

(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
05. August 2021 (05.08.2021)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2021/152166 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
B01L 3/02 (2006.01) *B01L 3/00* (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2021/052270

(22) Internationales Anmeldedatum:
01. Februar 2021 (01.02.2021)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2020 102 389.8
31. Januar 2020 (31.01.2020) DE

(71) Anmelder: **ALBERT-LUDWIGS-UNIVERSITÄT
FREIBURG** [DE/DE]; Friedrichstrasse 39, 79098 Freiburg
(DE).

(72) Erfinder: **GUTZWEILER, Ludwig**; Kronenstraße 23,
79100 Freiburg (DE). **GLEICHMANN, Tobias**; Reichen-
bacherstraße 15, 76337 Waldbronn (DE). **SCHÖNDUBE,**
Jonas; Gießenstraße 12, 79104 Freiburg (DE). **KOLTAY,**
Peter; Tannenbergsstr. 10 a, 79117 Freiburg (DE).

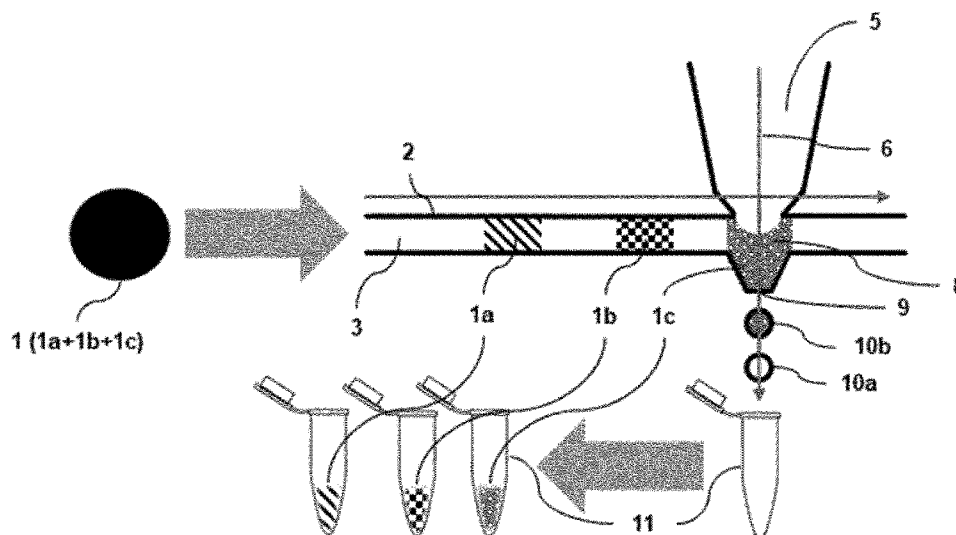
(74) Anwalt: **HERTIN UND PARTNER RECHTS- UND
PATENTANWÄLTE**; Kurfürstendamm 54/55, 10707
Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH,
KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA,
MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,

(54) Title: METHOD AND SYSTEM FOR ISOLATING MOLECULE FRACTIONS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND SYSTEM ZUR ISOLATION VON MOLEKÜLFRAKTIONEN

Figur 1



(57) Abstract: The present invention relates to a method for isolating one or more molecule fractions from a sample, the method comprising: (i) introducing the sample into a separation unit; (ii) in a separation channel of the separation unit, which channel is filled with a separation medium, separating molecules contained in the sample into molecule fractions; (iii) extracting one or more molecule fractions from an extraction region of the separation channel by activating a metering unit, wherein the extraction region is fluidically coupled to an opening, and by activating the metering unit, medium located in the extraction region is pushed out of the opening as medium fraction, wherein the medium fraction may comprise a molecule fraction or parts thereof.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Isolation einer oder mehrerer Molekülfractionen aus

NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU,
RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM,
ZW.

- (84) Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)

einer Probe, umfassend (i) Einbringen der Probe in eine Separationseinheit, (ii) Auftrennung von in der Probe enthaltenen Molekülen in einem mit einem Separationsmedium gefüllten Separationskanals der Separationseinheit in Molekülfraktionen, (iii) Extraktion einer oder mehrerer Molekülfraktionen aus einem Extraktionsbereich des Separationskanals mittels Aktivierung einer Dosiereinheit, wobei der Extraktionsbereich fluidisch an eine Öffnung gekoppelt ist und durch Aktivierung der Dosiereinheit im Extraktionsbereich befindliches Medium als Mediumfraktion aus der Öffnung ausgestoßen wird, wobei die Mediumfraktion eine Molekülfraktion oder Teile davon umfassen kann.

VERFAHREN UND SYSTEM ZUR ISOLATION VON MOLEKÜLFRAKTIONEN

Einleitung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Isolation einer oder mehrerer Molekülfractionen aus einer Probe, umfassend (i) Einbringen der Probe in eine Separationseinheit, (ii) Auftrennung von in der Probe enthaltenen Molekülen in einem mit einem Separationsmedium gefüllten Separationskanals der Separationseinheit in Molekülfractionen, (iii) Extraktion einer oder mehrerer Molekülfractionen aus einem Extraktionsbereich des Separationskanals mittels Aktivierung einer Dosiereinheit, wobei der Extraktionsbereich fluidisch an eine Öffnung gekoppelt ist und durch Aktivierung der Dosiereinheit im Extraktionsbereich befindliches Medium als Mediumfraction aus der Öffnung ausgestoßen wird, wobei die Mediumfraction eine Molekülfraction oder Teile davon umfassen kann.

Stand der Technik

Der Begriff Aufreinigung beschreibt im biologisch-chemischen Kontext häufig ein mehrstufiges Verfahren zur Anreicherung und Reinigung bestimmter Molekülspezies. Allerdings ist der Prozess, insbesondere für komplexere Proteine, in der Regel sowohl zeitaufwendig als auch kostenintensiv. Für viele nachgelagerte Analysen (Bspw. Proteinstrukturanalyse, Liganden-Bindung etc.) sowie für die Verwendung als Therapeutikum (z.B. Insulin, Albumin, ...) ist dieser Schritt jedoch zwingend erforderlich, um u.a. unerwünschte Nebenwirkungen oder fehlerhafte Resultate zu vermeiden.

Neben der Extraktion/Fällung und Filtration sind Chromatographie und Elektrophorese die leistungstärksten und effizientesten Technologien zur Aufreinigung wobei die Methode dem jeweiligen Einsatzzweck entsprechend gewählt wird. Dennoch weisen diese Ansätze prinzipiell einige Nachteile auf, die im Wesentlichen im Vorbereitungs- und Nachbearbeitungsaufwand liegen.

Eine relativ kosteneffiziente Lösung zur Extraktion von Molekülfractionen bietet beispielsweise die präparative Slab-Gel-Elektrophorese. Allerdings wird die Methode in der Praxis zumeist nur für Nukleinsäuren angewandt, da die Extraktion aus den für gewöhnlich verwendeten Hydrogelen durch Schmelzen dieser Gele erfolgt, wodurch andere, empfindlichere Proben wie z.B. Proteine beeinträchtigt werden würden. Überdies ist die präparative Gel-Elektrophorese aufwändig, da sie mit einem vergleichsweise hohen Vorbereitungs- und Nachbereitungsaufwand verbunden ist. Auch das Verfahren an sich dauert vergleichsweise lange mit einem Zeitaufwand im Bereich von mindestens ein bis zwei Stunden.

Im Vergleich zur präparativen Gelelektrophorese ist die Kapillarelektrophorese mit einem geringeren Zeitaufwand für das Verfahren an sich verbunden, umfasst jedoch ebenfalls einen hohen Vorbereitungs- und Nachbereitungsaufwand und ist mit hohen Kosten sowohl für die Geräte als auch für jeden Probenlauf verbunden [Zhu, Z., Lu, J. J., & Liu, S. *Analytica chimica acta* 2012, 709, 21-31].

Bei der Chromatographie (z.B. HPLC) lassen sich mittels eines nachgeschalteten Sammlers zwar die einzelnen Fraktionen gut isolieren, jedoch sind Vorbereitungs-, Nachbereitungs- und Analysezeiten jeweils vergleichsweise lang und die Kosten für Geräte als auch Probenläufe sehr hoch.

Zudem führen alle bekannten Aufreinigungsmethoden zu einem Vorliegen der isolierten Molekülfraktionen in einem Volumen, das mindestens im Mikroliter (μL) Bereich liegt, oft sogar im Milliliter (mL) Bereich. Um Probe (isolierte Molekülfraktionen) zu sparen, müssen für nachgeschaltete Analysen daher stets zusätzliche Pipettierschritte erfolgen.

Im Stand der Technik Verfahren sind auch Verfahren bekannt, bei denen einzelne Zellen aus einer Probe isoliert werden können [Schoendube, J., Wright, D., Zengerle, R., & Koltay, P, Biomicrofluidics 2015, 9(1), 014117; US2008/0286751A1]. Diese Verfahren ermöglichen aber nicht die Auftrennung und Isolation von Molekülfraktionen einer Probe.

Die WO 2008/130977A2 gehört zum Stand der Technik und offenbart ein System zur Partikelseparation. Dabei werden Feststoffpartikel, die in Flüssigkeit suspendiert sind, vereinzelt, aufgereiht oder separiert. Hydrodynamische Kräfte bewirken hierbei die Partikelseparation. Eine Methode zur Separation von Molekülfraktionen, also von in Flüssigkeit vollständig gelösten Molekülen, wird jedoch nicht offenbart.

Es gibt somit einen Bedarf für die Entwicklung von Verfahren und Vorrichtungen zur Aufreinigung von Molekülfraktionen aus einer Probe, die mit geringem Zeitaufwand sowohl in der Durchführung als auch der Vor- und Nachbereitung verbunden sind. Insbesondere wäre es wünschenswert, wenn die Aufreinigung von Molekülfraktionen auch in sehr kleinen Zielvolumina möglich wäre, bspw. in Pico Liter (pL) Bereich, so dass für bestimmte Folgeverwendungen, die ein geringes Volumen erfordern, die Nachbereitung vereinfacht wird. Zudem sollten neue Verfahren kosteneffizient durchführbar und zur Automatisierung geeignet sein.

Beschreibung der Erfindung

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein vorzugsweise automatisierbares Verfahren und/oder eine Vorrichtung zur Aufreinigung oder Isolation von Molekülfraktionen aus einer Probe bereitzustellen, das zeit- und kosteneffizient ist und ein geringes Zielvolumen im nL-pL Bereich ermöglicht.

Das der Erfindung zugrunde liegende technische Problem wird durch das hier beschriebene erfindungsgemäße Verfahren und das erfindungsgemäße System gelöst.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Isolation einer oder mehrerer Molekülfraktionen aus einer Probe, umfassend

- Einbringen der Probe in eine Separationseinheit,
- Auftrennung von in der Probe enthaltenen Molekülen in einem mit einem Separationsmedium gefüllten Separationskanals der Separationseinheit in Molekülfraktionen,

- Extraktion einer oder mehrerer Molekülfractionen aus einem Extraktionsbereich des Separationskanals mittels Aktivierung einer Dosiereinheit,

wobei der Extraktionsbereich fluidisch an eine Öffnung gekoppelt ist und durch Aktivierung der Dosiereinheit im Extraktionsbereich befindliches Medium als Mediumfraktion aus der Öffnung ausgestoßen wird, wobei die Mediumfraktion eine Molekülfraction oder Teile davon umfassen kann.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren handelt es sich bevorzugt um ein mikrofluidisches Verfahren. In Ausführungsformen umfasst die ausgestoßene Mediumfraktion zumindest einen Teil des im Extraktionsbereich befindlichen Mediums. In Ausführungsformen umfasst die ausgestoßene Mediumfraktion das gesamte im Extraktionsbereich befindliche Medium.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren handelt es sich demnach um eine Methode zur Separation von Molekülfractionen, also von in Flüssigkeit vollständig gelösten Molekülen. Bevorzugt bewirken dabei elektrische Kräfte die Separation von Molekülen.

Die vorliegende Erfindung basiert auf der Kombination mehrerer Operationseinheiten in einem, bevorzugt mikrofluidischen, System. Der Begriff „mikrofluidisches System“ bezeichnet die Gesamtheit einer Anordnung verschiedener Operationseinheiten bzw. fluidischer Elemente wie beispielsweise Kanäle, Kammern, Mischer usw., die dem Zweck dienen, eine flüssige Probe zu präparieren oder zu analysieren. Beispiele hierfür sind Elektrophorese- oder Chromatographie-Systeme sowie vollständige Analyse-Systeme die auch als Micro-Total-Analysis-Systems oder Lab-on-a-Chip-Systeme bezeichnet werden.

Überraschenderweise ergibt sich aus der bisher unbekannten Kombination einer Separationseinheit mit einer Dosiereinheit der große Vorteil, dass einzelne Arten von Molekülen oder Molekülfractionen aus einer Probe schnell, aufkonzentriert, in kleinem Volumen und kostengünstig isoliert werden und für Folgeanwendungen bereitgestellt werden können. Hierdurch ergeben sich viele vorteilhafte und im Lichte des bekannten Standes der Technik überraschende Anwendungsmöglichkeiten, wie beispielsweise die schnelle und effiziente Herstellung von speziellen Microarrays.

