

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-516472
(P2004-516472A)

(43) 公表日 平成16年6月3日(2004.6.3)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 27/447	GO 1 N 27/26 3 3 1 D	4 D O 5 4
BO 1 D 57/02	BO 1 D 57/02	
BO 3 C 5/00	BO 3 C 5/00 Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 34 頁)

(21) 出願番号	特願2002-551574 (P2002-551574)	(71) 出願人	592245546 ゲルハルト ヴェーバー
(86) (22) 出願日	平成13年12月7日 (2001.12.7)		ドイツ連邦共和国 8 0 1 1 キルヒハイム マルガリーテンヴェーク 2 3
(85) 翻訳文提出日	平成15年6月12日 (2003.6.12)	(74) 代理人	100100561 弁理士 岡田 正広
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/014408	(72) 発明者	ゲルハルト ヴェーバー
(87) 国際公開番号	W02002/050524		ドイツ連邦共和国 8 5 5 5 1 キルヒハイム マルガリーテンヴェーク 2 3
(87) 国際公開日	平成14年6月27日 (2002.6.27)	Fターム(参考)	4D054 FA06 FB03 FB09 FB20
(31) 優先権主張番号	100 63 097.9		
(32) 優先日	平成12年12月18日 (2000.12.18)		
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		

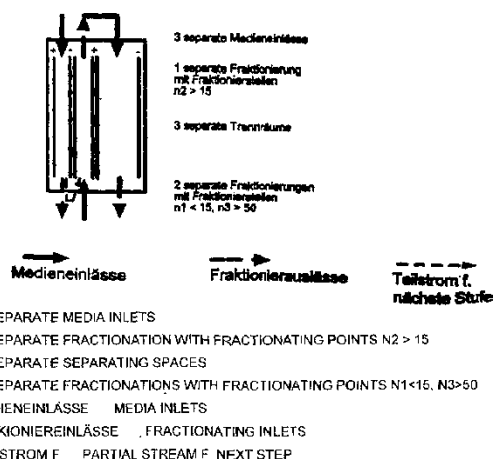
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 キャリアレス電気泳動方法及びこの方法を実施する電気泳動装置

(57) 【要約】

本発明は、サンプル物質を検体に分離するフリーフロー電気泳動方法に関する。本方法は、いくつかのステップ、すなわちサンプル物質を粗分別する第1のステップと、粗分別されたサンプル物質を精密に分別する少なくとも1つの第2ステップとから成る。これらのステップは、並列同時法、直列法、又はこれら2つの組み合わせで実行することができる。

【選択図】 図3



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サンプル物質を検体に分離するキャリアレス電気泳動方法であって、第 1 段階で、前記サンプル物質の粗分別を行い、少なくとも 1 つの第 2 段階で、前記粗分別されたサンプル物質の精密分別を行うことを特徴とする方法。

【請求項 2】

前記第 1 段階で、大きな線流速及び分離対象となる前記検体の短い移動経路を用いることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記第 1 段階では、前記第 2 段階よりも少ない数の分別サイトを用いることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の方法。 10

【請求項 4】

全段階を並列して同時に実行することを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

段階の並列同時処理による実行と、少なくとも 1 つの段階の直列実行とを組み合わせることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

分離チャンバと、電極と、分別部と、サンプル投入部とを備え、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法を実行する電気泳動装置であって、前記分離チャンバが、独立した電極と独立した分別部と独立したサンプル投入部とをそれぞれ有する多数の独立した分離空間に分割されていることを特徴とする装置。 20

【請求項 7】

隣接する分離空間が共通の電極を備えることを特徴とする請求項 6 に記載の装置。

【請求項 8】

前記独立した分別部が異なる数の分別サイトを有することを特徴とする請求項 6 又は 7 に記載の装置。

【請求項 9】

媒体を同じ体積だけ導入し且つ放出するために、定量ポンプの 2 つの独立した移送チャンネルが、前記分離空間の、電極近くの分別出口の領域に接続されていることを特徴とする請求項 6 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の装置。 30

【請求項 10】

前記分離チャンバは、それぞれ複数の独立した構造チャンバ要素から成る前部及び後部で構成されることを特徴とする請求項 6 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の装置。

【請求項 11】

前記後部が固体金属ブロックから成ることを特徴とする請求項 10 に記載の装置。

【請求項 12】

前記金属ブロックが冷却パイプを備えることを特徴とする請求項 11 に記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

40

【発明の属する技術分野】

本発明は、サンプル物質を検体に分離するキャリアレス電気泳動方法及びこの方法を実行する電気泳動装置に関する。

【0002】

【従来の技術】

既知のキャリアレス F F E 電気泳動方法は、独立した電極空間をただ 2 つ、及びこの電極空間の間に分離空間をただ 1 つ備えた分離チャンバを有する電気泳動装置で行われるのが普通である。

【0003】

ところで、F F E をプロテオミクス研究の分野に用いる場合は、数多くの異なるサンプル 50

物質を短時間で分離して、最大の分離量及びできるだけ高いサンプル物質のスループット率をあげる必要がある。

【0004】

しかし、大部分の分離処理におけるように、F F Eの場合、電気泳動装置を分離性能とサンプルスループットとについて同時に最適化することは非常に狭い範囲でしか可能ではない。これは、サンプル物質の量が増加すると分離性能が低下するからである。

【0005】

また、分離性能を最適化するには、できるだけ狭くて精密な分離チャンバギャップを有する分離空間と、特定の分離境界条件、例えば比較的小さい線流速、できるだけ長い分離時間、並びに分離空間の全幅及び/又は分離空間の当該サンプル物質を分別する領域に渡ることができるだけ多くの分別サイトなどが必要となる。しかし、線流速を自由に下げることが出来ないため、分離時間を延長するには電極の長さを相応に長くする必要がある。そしてこのことは、分離チャンバの外形寸法を同時に大きくする必要があることを意味するため、分離チャンバギャップを所望の精度で製造することが難しくなる。

10

【0006】

ドイツ特許出願公開公報第2215761A1号公報から、電気濾過処理によって作動する電気泳動装置が知られている。この既知の電気泳動装置は、分離チャンバと、分離チャンバの両側に配置された電極と、分別サイトと、サンプル投入サイトとを備える。分離チャンバ内には、分離チャンバを互いに接続された多数の分離空間に分割するいくつかのメンブレンが設けられる。メンブレンはフィルタとして機能し、いずれも分離対象となる種

20

【0007】

欧州特許出願公開公報第0203713A2号公報から、このような電気泳動装置において、メンブレンで区切られた分離空間の各々に対して、独立した1対の電極を設けることも知られている。

【0008】

【特許文献1】

ドイツ特許出願公開公報第2215761A1号公報

【特許文献2】

欧州特許出願公開公報第0203713A2号公報

30

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

このため、本発明の目的は、分離性能を向上し、分離時間を短縮し、高スループットを達成することが可能なキャリアレス電気泳動方法及びこの方法を実行する電気泳動装置を作成することにある。

【課題を解決するための手段】

この目的は、本発明によれば、請求項1に詳述のキャリアレス電気泳動方法によって達成される。

本発明に係る方法の特に好適な発展及び実施形態が、請求項2～5の主題である。

本発明に係る電気泳動装置が、請求項6の主題である。

40

本発明に係る電気泳動装置の特に好適な発展及び実施形態が、請求項7～12の主題である。

【0010】

本発明によれば、1段階の分離処理でなく2段階の分離処理が用いられるため、分離性能とサンプルスループットが同時に最適化される。この処理では、できるだけ高いサンプルスループットを達成するために極めて高速な予備分離もしくは粗分別を行い、次いで少なくとも第2段階で、粗分別されたサンプル物質の部分流に対して所期の精密分別を行う。

