

(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
29. Oktober 2009 (29.10.2009)

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2009/130300 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:

C12M 1/33 (2006.01) C12M 1/42 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2009/054948

(22) Internationales Anmeldedatum:

24. April 2009 (24.04.2009)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

10 2008 021 000.5

25. April 2008 (25.04.2008) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **QIAGEN GMBH** [DE/DE]; IP&L, Qiagen Str.1, 40724 Hilden (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **ROTHMANN, Thomas** [DE/DE]; Zum Bräuhaus 15b, 40764 Langenfeld (DE). **SCHMID, Claudia** [DE/DE]; Corneliast. 6/8, 45130 Essen (DE). **SCHÄFER, Andreas** [DE/DE]; Lupinenweg 11, 51375 Leverkusen-Schlebusch (DE). **CHRI-**

STOFFEL, Gabriele [DE/DE]; Wildrosenweg 17, 51061 Köln (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (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, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR BREAKING DOWN BIOLOGICAL MATERIAL

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUM AUFSCHLUSS VON BIOLOGISCHEM MATERIAL

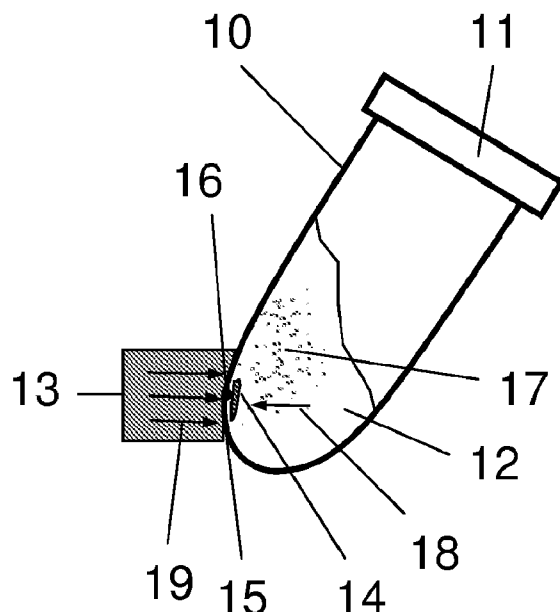


Fig. 3

(57) Abstract: The invention relates to a method for breaking down biological material, especially for obtaining biomolecules, by ultrasound, the biological material being arranged in a container together with a liquid.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Aufschluss von biologischem Material, insbesondere zur Gewinnung von Biomolekülen, mittels Ultraschall wobei das biologische Material in einem Behälter zusammen mit einer Flüssigkeit angeordnet wird.



Veröffentlicht:

- *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe g)*

Verfahren und Vorrichtung zum Aufschluss von biologischem Material

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Aufschluss von biologischem Material, insbesondere zur Gewinnung von Biomolekülen, mittels Ultraschall, wobei das biologische Material in einem Behältnis zusammen mit einer Flüssigkeit angeordnet wird sowie eine Vorrichtung dazu.

Derartige Verfahren, wie beispielsweise die Verwendung von Ultraschall zum Aufschluss von Materialien, wie beispielsweise organisches oder anorganisches Probenmaterial oder fossiles Material, sind aus dem Stand der Technik bekannt. Der Aufschluss erfolgt hierbei, um Zielbestandteile des aufzuschließenden Materials zu erhalten. Beim Aufschließen wird zwischen offenen und geschlossenen Umgebungsparametern unterschieden. Wobei das Aufschließen in einem geschlossenen Gefäß (siehe beispielsweise US-A-6100084) durchaus relevant sein kann, da damit ein verunreinigungsfreier Aufschluss erreicht werden kann, der insbesondere für das Aufschließen von biologischem Material, von Vorteil ist. Das aufzuschließende Material befindet sich hierbei in dem Gefäß in einer Flüssigkeit und wird mit Ultraschall beaufschlagt.

Nachteilig beim Aufschluss mittels Ultraschall in einem geschlossenen Gefäß ist, dass das Aufschlussmaterial in der Flüssigkeit frei beweglich ist. Damit befindet sich das Material entweder in einem Fokuspunkt des Ultraschalls und wird aufgeschlossen oder nicht. Weiterhin ist der Grad des Aufschlusses sehr schwierig zu beeinflussen.

