[0019] Gemäß einer vorteilhaften Ausgestaltung der vorliegenden Erfindung wird die erfindungsgemäße Kontaminationsbarriere (mit und ohne Additive) vorzugsweise zur Übersichtung von wässrigen Lösungen in offenen und/oder automatisierten Systemen mit biologischem Probenmaterial verwendet. Unter biologischem Probenmaterial werden im Sinne der vorliegenden Erfindung Biopolymere verstanden, welche zum einen natürlich vorkommende Makromoleküle, wie beispielsweise Nukleinsäuren, Proteine oder Polysaccharide, zum anderen aber auch synthetisch hergestellte Polymere sein können, solange diese die gleichen oder ähnliche Bausteine enthalten, wie die natürlichen Makromoleküle.

[0020] Überraschenderweise stellte sich heraus, dass durch eine Übersichtung wässriger Lösungen, welche vorzugsweise biologisches Probenmaterial enthalten, mit Kohlenwasserstoffen der vorgenannten Art, insbesondere in Form der erfindungsgemäßen Kontaminationsbarriere, speziell in offenen, automatisierten Systemen eine effiziente und reproduzierbare Vermeidung von vor allem aerosolbedingten Kontaminationen erfolgt.

[0021] Nachfolgend soll nun die vorliegende Erfindung anhand von beigefügten Zeichnungen sowie Ausführungsbeispielen näher erläutert werden.

[0022] Es zeigt:

Fig. 1 die Bildung von Aerosolen aus einer wässrigen Lösung bei im Stand der Technik bekannten offenen Proben-

gefäßten;

Fig. 2 eine auf eine wässrige Lösung überschichtete erfindungsgemäße Kontaminationsbarriere in einem offenen Probengefäß;

Fig. 3 einen schematischen aus dem Stand der Technik bekannten Pipetiervorgang aus einem offenen Probengefäß, bei dem ein Teil einer wässrigen Lösung unter Aerosolbildung entnommen wird;

Fig. 4 einen schematischen Pipetiervorgang aus einem offenen Probengefäß, bei dem ein Teil einer wässrigen Lösung unterhalb einer erfindungsgemäßen Kontaminationsbarriere ohne Aerosolbildung entnommen wird;

Fig. 5 einen schematischen Pipetiervorgang aus einem offenen Probengefäß, bei dem einer wässrigen Lösung unterhalb einer erfindungsgemäßen Kontaminationsbarriere ohne Aerosolbildung ein weiterer wasserlöslicher Teil hinzugegeben wird.

Fig. 6 Darstellung der Calls auf dem Array

[0023] Dem in Fig. 1 und Fig. 3 dargestellten Stand der Technik ist deutlich zu entnehmen, dass sich durch mechanische Einwirkung beim Pipetiervorgängen und/oder Mixen der Probe etc., beispielsweise mittels einer Pipetiervorrichtung 6 o. ä., in einem handelsüblichen Reaktionsgefäß 1 auf einer Pipetierplatte 2 (wie beispielsweise einer Mikrotiterplatte etc.) auf einer biologisches Probenmaterial aufweisenden, wässrigen Lösung 3, die Aerosole 4 bilden.

Eine derartige Aerosolbildung kann, sobald das Aerosol 4 aus dem Reaktionsgefäß 1 ausströmt, leicht zu Kontaminationen benachbarter Reaktionsgefäße führen.

[0024] Durch die in den Fig. 2, 4 und 5 dargestellte erfindungsgemäße Kontaminationsbarriere 5 wird eine derartige kontaminationsbedingende Aerosolbildung vermieden, da die wässrigen Aerosole 4 die Kontaminationsbarriere 5 nicht durchdringen können. Die wasserunlösliche Kontaminationsbarriere 5 liegt hierbei im Reaktionsgefäß 1 wie ein Film auf der wässrigen Lösung 3 in der sich das biologische Probenmaterial in gelöster Form befindet.

[0025] Beim Pipetiervorgang wird, wie in Fig. 4 und 5 gezeigt, die im Reaktionsgefäß 1 befindliche wässrige Lösung 3 beziehungsweise die Probe jeweils unter der Kontaminationsbarriere 5 bearbeitet. Durch die wasserunlösliche Zusammensetzung der Kontaminationsbarriere 5 wird die Bildung von Aerosolen 4 sowohl beim Eintauchen und Zurückziehen der Pipetiervorrichtung 6 aus der wässrigen Lösung 3 als auch beim Mischen ausgeschlossen.

[0026] Auch beim in Fig. 5 dargestellten Hinzufügen einer weiteren wässrigen Lösung zur Probe, kommt es beim Mischen der vorgelegten wässrigen Lösung 3 mit der zusätzlichen Lösung aufgrund der erfindungsgemäßen Kontaminationsbarriere 5 nicht zur Aerosolbildung der wässrigen Mischung 7.

[0027] Da die Kontaminationsbarriere 5, im Gegensatz zu fest in Reaktionsgefäßen eingebrachten Filtern und/oder Septen, zudem sehr flexibel ist, können jederzeit mittels einer Pipetiervorrichtung 6 dem Reaktionsgefäß 1 variable Mengen an wässriger Lösung 3 entnommen oder hinzugefügt werden, ohne dass sich zwischen der Oberfläche der wässrigen Lösung 3 und der Kontaminationsbarriere 5 ein Hohlraum ausbildet, wodurch zusätzlich die Bildung von Aerosolen 4 vermieden wird.