【0011】

第1段階の粗分別におけるサンプルスループットの増大は、特に、線流速を大きくすると同時に分離対象となる検体の移動経路を短くしてF F Eによる分離処理を行うことで達成

50

される。このため、粗分別用の分別サイトの数をかなり少なくすることが可能であり、1つのフラクションだけに注目するなら分別サイトを1つ設けるだけでもよい。この2段階処理を並列同時多重処理として実行することで、サンプルスループット率を更に上げることができる。

【0012】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の好適な実施例を、対応する図面を用いて更に詳細に説明する。

図1、図2及び図3に、本発明に係る分離チャンバの3つの例を、電気泳動装置の別々の実施例として図示する。分離チャンバが分離チャンバギャップを所要の精度で製造可能な外形寸法を有するように、いくつかの独立した分離空間を分離チャンバ内に設ける。図1では、4つの独立した分離空間に、4つの独立した媒体源と、それぞれn個（nは15よりも小さい）の分別サイトを有する4つの独立した分別部とを設ける。図2は、2つの独立した分離空間と、それぞれn個（nは50よりも大きい）の分別サイトを有する2つの独立した分別部への2つの独立した媒体入口とを有する分離チャンバを示す。最後に、図3は、3つの独立した分離空間と、3つの独立した媒体入口と、n1個及びn3個（n1は15よりも小さく、n3は50よりも大きい）の分別サイトを有する2つの独立した分別部と、更に、n2個（n2は15よりも大きい）の分別サイトを有する独立した分別部を備えた分離チャンバを示す。

10

【0013】

図1～図3に示す分離空間は、設計によって、独立した電極を備えるか、又は隣接する電極空間で同一の媒体を用いることが出来る場合には当該分離空間に共通の電極を備える。

20

【0014】

図1～図3に示す分離チャンバによると、キャリアレスFFE電気泳動を行って、少なくとも2段階処理の形でサンプル物質を検体へ分離することができる。第1段階では、サンプル物質の粗分別が行われ、少なくとも1つの第2段階では、粗分別されたサンプル物質の精密分別が行われる。

【0015】

この処理は、並列同時処理として又は連続処理で行うことができる。並列同時処理においては、図1及び図2に示す分離空間を、粗分別のための分離空間（図1）及び精密分別のための分離空間（図2）として使用できる。図3は、3段階処理の形での連続処理用の分離空間を示す。ここでは、粗分別が、2段階の精密分別と直列に組み合わされている。

30

【0016】

並列処理法の場合、1つのサンプル物質をいくつかの分離空間に同時に計量投入することが可能であり、異なるサンプル物質を独立した分離空間に適用することも可能である。並列同時処理でサンプル物質を分離することで、サンプル物質のスループット率またはサンプル物質数を増やすことができる。

【0017】

独立した分離空間の幅を小さくすることで、検体の移動経路を短くすることができ、分離媒体及びサンプル物質の流速が大きい状態で分離処理を行うことができる。分離空間の数が増えるのに伴い、分離空間の幅は十分に小さくなるが、その結果として、サンプルスループットははるかに高くなるものの粗分別は1度しか可能ではなくなる。

40

【0018】

分離空間を完全に独立した電極空間と直列に接続すると、1つの分離空間での分離で得られたフラクションが後続の分離空間において同じ分離条件で更に分別されるため、分離量を大きくすることができる。なお、直列接続された分離空間では、分離手法、分離媒体及び/又は使用する電気泳動分離パラメータ全体に関して別々の条件で分離操作を行うことも可能である。

【0019】

分離空間及び個々の分離空間の技術設計は、上述の構造を用いて後述するようにほぼ自由に組み合わせることができる。

50

【0020】

図4及び図5に示すように、分離チャンバは、2つのサブアセンブリ、すなわち分離チャンバの前部と分離チャンバの後部とから成るのが普通である。しかし、本発明に係る設計の場合、個々のサブアセンブリは、図4及び図5に図示するいくつかの独立した構造要素から成る。

【0021】

詳しくは、図4に示す場合、硬質合成樹脂シート2と軟質合成樹脂シート3とを有する合成樹脂ブロック1から成る分離チャンバ前部と、ガラスシート10と軟質合成樹脂シート11とを有する金属ブロック8から成る分離チャンバ後部とが、スペーサ5を介して互いに隣接して配置される。合成樹脂ブロック1は、いくつかの(図示の実施例では、4つの)電極空間4を備える。金属ブロック8は、冷却パイプ9を備える。更に、媒体入口7と多数の分別サイト6が設けられている。図5に、分別済みサンプルの移動12を示す。

10

【0022】

図4の分離チャンバの前部のサブアセンブリは、結果として、基本構成ブロックすなわちプレキシグラス1の固体ブロックから成り、最大8つの電極空間4と、媒体フィーダ及び分別部の特定のメソッドモジュール用の開口とを収容している。この基本構成ブロック1に、硬質合成樹脂素材の薄いシート2が貼付される。後者は、当該用途に必要なとされる合成樹脂ブロック1の電極空間領域のフローを搬送するための穴を有し、合成樹脂ブロック1の所要の電極空間を開口している。硬質合成樹脂シート2の、媒体フィーダ7及び分別部6の領域における設計についても同様である。分離空間に面する硬質合成樹脂シート2の表面は、直接化学的に変性しても良いし、図示のように合成樹脂シート3で覆っても良い。分離空間の直接の界面を形成する合成樹脂シート3の表面は、サンプル種の電気浸透及び吸着の影響が最小化される程度まで化学的に変性されている。

20

【0023】

先述のように基本構成ブロック、すなわち合成樹脂ブロック1を、特定の用途に合わせて変性された2つの合成樹脂シート2、3と組み合わせることにより、必要な分離段数、分離空間の幾何学的配置、及び特殊な電気泳動境界条件に関する上述の全ての要件が、当該分離処理の段階で達成される。

【0024】

図6及び図7に、分離チャンバの前部及び分離チャンバの後部の構造を詳細に示す。図7に示すように、分離チャンバの後部は、いくつかの層、すなわち金属ブロック8と、ガラスシート10と、軟質合成樹脂シート11とから成る。これらの層は、分離装置を当該用途に応じて最適化するために、様々に組み合わせることができる。

30

【0025】

従って、分離チャンバの後部の基本構成ブロックである固体金属ブロック8は、外部冷却と組み合わせることで、電気泳動分離中に発生する熱を効果的に取り除くことができる。分離空間に面する金属ブロック8の表面は、ガラス製の薄い電気絶縁シート10又はセラミックシートで覆われる。この電気絶縁シートを覆う合成樹脂シート11の表面(分離空間との界面を直接形成する)は、分離処理を最適化するように化学的に変性されている。一般に、分離空間に面する合成樹脂シート、すなわちシート3及び11は、材料及び化学変性の種類が同一か又は類似して良いが、特定の処理の組み合わせの場合には異なっても良い。

40

【0026】

図8、図9及び図10に、本発明に係る方法に用いることができる様々な分別モジュールを示す。標準的な設計では、図8に示す分別モジュールは、分別用の3つの出口を有する。特殊な用途においては、それぞれ図9及び図10に示すように、5つ又は7つの分別出口を設ける。これらの図では、分離媒体の流れの方向を矢印13で表すとともに、クロスフロー用の供給サイト14と、サンプル物質用のn個の分別サイト15と、残りの媒体用のn+1個の出口16を示す。