US-A-6878540, US-A-6881541, US-A-6887693 und US-A-20060019379 offenbaren ebenfalls den Einsatz von Ultraschall zum Aufschluss von Material. Als ein Transducer wird ein Ultraschalltrichter verwendet, der

direkt an die Wand des Containers andockt ist. Zusätzlich werden der Flüssigkeit im Gefäß Kügelchen zugegeben, die einen besseren Aufschluss des Materials bewirken sollen. Weiterhin wird offenbart, das Gefäß, das einen flexiblen Wandabschnitt aufweist, unter Druck zu setzen, um die Verbindung zwischen Gefäß und Transducer zu verbessern und damit den Übergang der Schallwellen in das Gefäß zu optimieren. Die beschriebenen Verfahren sind jedoch aufwendig, kostenintensiv und führen nur bedingt zum Erfolg.

US-B-6719449 offenbart ebenfalls eine Vorrichtung und ein Verfahren zum Aufschluss von Proben mittels einer berührungslosen Behandlung durch Ultraschall, bei dem ein fokussierter Energiestrahle verwendet wird. Dabei werden die Größen des Probenbehälters so gewählt, dass der gesamte Inhalt sich im Fokuspunkt befindet. Dadurch sind lediglich Aufschlüsse von geringen Materialmengen möglich. Ferner muss die Beaufschlagungszeit der Probe überwacht werden, um keine Überschallung zu erzeugen.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, die zuvor genannten Nachteile weitestgehend zu überwinden und einen definierten Aufschluss des Aufschlussmaterials zu bewirken.

Gelöst wird diese Aufgabe hinsichtlich des Verfahrens dadurch, dass das biologische Material im Behältnis frei beweglich ist, dass das biologische Material mittels Zentrifugalkraft zu einem vorbestimmten Punkt des Behältnisses bewegt wird und dass während des Zentrifugierens Ultraschallwellen erzeugt werden, wobei die Ultraschallwellen in einem Punkt fokussiert werden, der identisch mit dem Konzentrationspunkt ist, wobei die im Fokus entstehende, durch den Ultraschall hervorgerufene Kraft entgegengesetzt zur Zentrifugalkraft wirkt.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung bewirkt, dass das aufzuschließende Material aufgrund der Zentrifugalkraft in einem vorgegebenen Punkt im

Behältnis konzentriert vorliegt, der mit dem Konzentrationspunkt im Wesentlichen übereinstimmt. Bei dem aufzuschließenden Material kann es sich dabei um organisches und/oder anorganisches Probenmaterial, wie beispielsweise fossiles oder biologisches Material handeln. Ferner kann das Material einstückig vorliegen, beispielsweise in Form von Gewebematerial, oder aus mehreren, einzelnen Bestandteilen bestehen. Vorzugsweise handelt es sich bei dem aufzuschließenden Material um biologisches Material, wie Gewebe, Zellen, Sporen etc., welches sich insbesondere zur Gewinnung von Biomolekülen, wie Zellbestandteile, Proteine, Lipide, Kohlenhydrate, Nukleinsäuren etc., eignet.

Da sowohl die Ultraschallkraft als auch die Zentrifugalkraft so eingestellt sind, dass sie entgegengerichtet hinsichtlich der Wirkrichtung sind, bewirkt dieses, dass nach einem ausreichenden Aufschluss des Materials, der, auf die kleineren, nicht löslichen, Partikel des aufzuschließenden Materials, die sich im Fokuspunkt befinden, wirkende Kraftanteil der Zentrifugalkraft abnimmt, und diese Teile aus dem Fokuspunkt wandern, und damit die Wirkung der Ultraschallkraft auf diese Partikel erst reduziert und dann vollständig beendet wird. So wird ferner vorteilhafterweise mit dem Aufschließen gleichzeitig nicht nur das direkt in Lösung gegangene aufgeschlossene Material (vorzugsweise die zu gewinnenden Biomoleküle) sondern auch das nicht lösliche bzw. das nicht direkt in die Lösung übergegangene, aufgeschlossene Material von dem nicht aufgeschlossenen Material getrennt, wodurch insbesondere die notwendige Zeit reduziert wird, um den vollständigen Aufschluss herbeizuführen. Bei dem aufgeschlossenen Material handelt es sich vorzugsweise um kleine lösliche und/oder unlösliche Aufschlussbestandteile, besonders bevorzugt um Biomoleküle.