Bezugszeichenliste

[0028]

- 1 offenes Reaktionsgefäß
- 2 Pipetierplatte
- 3 wässrige Lösung
- 4 Aerosolmoleküle
- 5 Kontaminationsbarriere
- 6 Pipetiervorrichtung
- 7 wässrige Mischung (aus vorgelegter und hinzugefügter Probenlösung)

Ausführungsbeispiele

[0029] Anhand der nachstehenden Versuchsdurchführungen werden die wesentlichen Kontaminationsquellen (KQ) offener, automatisierter Pipetiersysteme, insbesondere in vollautomatischen Hochdurchsatz-Arbeitsstationen, sog. Robotersystemen (wie z. B. BioRobot Mdx/ QIAGEN GmbH), aufgezeigt und Kontaminationen (K), die vornehmlich durch Aerosolbildung, aber auch immer wieder durch mechanische Verschleppung von Probenmaterial entstehen, nachge-

wiesen sowie die deutliche Verringerung derartiger Kontaminationen durch den Einsatz der erfindungsgemäßen Kontaminationsbarriere dargestellt.

[0030] Zum Nachweis wurden Kreuzkontaminationstests anhand von Proben mit biologischem Probenmaterial im ppm-Bereich und kleiner, wie sie in gängigen Verfahren im Bereich der PCR-Diagnostik verwendet werden, durchgeführt. Die Versuche basierten hierbei auf einem gängigen im Stand der Technik bekannten Verfahren zur Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren, insbesondere von viraler RNA (verwendetes Protokoll: Q1Aamp 96 Virus Mdx V1.1 / QIAGEN GmbH).

[0031] Als Systemzubehör, Reagenzien, Verbrauchsmaterial etc. wurden ebenfalls handelsübliche Kits (z. B. Q1Aamp 96 Virus BioRobot Kit / QIAGEN GmbH) etc., die sich besonders für den Einsatz in Robotersystemen eignen, verwendet. Für die Versuchsdurchführung mit Alkanvorlage (Beispiele 1b und 2b) wurde in gängigen 96-well-Deepwellplatten (im Folgenden S-Blocks genannt) manuell jeweils 100 µl Dodekan vorgelegt.

[0032] Der Nachweis erfolgte nicht nur durch bloße Beobachtungen während der einzelnen Pipetierschritte im Aufreinigungsprozess, sondern ebenso durch die zusätzliche Bestimmung von tatsächlichen Nukleinsäure-Verunreinigungen in den Negativproben in einer anschließenden Downstream-Analyse (z. B. PCR, RT-PCR etc.). Neben den wesentlichen Kontaminationsquellen derartiger Systeme zeigen die nachstehenden Beispiele anhand der ermittelten Kontaminationsraten (KR) deutlich die Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Kontaminationsbarriere.

Beispiel 1:

[0033] Kreuzkontaminationstests, durchgeführt

- a) mit einem Probenvolumen von 285 µl ohne Alkanvorlage und
- b) mit einem Probenvolumen von 285 µl mit Alkanvorlage.

[0034] Der automatisierte Prozess wurde mit der Identifizierung der Proben, dem sog. Loadcheck, gestartet. Als positives Probenmaterial (PP) wurde Hepatitis-C-Virenmaterial (arHCV) mit einer durchschnittlichen Konzentration von 10^8 - 10^9 RNA copies/ ml und als negatives Probenmaterial (NP) Negativplasma (z. B. Citratplasma / Breitscheid) eingesetzt. Nach dem Loadcheck wurden jeweils 40 µl einer handelsüblichen Protease (z. B. QIAGEN Protease / QIAGEN GmbH) in den S-Block pipettiert, und das System auf 56°C hochgeheizt.

[0035] Die Zugabe von jeweils 285 µl Probenmaterial erfolgte, wie nachfolgend schematisch dargestellt, im "Schachbrett-Muster". Neben jeder PP (+) wurde alternierend eine NP (-) in den S-Block pipettiert (KQ 1!).

Tabelle 1: Schematische Darstellung der Auftragung der PP und NP im Schachbrett-Muster / S-Block

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
B	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
C	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
D	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
E	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
F	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
G	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
H	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+

[0036] Nachfolgend wurden den einzelnen Reaktionslösungen 305 µl eines handelsüblichen Lysepuffers (z. B. Lysis Buffer AL / QIAGEN GmbH) zugegeben, diese dann durch auf und ab pipettieren gemischt (KQ 2!) und nachfolgend für 10 Minuten inkubiert. Abschließend wurden im Abstand von ca. einer Minute pro Reihe jeder Reaktionslösung jeweils zweimal 360 µl Ethanol (p.a. oder min. 96 %) zu pipettiert (KQ 3!).

[0037] Zur Trennung bzw. Aufreinigung der so isolierten Nukleinsäuren wurden jeweils 910 µl Lysat automatisch in entsprechende Filtersysteme (z. B. Q1Aamp 96 plate/ QIAGEN GmbH) überführt (KQ 4!) und unter Vakuum 5 Minuten bei 25°C filtriert (KQ 5!).

[0038] Gemäß dem Versuchsprotokoll (s.o.) wurden die mit der Nukleinsäure beladenen Filter nachfolgend unter Vakuum mit jeweils 800 µl eines handelsüblichen Waschpuffers (z. B. Wash Buffer AW2 / QIAGEN GmbH) (KQ 6!) und dann in einem zweiten Waschschrift mit 930 µl Ethanol (p.a. oder min. 96 %) (KQ 7!) gewaschen und anschließend die

Membranen zur Beseitigung von Ethanol unter Vakuum und 60°C in einer automatisierten Vakuumvorrichtung (z. B. RoboVac/ QIAGEN GmbH) getrocknet (KQ 8!).