Zudem ermöglicht die Erfindung eine besonders hohe Flexibilität bei der Fraktionierung ,d.h. bei der Aufteilung eines Probenvolumens, gegeben durch mindestens eine isolierte Molekülfraction, in eine Vielzahl kleinerer Volumen, wobei sich die Konzentration der Vielzahl kleinerer Volumen in Abhängigkeit von der räumlichen Verteilung der Molekülfraction im Separationskanal vor der Fraktionierung unterscheidet. Somit ist eine sehr feingranulare konzentrationsabhängige Isolierung von Teilvolumen einer Molekülfraction denkbar.

Die vorliegende Erfindung verwendet zum einen eine Separationseinheit, um die in einer Probe enthaltenen Moleküle aufzutrennen bzw. zu separieren. Hierfür enthält die Separationseinheit ein Separationsmedium, das beispielsweise flüssig, gelförmig oder fest sein kann, oder Kombinationen hiervon enthalten kann, wie beispielsweise feste Partikel, die von Flüssigkeit umgeben sind. Das Separationsmedium ist in einem Separationskanal angeordnet, in den eine Probe eingeführt wird. Die in der Probe enthaltenen Moleküle können aufgrund unterschiedlicher Migrationsgeschwindigkeiten innerhalb des Separationskanals aufgetrennt werden, in Fraktionen

von Molekülen, die ähnliche oder gleiche Eigenschaften bezüglich der Trennkriterien aufweisen, und daher mit der gleichen Geschwindigkeit entlang des Separationskanals migrieren.

Die aufzutrennenden Moleküle einer Probe können beliebige organische oder anorganische Moleküle oder Verbindungen sein, die aufgrund von unterschiedlichen Wechselwirkungen mit dem Separationsmedium und/oder der Wandoberfläche des Separationskanals unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten innerhalb des Separationskanals aufweisen. Insbesondere lassen sich die in einer Probe enthaltene Biomoleküle wie beispielsweise Biopolymere in der Separationseinheit insbesondere nach physikalischen oder chemischen oder anderen Eigenschaften, wie beispielsweise Bindungseigenschaften, auftrennen. Dies betrifft insbesondere DNA, RNA, Proteine, Lipide, Lipoproteine, Polysaccharide und andere Biomoleküle und Biopolymere, die dem Fachmann bekannt sind.

Eine Auftrennung kann beispielsweise mittels Elektrophorese über die spezifische Ladung der Moleküle erfolgen. Hierzu kann das erfindungsgemäße System Elektroden zur Erzeugung eines elektrischen Feldes entlang des Separationskanals umfassen.

In Ausführungsformen der Erfindung kann auch eine Druck-getriebene Separation/Auftrennung der Moleküle stattfinden. In Ausführungsformen kann die Auftrennung mittels LC (liquid chromatography), insbesondere HPLC (high performance liquid chromatography) erfolgen.

Weitere Möglichkeiten der Auftrennung im Rahmen der vorliegenden Erfindung umfassen eine Trennung mittels eines magnetischen Feldes, wobei magnetische Partikel eingesetzt werden können; Affinitätschromatographie oder andere Trennmethode, bei denen die Migrationsgeschwindigkeit von Molekülen eine Probe innerhalb des Separationskanals aufgrund spezifischer Affinitäten der Moleküle zu einem im Separationskanal vorhandenen Medium, dass auf seiner Oberfläche beispielsweise bestimmte Moleküle umfassen kann, beeinflusst werden.

Im Rahmen der Erfindung werden die Begriffe Separationskanal, Trennkanal, und Migrationskanal synonym verwendet und sind miteinander austauschbar. Entsprechendes gilt für die Begriffe Trennmedium, Separationsmedium und Migrationsmedium.

Im Anschluss an die Auftrennung der in der Probe enthaltenen Moleküle in unterschiedliche Fraktionen innerhalb des Separationskanals können im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens bzw. Systems einzelne Fraktionen aus dem Separationskanal extrahiert bzw. isoliert werden. Hierzu wird eine Dosiereinheit verwendet.

In Ausführungsformen erfolgt die Trennung der Komponenten der Probe, wie beispielsweise verschiedener Biomoleküle, während der Migration durch das Trennmedium aufgrund spezifischer Eigenschaften der jeweiligen Moleküle, die unter anderem die elektrischen Eigenschaften (z.B. Ladung), den isoelektrischen Punkt, die Größe, die morphologische Struktur und das Molekulargewicht umfassen. Zusätzlich kann die Trennung durch die Porengröße, die elektrischen und strömungstechnischen Eigenschaften (z.B. Leitfähigkeit, Viskosität, Oberflächenspannung und Kontaktwinkel) des beispielsweise flüssigen oder gelförmigen Trennmediums sowie des Oberflächenmaterials des Trennkanals oder eines beispielsweise eines festen Trennmediums, wie einer Matrix, beeinflusst werden. Darüber hinaus wird die Trennung durch kombinierte Effekte wie molekulare Wechselwirkungen zwischen (Bio)Molekülen und dem Trennmedium und/oder dem Oberflächenmaterial beeinflusst.

Als Extraktion bzw. Isolation von Molekülen bzw. Molekülfraktionen wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Vorgang verstanden, bei dem in der Probe enthaltene Moleküle, die nach ihrer Auftrennung im Separationskanal in Fraktionen mit ähnlichen Trenneigenschaften migrieren, nach der Auftrennung aus dem Separationskanal kontrolliert entfernt bzw. entnommen oder herausgelöst werden. Die vorliegende Erfindung ermöglicht es somit, dass aus einer komplexen Mischung von Molekülen, die in einer Probe vorhanden sind, bestimmte einzelne Moleküle oder Molekülgruppen isoliert werden, die spezifische Eigenschaften aufweisen und die für den Anwender von besonderem Interesse sind.

In Ausführungsformen der Erfindung umfasst die Dosiereinheit einen Dosierkanal.

In Ausführungsformen der Erfindung umfasst das Verfahren zusätzlich das Ablegen der ausgestoßenen Mediumfraktion. Hierzu kann im erfindungsgemäßen System eine Ablegeeinheit genutzt werden.

Zudem kann im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens eine Detektionseinheit eine Molekülfraktion im Separationskanal detektieren, beispielsweise durch das Auslesen eines Fluoreszenzsignals. In Ausführungsformen der Erfindung wird durch die Detektion einer Molekülfraktion, bevorzugt die Detektion einer Molekülfraktion im Extraktionsbereich des Separationskanals, die Dosiereinheit aktiviert. Diese Aktivierung erfolgt in Ausführungsformen durch die Detektionseinheit, wobei die Detektionseinheit beispielsweise ein Aktivierungssignal an die Dosiereinheit senden kann.

Ausführungsformen der Erfindung umfassen auch ein bevorzugt mikrofluidisches Verfahren zur Isolation einer oder mehrerer Molekülfraktionen aus einer Probe, umfassend

- Einbringen der Probe in eine Separationseinheit,
- Auftrennung von in der Probe enthaltenen Molekülen mittels eines mit einem Separationsmedium gefüllten Separationskanals der Separationseinheit,
wobei die Moleküle in unterschiedlichen Molekülfraktionen entlang des Separationskanals migrieren können,
- Extraktion von einer oder mehrerer Molekülfraktionen aus dem Separationskanal mittels Aktivierung einer Dosiereinheit umfassend einen Dosierkanal,
wobei der Dosierkanal den Separationskanal durchquert und auf einer ersten Seite des Separationskanals eine mit Flüssigkeit gefüllte Dosierkammer umfassen kann,
wobei durch Aktivierung der Dosiereinheit eine fluidische Strömung bevorzugt aus der Dosierkammer durch den Dosierkanal erzeugt wird, wodurch im Durchquerungsbereich von Dosierkanal und Separationskanal befindliches Medium auf einer zweiten Seite des Separationskanals aus einer Öffnung des Dosierkanals als Mediumfraktion ausgestoßen wird,
wobei die ausgestoßene Mediumfraktion eine Molekülfraktion aus dem Separationskanal enthalten kann,

- und bevorzugt Ablegen der ausgestoßenen Mediumfraktion.

In Ausführungsformen umfasst die Dosiereinheit eine mit Flüssigkeit, beispielsweise einem Medium, gefüllte Dosierkammer. In Ausführungsformen erzeugt die Aktivierung der Dosiereinheit einen Fluidstrom aus der Dosierkammer durch den Dosierkanal.

Im Rahmen von Ausführungsformen der Erfindung mit einem Dosierkanal kann der Extraktionsbereich des Separationskanals dem Durchquerungsbereich von Dosierkanal und Separationskanal entsprechen. Das im Extraktionsbereich bzw. Durchquerungsbereich befindliche Medium kann Separationsmedium sein, aber auch ein anderes Medium, wie beispielsweise die Flüssigkeit, die in einer Dosierkammer der Dosiereinheit vorhanden ist.

In Ausführungsformen ist die Öffnung zum Ausstoßen der Mediumfraktion an dem der Dosierkammer entgegengesetzten Ende des Dosierkanals angeordnet.

Der Dosierkanal kann quer zum Separationskanal verlaufen und durchquert den Separationskanal. Entsprechend verläuft der Dosierkanal durch den Separationskanal, so dass ein Durchquerungsbereich der beiden Kanäle vorhanden ist. In Ausführungsformen der Erfindung verläuft der Dosierkanal in etwa orthogonal zum Separationskanal. Es ist aber auch möglich, dass der Dosierkanal schräg oder diagonal zum Separationskanal verläuft, beispielsweise mit einem Winkel zwischen 90° und 0° . Hierbei ist es nicht notwendig, dass der Separationskanal und/oder der Dosierkanal gerade verlaufen. Beide Kanäle können auch beispielsweise einen gebogenen oder „kurvigen“ Verlauf haben. Bevorzugt ist jedoch, dass beide Kanäle einen Durchquerungsbereich bilden, der als Schnittpunkt der beiden Kanäle bezeichnet werden kann, und in Ausführungsformen dem Extraktionsbereich des Separationskanals entspricht.

Der Dosierkanal umfasst in Ausführungsformen auf einer ersten Seite eine Dosierkammer, die mit einer geeigneten Flüssigkeit, beispielsweise einer Pufferlösung oder dem flüssigen Separationsmedium, gefüllt ist. Diese Dosierkammer dient als Reservoir für Flüssigkeit, sodass bei Aktivierung der Dosiereinheit aus der Dosierkammer ein definiertes, geeignetes Flüssigkeitsvolumen ausgestoßen werden kann, das in den Dosierkanal eintritt, so dass ein Fluidstrom innerhalb des Dosierkanals bei Aktivierung der Dosiereinheit entsteht. Hierdurch wird das Medium, das sich im Durchquerungsbereich von Separationskanal und Dosierkanal befindet, wobei es sich beispielsweise um eine in der Dosierkammer befindliche Pufferlösung handeln kann, aus diesem Bereich verdrängt und fließt entlang der Strömungsrichtung des Fluidstroms im Dosierkanal in einen zweiten Teil des Dosierkanals, der sich auf der anderen, zweiten Seite des Separationskanals befindet, auf der nicht die Dosierkammer liegt.

Am Ende dieses zweiten Teils des Dosierkanals befindet sich eine Öffnung, aus der das im Dosierkanal befindliche Medium bei Erzeugung eines Fluidstroms austreten kann. Hierbei ist das erfindungsgemäße System bzw. Verfahren bevorzugt so eingestellt, dass bei Aktivierung der Dosiereinheit so viel Flüssigkeit aus der Dosierkammer ausgestoßen wird, dass das Medium, das sich im Extraktionsbereich, also im Durchquerungsbereich der beiden Kanäle befindet, aus der Öffnung, die sich am Ende des zweiten Bereichs des Dosierkanals befinden kann, austritt. Hierdurch ist es möglich, eine Molekülfraktion, die sich im Durchquerungsbereich von Separationskanal und Dosierkanal befindet, aus dem Separationskanal zu isolieren, indem sie aus der Öffnung des Dosierkanals bei Aktivierung der Dosiereinheit ausgestoßen wird.

In Ausführungsformen befindet sich der Teil des Dosierkanals mit der Dosierkammer oberhalb des Separationskanals, und der Teil des Dosierkanals mit der Öffnung unterhalb des Separationskanals. Andere Anordnungen sind für einen Fachmann aufgrund der vorliegenden Beschreibung offensichtlich.

In Ausführungsformen erfolgt die Aktivierung der Dosiereinheit, wie zuvor beschrieben, durch die Detektionseinheit infolgedessen von einer Aktivierungseinheit, die als ein Teil der Dosiereinheit angesehen und integriert sein kann, aber auch als externe Einheit, die mit der Dosiereinheit interagiert, eine Kraft auf die Dosiereinheit ausgeübt wird, wodurch die Flüssigkeit in Bewegung versetzt wird und infolgedessen Flüssigkeit aus der Düse am Ende des Dosierkanals austritt. Dieser Austritt kann von der Aktivierungseinheit beispielsweise über die Ausübung/Einwirkung einer mechanischen Kraft, einen Druck, eine thermische Expansion, eine Beschleunigung bzw. Impulsübertragung oder Schwingung erzwungen werden. Die Aktivierungseinheit, die diese Kraft generiert, kann oberhalb, unterhalb, innerhalb oder hinter der Dosierkammer sowie auch an einer Stelle entlang des Dosierkanals angebracht werden. Im Falle einer Anbringung unterhalb der Dosierkammer, also entlang des Dosierkanals, würde zunächst das Flüssigkeitsvolumen aus der Öffnung ausgestoßen werden und annähernd zeitgleich (aufgrund von Kapillarkräften) Flüssigkeit aus der Dosierkammer in den Dosierkanal nachfließen. Andere Anordnungen sind für einen Fachmann aufgrund der vorliegenden Beschreibung offensichtlich.