Das nicht aufgeschlossene bzw. nicht aufschließbare Material (bei biologischem Material beispielsweise der Zelldebris etc.) bildet dabei durch

die Zentrifugalkraft vorteilhafterweise beeinflusst ein Pellet und verbleibt in diesem.

Eine vorteilhafte Lehre der Erfindung sieht vor, dass die Stärke der Zentrifugalkraft in Abhängigkeit der Partikelgröße des zum Aufschluss bestimmten biologischen Materials eingestellt wird. Auf diese Weise ist es möglich, definierte Aufschlussprofile in Abhängigkeit des aufzuschließenden Materials und des gewünschten Aufschlussgrades einzustellen.

Eine weitere vorteilhafte Lehre der Erfindung sieht vor, dass die Ultraschallwellen mittels eines Ultraschallemitters erzeugt werden, der bevorzugt direkt im Bereich des Fokuses des vorbestimmten Punktes des Behältnisses angeordnet ist. Dadurch kann eine direkte Abgabe erfolgen. Weiterhin wird die Verbindung zwischen Emitter und Behältnis durch die Zentrifugalkraft verbessert.

Eine weiterhin vorteilhafte Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist, dass das Behältnis und/oder die Flüssigkeit gekühlt werden. Dadurch wird bei bestimmten Aufschlussmaterialien, insbesondere bei biologischen Materialien, eine Veränderung des Materials aufgrund der durch den Ultraschall erzeugten Wärme verhindert.

Weiterhin wird die erfindungsgemäße Aufgabe durch eine Vorrichtung zum Ausführen des erfindungsgemäßen Verfahrens gelöst mit einer Aufnahme für ein Behältnis, mit einer Rotationsvorrichtung zum Ausüben einer Zentrifugalkraft auf das Behältnis, und einem Ultraschallemitter, der im Bereich des Behältnisses angeordnet ist.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung bewirkt auf einfache Weise die maschinelle Umsetzung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Eine weitere vorteilhafte Lehre der Erfindung sieht vor, dass der Ultraschallemitter in Richtung der Zentrifugalkraft angeordnet ist. Dadurch kann der wirkenden Zentrifugalkraft auf einfache Weise die Ultraschallkraft entgegengerichtet werden.

Nachfolgend wird die Erfindung anhand eines Ausführungsbeispiels anhand einer Zeichnung näher erläutert, wobei:

Fig. 1 Seitenansicht eines Behältnisses mit Flüssigkeit und Aufschlussmaterial,

Fig. 2 Seitenansicht zu Fig. 1 während des Zentrifugierens,

Fig. 3 Seitenansicht zu Fig. 2 mit Ultraschallbeaufschlagung,

Fig. 4 Seitenansicht zu Fig. 1 mit aufgeschlossenem Material, und

Fig. 5 Seitenansicht zu Fig.4 während der Entnahme des aufgeschlossenen Materials.

Fig. 1 bis Fig. 5 zeigen den Ablauf des erfindungsgemäßen Verfahrens.

In Fig. 1 ist ein Behältnis 10 dargestellt, das mit einem Deckel 11 verschlossen ist. In dem Behältnis 10 befindet sich eine Flüssigkeit 12 sowie darin ein aufzuschließendes Material 14. An einem Wandabschnitt 15 des Behältnisses 10 ist eine Ultraschallemitter 13 angeordnet. Das Behältnis 10 befindet sich in einer Vorrichtung (nicht dargestellt), mit der eine Zentrifugalkraft 18 erzeugt wird, die nach außen gerichtet ist, wie in Fig. 2 und 3 dargestellt ist. Die Zentrifugalkraft 18 bewirkt, dass das aufzuschließende Material 14 sich in einem Fokuspunkt 16 an dem Wandabschnitt 15 anordnet. In dem Fokuspunkt 16 bündelt sich das aufzuschließende Material 14. Weiterhin bündeln sich hier auch die von dem Emitter 13

erzeugten Ultraschallwellen, siehe Fig. 3, so dass hier eine Kraftentfaltung der Ultraschallkraft 19 auftritt, wodurch das aufzuschließende Material 14 aufgeschlossen wird. Gleichzeitig werden die nicht aufschließbaren bzw. unlöslichen Bestandteile des aufzuschließenden Materials 14, bedingt durch die Zentrifugalkraft, zu einem Pellet 20 geformt, welches sich in der Flüssigkeit 12 am Rand des Behältnisses 10, vornehmlich im Bereich des Wandabschnitts 15 absetzt resp. verbleibt.