[0039] Die aufgereinigte Nukleinsäure wurde abschließend unter Vakuum eine Minute lang einmal mit 50 µl und einmal mit 100 µl mindestens eines kommerziell erhältlichen Elutionspuffers (z. B. Elution Buffer AVE / QIAGEN GmbH) vom Filtersystem eluiert (KQ 9!). Das aufgefangene Eluat wurde für den nachfolgenden Amplifikationsprozess außerhalb des automatisierten Pipetiersystems aufbereitet. Dem für die RT-PCR aufbereiteten Eluat wurde ein handelsüblicher Enzymmix (z. B. Mastermix / QIAGEN GmbH) hinzu pipettiert (KQ 10!), zur Bestimmung der Nukleinsäure-Kontaminationen eine RT-PCR durchgeführt und die Ergebnisse ausgewertet.

[0040] Die zwei Versuchsdurchläufe (Lauf 1al und 1all) ohne Vorlage von Dodekan wurden mit folgender ar HCV-Verdünnung durchgeführt:

$$1 \times 10^{11} \text{ IU/ml} + 148,5 \text{ ml NP} = 1 \times 10^9 \text{ IU/ml}$$

[0041] Bis hin zur Zugabe des Elutionspuffers konnten weder im Lauf 1al noch im Lauf 1all Beobachtungen gemacht werden, die insbesondere an den Kontaminationsquellen (KQ) 1-4 auf Kontaminationen hingewiesen hätten.

Erst im Verlauf der Elution (KQ 7) konnten diesbezüglich Beobachtungen gemacht werden. So war beispielsweise eine deutliche Blasenbildung bei der Zugabe des Elutionspuffers insbesondere in Reihe 12 zu beobachten. Teilweise zerplatzten die Blasen beim Eintauchen und Herausziehen der Pipettenspitzen. Nach der Elution waren in Reihe 1 bei den NP-Positionen B, D, F (sowie im Lauf 1al auch H) die Auslassöffnungen des Filtersystems (Nozzles) ebenso gelb wie die der PP.

[0042] Nach Durchführung der RT-PCR wurden folgende Kreuzkontaminationen ermittelt:

Lauf 1al: 9 K / 48 NP $\Rightarrow$ $KR_{\text{Lauf 1al}} = 18,75 \%$

Lauf 1all: 2 K / 48 NP $\Rightarrow$ $KR_{\text{Lauf 1all}} = 4,17 \%$

[0043] Das ergibt eine durchschnittliche Kontaminationsrate (KR) von 11,46 %.

[0044] Die drei Versuchsdurchläufe (Lauf 1bl, 1bll und 1blII) mit Vorlage von Dodekan wurden ebenfalls mit der vorgenannten ar HCV-Verdünnung durchgeführt:

$$1 \times 10^{11} \text{ IU/ml} + 148,5 \text{ ml NP} = 1 \times 10^9 \text{ IU/ml}$$

[0045] Lauf 1blII wurde nachgeschaltet, nachdem in Lauf 1bll die Reihe B aufgrund der fehlenden PP-Aufgabe nicht mitgewertet werden konnte. Während der Versuchsdurchführung konnten jedoch keine besonderen Vorkommnisse, die auf Verschleppung von Probenmaterial während der Pipetervorgänge oder Aerosolbildung hinweisen, beobachtet werden.

[0046] Nach Durchführung der RT-PCR wurden folgende Kreuzkontaminationen ermittelt:

Lauf 1 bl: 1 K / 42 NP $\Rightarrow$ $KR_{\text{Lauf 1bl}} = 2,38 \%$

Lauf 1bll: 3 K / 48 NP $\Rightarrow$ $KR_{\text{Lauf 1bll}} = 6,25 \%$

Lauf 1blII: 3 K / 48 NP $\Rightarrow$ $KR_{\text{Lauf 1blII}} = 6,25 \%$

[0047] Das ergibt eine durchschnittliche Kontaminationsrate (KR) von 4,96 %.

[0048] Nach dem Vergleich der ermittelten Kontaminationsraten konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz von Dodekan die Kreuzkontaminationsrate für das gesamte Isolierungs- und Trennungsverfahren um mehr als das Doppelte (Faktor 2,3) verringert werden kann.

Beispiel 2:

[0049] Kreuzkontaminationstests, durchgeführt

- a) mit einem Probenvolumen von 570 µl ohne Alkanvorlage und
- b) mit einem Probenvolumen von 570 µl mit Alkanvorlage.

[0050] Der automatisierte Prozess wurde mit der Identifizierung der Proben, dem sog. Loadcheck, gestartet. Als

EP 2 189 219 A1

positives Probenmaterial (PP) wurde Hepatitis-C-Virenmaterial (arHCV) mit einer durchschnittlichen Konzentration von $10^8 - 10^9$ RNA copies/ ml und als negatives Probenmaterial (NP) Negativplasma (Citratplasma / Breitscheid) eingesetzt. Nach dem Loadcheck wurden jeweils 80 μ l einer handelsüblichen Protease (z. B. QIAGEN Protease / QIAGEN GmbH) in den S-Block pipettiert, und das System auf 56°C hochgeheizt.