Das aus der Öffnung ausgestoßene Volumen, also die Mediumfraktion, die insbesondere das Medium des Extraktionsbereichs bzw. Durchquerungsbereichs und die darin enthaltenen Moleküle bzw. die enthaltene Molekülfraktion umfasst, wird nach dem Ausstoßen bzw. im Rahmen des Ausstoßens aus der Öffnung abgelegt. Bei größerer Dimensionierung des Dosierkanals ist es wahrscheinlich, dass mehrere aufeinanderfolgende Aktivierungen der Dosiereinheit notwendig sind, bis das gewünschte Volumen des Durchquerungsbereichs von Dosier- und Separationskanal ausgestoßen ist, da gegebenenfalls ein kleineres Volumen ausgestoßen wird im Vergleich zum Volumen des Dosierkanals auf der zweiten Seite.

Im Kontext der Erfindung umfasst der Begriff „Ablegen“ ein kontaktfreies Ablegen, beispielsweise in dem das Medium als ein oder mehrere frei fliegende Tropfen aus der Öffnung ausgestoßen wird und auf einer Auffangvorrichtung, beispielsweise einem Auffanggefäß oder einem Auffangsubstrat, aufgefangen wird, ohne dass hierbei ein direkter Kontakt zwischen der Öffnung und der Auffangvorrichtung zustande kommt oder eine Fluidbrücke zwischen diesen Strukturen gebildet wird. In Ausführungsformen der Erfindung wird die Mediumfraktion als frei-fliegender Tropfen aus der Öffnung ausgestoßen.

Darüber hinaus umfasst „Ablegen“ aber auch einen Auffangvorgang, bei dem ein Kontakt oder eine Fluidbrücke entsteht, beispielsweise durch ein Kontakt- bzw. Halbkontaktverfahren. Ablegen umfasst somit im Sinne der Erfindung alle Arten von üblichen Dosierverfahren, die insbesondere in mikrofluidischen System zum Ablegen bzw. Auftragen von Flüssigkeiten verwendet werden können und einem Fachmann bekannt sind.

In Ausführungsformen ist die Öffnung eine Düse zum Ausstoßen der Mediumfraktion. Die Art der Öffnung des Dosierkanals kann im Rahmen der vorliegenden Erfindung je nach Art des gewünschten Ablege-Mechanismus angepasst werden. Beispielsweise ist es bevorzugt, dass die Öffnung durch eine Düse geformt wird, die die Formung von freifliegenden Tropfen ermöglicht

oder vereinfacht. Dies ist insbesondere in Fällen wünschenswert, wo ein kontaktfreies Ablegen gewünscht oder notwendig ist. Die Düsenöffnung kann, soweit vorteilhaft, jedwede Geometrie annehmen. Dazu zählen beispielsweise rund, rechteckig, quadratisch, sternförmig, oval sowie Mischformen hiervon. Zudem kann sich die Öffnung auch auf einer Fläche befinden, die um ein Vielfaches größer ist als die Düsenöffnungsfläche oder durch das Ende einer Kapillar-ähnlichen Struktur gebildet werden (wie beispielsweise einer Kanüle). Dem Fachmann sind geeignete Öffnungsformen für die verschiedenen Ablegevarianten bekannt.

Die Dosierung kann beispielsweise über eine Membran-Deformation in der Dosierkammer (wiederholtes Eindrücken und anschließende Relaxation) durch einen Piezoaktor realisiert werden [Schoendube, J., Wright, D., Zengerle, R., & Koltay, P. *Biomicrofluidics* 2015, 9(1), 014117]. Weiterhin kann die Dosierung gemäß dem Bubble-Jet-Prinzip, Inkjet-Prinzip Trägheitsbedingt, druckgetrieben, thermisch durch punktuelle Erwärmung der Flüssigkeit in der Dosierkammer oder über eine Ventilsteuerung (bspw. pneumatisch, etc.) erfolgen. Weiterhin kann die Dosierung durch Kapillarkräfte erfolgen, beispielsweise durch Aufsetzen der Düse auf ein Substrat oder den Boden eines Auffanggefäßes, sodass Flüssigkeit und Substrat in Kontakt kommen und über die Benetzung des Substratmaterials die Flüssigkeit aus der Düse gezogen wird. Geeignete Dosiereinheiten und Dosierkammern sind einem Fachmann bekannt.

Die Separationseinheit umfasst einen Separationskanal, der bevorzugt ein Mikrokanal ist, der mit einem bevorzugt flüssigen oder gelförmigen Separationsmedium befüllt ist. Dieser kann auch in einem Teilbereich mit einem flüssigen und in einem anderen Teilbereich mit einem gelförmigen Separationsmedium befüllt sein. Ein Separationskanal kann im Rahmen der Erfindung unterschiedliche Querschnittsformen umfassen, beispielsweise rund, oval, rechteckig, quadratisch, polygonal oder jede andere vorstellbare geeignete Form. Die Querschnittsform kann sich entlang des Separationskanals auch ändern. Zudem sind je nach Anwendung unterschiedliche Querschnittsgrößen des Separationskanals für die vorliegende Erfindung geeignet. Für Kanäle mit in etwa rundem Querschnitt sind beispielsweise Durchmesser von 10-2000 µm geeignet, insbesondere auch Durchmesser von 15-1800, 20-1600, 30-1400, 40-1200, 50-1000, 60-900, 70-800, 80-600, 90-500, 100-480, 120-460, 140-440, 160-420, 180-400, 200-380, 220-360, 240-340, 260-320, 280-300 µm. Entsprechende resultierende Querschnittsflächen sind auch für andere Formen von Separationskanälen geeignet und sind für einen Fachmann offensichtlich im Rahmen der vorliegenden Offenbarung. Entsprechende Querschnittsvarianten und Dimensionierungen können in Ausführungsformen auch auf den Dosierkanal zutreffen. Überdies kann der Separationskanal Restriktionselemente enthalten, die zu einem erhöhten fluidischen Widerstand führen. Auch ist ein Separationskanal denkbar, der beispielsweise meanderförmig angelegt ist.

In Ausführungsformen enthält der Separationskanal im Extraktionsbereich ein anderes Medium als in anderen oder allen anderen Bereichen des Separationskanal. Die jeweiligen Medien können so gewählt sein, dass ein Nachfließen von Separationsmedium in den Extraktionsbereich nach Aktivierung der Dosiereinheit nicht stattfindet. Beispielsweise kann das Separationsmedium gelförmig sein, wohingegen das Medium im Extraktionsbereich flüssig ist.

Der Trennkanal kann sich im Rahmen der Erfindung in einer Kapillare befinden, ähnlich wie bei der Kapillarelektrophorese. In Ausführungsformen der Erfindung umfasst die Separationseinheit

eine Kapillare, die als Separationskanal dient. Bevorzugt findet in solchen Ausführungsformen die Auftrennung der Molekülfractionen der Probe entlang eines elektrischen Feldes innerhalb der mit dem Separationsmedium gefüllten Kapillare statt. Entsprechend kann die Auftrennung im Rahmen der Erfindung mittels einer Kapillarelektrophorese stattfinden. In einer anderen Ausführungsform kann die Triebkraft zur Bewegung der Moleküle auch ein Druckgradient sein.

Der Begriff „Separationsmedium“ oder „Trennmedium“ im Sinne der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf jede Art von geeignetem Medium, mit dessen Hilfe eine Auftrennung von Molekülen in einem Separationskanal gemäß bestimmten chemischen oder physikalischen Eigenschaften der Moleküle möglich ist. Hierzu sind insbesondere flüssige oder wässrige Lösungen sowie Gele geeignet. Zudem können als Separationsmedium auch feste Medien verwendet werden, beispielsweise solche, die einem Fachmann aus Chromatographie Säulen bekannt sind, wobei diese auch in Verbindung mit einem flüssigen Laufmittel oder flüssigen oder gelförmigen Separationsmedium genutzt werden können. Entsprechend sind alle gängigen Separationsmedien, die in Chromatographie- und Elektrophoreseverfahren genutzt werden im Rahmen der Erfindung als Separationsmedium einsetzbar, insbesondere zusammen mit einem festen Medium, wie beispielsweise der Matrix einer Chromatographie Säule. Entsprechend kann der Begriff Separationsmedium in Ausführungsformen der Erfindung beispielsweise auch als die Kombination eines festen Mediums und eines flüssigen Laufmittels verstanden werden.

Flüssige und gelförmigen Separationsmedien im Sinne der Erfindung umfassen jede Art von wässriger Lösung auf Wasserbasis oder Gele, die Wasser oder andere Flüssigkeiten wie anorganische oder organische Lösungsmittel oder Additive wie DMSO, DMF oder Glycerin zu ihrer Herstellung benötigen. Beispiele für flüssige und gelförmigen Trennmedien gemäß der vorliegenden Erfindung sind unter anderem wasserbasierte Gele, Puffer, Salzlösungen, flüssige Gele, feste Gele, flüssige oder feste Gele auf Polyacrylamidbasis, lineare oder (quer-)vernetzte Gele auf Polyacrylamidbasis, agarosebasierte Gele, Hydrogele wie Alginat, Blockpolymere, Blockcopolymere, Hydroxyethylcellulose oder Derivate hiervon, pluronische, Gelatine- oder Chitinhydrogele, Gradientengele und Pufferlösungen sowie Mischungen der vorgenannten Medien- und Geltypen. Darüber hinaus kann ein Trennkanal mehr als ein Trennmedium enthalten, beispielsweise mehr als eine Flüssigkeit und/oder ein Gel und/oder feste Materialien, beispielsweise Chromatographie-Materialien. So kann beispielsweise der Trennkanal aus verschiedenen Teilen verschiedener Flüssigkeits- oder Geltypen zusammengesetzt werden. So kann beispielsweise ein Trennkanal einen aus Polyacrylamid gebildeten Abschnitt umfassen, der mit einem aus Agarose gebildeten Abschnitt verbunden ist. Es ist ein großer Vorteil der vorliegenden Erfindung, dass insbesondere alle Arten von Flüssigkeiten und Gelen mit elektrischer Leitfähigkeit geeignet sind, als flüssige Trennmedien zu dienen.

Die vorliegende Erfindung bietet wesentliche Vorteile gegenüber anderen Verfahren zur Isolation von Molekülen bzw. Molekülgruppen oder Molekülfraction aus einer Probe mit einer komplexen Molekülzusammensetzung.

Zum einen wird nur eine sehr geringe Menge an Ausgangsmaterial bzw. Probenvolumen benötigt. Andererseits können aber auch große Probenvolumen, beispielsweise über geeignete Reservoirs für die Probenaufnahme, eingebracht werden. Unabhängig vom Ausgangsvolumen ist es möglich, Moleküle eines großen Probenvolumens im Separationskanal oder bei Eintritt in den

Separationskanal zu fokussieren und in scharf abgetrennte Molekülfraktionen aufzutrennen. Die Erfindung gibt dem Anwender somit die Möglichkeit, sowohl extrem kleine als auch relativ große Probenvolumina zu analysieren. Im Falle größerer Probenvolumina bietet sich die wiederholte Aufreinigung mehrerer kleinerer Teilvolumina sequentiell hintereinander an. Geeignete Probenvolumina, die in Ausführungsformen in das System bzw. das Verfahren eingebracht werden können, liegen insbesondere im Picoliter- bis zum Mikroliter-Maßstab, wobei auch andere Volumina einsetzbar sind.

Zudem ermöglicht das erfindungsgemäße Verfahren bzw. System eine Auftrennung und Isolation von Molekülen unter Einsatz von sehr geringen Mengen an Verbrauchsmaterialien, so dass die Kosten für die Analyse und Auftrennung einer Probe sehr geringgehalten werden können. Darüber hinaus ermöglicht die vorliegende Erfindung die Auftrennung und Isolation von Molekülen bzw. Molekülfraktion in einem einzigen einheitlichen Verfahren, was eine erhebliche Zeitersparnis herbeiführt. Zudem können die resultierenden isolierten Molekül Fraktionen nach der Isolation in sehr kleinen Volumina verfügbar sein, die bereits für die Anschlussanwendung geeignet sind, wobei auch eine konzentrationsabhängige Isolierung erfolgen kann. Da eine Molekülfraktion für gewöhnlich auch einen räumlichen Konzentrationsgradienten darstellt, d.h. mit jeweils einer Maximalkonzentration in der Mitte der Fraktion und abfallenden Konzentration an den Flanken (vor und hinter der Mitte der Fraktion), kann aus einer Molekülfraktion genau der Bereich isoliert werden, der die für eine Anschlussanwendung geeignete Konzentration aufweist bzw. aus der sich diese in Abhängigkeit des isolierten Volumens ergibt.

Das Verfahren kann an die Bedürfnisse des Anwenders angepasst werden und erfordert somit sehr geringe Vor- und Nachbereitung Zeiten.