【0027】

50

動作中、定量ポンプの移送速度が等しい2つの独立した移送チャンネルが、分離空間の、電極近くの分別出口の領域にそれぞれ接続される。移送ポンプの回転の方向によって、一方の接続部を介して媒体が電極近くの分離空間に導入されるとともに、第2の接続部を介して媒体が分離空間から同じ体積速度で放出される。電極近くの分離空間において媒体を同時に導入し放出することにより、サンプルの分別サイトの領域におけるフロープロファイルが、図11、図12及び図13に示すように変化する。

【0028】

図11は、2つの検体17及び18、クロスフロー用ポンプ21、クロスフロー用フィーダライン20、及びフロープロファイル用マスク19を示す。図11に、クロスフロー無し
10
のフロープロファイルを示す。図12は、クロスフローを開始した後のフロープロファイルを示す。図13は、ポンプ21の回転方向を逆にしてクロスフローを開始した場合のフロープロファイルを示す。

【0029】

以下に、予備長期試験、すなわち2つの典型的な応用例におけるフラクションモジュールの動作を説明する。

【0030】

所望の分離物質の予備分離中、2チャンネルポンプの移送速度を選択して、分離対象となる物質がこの目的のために設けられたサンプル出口を介して収集されるようにする。2チャンネルポンプの移送速度は、予備分離の時間中、変化しない。サンプル分別ライン内に
20
放出された検体を僅かな時間遅れで量的に検出できる場合、分離処理を制御する検出信号を用いて、検体が最適な収率及び純度で分離できるようにすることが可能である。

【0031】

一方、ポンプの移送速度が電気泳動分離処理中に連続的に変更される場合、次々と分離された物質がサンプル分別サイトを介して収集される。2チャンネルポンプの移送速度を
20
変えることにより、また回転方向を変えることにより、全ての分離種を分別サイトを介して連続的に溶出し、続いて収集容器を時間制御またはピーク制御切替えしながら検出システムとフラクション収集装置とに引き渡すことができる。

【0032】

サンプル分別サイトに向かって20mmを超えてサンプル帯を局所移動したい場合は、サンプル分別出口の数を増やすと良い。この数を自由に増やして分離空間の幅を大きくし、
30
サンプルの最適な溶離性を得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の一実施例における分離チャンバの設計の概略図である。

【図2】本発明の一実施例における分離チャンバの設計の概略図である。

【図3】本発明の一実施例における分離チャンバの設計の概略図である。

【図4】本発明の一実施例における分離チャンバの概略断面図である。

【図5】本発明の一実施例における分離チャンバの概略断面図である。

【図6】分離チャンバの前部の、媒体源の領域における構造を示す。

【図7】分離チャンバの後部の、分別部の領域における構造を示す。

【図8】異なる分別サイト及びクロスフローフィーダラインの相対的な空間配置を示す。
40

【図9】異なる分別サイト及びクロスフローフィーダラインの相対的な空間配置を示す。

【図10】異なる分別サイト及びクロスフローフィーダラインの相対的な空間配置を示す。

【図11】クロスフローによるフロープロファイルへの影響を示す。

【図12】クロスフローによるフロープロファイルへの影響を示す。

【図13】クロスフローによるフロープロファイルへの影響を示す。

【符号の説明】

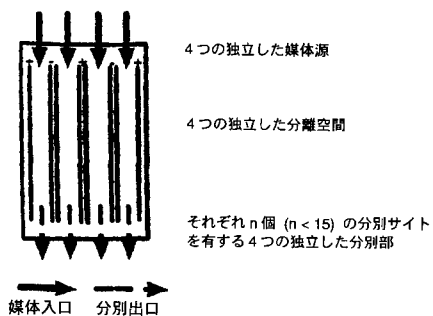
1：合成樹脂ブロック

2：硬質合成樹脂シート

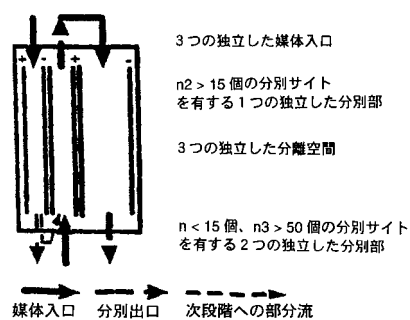
3：軟質合成樹脂シート

- 4 : 電極空間
- 5 : スペーサ
- 6 : 分別サイト
- 7 : 媒体入口
- 8 : 金属ブロック
- 9 : 冷却パイプ
- 10 : ガラスシート
- 11 : 軟質合成樹脂シート
- 12 : 分別済みサンプルの移動
- 13 : 分離媒体の流れ
- 14 : クロスフロー用供給サイト
- 15 : サンプル物質用分別サイト
- 16 : 媒体用出口
- 17 : 検体
- 18 : 検体
- 19 : フロープロファイル用マスク
- 20 : クロスフロー用フィーダライン
- 21 : ポンプ