Die Zugabe von jeweils 570 μ l Probenmaterial erfolgte, wie vorstehend in der Tabelle 1 bereits schematisch dargestellt, im "Schachbrett-Muster". Neben jeder PP (+) wurde alternierend eine NP (-) in den S-Block pipettiert (KQ 1!).

[0051] Nachfolgend wurden den einzelnen Reaktionslösungen 610 μ l eines handelsüblichen Lysepuffers (z. B. Lysis Buffer AL / QIAGEN GmbH) zugegeben, diese dann durch auf und ab pipettieren gemischt (KQ 2!) und nachfolgend für 10 Minuten inkubiert. Abschließend wurden im Abstand von einer Minute pro Reihe jeder Reaktionslösung jeweils zweimal 720 μ l Ethanol (p.a oder min. 96%) zu pipettiert (KQ 3!).

[0052] Zur Trennung bzw. Aufreinigung der so isolierten Nukleinsäuren wurden jeweils zwei mal 910 μ l Lysat automatisch in entsprechende Filtersysteme (z. B. QIAamp 96 plate/ QIAGEN GmbH) überführt (KQ 4!) und unter Vakuum 5 Minuten bei 25°C filtriert (KQ 5!).

[0053] Gemäß dem Versuchsprotokoll (s.o.) wurden die mit der Nukleinsäure beladene Filter nachfolgend unter Vakuum jeweils mit 800 μ l eines handelsüblichen Waschpuffers (z. B. Wash Buffer AW2 / QIAGEN GmbH) (KQ 6!) und dann in einem zweiten Waschschrift mit 930 μ l Ethanol (p.a. oder min. 96 %) (KQ 7!) gewaschen und anschließend die Membranen zur Beseitigung von Ethanol unter Vakuum und 60°C in einer automatisierten Vakuumvorrichtung (z. B. RoboVac/ QIAGEN GmbH) getrocknet (KQ 8!).

[0054] Die aufgereinigte Nukleinsäure wurde abschließend unter Vakuum eine Minute lang einmal mit 50 μ l und einmal mit 100 μ l mindestens eines Elutionspuffers (z. B. Elution Buffer AVE / QIAGEN GmbH) vom Filtersystem eluiert (KQ 9!). Das aufgefangene Eluat wurde für den nachfolgenden Amplifikationsprozess außerhalb des automatisierten Pipetiersystems aufbereitet. Dem für die RT-PCR aufbereiteten Eluat wurde ein handelsüblicher Enzymmix (z. B. Mastermix / QIAGEN GmbH) hinzu pipettiert (KQ 10!), zur Bestimmung der Nukleinsäure-Kontaminationen eine RT-PCR durchgeführt und die Ergebnisse ausgewertet.

[0055] Die zwei Versuchsdurchläufe (Lauf 2a1 und 2a11) ohne Vorlage von Dodekan wurden mit folgender ar HCV-Verdünnung durchgeführt:

$$15\text{ml } 1 \times 10^9 \text{ IU/ml} + 22,5 \text{ ml NP} = 4 \times 10^8 \text{ IU/ml}$$

[0056] Schon bei der Zugabe des Lysepuffers in den S-Block türmen sich bereits die Blasen bis zur Oberkante der einzelnen Reaktionsgefäße auf. Zudem führen die Pipetierspitzen (Tips) so schnell wieder aus den Reaktionsgefäßen heraus, dass teilweise die entstandenen Blasen platzen (besonders in Position H5 und H10). Auch beim der zweiten Zugabe des Lysats entstanden beim Mischen im S-Block vermehrt Blasen, die beim Herausfahren der Tips mit hochgezogen wurden und/oder zerplatzten.

[0057] Auch bei der Zugabe des Elutionspuffers konnten sowohl im Lauf 2a1 als auch im Lauf 2a11 Beobachtungen hinsichtlich Kontaminationen gemacht werden. So war beispielsweise eine deutliche Blasenbildung während und nach der Zugabe des Elutionspuffers insbesondere in Reihe G sowie auf der Position H6 zu sehen. Teilweise zerplatzten auch hier die Blasen beim Eintauchen und/oder Herausziehen der Tips. Nach der Elution waren in Reihe 1 bei den NP-Positionen B, D, F und H die Nozzles unter der QIAplate ebenfalls gelb wie bei den PP.

[0058] Nach Durchführung der RT-PCR wurden folgende Kreuzkontaminationen ermittelt:

Lauf 2l: 31 K / 48 NP $\Rightarrow$ $KR_{\text{Lauf 2a1}} = 64,58 \%$

Lauf 2a11: 34 K / 48 NP $\Rightarrow$ $KR_{\text{Lauf 2a11}} = 70,08 \%$

[0059] Das ergibt eine durchschnittliche Kontaminationsrate (KR) von 67,33 %.

[0060] An dieser Stelle zeigt sich deutlich, dass die Pipetierschritte mit steigendem Probenvolumen wesentlich anfälliger für Kreuzkontaminationen sind, da hier das S-Block-Volumen vollständig ausgenutzt wird.

[0061] Die zwei Versuchsdurchläufe (Lauf 2b1 und 2b11) mit Vorlage von Dodekan wurden ebenfalls mit der vorgeannten ar HCV-Verdünnung durchgeführt:

$$15\text{ml } 1 \times 10^9 \text{ IU/ml} + 22,5 \text{ ml NP} = 4 \times 10^8 \text{ IU/ml}$$

[0062] Um die Wirkung der Dodekan-Überschichtung in bezug auf eine Verminderung bzw. Verhinderung von Blasenbildungen etc. besser beobachten zu können, wurde das eingesetzte Dodekan vorher mit Sudanschwarz eingefärbt.