Verschiedene Arten von verfügbaren Proben können als Ausgangsmaterial in dem Verfahren eingesetzt werden, und das Volumen und der Puffer, in dem die resultierenden isolierten Molekülfraktionen nach dem Verfahren vorhanden sind, können an die Bedürfnisse und Folgeanwendungen angepasst werden, insbesondere über die in der Dosierkammer und im Dosierkanal vorhandene Flüssigkeit, wie beispielsweise eine Pufferlösung. So ist es möglich, dass isolierte Molekülfraktionen in sehr kleinen Volumina von wenigen Pikolitern oder Nanolitern vorliegen.

Zudem können die isolierten Molekülfraktionen in verschiedenen Gefäßen oder auf verschiedenen Substraten oder verschiedenen Substratpositionen abgelegt werden, je nach gewünschter Folgeanwendung. Beispielsweise können unterschiedliche Fraktionen in unterschiedlichen Töpfchen (engl. Wells) einer Mikrotiterplatte aufgefangen werden oder an verschiedenen Stellen eines Substrats, wie beispielsweise einem für Microarrays geeignetem Objektträger, abgelegt werden. Hierbei ist sowohl ein kontaktfreies Ablegen möglich, als auch andere Verfahren, die beispielsweise das *semi-contact writing* [Gutzweiler et al. J. Micromech. Microeng. 26 (2016) 045018 (10pp)]. Die Töpfchen der Mikrotiterplatte können auch mit geeigneten Puffern oder anderen Flüssigkeiten vorbefüllt sein, um die Verdunstung der kleinen ausgestoßenen bzw. abgelegten Volumina zu reduzieren.

Aufgrund der möglichen kleinen resultierten Volumina ermöglicht das erfindungsgemäße Verfahren beispielsweise die einfache und schnelle Herstellung von Microarrays, beispielsweise Protein- oder DNA-Microarrays, durch ein einfaches und integriertes Verfahren, bei dem

Auftrennung von Molekülen einer Probe, beispielsweise Proteinen, und deren Auftragung auf ein Substrat ohne Zwischenschritt innerhalb eines Verfahrens möglich sind.

In Ausführungsformen der Erfindung erfolgt das Ablegen bzw. Dosieren einer Molekülfraction oder Teile hiervon in die Probenzuführung eines zweiten mikrofluidischen Systems. Hierbei kann es sich um ein zweites erfindungsgemäßes System handeln, welches sich von dem ersten mikrofluidischen System, aus dem die Molekülfraction isoliert wurde, insofern unterscheidet, dass andere Trenn- oder Reinigungsbedingungen durch beispielsweise die Verwendung eines anderen Trennmediums oder einer anderen Ionenstärke oder eines anderen pH-Wertes gegeben sind, sodass die Molekülfraction in Unterfraktionen, die in dem ersten System nicht abgetrennt werden konnten, aufgetrennt wird und diese gemäß der Erfindung isoliert werden. Hiermit könnte man mit dem gemäß der Erfindung beschriebenen Systems ein der 2-Dimensionalen-(Gel)-Elektrophorese bzw. 2-Dimensionalen-Chromatographie entsprechendes Verfahren umsetzen.

In Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Auftrennung aufgrund einer oder mehrerer physikalischer und/oder chemischer Eigenschaften der Moleküle, beispielsweise nach Ladung, Molekulargewicht, Größe, Funktion, Struktur, isoelektrischem Punkt, chemischer oder physikalischer Wechselwirkung mit dem Separationsmedium und/oder der Oberfläche des Separationskanals.

In Ausführungsformen der Erfindung sind die Oberflächen im Separationskanal modifiziert bzw. funktionalisiert. Bei geeigneter Funktionalisierung der Oberfläche, beispielsweise durch eine Beschichtung der Kanalwände, können unerwünschte Wechselwirkungen, wie beispielsweise unspezifische Bindungen, zwischen den Oberflächen und den Molekülen unterbunden werden. Darüber hinaus kann eine Oberflächenfunktionalisierung auch dazu genutzt werden ungewollte Molekül-Fractionen durch an der Kanalwand gebundene Fänger-Moleküle anbinden zu lassen bzw. durch spezifische Bindungen herauszufiltern. Somit kann durch Funktionalisierung eine (zusätzliche) Auftrennung bzw. eine Filterung oder Aufreinigung erzielt werden. Zudem kann in Ausführungsformen die Kanalwand dahingehend modifiziert werden, dass die Oberflächenladung beeinflusst wird, um bewusst einen elektro-osmotischen Fluss für chromatographische Trennungen zu generieren oder diesen zu unterbinden im Falle von elektrophoretischen Trennungen.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung beträgt das Probenvolumen (also das sog. „geladenen Volumen“) etwa 1 nL bis 100 μ L, vorzugsweise etwa 10 nL bis 10 μ L, etwa 100 nL bis 2 μ L, oder etwa 1 μ L.

Der Bereich von etwa 1 nL bis 100 μ L ist besonders vorteilhaft, da er sich auf kleine Probenvolumina bezieht, die zu einer hohen Trennauflösung führen. Der Bereich von ca. 10 nL bis 10 μ L ist zudem bevorzugt, da neben dem Vorteil der hohen Trennauflösung ein kleineres maximales Volumen erforderlich ist, was zu einer effizienteren Nutzung des Probenmaterials führt. Der Probenvolumenbereich von ca. 100 nL bis 10 μ L ist bevorzugt, da er neben den oben genannten Vorteilen eine genaue Dosierung des Probenvolumens ermöglicht, während das maximale Volumen noch klein genug ist, um die Verwendung von sehr dünnen bzw. feinen Trennkanälen zu ermöglichen, die die Probe aufnehmen können. Darüber hinaus ermöglicht dieses Probenvolumen eine hohe Empfindlichkeit oder Detektion der Probenkomponenten bei gleichzeitig sehr hoher Trenngenauigkeit. Ein Probenvolumen von etwa 1 μ L ist besonders

geeignet, da aufgrund des geringen Volumens der Probe die Mengen aller anderen an der Methode der vorliegenden Erfindung beteiligten Materialien reduziert werden können.

In Ausführungsformen der Erfindung umfasst die Separationseinheit Elektroden zur Erzeugung eines elektrischen Feldes entlang des Separationskanals, bevorzugt an den Enden des Separationskanals oder innerhalb der Dosierkammer.

Das erfindungsgemäße System bzw. Verfahren kann bevorzugt Elektroden umfassen, beispielsweise eine Anode und eine Kathode, die in Kontakt mit dem Trennmedium stehen, also elektrisch mit dem Trennmedium verbunden sind, so dass über die jeweiligen Kontaktstellen ein elektrisches Feld an das Trennmedium angelegt werden kann. Dies ermöglicht das Anlegen einer Spannung zwischen den Elektroden innerhalb des Trennmediums, was zur Bildung eines elektrischen Feldes und zur Migration und schließlich zur Trennung der Komponenten in einer Probe führt, die in die Separationseinheit und das Trennmedium eingebracht wurde und hierin eingeschlossen ist. Die Trennung der Komponenten kann insbesondere aufgrund ihrer Größe, ihres Molekulargewichts, ihrer Ladung und/oder ihres isoelektrischen Punktes (pI, pI_I, IEP) erfolgen.

In bevorzugten Ausführungsformen umfasst die vorliegende Erfindung mehr als eine Anode und mehr als eine Kathode. So kann beispielsweise die Vorrichtung der vorliegenden Erfindung zwei Anoden und zwei Kathoden umfassen, die eine parallele Analyse von zwei Proben in unabhängigen Trennkanälen ermöglichen, die mit verschiedenen Elektroden verbunden sind. In solchen Ausführungsformen können auch die übrigen Komponenten des Systems in entsprechend mehrfacher Ausführung vorhanden sein.

Zudem ist es möglich, unterschiedliche elektrische Felder über den Separationskanal und den Dosierkanal anzulegen, so dass beispielsweise eine unerwünschte Diffusion von Molekülen innerhalb des Separationsmediums, insbesondere im Durchquerungsbereich von Separationskanal und Dosierkanal, verhindert werden kann. Beispielsweise kann durch das Anlegen eines geeigneten elektrischen Feldes im Bereich des Durchquerungspunktes von Separation und Dosierkanal verhindert werden, dass unerwünschte Molekülfractionen in den Dosierkanal oder die Dosierkammer hinein diffundieren, sodass sichergestellt ist, dass diese Fractionen durch den Durchquerungsbereich hindurch wandern entlang des Separationskanals. Solche hindurchwandernden Fractionen können am Ende des Separationskanals in einem geeigneten Reservoir aufgefangen werden.

Ausführungsformen der Erfindung umfassen ein elektrisches Feld, das entlang des Dosierkanals ausgerichtet ist, und die Diffusion von in der Probe enthaltenen Molekülen oder Molekülfractionen in den Dosierkanal verhindert. Ein entsprechendes abstoßendes elektrisches Feld kann entlang der verschiedenen Strukturen der Erfindung angelegt sein, um die gewünschte Migrationsrichtung der in der Probe enthaltenen Moleküle zu gewährleisten. Beispielsweise kann eine nicht gewünschte Migration in den Dosierkanal oder in Richtung der Dosierkammer verhindert werden.

Das für die Auftrennung angelegte elektrische Feld kann zwischenzeitlich, bevorzugt während der kurzzeitigen Aktivierungen der Dosiereinheit zum Ausstoßen der Molekül-Fractionen abgeschaltet oder umgekehrt werden um ein Hineinmigrieren nachfolgender Molekül-Fractionen

aus dem Separationskanal in den Durchquerungsbereich zwischen Dosierkanal und Separationskanal zu verhindern oder einem durch die Dosiereinheit möglicherweise generierten und sich negativ auf die Aufreinigung auswirkenden Fluss entlang des Separationskanals entgegenzuwirken.

Vorzugsweise wird im erfindungsgemäßen Verfahren eine Detektionseinheit eingesetzt. In Ausführungsformen umfasst die Erfindung eine Detektionseinheit, die eine Molekülfraktion im Separationskanal detektiert. In Ausführungsformen detektiert die Detektionseinheit eine Molekülfraktion im Extraktionsbereich, beispielsweise im Durchquerungsbereich von Dosierkanal und Separationskanal.

Die Detektion kann UV/Vis-, Fluoreszenz-, Leitfähigkeit- und/oder Impedanz-Detektion umfasst. In Ausführungsformen der Erfindung ist das erfindungsgemäße System oder zumindest Teile davon, wie beispielsweise der Ummantelung des Separationskanals, transparent. Hierdurch wird die Detektion von Molekülfraktionen, beispielsweise durch Detektion eines Fluoreszenzsignals, auch durch eine außerhalb des Separationskanals angeordnete Detektionseinheit ermöglicht.

Eine im Rahmen der Erfindung zu verwendende Detektionseinheit ist geeignet, Molekülfraktionen innerhalb des Separationskanals und insbesondere im Durchquerungsbereich von Dosierkanal und Separationskanal zu detektieren mittels üblicher Detektionsverfahren und Sensoren, wobei UV/Vis-, Fluoreszenz-, Leitfähigkeit- und/oder Impedanz-Detektion und entsprechende geeignete Sensoren innerhalb der Detektionseinheit verwendet werden können. Der Fachmann ist in der Lage, entsprechende Detektionseinheiten bereitzustellen, die auf die zu isolierenden Moleküle und Molekülfraktionen ausgerichtet sein können.

Die Leitfähigkeitsdetektion kann in elektromigrativen Trenntechniken, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden können, wie beispielsweise der Kapillarelektrophorese, als universeller Detektor eingesetzt werden. Wird die Detektion kontaktlos durchgeführt, können sehr stabile und reproduzierbare Messungen erreicht werden, da die Elektroden nicht durch in dem erfindungsgemäßen Verfahren oder System eingesetzte Materialien verunreinigt werden können. Beispielsweise kann mit Hilfe der Leitfähigkeitsdetektion auf mikrofluidischen Chips die Trennung von Molekülfraktionen auch im Rahmen von mehrdimensionalen Trennungen überwacht werden. Hierbei kann eine Potenzialkontrolle auch nur am Durchquerungsbereich oder kurz vor dem Durchquerungsbereich von Dosierkanal und Trennkanal erfolgen.