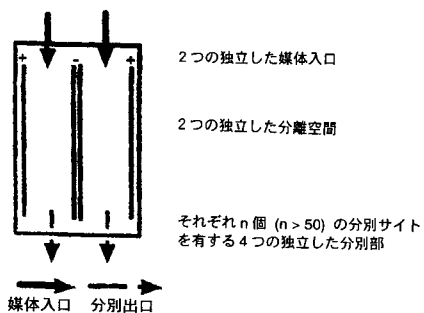
【 図 1 】



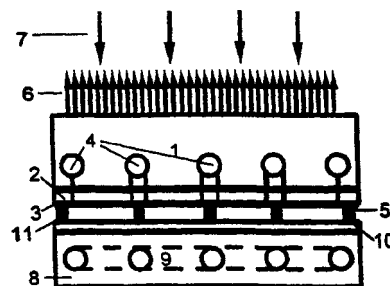
【 図 3 】



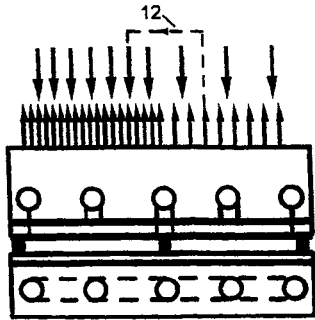
【 図 2 】



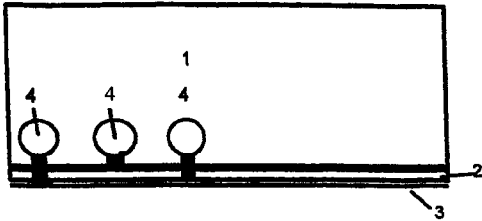
【 図 4 】



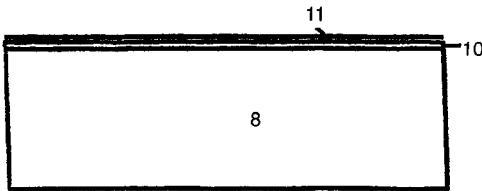
【 図 5 】



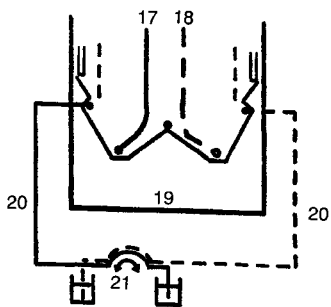
【 図 6 】



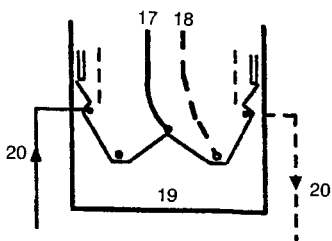
【 図 7 】



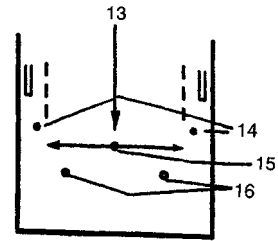
【 図 1 1 】



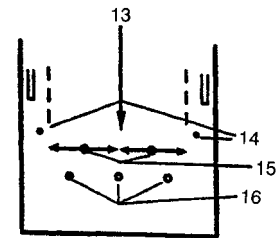
【 図 1 2 】



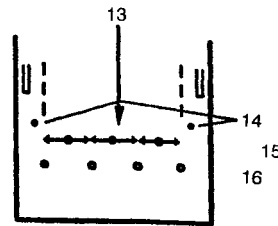
【 図 8 】



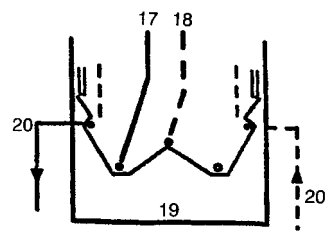
【 図 9 】



【 図 1 0 】



【 図 1 3 】



【国際公開パンフレット】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
27. Juni 2002 (27.06.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/50524 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation: G01N 27/00
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/14408
- (22) Internationales Anmeldedatum: 7. Dezember 2001 (07.12.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 100 63 097.9 18. Dezember 2000 (18.12.2000) DE
- (71) Anmelder und
(72) Erfinder: WEBER, Gerhard [DE/DE]; Margeritenweg 23, 85551 Kirchheim (DE).
- (74) Anwalt: WILHELMS, KILIAN & PARTNER, Edward-Schmid-Str. 2, 81541 München (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht: — ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



(54) Title: FREE FLOW ELECTROPHORESIS METHOD AND ELECTROPHORESIS DEVICE FOR CARRYING OUT THIS METHOD

(54) Bezeichnung: TRÄGERFREIES ELEKTROPHORESEVERFAHREN UND ELEKTROPHORESEVORRICHTUNG ZUR DURCHFÜHRUNG DIESES VERFAHRENS

(57) Abstract: The invention relates to a free flow electrophoresis method for separating sample substances into their analytes. Said method comprises several steps, a first step for the crude fractionation of the sample substance and at least one second step in which the crudely fractionated sample substance is finely fractionated. These steps can be performed in a parallel simultaneous method, in a serial method or in a combination of these two.

(57) Zusammenfassung: Trägerfreies Elektrophoreseverfahren zum Trennen von Probenstoffen in ihre Analyten. Das Verfahren wird in mehreren Stufen, nämlich einer ersten Stufe für eine Grobfractionierung der Probensubstanz und in wenigstens einer zweiten Stufe ausgeführt, in der eine Feinfractionierung der grobfractionierten Probensubstanz erfolgt. Die Stufen können in einem parallelen simultanen Verfahren, in einem seriellen Verfahren oder in einem parallelen simultanen Verfahren kombiniert mit einer seriellen Stufe ausgeführt werden.

WO 02/50524 A2

WO 02/50524

PCT/EP01/14408

1

Trägerfreies Elektrophoreseverfahren und Elektrophoresevorrichtung zur Durchführung dieses Verfahrens

Die Erfindung betrifft eine trägerfreies Elektrophoreseverfahren zum Trennen von Probensubstanzen in ihre Analyten sowie eine Elektrophoresevorrichtung zur Durchführung dieses Verfahrens.

Bekannte trägerfreie Elektrophoreseverfahren FFE arbeiten üblicherweise mit Elektrophoresevorrichtungen, deren Trennkammer nur zwei getrennte Elektrodenräume und nur einen Trennraum zwischen diesen Elektrodenräume aufweist.

Wenn jedoch die FFE im Bereich der Proteomics-Forschung eingesetzt werden soll, muß es möglich sein, eine Vielzahl von unterschiedlichen Probesubstanzen in kurzer Zeit, mit größtmöglicher Trennleistung und bei größtmöglichem Durchsatz an Probenmenge zu trennen.

Wie bei den meisten Trennverfahren ist jedoch auch bei der FFE eine gleichzeitige Optimierung der Elektrophoresevorrichtung hinsichtlich der Trennleistung und des Probedurchsatzes nur in sehr engen Grenzen möglich, da eine Erhöhung der Menge der Probesubstanz eine Minderung der Trennleistung zur Folge hat.

Die Optimierung der Trennleistung erfordert weiterhin einen Trennraum mit einem möglichst engen und präzisen Trennkammerspalt sowie besondere Randbedingungen der Trennung wie z.B. eine relativ geringe lineare Flußgeschwindigkeit, eine möglichst lange Trennzeit und möglichst viele Fraktionierstellen über die gesamte Breite des Trennraumes bzw. über den Bereich des Trennraumes, in dem die interessierende Probesubstanz fraktioniert werden soll. Da aber die lineare Flußgeschwindigkeit nicht beliebig reduziert werden kann, erfordert eine Verlängerung der Trennzeit eine entsprechende Vergrößerung der Länge der Elektroden. Das wiederum bedeutet eine gleichzeitige Erhöhung der Außendimensionen der Trennkammer,

was es schwierig bis unmöglich macht, den Trennkammer-spalt mit der geforderten Präzision zu fertigen.

Aus der DE 2215761 A1 ist eine Elektrophoresevorrichtung bekannt, die nach dem Elektrofiltrationsverfahren arbeitet. Die bekannte Elektrophoresevorrichtung weist eine Trennkammer, auf beiden Seiten der Trennkammer angeordnete Elektroden, Fraktionierstellen und Probeaufgabestellen auf, wobei in der Trennkammer mehrere Membrane vorgesehen sind, die die Trennkammer in eine Vielzahl von miteinander in Verbindung stehende Trennräume unterteilt. Die Membranen dienen als Filter und sind für die jeweils abzutrennenden Spezies permeabel.

Aus der EP 0203713 A2 ist es weiterhin bekannt, bei einer derartigen Elektrophoresevorrichtung für jeden der von den Membranen begrenzten Trennräume ein eigenes Elektrodenpaar vorzusehen.

Die der Erfindung zugrunde liegende Aufgabe besteht daher darin, eine trägerfreies Elektrophoreseverfahren und eine Elektrophoresevorrichtung zur Durchführung dieses Verfahren zu schaffen, die eine höhere Trennleistung, eine kürzere Trennzeit und einen größeren Durchsatz erlauben.

Diese Aufgabe wird gemäß der Erfindung durch das trägerfreie Elektrophoreseverfahren gelöst, das im Anspruch 1 angegeben ist.

Besonders bevorzugte Weiterbildungen und Ausgestaltungen des erfindungsgemäßen Verfahrens sind Gegenstand der Ansprüche 2 bis 5.

Die erfindungsgemäße Elektrophoresevorrichtung ist Gegenstand des Anspruchs 6.

Besonders bevorzugte Weiterbildungen und Ausgestaltungen der erfindungsgemäßen Elektrophoresevorrichtung sind Gegenstand der Ansprüche 7 bis 12.