[0063] Während der gesamten Versuchsdurchführung konnten jedoch keine besonderen Vorkommnisse hinsichtlich Kontaminationen beobachtet werden. Auch wiesen die Nozzles an der QIAplate wie schon unter Beispiel 1b) aufgeführt nach der Elution keine Rückstände bzw. Verfärbungen auf.

[0064] Nach Durchführung der RT-PCR wurden folgende Kreuzkontaminationen ermittelt:

Lauf 2bl: 6 K /48 NP $\Rightarrow$ $KR_{\text{Lauf 2bl}} = 12,50 \%$

Lauf 2bII:10 K /48 NP $\Rightarrow$ $KR_{\text{Lauf 2bII}} = 20,83 \%$

[0065] Das ergibt eine durchschnittliche Kontaminationsrate (KR) von 16,67 %

[0066] Nach dem Vergleich der ermittelten Kontaminationsraten konnte somit gezeigt werden, dass durch den Einsatz von Dodekan die Kreuzkontaminationsrate für das gesamte Isolierungs- und Trennungsvorgehen mit höheren Proben- und Reaktionsvolumina sogar um mindestens den Faktor 4 verringert werden kann.

[0067] Wie bereits vorstehend aufgeführt, weist ein derartiges Gesamtverfahren jedoch etliche Fehler- bzw. Kontaminationsquellen auf. Um nun die Wirkung der erfindungsgemäßen Kontaminationsbarriere für einen einzelnen Pipetierschritt zu bestimmen, wurden im Laufe dieser Versuchsreihen einzelne Proben (vorzugsweise NP) entnommen und mittels RT-PCR analysiert. Ausgehend von den in den Beispielen 1b und 2b gemachten Beobachtungen, dass durch die Überschichtung mit Dodekan die Bildung von Blasen beziehungsweise Aerosolen insbesondere in den ersten Prozessschritten (im Bereich der Kontaminationsquellen 1 bis 4) durch das Eintauchen und Herausziehen der Pipetierspitzen verhindert wurde, wurden an diesen Stellen des Gesamtverfahrens Proben entnommen und analysiert. Keine dieser Proben wies Nukleinsäure-Verunreinigungen auf. Für einzelne Prozessschritte können somit durch den Einsatz von Dodekan (Kreuz-) Kontaminationen sogar ganz vermieden werden.

[0068] Weitere Versuche zeigten, dass durch den Einsatz von Dodekan auch in den Pipetierschritten der Downstream-Analysen (wie z. B. der RT-PCR) gute Erfolge bei der Verminderung von (Kreuz-) Kontaminationen erzielt werden können. So wurden beispielsweise in weiteren Kreuzkontaminationstests die für eine RT-PCR notwendige handelsüblich Enzymmischung (z. B. Mastermix / QIAGEN GmbH) einer mit Dodekan überschichteten Probe zugegeben. Auch hier wiesen die Negativproben in den Versuchsreihen mit der erfindungsgemäßen Kontaminationsbarriere deutlich weniger bis gar keine Kontaminationen auf.

[0069] Das Überschichten mit der erfindungsgemäßen Kontaminationsbarriere eignet sich jedoch nicht nur für jegliche Art von Pipetiervorgängen. Gemäß einer weiteren Ausgestaltung der vorliegenden Erfindung kann die erfindungsgemäße Kontaminationsbarriere auch in anderen Modulen der Probenbearbeitung, in denen (Kreuz-) Kontaminationen auftreten, eingesetzt werden. So verhindert die Verwendung der erfindungsgemäßen Kontaminationsbarriere beispielsweise in ebenso vorteilhafter Weise eine Kreuzkontamination, die durch Aerosolbildung, beim Überschlagen mit Waschpuffern, durch die Abgabe mit einem Dispenser, durch das Einbringen von Rühr- oder Mischvorrichtungen (wie z. B. Rührfischen, Rührstäben, Mischstempel oder Mischkolben etc.) sowie bei mechanischen Rühr- und/oder Mischvorgängen auftritt. (Wobei mit Rühren eine kreisförmig Bewegung und mit Mischen eine Auf- und Abwärtsbewegung gemeint sein soll.)

[0070] Zudem kann die eingesetzte Kontaminationsbarriere auch weitere Applikationen positiv beeinflussen. So führt beispielsweise der Einsatz der erfindungsgemäßen Kontaminationsbarriere in Arrayexperimenten wie im Folgenden dargestellt neben der Vermeidung von Kontaminationen auch zu einer Stabilisierung derartiger Applikation.

Beispiel 3:

[0071] Auf Grund der besonderen Eigenschaften der erfindungsgemäßen Additive wurden zur Überschichtung von Reaktionsansätzen für die Arrayexperimente neben Mineralölen auch Mischungen aus Mineral- und Siliconölen gewählt.

[0072] Der Einsatz der erfindungsgemäßen Kontaminationsbarriere erfolgte hierbei im Laufe einer Präparation von biotin-markierter cRNA zur Hybridisierung auf Microarrays (z. B. Human Genome U133B Array / Affymetrix, US), wobei unterschiedliche Volumina der Kontaminationsbarriere zu den cRNA Fragmentierungsansätzen hinzugegeben wurden. Als Kontaminationsbarriere wurden unterschiedliche Mengen an Mineralöl bzw. einem Gemisch aus Mineralöl und Siliconöl eingesetzt.