Die Visualisierung und/oder Quantifizierung von Molekülen bzw. Molekülfraktion im Separationskanal kann mittels laserinduzierter Fluoreszenz erfolgen. Daher sollten im Rahmen dieser Ausführungsform die zu detektierenden Moleküle fluoreszierend markiert werden. Dies kann durch die Kopplung eines Moleküls an einen Fluorophor erreicht werden. Fluorophore (oder Fluorochrome), die im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, sind fluoreszierende chemische Verbindungen, die bei Lichtanregung Licht wieder abgeben können. Fluorophore zur Verwendung als Markierungen für die Erzeugung markierter Biomoleküle der Erfindung umfassen, ohne Anspruch auf Vollständigkeit zu erheben, Rhodamin und Derivate, wie Texas Red, Fluoreszein und Derivate, wie 5-Brommethylfluoreszein, Luzifer Yellow, IAEDANS, 7-Me2N-Cumarin-4-acetat, 7-OH-4-CH3-Cumarin-3-acetat, 7-NH2-4CH3-Cumarin-3-acetat (AMCA), Monobromobiman, Pyrentrisulfonate, wie z.B. Cascade Blue, und Monobromtrimethyl-

Ammonioibiman, FAM, TET, CAL Fluor Gold 540, HEX, JOE, VIC, CAL Fluor Orange 560, Cy3, NED, Quasar 570, Oyster 556, TMR, CAL Fluor Rot 590, ROX, LC Rot 610, CAL Fluor Rot 610, Texas Rot, LC Rot 610, CAL Fluor Rot 610, LC Rot 640, CAL Fluor Rot 635, Cy5, LC Rot 670, Quasar 670, Oyster 645, LC Rot 705, Cy5.5, BODIPY FL, Oregon Green 488, Rhodamin Green, Oregon Green 514, Cal Gold, BODIPY R6Gj, Yakima Yellow, JOE, HEX, Cal Orange, BODIPY TMR-X, Quasar-570 /Cy3, TAMRA, Rhodamin Red-X, Rhodamin B, Rhodamin 6G, Redmond Red, BODIPY 581/591, Cy3.5, Cal Red/Texas Red, BODIPY TR-X, BODIPY 630/665-X, Pulsar-650, Quasar-670/Cy5.

Alternativ können die Moleküle der vorliegenden Erfindung intrinsisch fluoreszierend sein, zum Beispiel fluoreszierendes Protein. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform können fluoreszierende Moleküle mit dem zu detektierenden Molekül verknüpft werden. Nicht einschränkende Beispiele für fluoreszierende Proteine, die im Rahmen der Erfindung verwendet werden können, sind Photoproteine wie Aequorin; Obelin; Aequorea fluoreszierende Proteine, wie z.B. grüne fluoreszierende Proteine (GFP, EGFP, AcGFP1), blaue fluoreszierende Proteine (CFP, ECFP), blaue fluoreszierende Proteine (BFP, EBFP), rote fluoreszierende Proteine (RFP), gelbe fluoreszierende Proteine (YFP, EYFP), ultraviolette fluoreszierende Proteine (GFPuv), ihre Fluoreszenzverbesserungsvarianten, ihre Peptiddestabilisierungsvarianten und dergleichen; fluoreszierende Proteine aus dem Korallenriff, wie z.B. Discosoma rote fluoreszierende Proteine (DsRed, DsRed1, DsRed2 und DsRed-Express), Anemonia rote fluoreszierende Proteine (AsRed und AsRed2), Heteractis far-red fluoreszierende Proteine (HcRed, HcRed1), Anemonia cyan fluoreszierende Proteine (AmCyan, AmCyan1), Zoanthus grün fluoreszierende Proteine (ZsGreen, ZsGreen1), Zoanthus gelb fluoreszierende Proteine (ZsYellow, ZsYellow1), ihre Fluoreszenzverbesserungsvarianten, ihre Peptiddestabilisierungsvarianten und dergleichen; Renilla reniformis grün fluoreszierendes Protein (Vitality hrGFP), seine Fluoreszenzverbesserungsvarianten, seine Peptid-Destabilisierungsvarianten und dergleichen; und Great Star Coral fluoreszierende Proteine, wie z.B. Montastrea cavernosa fluoreszierendes Protein (Monster Green® Fluorescent Protein), seine Fluoreszenzverbesserungsvarianten, seine Peptiddestabilisierungsvarianten und dergleichen. Ein Fachmann versteht, dass diese und eine Vielzahl anderer fluoreszierender Proteine als fluoreszierendes Protein in Aspekten der Erfindung nützlich sein können (Jennifer Lippincott-Schwartz & George H. Patterson, Development and Use of Fluorescent Protein Markers in Living Cells, 300(5616) Science 87-91 (2003); and Jin Zhang et al., 3(12) Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 906-918 (2002)). Einem Fachmann ist zudem klar, dass diese und viele andere fluoreszierende Proteine, einschließlich Spezies Orthologe und Paralogue der oben beschriebenen natürlich vorkommenden fluoreszierenden Proteine sowie künstliche fluoreszierende Proteine, als fluoreszierendes Protein nützlich sein können, das in Aspekten der vorliegenden Beschreibung offenbart wird.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung können interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe für die Detektion von Molekülen, beispielsweise von Nukleinsäuremolekülen, verwendet werden. Zu diesen Farbstoffen gehören insbesondere Ethidiumbromid, Propidiumjodid, Hoechst 33258, Hoechst 33342, Acridinorange, Ethidiumbromid-Homodimere, EverGreen und alle Farbstoffe der Familien SYBR und SYTO. Zu diesen Farbstoffen gehören auch POPO, BOBO, YOYO und TOTO von Molecular Probes (Eugene, Oreg.).

Weitere mögliche Detektionsmittel können spezifische Markierungen umfassen, wie z.B. Fluoreszenzmarkierungen, Leuchtmarkierungen, spezifische reaktive chemische Gruppen, Gold-, Silber-, Magnet-, Metalloxidpartikel, Beads mit Markerpartikeln, nicht fluoreszierende Farbstoffe oder radioaktive Markierungen. In einer weiteren Ausführungsform werden die Moleküle während der Migration durch Ultraviolett-(UV-)Absorptionserkennung nachgewiesen. Darüber hinaus können die Moleküle während der Migration elektrochemisch über die Impedanzdetektion, die einen spezifischen Messelektrodenaufbau erfordert, der in das erfindungsgemäße System und insbesondere die Detektionseinheit implementiert werden kann, markierungsfrei detektiert werden.

In Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens aktiviert die Detektion einer Molekülfraktion im Durchquerungsbereich von Dosierkanal und Separationskanal die Dosiereinheit. Entsprechend kann die Aktivierung der Dosiereinheit durch die Detektionseinheit erfolgen, wenn die Detektionseinheit das Vorhandensein einer Molekülfraktion im Durchquerungsbereich von Dosierkanal und Separationskanal detektiert bzw. anzeigt.

In Ausführungsformen steuert die Detektionseinheit die Aktivierung der Dosiereinheit, wobei eine Aktivierung der Dosiereinheit zum Ausstoßen des im Extraktionsbereich befindlichen Mediums umfassend die darin enthaltenen Molekülfraktion führt. Hierbei wird eine Aktivierung der Dosiereinheit von der Detektionseinheit ausgelöst, wenn das Vorhandensein einer Molekülfraktion, die isoliert werden soll, innerhalb des Durchquerungsbereich von Dosierkanal und Separationskanal von der Detektionseinheit detektiert wird.

Hierbei kann die Detektionseinheit so angeordnet sein, dass eine Detektion von Molekülfraktionen kurz vor oder im Durchquerungsbereich von Dosierkanal und Separationskanal detektiert wird. In Fällen, wo die Detektionseinheit vor dem Durchquerungsbereich angeordnet ist und ein Molekül oder eine Molekülfraktion vor dem Eintritt in den Durchquerungsbereich detektiert, kann eine Aktivierung der Dosiereinheit mit einer geeigneten Verzögerung nach der Detektion erfolgen, so dass die Molekülfraktion im Zeitraum zwischen Detektion und Aktivierung in den Durchquerungsbereich migriert ist. Überdies kann die Detektionseinheit auch das Abschalten oder Umkehren des angelegten zur Trennung verwendeten elektrischen Feldes sowie das Anlegen eines elektrischen Feldes zwischen einer vor der Dosiereinheit befindlichen Elektrode und der Elektrode in der Probeneinbringung steuern, sodass die Wanderung nachfolgender Fraktionen für den Zeitraum der Aktivierung der Dosiereinheit angehalten oder zumindest verzögert wird.

Ein Fachmann ist in der Lage verschiedene Ausführungsformen der Erfindung zu entwerfen bzw. zu konfigurieren, in denen die Einheiten der Erfindung zueinander so angeordnet sind, dass die Detektionseinheit die Aktivierung der Dosiereinheit in geeigneter Weise kontrolliert, um die Isolation von spezifischen detektierbaren bzw. detektierten Molekülfraktionen zu gewährleisten.

In Ausführungsformen der Erfindung findet eine kontinuierliche Aktivierung der Dosiereinheit statt. In diesen Ausführungsformen wird somit konstant Mediumfraktionen aus dem Dosierkanal ausgestoßen, wobei nur die gewünschten Tropfen oder Volumina von Separationsmedium abgelegt werden auf eine Auffangvorrichtung, beispielsweise in einem Auffanggefäß oder auf einem Substrat, wohingegen das übrige ausgestoßene Medium verworfen, beispielsweise abgesaugt wird. Hierbei ist es möglich, dass die Detektionseinheit anzeigt, wann ein

ausgestoßener Tropfen aufgefangen beziehungsweise abgelegt werden soll, und wann ausgestoßene Tropfen abgesaugt oder verworfen werden sollen.

Solche Ausführungsformen sind vorteilhaft, da durch die kontinuierliche Dosierung bzw. das kontinuierliche Ausstoßen eine unerwünschte Diffusion von Separationsmedium und migrierenden Molekülfraktionen in den Dosierkanal verhindert werden kann.

In Ausführungsformen des Verfahrens umfasst die Öffnung des Dosierkanals eine Düse zum Ausstoßen des im Durchquerungsbereich von Dosierkanal und Separationskanal befindlichen Separationsmediums. Die Verwendung einer Düse im Bereich der Öffnung des Dosierkanals ist besonders vorteilhaft für Ausführungsformen, in denen ein kontaktfreies Auffangen des ausgestoßenen Mediums erwünscht ist, da Düsen die Formung von freifliegenden Tropfen begünstigen und hierfür besonders geeignet sind. In Ausführungsformen wird die zu isolierende Molekülfraktion mit dem Medium als ein oder mehrere fliegende Tropfen aus dem Dosierkanal ausgestoßen. Entsprechend kann das Ablegen kontaktfrei durch Ausstoßen von fliegenden Tropfen erfolgen. Diese Form des kontaktfreien Ablegens ist besonders vorteilhaft, da hierdurch die Kontaminationsgefahr minimiert werden kann, da kein Kontakt zwischen der Auffangvorrichtung und der Öffnung des Dosierkanals zustande kommt, auch nicht in Form einer Fluidbrücke.

Im Allgemeinen bezeichnet der Begriff „Düse“ eine technische Vorrichtung zur Beeinflussung eines Fluids beim Übertritt von einer Rohrströmung in den freien Raum. Die Düse bildet dabei oft den Abschluss der Rohrleitung. Entsprechend kann ein offenes Ende eines Schlauches oder einer Kapillare ebenfalls als (freistehende) Düse bezeichnet werden. Der Düsenrand muss dabei nicht zwangsläufig dünnwandig sein wie bei freistehenden Düsen wie beispielsweise Kapillaren oder Kanülen, sondern kann in der Ebene der Düsenfläche um ein Vielfaches ausgedehnter sein im Vergleich zum Düsendurchmesser. Eine Düse kann auf ihrer gesamten Länge die gleiche Querschnittsfläche haben, sich erweitern, verjüngen oder weitere komplexe Formen aufweisen. Eine Düse verrichtet normalerweise keine Arbeit, sondern wandelt zwischen Geschwindigkeit und statischem Druck. Durch eine Düse kann ein Fluid entlang eines Druckgefälles beschleunigt, eine feste oder zähflüssige Masse geformt (siehe Extruder) oder eine flüssige Substanz zerstäubt werden. Dem Fachmann sind verschiedenen Düsenformen, die im Rahme der vorliegenden Erfindung an der Öffnung des Dosierkanals verwendet werden können, bekannt.

Alternativ kann die auszustoßende Molekülfraktion über eine Kapillarbrücke zwischen der Öffnung des Dosierkanals und einer Oberfläche abgelegt werden. Hierbei ist es bevorzugt, dass zwischen der Öffnung und der Ablegeoberfläche eine Höhe $h > 0$ mm besteht.

Es kann im Rahmen der Erfindung an der Öffnung des Dosierkanals auch eine Schlauchdüse (PipeJet) oder gezogene Chip-Düse verwendet werden, die bevorzugt sind für Ausführungsformen, bei denen das ausgestoßene Separationsmedium im Kontakt- bzw. Halbkontaktverfahren abgelegt werden.

In weiteren Ausführungsformen kann beim Ablegen ein Kontakt zwischen der Öffnung des Dosierkanals und der Ablageoberfläche zustande kommen.

Im Rahmen der Erfindung kann die Dosiereinheit am Ende des Separationskanals angeordnet sein. In anderen Ausführungsformen ist die Dosiereinheit im ersten Drittel, in etwa nach der

Hälfte, oder nach dem zweiten Drittel des Separationskanals angeordnet. Weitere Ausführungsform sind für einen Fachmann ohne weiteres vorstellbar und umsetzbar.

Im Rahmen der Erfindung ist es aber bevorzugt, dass vor der Dosiereinheit eine geeignete bzw. ausreichende Separation/Auftrennung der in einer Probe enthaltenen Moleküle im Separationskanal gewährleistet ist. Der Separationskanal kann nach dem Durchquerungspunkt von Dosierkanal und Separationskanal weiter verlaufen. Es sind Ausführungsformen möglich, die mehr als eine Dosiereinheit umfassen, wobei die Dosiereinheit in unterschiedlichen Bereichen des Separationskanals angeordnet sein können.