Gemäß der Erfindung wird somit statt eines einstufigen Trennverfahrens bei gleichzeitiger Optimierung der Trennleistung und des Probendurchsatzes ein zweistufiges Trennverfahren

ren angewandt, das in einer ersten Stufe eine sehr schnelle Vortrennung oder Grobfraktionierung mit dem Ziel des größtmöglichen Probendurchsatzes und nachfolgend in wenigstens einer zweiten Stufe eine gezielte Feinfraktionierung des grobfraktionierten Teilstromes der Probensubstanz durchführt.

Eine Erhöhung des Probendurchsatzes in der ersten Stufe der Grobfraktionierung kann insbesondere dadurch erzielt werden, daß der Trennvorgang mittels der FFE bei erhöhter linearer Flußgeschwindigkeit und gleichzeitig verkürzter Wanderungsstrecke für die zu trennenden Analyten durchgeführt wird. Dabei kann die Zahl der Fraktionierstellen für die Grobfraktionierung deutlich reduziert werden und kann für den Fall, daß nur an einer Fraktion Interesse besteht, eine einzige Fraktionierstelle vorgesehen werden. Eine weitere Erhöhung des Probendurchsatzes ist dann möglich, wenn dieses zweistufige Verfahren in Form eines parallelen simultanen Mehrfachverfahrens durchgeführt wird.

Im Folgenden werden anhand der zugehörigen Zeichnungen besonders bevorzugte Ausführungsbeispiele der Erfindung näher beschrieben. Es zeigen

- Figur 1, Figur 2 und Figur 3 schematische Ansichten der Ausbildung der Trennkammer bei drei Ausführungsbeispielen der Erfindung,
- Figur 4 und Figur 5 schematische Schnittansichten der Trennkammer bei einem Ausführungsbeispiel der Erfindung,
- Figur 6 und Figur 7 den Aufbau des Trennkammervorderteils und des Trennkammerrückteils im Bereich der Medienzuführungen und Fraktionierung jeweils,
- Figur 8, Figur 9 und Figur 10 die relative räumliche Anordnung der verschiedenen Fraktionierstellen und der Zuleitungen der Querströmungen und
- Figur 11, 12 und 13 die Beeinflussung des Strömungsprofils mittels der Querströmung.

In den Figuren 1, 2 und 3 sind schematisch drei Beispiele der Trennkammer bei verschiedenen Ausführungsbeispielen der erfindungsgemäßen Elektrophoresevorrichtung dargestellt. Damit die Trennkammer eine Außenabmessung hat, die eine Fertigung des Trennkammerspaltes mit der notwendigen Präzision erlaubt, sind in der Trennkammer mehrere separate Trennräume vorgesehen. Gemäß Figur 1 sind vier separate Trennräume mit vier separaten Medienzuführungen und vier separaten Fraktionierungen mit jeweils n Fraktionierstellen vorgesehen, wobei n kleiner 15 ist. Figur 2 zeigt eine Trennkammer mit zwei separaten Trennräumen und zwei separaten Medieneinlässen bei zwei separaten Fraktionierungen mit jeweils n Fraktionierstellen, wobei n größer 50 ist. Figur 3 zeigt schließlich eine Trennkammer mit drei separaten Trennräumen, drei separaten Medieneinlässen, zwei separaten Fraktionierungen mit n_1 und n_3 Fraktionierstellen, wobei n_1 kleiner 15 und n_3 größer 50 ist, und einer weiteren separaten Fraktionierung mit n_2 Fraktionierstellen, wobei n_2 größer 15 ist.

Die in den Figuren 1 bis 3 dargestellten Trennräume haben je nach Ausführungsform separate Elektroden oder gemeinsame Elektroden mit den benachbarten Trennräumen, wenn identische Medien in den jeweiligen Elektrodenräumen verwendet werden können.

Mit den in den Figuren 1 bis 3 dargestellten Trennkammern, erfolgt eine trägerfreie Elektrophorese FFE zum Trennen von Probesubstanzen in ihre Analyten in Form eines wenigsten zweistufigen Verfahrens, wobei in der ersten Stufe eine Grobfraktionierung der Probesubstanz und in wenigstens einer zweiten Stufe eine Feinfraktionierung der grobfraktionierten Probesubstanz erfolgt.

Dieses Verfahren kann im parallelen Simultanbetrieb oder im seriellen Betrieb durchgeführt werden, wobei die in den Figuren 1 und 2 dargestellten Trennräume im parallelen Simultanbetrieb als Trennraum für die Grobfraktionierung (Figur 1) und

als Trennraum für die Feinfraktionierung (Figur 2) verwandt werden können. Figur 3 zeigt den Trennraum für den seriellen Betrieb in Form eines dreistufigen Verfahrens, bei dem die Grobfraktionierung in Serie mit einer zweistufigen Feinfraktionierung kombiniert ist.

Bei der parallelen Arbeitsweise kann entweder eine einzelne Probesubstanz gleichzeitig mehreren Trennräumen zudoziert werden oder es können verschiedene Probesubstanzen in die separaten Trennräume appliziert werden. Die Trennung der Probesubstanzen im parallelen Simultanverfahren ermöglicht eine Erhöhung des Durchsatzes der Probesubstanzen oder eine Erhöhung der Anzahl der Probesubstanzen.

Durch eine Verkürzung der Breite der separaten Trennräume lassen sich die Wanderungsstrecken der Analyten verkürzen und können die Trennprozesse mit höherer Flußgeschwindigkeit der Trennmedien und der Probesubstanzen durchgeführt werden. Mit zunehmender Zahl der Trennräume wird die Breite der Trennräume wesentlich kleiner, was allerdings zur Folge hat, daß zwar nur eine Grobfraktionierung aber mit wesentlich höherem Probanddurchsatz möglich ist.

Wenn die Trennräume mit völlig getrennten Elektrodenräumen in Serie geschaltet sind, werden die Fraktionen der Trennung aus einem Trennraum in den nachfolgenden Trennräumen unter identischen Trennbedingungen weiter getrennt und läßt sich dadurch eine höhere Trennleistung erzielen. In den in Serie geschalteten Trennräumen können die Trennungen aber auch unter verschiedenen Bedingungen hinsichtlich der verwendeten Trenntechniken, der Trennmedien und/oder der allgemeinen elektrolytischen Trennparameter durchgeführt werden.

Die Trennräume und die technischen Ausführungen der einzelnen Trennräume lassen sich mittels des oben beschriebenen Aufbaus fast beliebig kombinieren, wie es im Folgendem beschrieben wird.

Wie es in den Figuren 4 und 5 dargestellt ist, besteht eine Trennkammer üblicherweise aus zwei Baugruppen, nämlich dem Trennkammervorderteil und dem Trennkammerrückteil. Bei der erfindungsgemäßen Ausbildung bestehen die einzelnen Baugruppen jedoch aus mehreren separaten Bauelementen, die schematisch in Figur 4 und Figur 5 dargestellt sind.

Das heißt im Einzelnen, daß in der in Figur 4 dargestellten Weise ein Trennkammervorderteil aus einem Kunststoffblock 1 mit einer Hartplastikfolie 2 und eine Weichplastikfolie 3 sowie ein Trennkammerrückteil aus einem Metallblock 8 mit einer Glasfolie 10 und einer Weichplastikfolie 11 über Abstandhalter 5 aneinander angeordnet sind. Im Kunststoffblock 1 sind mehrere, bei dem dargestellten Ausführungsbeispiel vier, Elektrodenräume 4 vorgesehen. Im Metallblock 8 befinden sich Kühlrohre 9. Es sind weiterhin Medieneinlässe 7 und eine Vielzahl von Fraktionierungsstellen 6 vorgesehen. Figur 5 zeigt die Übertragung 12 der vorfraktionierten Probe.