[0073] Die Synthese der Hybridisierungsproben wurde gemäß dem Herstellerprotokoll (Affymetrix) durchgeführt. Nach der Synthese von cRNA aus 2 µg HeLa S3 total RNA wurde in verschiedene Fragmentierungsansätze 1 µl, 5 µl und 10 µl der Öle hinzugegeben. Diese Fragmentierungsansätze wurden in den Hybridisierungsansatz überführt. Die Hybridisierung und Analyse der GeneChip Arrays wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Kontrollen wurden Proben (K) eingesetzt, die ohne Kontaminationsbarriere ebenfalls gemäß dem Standard-Herstellerprotokoll zur Probenaufbereitung prozessiert wurden.

[0074] Anschließend wurden zu dieser Versuchsreihe Daten (zum Hintergrund auf den verwendeten Arrays), zu detektierbaren, statistisch relevanten Signalen (Present Calls) und den nicht detektierbaren Signalen auf dem Array erhoben. Dabei sollten die Schwankungen der Messwerte gering und unabhängig von der Zugabe der Öle sein. Die ermittelten Daten wurden in einem Säulendiagramm in Figur 6 dargestellt.

[0075] Die Ergebnisse zeigen, dass unter Zugabe der erfindungsgemäßen Kontaminationsbarriere (mit und ohne Additiv) gleichmäßige Hybridisierungsergebnisse erzielt werden. Die Schwankungen der Calls liegen bei +/- 2 %, was der vom Chip-Hersteller angegebenen Schwankung für technische Replikate entspricht.

[0076] Da ferner auch eine Vermeidung von Kreuzkontaminationen bei der automatisierten Präparation von Proben zur Hybridisierung auf Microarrays vorteilhaft und wünschenswert ist, wurde in weiteren Versuchen die Wirkung der erfindungsgemäßen Kontamination auf einem automatisierten System (BioRobot 8000 / QIAGEN GmbH), bei dem Verschleppungen von Teilen der Kontaminationsbarriere während der Prozessierungsschritte bzw. während der Probenvorbereitung auftreten können, überprüft. Für die automatisierte Präparation von RNA aus Zellkulturzellen wurde dabei die RNeasy 96 Chemie (QIAGEN GmbH) verwendet. Dazu wurden 5 µg total RNA aus Hela Zellen an die Säulenmatrix der RNeasy 96 Platten gebunden (n=4). Nach drei Waschschritten wurde die gereinigte RNA von der Säule mit Wasser eluiert. Zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen während der Elution und zur Verbesserung der Ausbeute wurde die Probe zuvor mit Mineralöl sowie einem Gemisch aus Mineralöl und Siliconöl überschichtet. Um zu überprüfen, ob gegebenenfalls auch das Additiv alleine für diese Applikation geeignet ist, wurde ein Versuchsansatz nur mit Siliconöl überschichtet. Nachfolgend wurde die RNA Ausbeute photometrisch bestimmt.

[0077] Auch die Überschichtung der Proben mit einer erfindungsgemäßen Kontaminationsbarriere, der als Additiv ein Siliconöl zugesetzt wurde, führte auf einem automatisierten System zu einer höheren Ausbeute als vergleichbare Versuche ohne die erfindungsgemäße Kontaminationsbarriere. Überraschenderweise konnte hierbei die Ausbeute mit dem Einsatz der erfindungsgemäßen Additive um bis zu 10% gesteigert werden, was eine weitere Verbesserung der erfindungsgemäßen Kontaminationsbarriere darstellt.

[0078] Weitere Versuchsreihen ergaben zudem, dass neben den vorgenannten Mineralöl/Siliconöl-Mischungen auch Siliconöle alleine oder in Form von Additivgemischen in Hybridisierungsansätzen als erfindungsgemäße Kontaminationsbarriere fungieren können. (Getestet wurden hierbei handelsübliche Siliconöle, wie AK 35, AK 50 und AK 100 der Wacker Chemie GmbH)

Patentansprüche

1. Kontaminationsbarriere zur Vermeidung von Verunreinigungen wässriger Lösungen in offenen und/oder automatisierten Systemen, wobei die Kontaminationsbarriere aus mindestens einem Siliconöl besteht, oder ein Gemisch mindestens eines Siliconöls mit zumindest einem mit Wasser nicht mischbaren Kohlenwasserstoff oder mit einem Kohlenwasserstoffgemisch aufweist.
2. Kontaminationsbarriere gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** diese einen unsubstituierten Kohlenwasserstoff aufweist.
3. Kontaminationsbarriere gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** diese einen substituierten Kohlenwasserstoff aufweist.
4. Kontaminationsbarriere nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet, dass** diese einen cyclischen, gesättigten oder ungesättigten Kohlenwasserstoff aufweist.
5. Kontaminationsbarriere nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet, dass** diese einen verzweigten und/oder unverzweigten acyclischen Kohlenwasserstoff aufweist.
6. Kontaminationsbarriere nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Kohlenwasserstoff 5 bis 20, vorzugsweise 6 bis 16, besonders bevorzugt 8 bis 12 Kohlenstoffatome aufweist.
7. Kontaminationsbarriere nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet, dass** diese als Kohlenwasserstoff besonders bevorzugt ein verzweigtes oder unverzweigtes Alkan, vorzugsweise mit 8 bis 12 Kohlenstoffatome, aufweist.
8. Kontaminationsbarriere nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet, dass** diese als Alkan bevorzugt Oktan, Nonan, Dekan und/oder Dodekan sowie Mischungen daraus aufweist.
9. Kontaminationsbarriere nach einem der Ansprüche 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet, dass** diese als Kohlenwasserstoffgemisch Mineralöl aufweist.