Es ist zudem möglich, dass die erfindungsgemäße Separationseinheit ein oder mehrere Reservoirs, beispielsweise für Separationsmedium, Flüssigkeiten, Pufferlösungen und/oder Proben umfasst. Einzelne Reservoirs können hierbei mehrere Funktionen erfüllen, beispielsweise als Kontaktpunkt für Elektroden dienen und als Einführungsort für Proben.

Im Rahmen der Erfindung bezieht sich der Begriff „Reservoir“ auf einen Bereich der Separationseinheit, in dem sich eine Erweiterung oder Ausdehnung des Separationsmediums befindet. Dies können beispielsweise Kontaktstellen des Separationsmediums mit den Elektroden des erfindungsgemäßen Systems sein.

Es ist vorteilhaft, an diesen Kontaktpunkten Reservoirs aus Separationsmedium oder Elektrolytlösung (z.B. Puffer) vorliegen zu haben, da sie Flexibilität bei der Platzierung der Elektroden bieten und es ansonsten schwierig sein kann, die Elektroden mit den zum Teil sehr klein-dimensionierten Strukturen des Trennkanals des Dosierkanals in Verbindung zu bringen. Darüber hinaus kann durch die große Kontaktfläche, die mit Hilfe von Reservoirs zwischen den Elektroden und dem Trennmedium ermöglicht werden kann, eine Wärmeentwicklung und damit die Bildung von Gasblasen, die zu Strominstabilitäten führen können, verhindert werden.

Zusätzlich liefern Reservoirs eine erhöhte Anzahl von Ladungsträgern, um den Strom stabil zu halten und damit die Migrationsgeschwindigkeit konstant zu halten.

Weiterhin können Reservoirs als Einbringungsorte für die Probe in das erfindungsgemäße System dienen. Insbesondere bei mikrofluidischen Systemen, in denen alle Strukturen sehr klein dimensioniert sind, kann die Einbringung von Proben in das System schwierig sein. Das Einbringen kann dadurch vereinfacht werden, dass an den Einbringungspunkten Reservoirs von Trennmedium vorhanden sind, aus denen beispielsweise durch das Anlegen eines elektrischen Feldes die in der Probe enthaltenen Moleküle oder Molekülfraktionen in den Trennkanal hinein migrieren. Hierbei kann das elektrische Feld so angelegt werden, dass es zu einer Fokussierung der Probenmoleküle am Eintrittspunkt in den Trennkanal kommt, so dass eine scharfe Auftrennung der Moleküle auch bei vergleichsweise großen Probenvolumina möglich ist.

Darüber hinaus können Reservoirs auch am Ende des Separationskanals vorhanden sein als Sammelpunkte für Moleküle und Molekülfraktionen, die nicht mithilfe der Dosiereinheit aus dem Separationskanal isoliert wurden, sondern die durch den Durchquerungspunkt von Separationskanal und Dosierkanal hindurch gewandert sind.

In Ausführungsformen kann eine der Elektroden, mit deren Hilfe ein elektrisches Feld über den Separationskanal angelegt werden kann, in der Dosierkammer der Dosiereinheit positioniert sein.

Zudem kann die Dosierkammer als Ionenreservoir im Rahmen des erfindungsgemäßen Systems dienen. In solchen Ausführungsformen ist es möglich, dass die Moleküle bzw. Molekülfraktionen in den Dosierkanal, beispielsweise den Bereich über der Öffnung, eintreten.

Zudem ist es in Ausführungsformen der Erfindung bevorzugt, dass die Flüssigkeit der Dosierkammer, das Medium im Dosierkanal und das Separationsmedium identische oder ähnliche Flüssigkeiten sind und/oder die gleiche Leitfähigkeit bzw. Ionenstärke aufweisen.

Im Rahmen der Erfindung umfasst der Begriff „Flüssigkeit“ auch flüssigkeitsbasierte Gele.

In bestimmten Ausführungsformen der Erfindung wird die Temperatur der Separationseinheit und/oder der Dosiereinheit aktiv geregelt. Entsprechende Ausführungsformen können eine oder mehrere Temperaturregulierungseinheiten umfassen.

Eine oder mehrere Temperaturregulierungseinheiten können die Temperatur des Separationskanals und/oder des Dosierkanals und/oder Teilen von diesen Kanälen bzw. der darin enthaltenen Medien regulieren. Insbesondere kann eine Temperaturregulierungseinheit verwendet werden, die die Temperatur im Durchquerungsbereich von Separationskanal und Dosierkanal regulieren kann. Eine Temperaturregulierungseinheit kann Teil der Separationseinheit oder der Dosiereinheit oder von beiden sein. Beispielsweise können im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens eine oder mehrere Temperaturregulierungseinheiten genutzt werden, die die Temperatur der Separationseinheit, der Dosiereinheit und/oder bestimmte Bereiche der Anordnung reguliert.

Wenn beispielsweise das Separationsmedium ein Gel ist, dass bei der üblichen Umgebungstemperatur, in der das erfindungsgemäße Verfahren durchgeführt wird, fest bzw. gelförmig ist, aber bei erhöhter Temperatur flüssig wird, ist es vorteilhaft, wenn bei Aktivierung der Dosiereinheit die Temperatur im Durchquerungsbereich von Dosierkanal und Separationskanal zeitweise soweit erhöht wird, dass in diesem Bereich eine Verflüssigung des Separationsmediums stattfindet, so dass das verflüssigte Separationsmedium problemlos durch den induzierten Fluidstrom aus dem Durchquerungsbereich verdrängt werden kann. Des Weiteren kann die Temperaturregulierungseinheit dazu genutzt werden Kanalstrukturen mit Gelen zu befüllen, die bei Raumtemperatur fest und bei erhöhten Temperaturen flüssig sind. Umgekehrt kann ein Kühlen des Systems das Befüllen der Kanalstruktur mit Trennmedien, die sich bei höheren Temperaturen verfestigen, ermöglichen. Entsprechend würde ein Abkühlen der Dosiereinheit im Durchquerungsbereich von Dosierkanal und Separationskanal auch das Verdrängen des Separationsmediums durch den induzierten Fluidstrom aus dem Durchquerungsbereich erleichtern. Ein Beispiel für ein solches Trennmedium ist Pluronic® F127.

Im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens kann die ausgestoßene Molekülfraktion auf oder in einer Auffangvorrichtung, beispielsweise einem Reaktionsgefäß, insbesondere einer Kavität (engl. Well) einer Mikrotiterplatte, einem Röhrchen bzw. Reaktionsgefäß (z.B. 200 µL Eppendorf Tubes) oder auf einem geeigneten Auffangsubstrat/Substrat, bevorzugt einem Array-Substrat wie beispielsweise einem Objektträger aus Glas, Metall, Kunststoff o.ä. Material, abgelegt werden. Zudem kann die Auffangvorrichtung eine poröse Membran sein, beispielsweise eine (Nitro-) Cellulose, Cellulose-Acetat, Polyethersulfon oder ähnliches, ein festes Hydrogel, die Öffnung

einer Kapillare oder chromatografischen Säule oder ein gemäß der Erfindung beschriebenes Reservoir zur Probeneinbringung.

Insbesondere ist es erfindungsgemäß möglich, dass unterschiedliche Medium- bzw. Molekülfraktionen in unterschiedliche Reaktionsgefäße oder an unterschiedliche Positionen eines Substrats abgelegt werden. Hierzu ist die Verwendung einer Ablegeeinheit im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens oder erfindungsgemäßen Systems bevorzugt. In Ausführungsformen stellt eine Ablegeeinheit nach Ablegen einer Mediumfraktion ein unterschiedliches Reaktionsgefäß oder eine unterschiedliche Position auf dem Substrat bereit.

Eine Ablegeeinheit steuert die Positionierung der jeweilig verwendeten Auffangvorrichtung, wie beispielsweise einer Multiwell-Platte oder eines Objektträgers relativ zu der verwendeten Separations- und/oder Dosiereinheit, aus der die Mediumfraktion ausgestoßen wird. Hierbei kann die Aktivierung und Positionsverschiebung der Ablegeeinheit und/oder der Separations- und/oder Dosiereinheit mit der Aktivierung der Dosiereinheit synchronisiert sein. Gegebenenfalls werden sowohl die Separations- und/oder Dosiereinheit als auch die Ablegeeinheit durch die Detektionseinheit gesteuert bzw. aktiviert.

Eine Ablegeeinheit ermögliche also eine relative Verschiebung der Auffangvorrichtung gegenüber der Öffnung, aus der die Mediumfraktionen ausgestoßen werden. So kann beispielsweise nach Aktivierung der Dosiereinheit und Ablegen des ausgestoßenen Mediums in oder auf einer Auffangvorrichtung eine zeitlich verzögerte relative Positionsverschiebung der Ablegeeinheit und der von dieser gehaltenen Auffangvorrichtung gegenüber der Öffnung erfolgen, so dass bei einer folgenden Aktivierung der Dosiereinheit das dann ausgestoßene Mediums an einer anderen Position der Auffangvorrichtung abgelegt wird. Entsprechend ist es vorteilhaft, wenn im Rahmen der Erfindung für das Ablegen eine Ablegeeinheit verwendet wird, die nach Ablegen einer Molekülfraktion ein unterschiedliches Reaktionsgefäß oder eine unterschiedliche Position auf dem Substrat bereitstellt. So kann eine weitere bzw. folgende Molekülfraktion in diesem unterschiedlichen Gefäß bzw. auf dieser unterschiedlichen Position abgelegt werden. Zur Positionierung der Auffangvorrichtung kann beispielsweise ein 2- oder 3-Achs-System verwendet werden.

Insbesondere ist es durch die vorliegende Erfindung möglich, durch Ablegen einer Vielzahl von bevorzugt unterschiedlichen aufgetrennten Molekülfraktionen auf unterschiedlichen Positionen eines Substrats einen Mikroarray herzustellen.

Die Erfindung betrifft daher auch ein Verfahren zur Herstellung eines Mikroarrays, wobei das erfindungsgemäße Verfahren zur Isolation einer oder mehrerer Molekülfraktionen aus einer Probe angewendet wird, und mehrere Molekülfraktionen aus einer oder mehreren Proben an unterschiedlichen Positionen eines für einen Mikroarray geeigneten Substrats abgelegt werden, bevorzugt durch eine kontaktfreie Dosierung, wie z.B. Ausstoßen des Mediums aus dem Extraktionsbereich aus einer Düse als frei fliegende Tropfen. Hierbei ist die Verwendung einer Ablegeeinheit, die die relative Positionierung der Auffangvorrichtung gegenüber der Öffnung steuert, vorteilhaft.

Die vorliegende Erfindung betrifft zudem ein System zur Isolation einer oder mehrerer Molekülfraktionen aus einer Probe, umfassend

- eine Separationseinheit umfassend
 - i. einen Separationskanal, der bevorzugt mit einem Separationsmedium gefüllt ist,
und optional
 - ii. ein oder mehrere Reservoirs für Flüssigkeiten und/oder Proben, und/oder
 - iii. Elektroden zur Erzeugung eines elektrischen Feldes entlang des Separationskanals,
- eine Dosiereinheit,
und optional
- eine Detektionseinheit und/oder
- eine Ablegeeinheit.

In Ausführungsformen des Systems umfasst die Dosiereinheit einen Dosierkanal, der den Separationskanal durchquert und auf einer ersten Seite des Separationskanals eine mit Flüssigkeit gefüllte Dosierkammer und auf einer zweiten Seite des Separationskanals eine Öffnung, bevorzugt eine Dosierdüse, umfasst.

Das erfindungsgemäße System ist bevorzugt ein mikrofluidisches System. In Ausführungsformen des Systems, die eine Trennung mittels Druck nutzen, umfasst die Separationseinheit geeignete Anschlüsse zur Beaufschlagung des Separationskanals mit einem geeigneten Druck durch eine externe Druckquelle.

Die verschiedenen Einheiten des Systems sind nicht zwingend miteinander in einer einheitlichen Vorrichtung verbunden und können miteinander als separate Vorrichtungen kombiniert werden. Es beispielsweise möglich, dass die Separationseinheit ein mikrofluidischer Chip ist, der Falle von elektrophoretischer Trennung beispielsweise in eine Halterung mit Elektroden eingesetzt wird oder selber Elektroden erhält. Ein Separationschip kann die Dosiereinheit mit umfassen in einer einheitlichen Vorrichtung, oder kann mit einer Dosiereinheit kombiniert werden, wobei die Dosiereinheit eine physisch getrennt Vorrichtung bildet. Das gleich gilt für die Detektionseinheit und die Ablegeeinheit.

Weiterhin betrifft die Erfindung ein Kit zur mikrofluidischen Isolation einer oder mehrerer Molekülfractionen aus einer Probe, umfassend eine oder mehrere Komponenten eines erfindungsgemäßen Systems, wie beispielsweise eine Separationseinheit umfassend einen Separationskanal, eine Dosiereinheit, umfassend einen Dosierkanal mit einer Dosierkammer, eine Detektionseinheit, eine Auffangvorrichtung und/oder eine Ablegeeinheit.

Es ist bevorzugt, dass das erfindungsgemäße System zur Umsetzung des erfindungsgemäßen Verfahrens dient.

Die Verwendung aller hier für das erfindungsgemäße Verfahren offenbarten Erfindungsmerkmale ist ebenfalls im Rahmen des erfindungsgemäßen Systems oder Kits möglich und hiermit

offenbart. Das gleiche gilt andersherum auch für Merkmale, die im Kontext des erfindungsgemäßen Systems beschrieben wurden.