Fig. 4 zeigt das Behältnis 10 nach Durchführung des Aufschlusses. Das aufgeschlossene Material 17, welches in Lösung gegangen ist oder aufgrund der Gewichtsabnahme der einzelnen Partikel nicht mehr im Fokuspunkt 16 gehalten wurde, befindet sich in gelöster und/oder partikulärer Form in der Flüssigkeit 12. An dem Wandabschnitt 15 bzw. in seiner Nähe befinden sich das Pellet 20.

Fig. 5 zeigt die Entnahme des aufgeschlossenen Materials 17 aus dem Behälter 10 mittels einer Entnahmevorrichtung 21, wie beispielsweise einer Pipette.

Bezugszeichenliste

10	Behältnis
11	Deckel
12	Flüssigkeit
13	Emitter
14	aufzuschließendes Material
15	Wandabschnitt
16	Fokuspunkt
17	aufgeschlossenes Material
18	Zentrifugalkraft
19	Ultraschallkraft
20	Pellet der nicht aufschließbaren Bestandteile
21	Entnahmevorrichtung

Patentansprüche

1. Verfahren zum Aufschluss von biologischem Material, insbesondere zur Gewinnung von Biomolekülen, mittels Ultraschall wobei das biologische Material in einem Behältnis zusammen mit einer Flüssigkeit angeordnet wird,

dadurch gekennzeichnet, dass

das biologische Material im Behältnis frei beweglich ist, dass das biologischen Material mittels Zentrifugalkraft zu einem vorbestimmten Punkt des Behältnisses bewegt wird und dass während des Zentrifugierens Ultraschallwellen erzeugt werden, wobei die Ultraschallwellen in einem Punkt fokussiert werden, der identisch mit dem Konzentrationspunkt ist, wobei die im Fokus entstehende, durch den Ultraschall hervorgerufene Kraft entgegengesetzt zur Zentrifugalkraft wirkt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Stärke der Zentrifugalkraft in Abhängigkeit der Partikelgröße des zum Aufschluss bestimmten biologischen Materials eingestellt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Ultraschallwellen mittels eines Ultraschallemitters erzeugt werden, der bevorzugt direkt im Bereich des Fokuses des vorbestimmten Punktes des Behältnisses angeordnet ist.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Behältnis und/oder die Flüssigkeit gekühlt werden.

5. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 4 mit einer Aufnahme für ein Behältnis, mit einer Rotationsvorrichtung zum Ausüben einer Zentrifugalkraft auf das Behältnis, einem Ultraschallemitter, der im Bereich des Behältnisses angeordnet ist.
6. Vorrichtung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Ultraschallemitter in Richtung der Zentrifugalkraft angeordnet ist.