EP 2 189 219 A1

10. Kontaminationsbarriere nach einem der Ansprüche 1 bis 9, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Silikonöl ein Syntheseöl auf Basis halborganischer Polymere und Copolymere aus Silizium-Sauerstoff-Einheiten mit organischen Seitenketten aufweist.

5 11. Kontaminationsbarriere nach einem der Ansprüche 1 bis 10, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Silikonöl unverzweigte wechselweise aus Silizium- und Sauerstoffatomen aufgebaute Ketten mit einer Kettenlänge von 10 bis 1000 Silizium-Atomen, bevorzugt von 30 bis 500 Silizium-Atomen, besonders bevorzugt von 50 bis 150 Silizium-Atomen, aufweist.

10 12. Verfahren zur Vermeidung von Kontaminationen, **dadurch gekennzeichnet, dass** bei der Bearbeitung wässriger Lösungen in offenen und/oder automatisierten Systemen, diese mit einer Kontaminationsbarriere gemäß mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche überschichtet werden.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

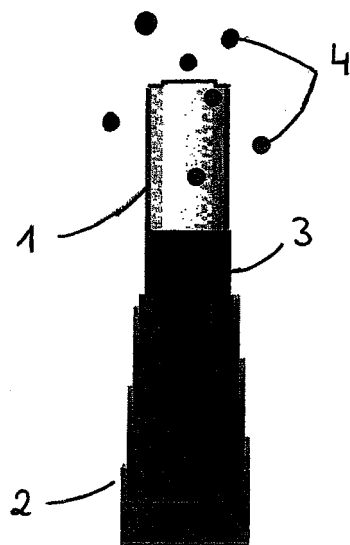


Fig. 1

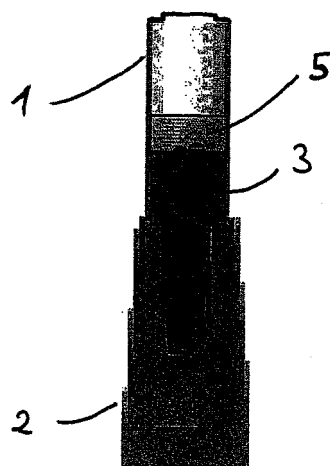


Fig. 2

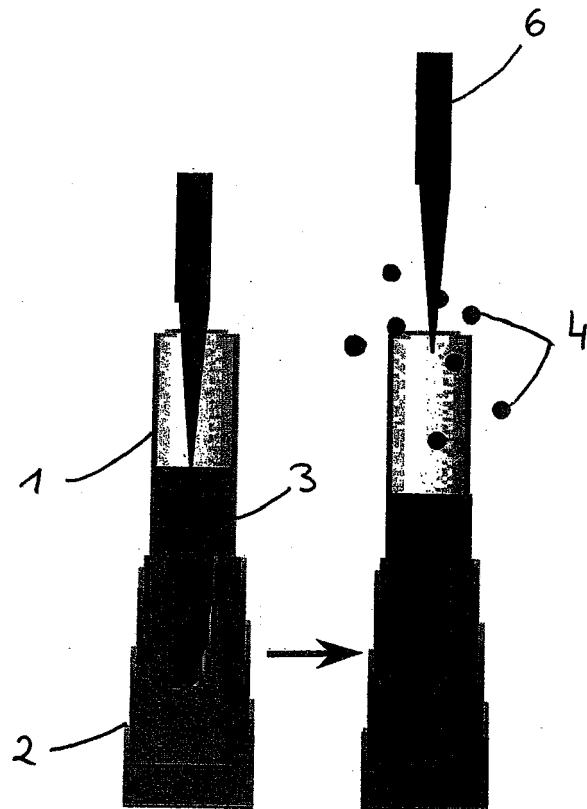


Fig. 3

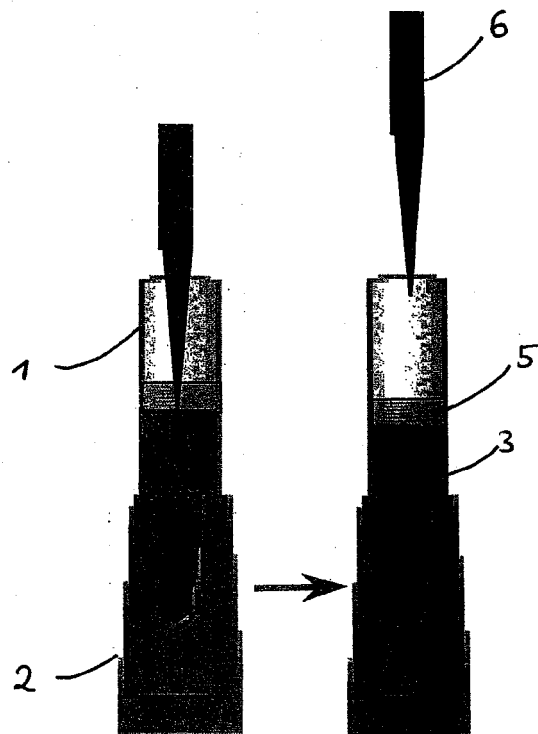


Fig. 4

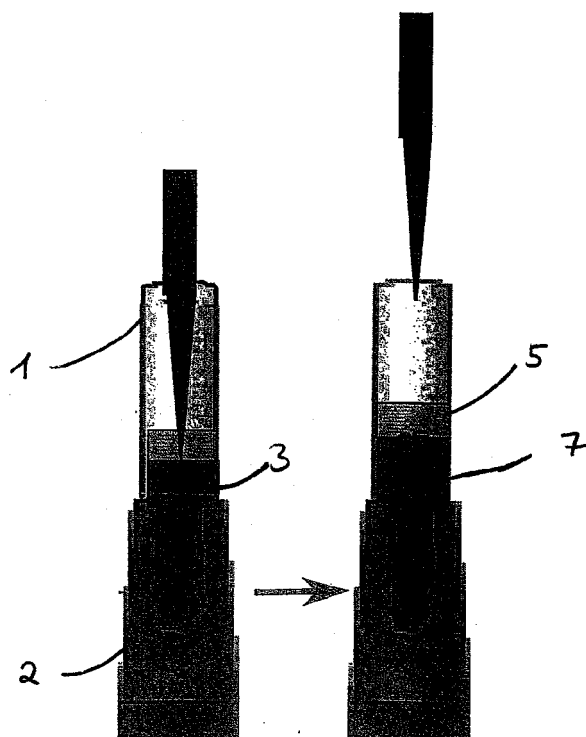
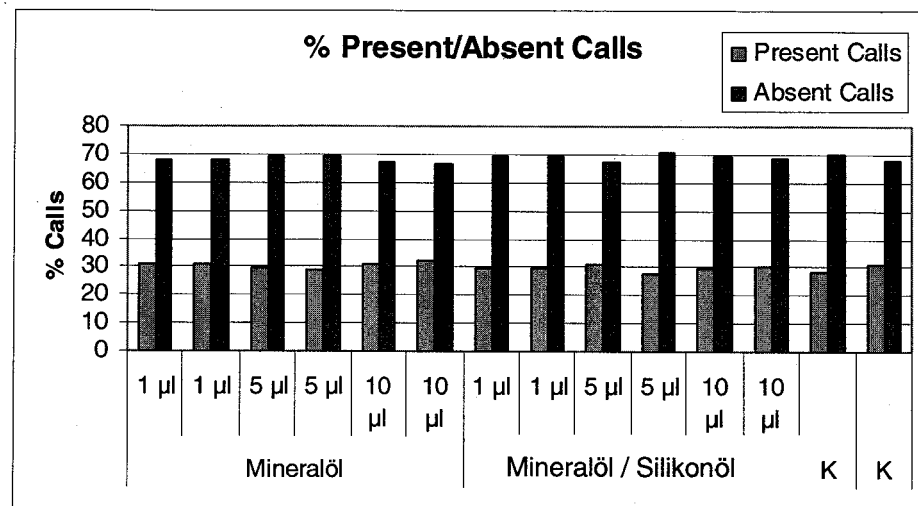


Fig. 5



Figur 6: Darstellung der Calls auf dem Array



EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 10 15 3162

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (IPC)
X	US 2003/036055 A1 (SORGE JOSEPH A [US]) 20. Februar 2003 (2003-02-20) * Absatz [0093] - Absatz [0095] *	1-3,12	INV. B01L3/00
X	WO 03/092892 A1 (GREINER BIO ONE GMBH [DE]; KNEBEL GUENTHER [DE]; D ARCY ALLAN [FR]; CU) 13. November 2003 (2003-11-13) * Seite 14, Zeile 8 - Zeile 20; Abbildung 17 *	1-3,12	