Die Baugruppe des Trennkammervorderteils in Figur 4 besteht somit aus einem Basisbaustein, nämlich einem massiven Plexiglasblock 1, in dem bis zu acht Elektrodenräume 4 und die Öffnungen für spezifische Methodenmodule der Medienzuführungen und der Fraktionierungen untergebracht sind. Auf diesen Basisbaustein 1 ist eine dünne Folie 2 aus einem harten Kunststoffmaterial aufgebracht, wobei diese im Bereich der für die jeweiligen Anwendung benötigten Elektrodenräume des Kunststoffblockes 1 Öffnungen für den Stromtransport aufweist und die benötigten Elektrodenräume des Kunststoffblockes 1 nicht verschließt. Das gleiche gilt für die Ausführung der Hartplastikfolie 2 im Bereich der Medienzuführungen 7 und der Fraktionierungen 6. Die dem Trennraum zugewandte Fläche der Hartplastikfolie 2 kann entweder direkt chemisch modifiziert sein oder in der dargestellten Weise durch eine Kunststoffolie 3 abgedeckt sein, deren Oberfläche, die den Trennraum direkt begrenzt, soweit chemisch modifiziert ist, daß die Effekte der

Elektroosmose und der Sorption der Probenspezies minimiert sind.

Durch die beschriebene Kombination des Basisbausteines, nämlich des Kunststoffblockes 1, mit den beiden Kunststoffolien 2, 3, die anwendungsspezifisch modifiziert sind, können alle beschriebenen Anforderungen hinsichtlich der Anzahl der notwendigen Trennstufen, der Geometrie des Trennraumes und der speziellen elektrophoretischen Randbedingungen in der jeweiligen Stufe des Trennprozesses erfüllt werden.

In den Figuren 6 und 7 ist der Aufbau des Trennkammervorderteils und Trennkammerrückteils jeweils im Einzelnen dargestellt. Wie es in Figur 7 dargestellt ist, besteht der Trennkammerrückteil aus mehreren Schichten, nämlich dem Metallblock 8, der Glasfolie 10 und der Weichplastikfolie 11. Diese Schichten können in verschiedener Weise kombiniert werden, um die Trennvorrichtung für die jeweilige Anwendung zu optimieren.

Der Basisbaustein des Trennkammerrückteils ist somit ein massiver Metallblock 8, der in Verbindung mit einer externen Kühlung eine effektive Abführung der während der elektrophoretischen Trennung entwickelten Wärme ermöglicht. Die dem Trennraum zugewandte Oberfläche des Metallblockes 8 ist durch die elektrisch isolierende dünne Folie 10 aus Glas oder eine Keramikfolie abgedeckt, wobei diese elektrisch isolierte Folie durch die Kunststoffolie 11 abgedeckt ist, deren Oberfläche, die den Trennraum direkt begrenzt, chemisch so modifiziert ist, daß eine Optimierung des Trennvorganges erzielt ist. In der Regel können die dem Trennraum zugewandten Kunststoffolien, das heißt die Folien 3 und 11 hinsichtlich ihres Materials und der Art der chemischen Modifizierung identisch oder ähnlich sein, sie können bei bestimmten Verfahrenskombinationen aber auch unterschiedlich sein.

In den Figuren 8, 9 und 10 sind verschiedene Fraktioniermodule dargestellte, die bei dem erfindungsgemäßen Verfahren

verwandt werden können. Der Fraktionierungsmodul in Figur 8 enthält in der Standardausführung drei Auslässe für die Fraktionierung, wobei bei besonderen Anwendungen fünf oder sieben Fraktionsauslässe vorgesehen sind, wie es in Figur 9 und Figur 10 jeweils dargestellt ist. Dabei ist die Flußrichtung des Trennmediums durch einen Pfeil 13 wiedergegeben und sind die Zuführungsstellen 14 für die Querströmung, die n Fraktionierstellen 15 für die Probensubstanz, und n+1 Auslässe 16 für das restliche Medium dargestellt.

Im Betrieb werden zwei separate Förderkanäle mit identischer Förderrate einer Dosierpumpe werden mit dem Trennraum jeweils im Bereich der elektrodennahen Fraktionierungsauslässe verbunden, wobei je nach Drehrichtung der Förderpumpe über eine Verbindung zu dem elektrodennahen Trennraum ein Medium zugegeben wird und gleichzeitig über eine zweite Verbindung ein Medium aus dem Trennraum mit derselben Volumenrate abgeführt wird. Durch die gleichzeitige Zugabe und Abführung des Mediums im elektrodennahen Trennraum wird das Strömungsprofil im Bereich der Fraktionierstelle der Probe verändert, wie es in den Figuren 11, 12 und 13 dargestellt ist.

Figur 11 zeigt zwei Analyten 17, 18, eine Pumpe 21 für die Querströmung, die Zuleitung 20 für die Querströmung und die Maske 19 für das Strömungsprofil. In Figur 11 ist ein Strömungsprofil ohne Querströmung dargestellt, Figur 12 zeigt das Profil bei angeschalteter Querströmung und Figur 13 zeigt das Strömungsprofil bei angeschalteter Querströmung aber mit umgekehrter Drehrichtung der Pumpe 21.

Im Folgendem wird ein präparativer Langzeitversuch, das heißt der Betrieb des Fraktionsmoduls bei zwei typischen alternativen Anwendungen, beschrieben:

Bei der präparativen Isolierung einer beliebigen getrennten Substanz wird die Förderrate der zweikanaligen Pumpe so gewählt, daß die zu isolierende Substanz über einen der dafür vorgesehenen Probenauslässe gesammelt werden kann. Die Förder-

rate der Zweikanalpumpe bleibt während der Dauer der präparativen Isolierung unverändert. Kann der im Probenfraktionierschlauch abfließende Analyt nur mit geringer Zeitverzögerung quantitativ detektiert werden, kann das Signal der Detektion für die Steuerung des Trennverfahrens dahingehend genutzt werden, daß der Analyt mit bester Ausbeute und Reinheit isoliert werden kann.

Wird während der elektrophoretischen Trennung die Förderrate der Pumpe jedoch kontinuierlich verändert, werden nacheinander getrennte Substanzen über die Probenfraktionierstelle gesammelt. Durch die Änderung der Förderrate und durch die Änderung der Drehrichtung der Zweikanalpumpe können alle getrennten Spezies nacheinander über die Fraktionierstelle eluiert werden und nachfolgend einem Detektionssystem und einem Fraktionssammler mit zeitgesteuertem oder peakgesteuertem Wechsel der Sammelgefäße zugeführt werden.

Wenn eine örtliche Verschiebung der Probenbande um mehr als 20 mm in Richtung der Probenfraktionierstelle erzielt werden muß, empfiehlt sich eine Erhöhung der Anzahl der Probenfraktionierauslässe, wobei diese Anzahl bei höheren Werten der Breite des Trennraumes beliebig erhöht werden kann, um eine optimale Qualität der Elution der Proben zu ermöglichen.