Spezielle Beschreibung der Erfindung

Die Erfindung wird durch die folgenden Figuren und Beispiele näher beschrieben. Diese schränken den Umfang der Erfindung nicht ein, sondern stellen bevorzugte Ausführungsformen von Aspekten der Erfindung dar und dienen der besseren Veranschaulichung der hier beschriebenen Erfindung.

Figuren:

Figur 1: Darstellung des Grundprinzips der Vereinzelung verschiedener Biomolekülspezies aus einer Mischlösung anhand einer spezifischen Ausführungsform. Die in Figur 1 dargestellte Ausführungsform der Erfindung zeigt ein mikrofluidisches System zur Vereinzelung von Biomolekülfractionen und besteht im Folgenden aus zwei funktionalen Operationseinheiten:

Bezugszeichenliste: 1 = (Bio)Molekül-Mischlösung = Probe mit Probenbestandteilen 1a, 1b und 1c; 1a, b & c = Aufgetrennte Biomolekülfractionen (Probenbestandteile); 2 = Separationskanal; 3 = Separationsmedium; 5 = Dosierkammer; 6 = Dosierkanal; 8 = Extraktionsbereich = Durchquerungsbereich Separationskanal/Dosierkanal; 9 = Öffnung/Düse am Ende des Dosierkanals; 10a = ausgestoßene Mediumfraction ohne Biomolekülfraction; 10b = ausgestoßene Mediumfraction mit Biomolekülfraction 1c; 11 = Ablegeeinheit/Auffangeinheit.

Eine Operationseinheit 1 (Separationseinheit) dient der Trennung der einzelnen Molekülfractionen (1a, 1b, 1c), insbesondere wie hier dargestellt Biomolekülfractionen (1a, 1b, 1c), aus einer Mischlösung (1) innerhalb eines Mikrokanals/Separationskanals (2), beispielsweise unter Verwendung geeigneter Methoden zur Trennung nach Molekulargewicht, Größe, isoelektrischem Punkt, Ladung, etc...

Eine Operationseinheit 2 (Dosiereinheit) ermöglicht die Aufreinigung einzelner (Bio)-Molekülfractionen (1a, 1b, 1c). Hierbei ist Operationseinheit 2 hinter Operationseinheit 1 geschaltet und dient der Vereinzelung bzw. Extraktion der jeweiligen aufgetrennten (Bio)-Molekülfractionen (1a, 1b, 1c) aus dem Mikrokanal (2) während des Migrationsprozesses, bevorzugt wie hier dargestellt in Form von frei fliegenden Tropfen (10b) mittels kontaktfreier Dosierprinzipien (Inkjet, Bubblejet, usw.). Die jeweiligen Fractionen werden hierbei beispielsweise in separate Reaktionsgefäße (11) oder Töpfchen einer Mikrotiterplatte oder im Array-Format auf spezielle Substrate dosiert.

Die Erfindung kann hierbei eine Detektionseinheit umfassen, die eine aufzureinigende Molekülfraction kurz vor oder im Durchquerungsbereich von Operationseinheit 1 und Operationseinheit 2 detektiert und die Aktivierung der Dosiereinheit auslöst.

Figur 2: Ein Impedanz-Chip aus vorherigen Arbeiten an der Universität Freiburg ist hier dargestellt [Schoendube, J., Wright, D., Zengerle, R., & Koltay, P. (2015). Single-cell printing based on impedance detection. *Biomicrofluidics*, 9(1), 014117]. Der Chip wurde ursprünglich

entwickelt, um Zellen einer Probe zu vereinzeln. Das Bild zeigt den Chip, der auch in Figur 3 dargestellt ist, in seiner Gesamtheit. Über den Trennkanal wird eine Spannung angelegt, sodass die aufzutrennende Probe durch den Kanal migriert.

Figur 3: Markierter Chipausschnitt aus Figur 2 unter dem Fluoreszenzmikroskop (RhodaminB-Kanal). Der Chip ist um 180° gedreht und besitzt eine Kanalbreite von 40 µm. Die Kanäle wurden mit einem geeigneten Trenngel befüllt. Im Reservoir wurde eine Fraktion einzelsträngiger DNA-Fragmente (30 Nukleotide / Farbstoff-Label: Atto532 / Konzentration: 100 µM) als Probe vorgelegt. Das angelegte Feld betrug 40 V/cm. Die verschiedenen Bilder wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten während des Migrationsprozesses aufgenommen.

Beispiel 1, Elektrophorese + „Inkjet“

Die in diesem Beispiel beschriebene Trennstruktur beinhaltet Reservoirs für Flüssigkeiten und Proben sowie einen Mikrokanal, der mit einem flüssigen Separationsmedium befüllt ist, und an dessen Enden ein elektrisches Feld als Triebkraft für die Migration der Biomoleküle angelegt wird. Wird die Probe (oder ein Teil davon) in den Trennkanal eingeleitet, migrieren die (Bio)-Moleküle aufgrund elektrokinetischer Effekte entsprechend ihrer Größe bzw. ihres Ladung-zu-Masse-Verhältnisses unterschiedlich schnell und trennen sich in Fraktionen auf.

Am Ende des Trennkanals können die getrennten Fraktionen mit einem Detektor (Beispiele: UV/Vis-, Fluoreszenz-, oder Impedanz-basierte Erkennung) erfasst werden. Direkt hinter dem Detektor ist die Dosiereinheit angebracht. Der Dosierkanal, an dessen unterem Ende sich eine Düse und am anderen Ende eine mit Flüssigkeit gefüllte Kammer befindet, verläuft quer zum Dosierkanal.

Die Dosiereinheit wird aktiviert, sobald oder kurz nachdem eine (Bio)-Molekülfraktion detektiert wird und diese sich im Dosierkanal befindet. Es werden fortlaufend einzelne Tropfen in ein Reaktionsgefäß, ein Töpfchen einer Mikrotiterplatte oder auf ein anderes Substrat (z.B. ein Objektträger) dosiert, bis kein Signal der jeweiligen Fraktion mehr detektiert wird.

Sobald die nächste Fraktion detektiert wird wiederholt sich der Vorgang wobei die nächstfolgende Fraktion entweder in ein anderes Reaktionsgefäß/Töpfchen oder an eine andere Stelle auf dem Substrat (Voraussetzung: Montage des Trenn-/Dosiersystems an einem Automatisierungssystem) dosiert wird. Die beiden Einheiten sind im Idealfall auf einem Chip integriert.

Die Dosierung kann beispielsweise über eine Membran-Deformation in der Dosierkammer (wiederholtes Eindrücken und anschließende Relaxation) durch einen Piezoaktor realisiert werden [Schoendube, J., Wright, D., Zengerle, R., & Koltay, P. (2015). Single-cell printing based on impedance detection. *Biomicrofluidics*, 9(1), 014117]. Weiterhin kann die Dosierung gemäß dem Bubble-Jet-Prinzip, Trägheitsbedingt oder über eine Ventilsteuerung (bspw. pneumatisch, etc.) erfolgen. Ob eine oder mehrere Fraktionen pro Reaktionsgefäß/Töpfchen dosiert werden ist dabei individuell auswählbar. Ebenso kann dadurch nur eine Zielfraktion per Dosierung extrahiert werden, während die anderen Fraktionen weiter entlang des Trennkanals in ein Auffangreservoir hinter dem Dosierkanal migrieren.

Zusätzlich besteht die Möglichkeit, durch wiederholte Teilinjektionsvorgänge der Probe, anschließender Trennung und Dosierung der Fraktionen mehrere hintereinander folgende Microarrays zu generieren, was einen weiteren relevanten Anwendungsfall neben der reinen Aufreinigung darstellt und im Vergleich zu etablierten Methoden ein entscheidender Vorteil und Alleinstellungsmerkmal ist:

Die Auftrennung der Probe und die Herstellung eines Microarrays für die weitere Analyse der Probe kann in einem Schritt und mit einer wesentlich kleineren Probenmenge erfolgen, als bei herkömmlicher Durchführung in zwei aufeinanderfolgenden Schritten. Die Prozesszeit zwischen 5-20 Minuten pro Lauf – je nach Probe – ist relativ gering und stellt neben der geringen erforderlichen Probenmenge einen weiteren Vorteil des Verfahrens dar. Somit entspricht die Aufreinigungszeit ungefähr der benötigten Zeit für die Elektrophorese und ist damit maximal effizient.

Da Trenn- und Dosierstruktur auf einem Chip integriert werden können, belaufen sich die Kosten auf ca. <5 € im Falle eines wiederverwendbaren Chips und ca. 20-50 € im Falle eines Einwegproduktes. Bei einer Herstellung mittels Spritzgussverfahren ließen sich die geschätzten Kosten zusätzlich deutlich reduzieren.

Beispiel 2. Separationseinheit

In diesem Beispiel, das die prinzipielle Ausführbarkeit der Erfindung veranschaulicht und durch die Figuren 2 und 3 näher beschrieben wird, wird ein ursprünglich zur Zell-Vereinzelung vorgesehener mikrofluidischer Chip verwendet, um die Migration eines (Bio)-Molekülfragmentes quer zum Dosierkanal zu demonstrieren. Der zweckentfremdete Chip, ein Verbund aus Silizium und Glas, weist zumindest Teile der für die Erfindung benötigten Strukturen auf [Schoendube, J., Wright, D., Zengerle, R., & Koltay, P. (2015). Single-cell printing based on impedance detection. *Biomicrofluidics*, 9(1), 014117].

Für die in Figur 3 gezeigte Bilderserie wurden geladene fluoreszenzmarkierte DNA-Fragmente entlang des Trennkanals unter dem Einfluss des elektrischen Feldes bewegt. Die Fragmente migrieren als breiter Strom, da auf dem verwendeten Chip keine entsprechende Injektionsstruktur zur Fokussierung der Probe auf dem Chip vorhanden ist und somit ständig neue Probe nachfließt, was ebenfalls eine sichtbare Trennung verhindert.

Während des hier gezeigten Migrationsprozesses, der nur in Teilen der beanspruchten Erfindung entspricht, diffundiert die Probe in den Dosierkanal (also in die Düse und die Dosierkammer). Dies kann verhindert werden, indem man an der Dosierkammer ein abstoßendes elektrisches Feld anlegt und die Fraktionen mit Hilfe einer Dosiereinheit aus der Chip-Düse dosiert, was in dem hier dargestellten Vergleichsbeispiel aufgrund des Fehlens einer erfindungsgemäßen Dosiereinheit nicht möglich ist.

Ebenfalls könnte in einem erfindungsgemäßen Verfahren bzw. einer erfindungsgemäßen Vorrichtung ein kontinuierlicher Dosierungsprozess kombiniert mit einer Absaugung für unerwünschte Tropfen die Diffusion in die Dosierkammer verhindern. Der Chip wurde in dem dargestellten Beispiel aus Gründen der besseren Visualisierung des Migrationsprozesses nicht

aktuiert, es wurde also kein Tropfenausstoß induziert. Das Prinzip der Tropfendosierung wurde jedoch schon zuvor mehrmals demonstriert und findet bereits Anwendung in diversen kommerziellen Produkten.