X	WO 98/47003 A1 (CYTONIX CORP [US]; US HEALTH [US]; BROWN JAMES F [US]; SILVER JONATHAN) 22. Oktober 1998 (1998-10-22) * Seite 12, Zeile 3 - Zeile 14 * * Seite 28, Zeile 27 - Seite 29, Zeile 21 *	1	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (IPC)
			B01L C12Q
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort München		Abschlußdatum der Recherche 30. März 2010	Prüfer Tragoustis, Marios
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

3
EPO FORM 1503 03.82 (P04C03)

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 10 15 3162

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am

Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

30-03-2010

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 2003036055 A1	20-02-2003	KEINE	

WO 03092892 A1	13-11-2003	AT 500523 A1	15-01-2006
		AU 2003232220 A1	17-11-2003
		EP 1499443 A1	26-01-2005
		US 2006051249 A1	09-03-2006

WO 9847003 A1	22-10-1998	AU 7128998 A	11-11-1998
		US 6391559 B1	21-05-2002
		US 2008160525 A1	03-07-2008
		US 2008171380 A1	17-07-2008
		US 2008171382 A1	17-07-2008
		US 2009035759 A1	05-02-2009
		US 2008171324 A1	17-07-2008
		US 2008213766 A1	04-09-2008
		US 2008169184 A1	17-07-2008
		US 2008171325 A1	17-07-2008
		US 2008171326 A1	17-07-2008
		US 2008171327 A1	17-07-2008
		US 6143496 A	07-11-2000

EPO FORM P0461

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82

IN DER BESCHREIBUNG AUFGEFÜHRTE DOKUMENTE

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde ausschließlich zur Information des Lesers aufgenommen und ist nicht Bestandteil des europäischen Patentdokumentes. Sie wurde mit größter Sorgfalt zusammengestellt; das EPA übernimmt jedoch keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

In der Beschreibung aufgeführte Patentdokumente

- DE 20006546 U1 [0004]
- EP 0011327 B1 [0006]