Patentansprüche

1. Trägerfreies Elektrophoreseverfahren zum Trennen einer Probensubstanz in ihre Analyten, dadurch gekennzeichnet, daß in einer ersten Stufe eine Grobfractionierung der Probensubstanz und in wenigstens einer zweiten Stufe eine Feinfraktionierung der grobfractionierten Probensubstanz erfolgt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß in der ersten Stufe mit einer hohen linearen Flußgeschwindigkeit und einer kurzer Wanderungsstrecke der zu trennenden Analyten gearbeitet wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß in der ersten Stufe eine kleinere Anzahl von Fraktionierstellen als in der zweiten Stufe verwandt wird.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß alle Stufen parallel simultan ausgeführt werden.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Ausführung von Stufen in einem parallelen simultanen Verfahren mit einer seriellen Ausführung wenigstens einer Stufe kombiniert wird.

6. Elektrophoresevorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 5 mit einer Trennkammer, Elektroden, Fraktionierungen und Probeaufgaben, dadurch gekennzeichnet, daß die Trennkammer in eine Vielzahl von separaten Trennräumen mit separaten Elektroden, separaten Fraktionierungen und separaten Probeaufgaben jeweils aufgeteilt ist.

WO 02/50524

11

PCT/EP01/14408

7. Vorrichtung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß für benachbarte Trennräume gemeinsame Elektroden vorgesehen sind.

8. Vorrichtung nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß die separaten Fraktionierungen verschiedene Anzahlen von Fraktionierstellen haben.

9. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zwei separate Förderkanäle einer Dosierpumpe mit dem Trennraum im Bereich der elektrodennahen Fraktionierauslässe verbunden sind, um Medium zuzugeben und im selben Volumen abzuführen.

10. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Trennkammer aus einem Vorder- und einem Rückteil aufgebaut ist, die aus mehreren separaten Kammerbauelementen jeweils bestehen.

11. Vorrichtung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Rückteil aus einem massiven Metallblock besteht.

12. Vorrichtung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß im Metallblock Kühlrohre vorgesehen sind.

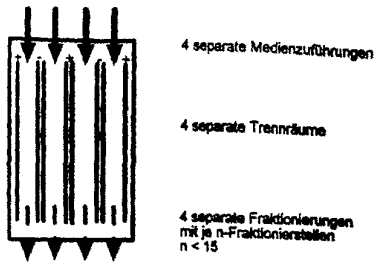


Fig. 1

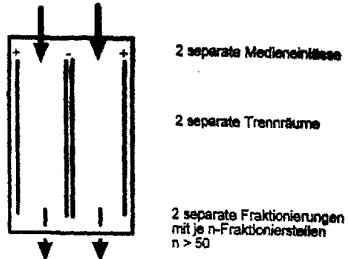


Fig. 2

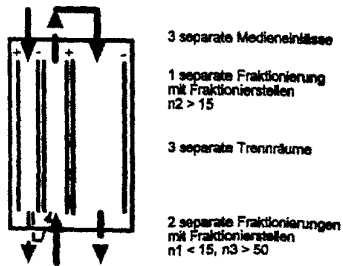


Fig. 3

→
Medieneinlässe

→
Fraktionierauslässe

Teilstrom f.
nächste Stufe

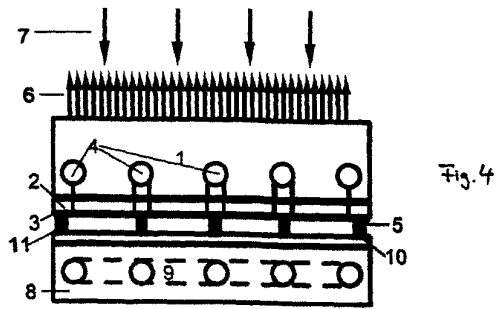


Fig. 4

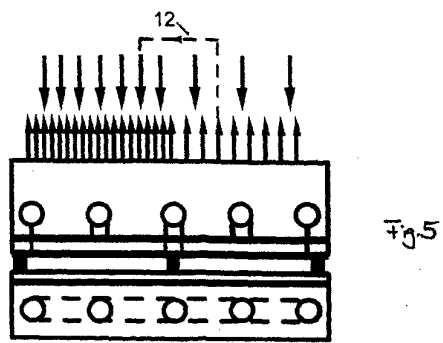
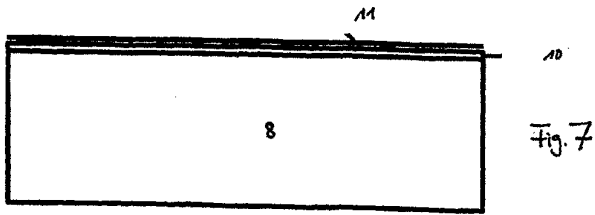
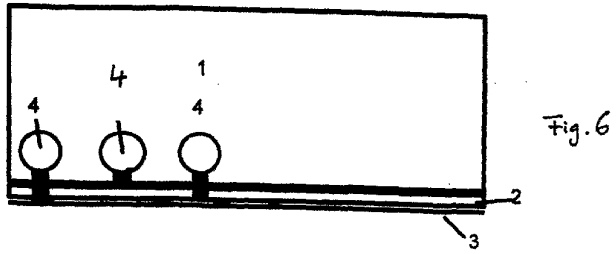
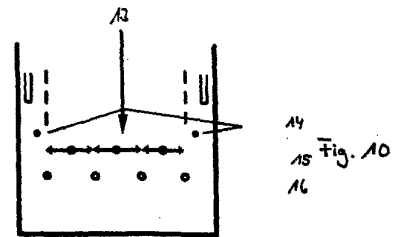
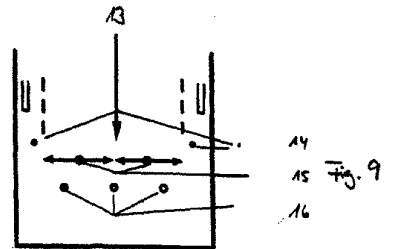
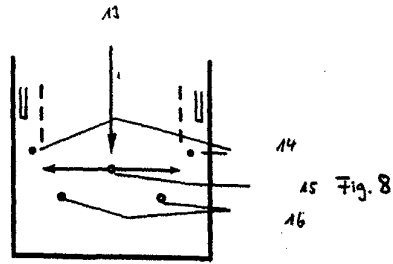


Fig. 5





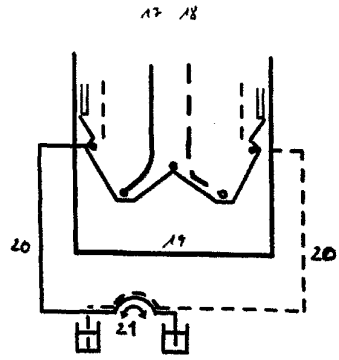


Fig. 11

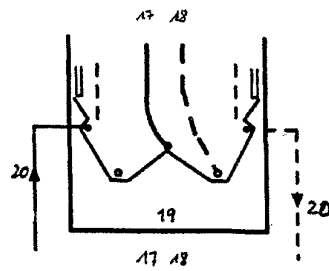


Fig. 12

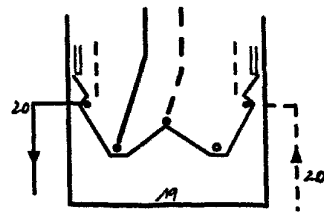


Fig. 13

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
27. Juni 2002 (27.06.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/050524 A3

(51) Internationale Patentklassifikation: G01N 27/447, B01D 57/02 (74) Anwalt: WILHELMS, KILIAN & PARTNER, Eduard-Schmid-Str. 2, 81541 München (DE)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/14408 (81) Bestimmungsstaaten (national): AU, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LI, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, NO, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum: 7. Dezember 2001 (07.12.2001) (82) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