Ansprüche

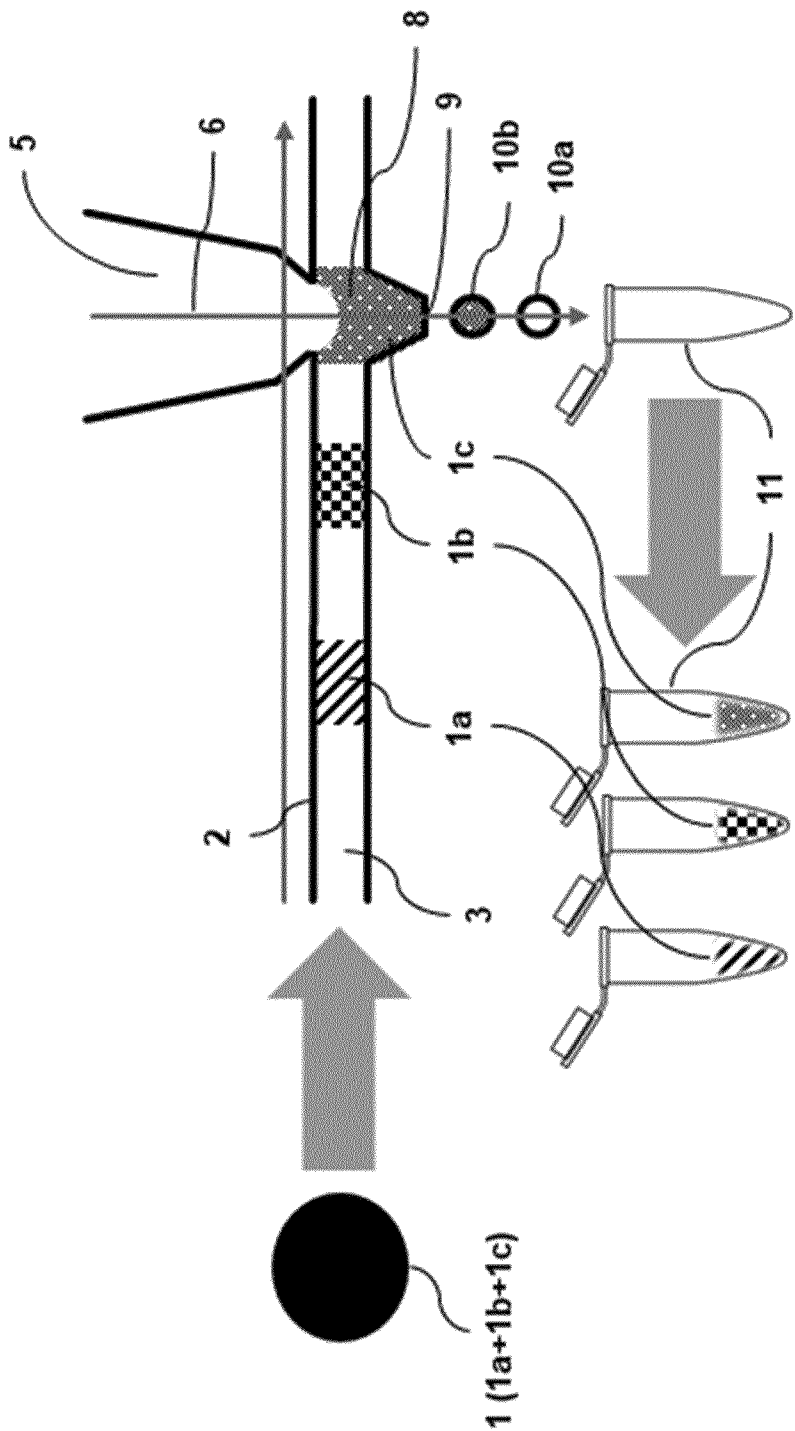
1. Verfahren zur Isolation einer oder mehrerer Molekülfractionen aus einer Probe, umfassend
 - a. Einbringen der Probe in eine Separationseinheit,
 - b. Auftrennung von in der Probe enthaltenen Molekülen in einem mit einem Separationsmedium gefüllten Separationskanals der Separationseinheit in Molekülfractionen,
 - c. Extraktion einer oder mehrerer Molekülfractionen aus einem Extraktionsbereich des Separationskanals mittels Aktivierung einer Dosiereinheit,wobei der Extraktionsbereich fluidisch an eine Öffnung gekoppelt ist und durch Aktivierung der Dosiereinheit im Extraktionsbereich befindliches Medium als Mediumfraction aus der Öffnung ausgestoßen wird, wobei die Mediumfraction eine Molekülfraction oder Teile davon umfassen kann.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei es sich um ein mikrofluidisches Verfahren handelt.
3. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei die Mediumfraction als frei-fliegender Tropfen ausgestoßen wird.
4. Verfahren nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, wobei die Dosiereinheit eine Dosierkammer und/oder einen Dosierkanal umfasst.
5. Verfahren nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, wobei der Extraktionsbereich dem Durchquerungsbereich von Dosierkanal und Separationskanal entspricht.
6. Verfahren nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, wobei die Aktivierung der Dosiereinheit einen Fluidstrom aus der Dosierkammer durch den Dosierkanal erzeugt, wodurch das im Durchquerungsbereich von Dosierkanal und Separationskanal befindliche Separationsmedium auf einer zweiten Seite des Separationskanals aus einer Öffnung des Dosierkanals ausgestoßen wird.
7. Verfahren nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, wobei eine Detektionseinheit eine Molekülfraction im Separationskanal detektiert, wobei die Detektion bevorzugt UV/Vis-, Leitfähigkeit- und/oder Impedanz-Detektion umfasst.
8. Verfahren nach dem vorherigen Anspruch, wobei durch die Detektion einer Molekülfraction, bevorzugt im Extraktionsbereich des Separationskanals, die Dosiereinheit aktiviert wird.
9. Verfahren nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, wobei die Temperatur der Separationseinheit und/oder der Dosiereinheit aktiv geregelt wird.
10. Verfahren nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, wobei die Auftrennung der Molekülfractionen der Probe mittels Elektrophorese, mittels Kapillarelektrophorese, Druck-getrieben, mittels LC (liquid chromatography), insbesondere HPLC (high performance liquid chromatography), mittels eines magnetischen Feldes, mittels Affinitätschromatographie oder

andere Trennmethoden, bei denen die Migrationsgeschwindigkeit von Molekülen eine erfolgen.

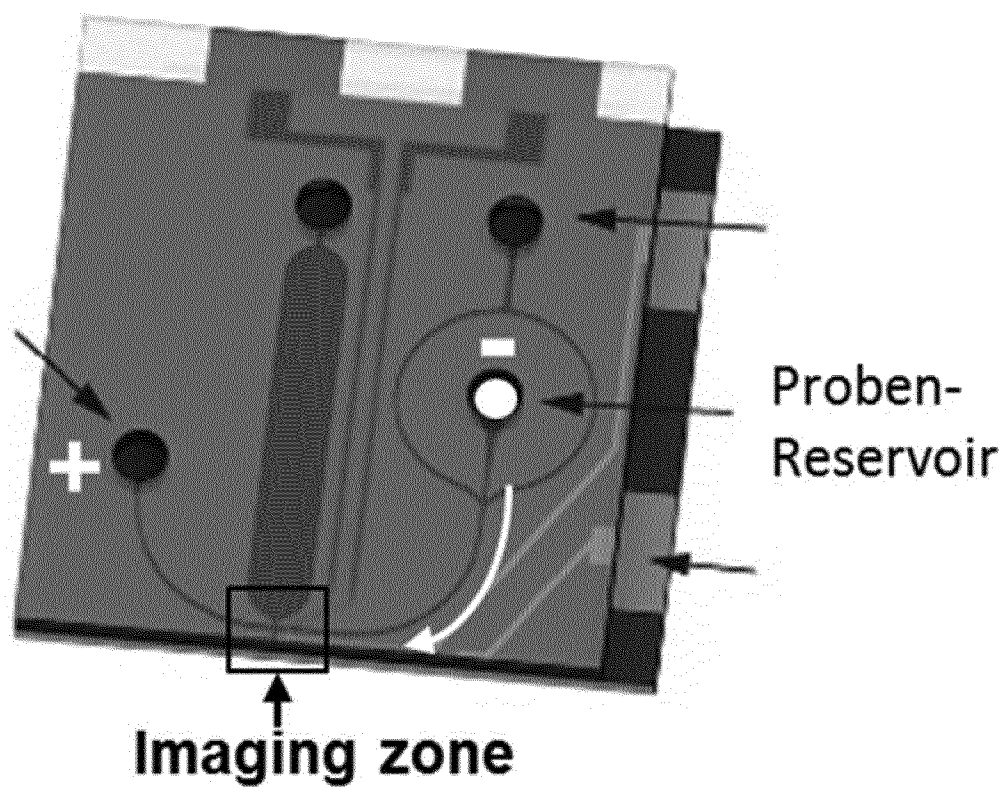
11. Verfahren nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, wobei die Auftrennung der Molekülfractionen der Probe entlang eines elektrischen Feldes erfolgt
12. Verfahren nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, wobei die ausgestoßene Mediumfraction in einem Reaktionsgefäß, bevorzugt einer Kavität (engl. Well) einer Mikrotiterplatte, oder auf einem geeigneten Substrat, bevorzugt einem Array-Substrat wie beispielsweise einem Objektträger, abgelegt wird und/oder unterschiedliche Mediumfractionen in unterschiedliche Reaktionsgefäße oder an unterschiedlichen Positionen eines Substrats abgelegt werden.
13. Verfahren nach dem vorherigen Anspruch, wobei für das Ablegen eine Ablegeeinheit verwendet wird, die nach Ablegen einer Molekülfraction ein unterschiedliches Reaktionsgefäß oder eine unterschiedliche Position auf dem Substrat bereitstellt.
14. Verfahren nach dem vorherigen Anspruch, wobei durch Ablegen einer Vielzahl bevorzugt unterschiedlicher aufgetrennter Molekülfractionen an unterschiedlichen Positionen eines Substrats ein Mikroarray hergestellt wird.
15. System zur Isolation einer oder mehrerer Molekülfractionen aus einer Probe, umfassend
 - a. eine Separationseinheit umfassend
 - i. einen Separationskanal, der bevorzugt mit einem Separationsmedium gefüllten ist,
und optional
 - ii. ein oder mehrere Reservoirs für Flüssigkeiten und/oder Proben,
 - iii. Elektroden zur Erzeugung eines elektrischen Feldes entlang des Separationskanals,
 - iv. Geeignete Anschlüsse zur Beaufschlagung des Separationskanals mit einem geeigneten Druck durch eine externe Druckquelle
 - b. eine Dosiereinheit, und optional
 - c. eine Detektionseinheit und/oder
 - d. eine Ablegeeinheit.

FIGUREN

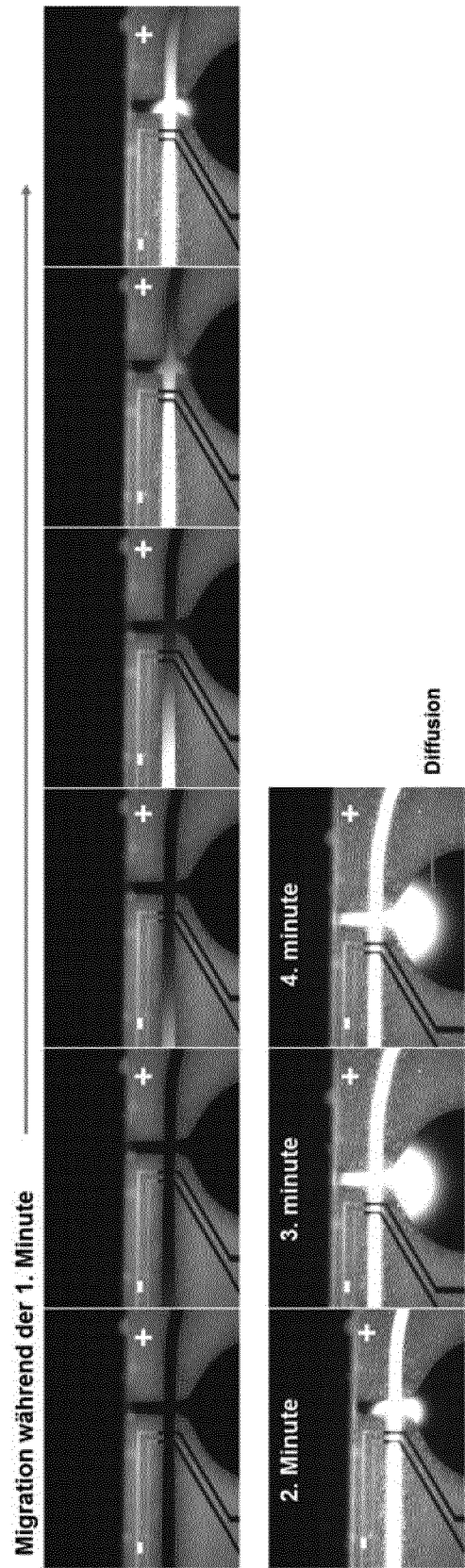
Figur 1



Figur 2



Figur 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2021/052270**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****B01L 3/02**(2006.01)i; **B01L 3/00**(2006.01)i

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)

B01L

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 practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J. SCHOENDUBE ET AL. "Single-cell printing based on impedance detection" <i>BIOMICROFLUIDICS</i> , Vol. 9, No. 1, 01 January 2015 (2015-01-01), page 014117 DOI: 10.1063/1.4907896 XP055575870	15
Y	figure 1	1-14
Y	US 2010084270 A1 (VULTO PAUL [DE] ET AL) 08 April 2010 (2010-04-08) paragraphs [0106] - [0107]; figures 1-3	1-14



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family 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 application or patent 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

"T" 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

"Y" 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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 April 2021

Date of mailing of the international search report

23 April 2021

Name and mailing address of the ISA/EP

European Patent Office
p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk
Netherlands

Telephone No. (+31-70)340-2040

Facsimile No. (+31-70)340-3016

Authorized officer

Campbell, Paul

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/EP2021/052270

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2010084270	A1	08 April 2010	AT	554168	T	15 May 2012
				DE	102006050871	A1	08 May 2008
				EP	2084280	A1	05 August 2009
				US	2010084270	A1	08 April 2010
				WO	2008049638	A1	02 May 2008

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 INV. B01L3/02 B01L3/00
 ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 B01L

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

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	J. SCHOENDUBE ET AL: "Single-cell printing based on impedance detection", BIOMICROFLUIDICS, Bd. 9, Nr. 1, 1. Januar 2015 (2015-01-01), Seite 014117, XP055575870, DOI: 10.1063/1.4907896	15
Y	Abbildung 1	1-14
Y	US 2010/084270 A1 (VULTO PAUL [DE] ET AL) 8. April 2010 (2010-04-08) Absätze [0106] - [0107]; Abbildungen 1-3	1-14



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, 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 erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

15. April 2021

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

23/04/2021

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Campbell, Paul

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2021/052270

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 2010084270 A1	08-04-2010	AT 554168 T	15-05-2012
		DE 102006050871 A1	08-05-2008
		EP 2084280 A1	05-08-2009
		US 2010084270 A1	08-04-2010
		WO 2008049638 A1	02-05-2008