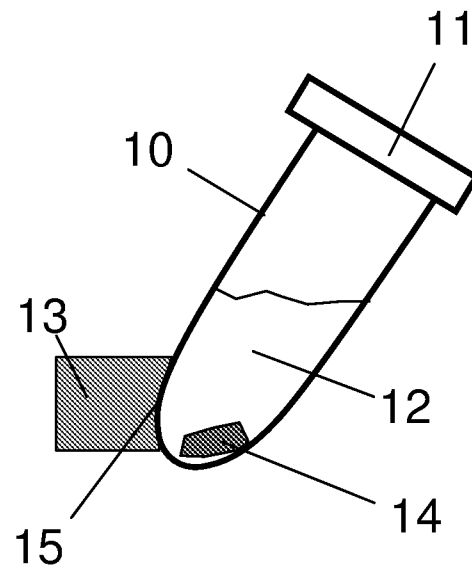


Fig. 1

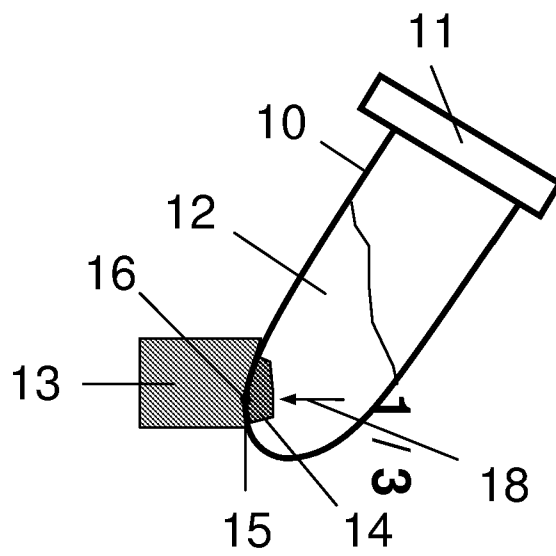


Fig. 2

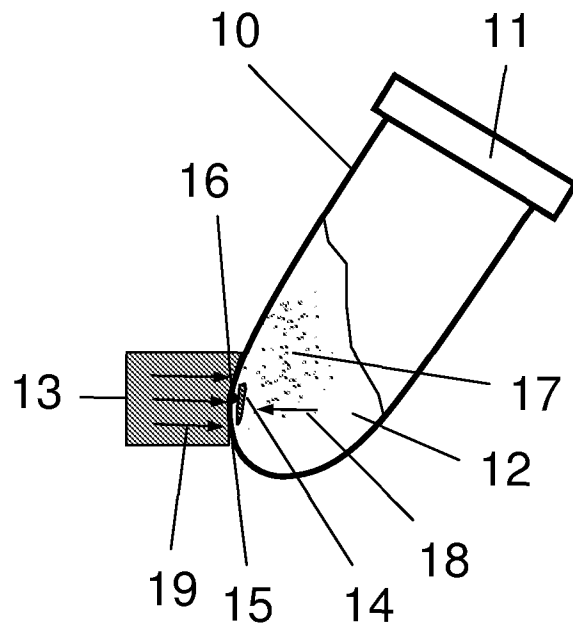


Fig. 3

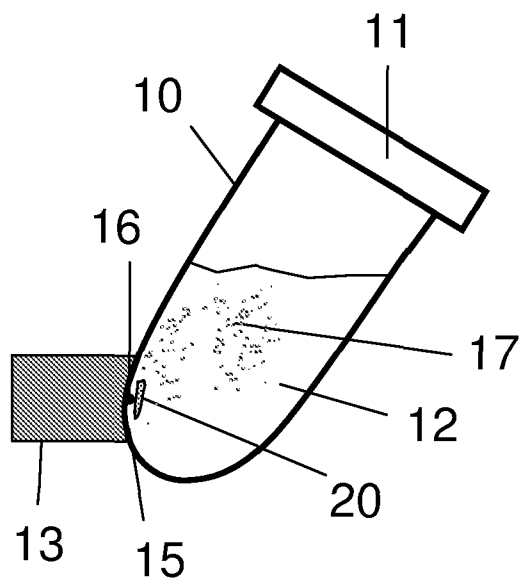


Fig. 4

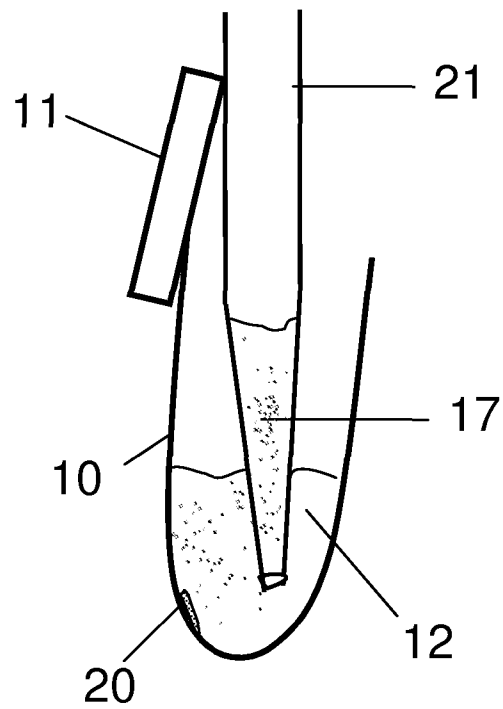


Fig. 5