(25) Einreichungssprache: Deutsch (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

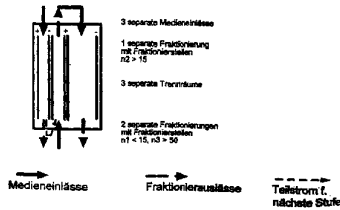
(30) Angaben zur Priorität: 100 63 097.9 18. Dezember 2000 (18.12.2000) DE

(71) Anmelder und (72) Erfinder: WEBER, Gerhard [DE/DE]; Margeritenweg 23, 85551 Kirchheim (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: FREE FLOW ELECTROPHORESIS METHOD AND ELECTROPHORESIS DEVICE FOR CARRYING OUT THIS METHOD

(54) Bezeichnung: TRÄGERFREIES ELEKTROPHORESEVERFAHREN UND ELEKTROPHORESEVORRICHTUNG ZUR DURCHFÜHRUNG DIESES VERFAHRENS



3 SEPARATE MEDIA INLETS
1 SEPARATE FRACTIONATION WITH FRACTIONATING POINTS N2 > 15
3 SEPARATE SEPARATING SPACES
2 SEPARATE FRACTIONATIONS WITH FRACTIONATING POINTS N1 < 15, N3 > 50
MEDIENEINLÄSSE MEDIA INLETS
FRAKTIONIEREINLÄSSE FRACTIONATING INLETS
TEILSTROM F... PARTIAL STREAM F. NEXT STEP

(57) Abstract: The invention relates to a free flow electrophoresis method for separating sample substances into their analytes. Said method comprises several steps, a first step for the crude fractionation of the sample substance and at least one second step in which the crudely fractionated sample substance is finely fractionated. These steps can be performed in a parallel simultaneous method, in a serial method or in a combination of these two.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



WO 02/050524 A3

WO 02/050524 A3 

OAPI-Patent (BF, BJ, CI, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NI, SN, TD, TG).

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.*

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen

Recherchenberichts: 27. Dezember 2002

(57) Zusammenfassung: Trägerfreies Elektrophoreseverfahren zum Trennen von Probensubstanzen in ihre Analyten. Das Verfahren wird in mehreren Stufen, nämlich einer ersten Stufe für eine Grobfractionierung der Probensubstanz und in wenigstens einer zweiten Stufe ausgeführt, in der eine Feinfractionierung der grobfractionierten Probensubstanz erfolgt. Die Stufen können in einem parallelen simultanen Verfahren, in einem seriellen Verfahren oder in einem parallelen simultanen Verfahren kombiniert mit einer seriellen Stufe ausgeführt werden.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		National Application No. ru/EP 01/14408
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N2/447 B01D57/02		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N B01D		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 497 077 A (CIBA GEIGY AG) 5 August 1992 (1992-08-05) column 1, line 43-45 column 10, line 2-31; figure 9 ---	1,6,10, 12
A	EP 0 203 713 A (DORR OLIVER INC) 3 December 1986 (1986-12-03) cited in the application page 18, line 3-27 page 19, line 23 -page 21, line 3; figures 5,8 ---	1,2,6,7
A	DE 42 32 781 C (ERNO RAUMFAHRTTECHNIK GMBH) 28 October 1993 (1993-10-28) the whole document ---	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed **P* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone **X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *S* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
10 June 2002	18/06/2002	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5018 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3616	Authorized officer Müller, T	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 01/14408
C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WEBER G ET AL: "RECENT DEVELOPMENTS IN PREPARATIVE FREE FLOW ISOELECTRIC FOCUSING" ELECTROPHORESIS, WEINHEIM, DE, vol. 19, no. 10, July 1998 (1998-07), pages 1649-1653, XP001057209 ISSN: 0173-0835 the whole document ---	1-12
A	TODD P ET AL: "MULTISTAGE ELECTROPHORESIS SYSTEM FOR THE SEPARATION OF CELLS, PARTICLES AND SOLUTES" ELECTROPHORESIS, WEINHEIM, DE, vol. 21, 2000, pages 318-324, XP002937157 ISSN: 0173-0835 the whole document -----	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International Application No. PCT/EP 01/14408	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
EP 0497077	A	05-08-1992	EP 0497077 A1	05-08-1992	
			DE 59108006 D1	22-08-1996	
			JP 5080032 A	30-03-1993	
			US 5180480 A	19-01-1993	
EP 0203713	A	03-12-1986	US 4604174 A	05-08-1986	
			AU 579724 B2	08-12-1988	
			AU 5647286 A	06-11-1986	
			EP 0203713 A2	03-12-1986	
			JP 61293506 A	24-12-1986	
			ZA 8603239 A	30-12-1986	
DE 4232781	C	28-10-1993	DE 4232781 C1	28-10-1993	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Internationales Aktenzeichen PLI/EP 01/14408
A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 G01N27/447 B01D57/02		
Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 G01N B01D		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data, PAJ		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 497 077 A (CIBA GEIGY AG) 5. August 1992 (1992-08-05) Spalte 1, Zeile 43-45 Spalte 10, Zeile 2-31; Abbildung 9	1,6,10, 12
A	EP 0 203 713 A (DORR OLIVER INC) 3. Dezember 1986 (1986-12-03) in der Anmeldung erwähnt Seite 18, Zeile 3-27 Seite 19, Zeile 23 -Seite 21, Zeile 3; Abbildungen 5,8	1,2,6,7
A	DE 42 32 781 C (ERNO RAUMFAHRTTECHNIK GMBH) 28. Oktober 1993 (1993-10-28) das ganze Dokument	1-12
	--- -/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besondere Berücksichtigung angesehen ist *E* Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelsfrei erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchebericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (we-ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Sitzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindersicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindersicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Abschlussdatum des internationalen Recherchenberichts	
10. Juni 2002	18/06/2002	
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.O. 5518 Patentlaan 2 NL - 2599 EV Rijswijk Tel. (+31-70) 348-2540, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Beauftragter Müller, T	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		ationales Aktenzeichen PCT/EP 01/14408
C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
A	WEBER G ET AL: "RECENT DEVELOPMENTS IN PREPARATIVE FREE FLOW ISOELECTRIC FOCUSING" ELECTROPHORESIS, WEINHEIM, DE, Bd. 19, Nr. 10, Juli 1998 (1998-07), Seiten 1649-1653, XP001057209 ISSN: 0173-0835 das ganze Dokument ----	1-12
A	TODD P ET AL: "MULTISTAGE ELECTROPHORESIS SYSTEM FOR THE SEPARATION OF CELLS, PARTICLES AND SOLUTES" ELECTROPHORESIS, WEINHEIM, DE, Bd. 21, 2000, Seiten 318-324, XP002937157 ISSN: 0173-0835 das ganze Dokument -----	1-12

Formblatt PCT/ISA210 (Fortsetzung von Blatt 2) Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT				Internationales Aktenzeichen PCI/EP 01/14408	
Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 0497077	A	05-08-1992	EP	0497077 A1	05-08-1992
			DE	59108006 D1	22-08-1996
			JP	5080032 A	30-03-1993
			US	5180480 A	19-01-1993
EP 0203713	A	03-12-1986	US	4604174 A	05-08-1986
			AU	579724 B2	08-12-1988
			AU	5647286 A	06-11-1986
			EP	0203713 A2	03-12-1986
			JP	61293506 A	24-12-1986
			ZA	8603239 A	30-12-1986
DE 4232781	C	28-10-1993	DE	4232781 C1	28-10-1993

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PH,PL,P T,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW