

(51) Internationale Patentklassifikation⁶ : G01N 30/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/13689 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 2. April 1998 (02.04.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/05295 (22) Internationales Anmeldedatum: 26. September 1997 (26.09.97) (30) Prioritätsdaten: 196 40 076.7 28. September 1996 (28.09.96) DE 197 24 266.9 9. Juni 1997 (09.06.97) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: FUHR, Günter [DE/DE]; Berliner Strasse 28A, D-13127 Berlin (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KORLACH, Jonas [DE/DE]; Karl-Liebknecht-Strasse 9, D-10178 Berlin (DE). EHWALD, Rudolf [DE/DE]; Strelitzer Strasse 56, D-10115 Berlin (DE). (74) Anwälte: HERTZ, Oliver usw.; Brienner Strasse 52, D-80333 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>

(54) Title: PROCESS AND DEVICE FOR ISOELECTRIC PARTICLE SEPARATION

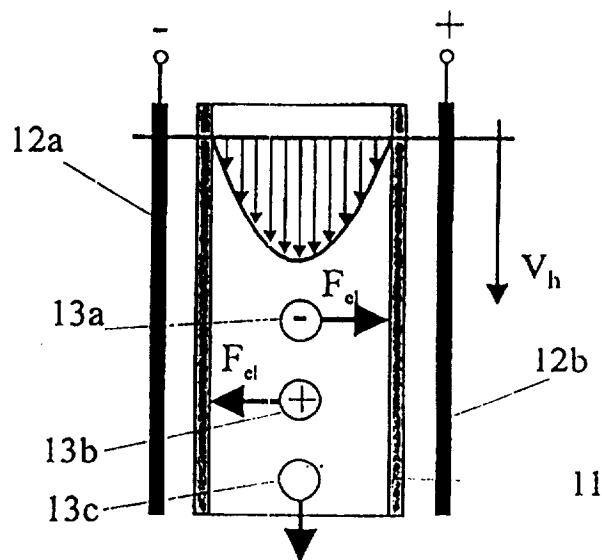
(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR ISOELEKTRISCHEN TEILCHENTRENNUNG

(57) Abstract

In order to isoelectrically separate particles with a pH-dependent net charge, the particles are exposed in a guiding liquid to electric field forces. The pH value of the guiding liquid is set in such a way that at least one predetermined type of particle is separated from the remaining particles and migrates to a fixing collecting means under the effect of the electric field forces. The collecting means is for example a porous hollow fibre delimited by electrodes which generate the electric field forces and crossed by the guiding liquid together with the sample to be separated. The particles whose isoelectric point matches the pH value of the guiding liquid run unimpeded through the fibres, whereas the remaining particles are pressed against the inner wall of the fibre and are prevented from being carried away with the liquid flow.

(57) Zusammenfassung

Zur isoelektrischen Trennung von Teilchen mit pH-abhängiger Nettoladung werden die Teilchen in einer Führungsflüssigkeit elektrischen Feldkräften ausgesetzt. Der pH-Wert der Führungsflüssigkeit wird derart eingestellt, daß mindestens eine vorbestimmte Teilchenart sich von den übrigen Teilchen trennt und unter Wirkung der elektrischen Feldkräfte zu einem fixierenden Auffangmittel wandert. Das Auffangmittel ist zum Beispiel eine poröse Hohlfaser, die von Elektroden zur Bildung der elektrischen Feldkräfte begrenzt und von der Führungsflüssigkeit mit der zu trennenden Probe durchströmt wird. Teilchen, deren isoelektrischer Punkt mit dem pH-Wert der Führungsflüssigkeit übereinstimmt, durchlaufen die Faser ungehindert, während die übrigen Teilchen an die Faserinnenwand gedrückt und vom Weitertransport mit dem Flüssigkeitsstrom ausgeschlossen werden.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verfahren und Vorrichtung zur
isoelektrischen Teilchentrennung

Die Erfindung betrifft Verfahren und Vorrichtungen zur isoelektrischen Trennung von Teilchen, deren Ladungseigenschaften vom pH-Wert einer Führungsflüssigkeit abhängen, insbesondere zur Trennung ampholytischer suspendierter Teilchen, Kolloide oder biologischer Zellen. Die Erfindung betrifft insbesondere die Trennung derartiger Teilchen aus einer Führungsflüssigkeitsströmung.

Aus der Molekularbiologie, Biochemie, Medizin und Biotechnologie sind zahlreiche Trenntechniken bekannt, deren Funktion auf Ladungsunterschieden von Molekülen innerhalb einer zu trennenden Substanz beruht. Bei zwitterionischen Verbindungen (sogenannte Ampholyte oder ampholytische Moleküle) hängt die Molekülladung vom pH-Wert der Umgebungslösung ab. Der isoelektrische Punkt (im folgenden: IP) einer Verbindung ist der pH-Wert, bei dem die Nettoladung der amphoterischen Moleküle gleich null ist. Die Ladung des Moleküls ist bei einem pH-Wert kleiner als dem IP positiv bzw. im entgegengesetzten Fall negativ.

Bei der isoelektrischen Fokussierung (im folgenden IEF) werden Proteine mit unterschiedlichen IP's unter Verwendung räumlicher pH-Gradienten entlang einer Trennstrecke getrennt (s. R. A. M. Osher et al. in "The Dynamics of Electrophoresis" (Hrsg. B. J. Radola VCH, Weinheim, 1992, S. 163-231)). Die IEF wird beispielsweise unter Verwendung poröser Gelmatrizen oder für analytische Trennungen geringster Probenmengen unter Verwendung dünner Kapillaren als sogenannte cIEF (s. F. Foret

et al. "Capillary Electrophoresis", in "Advances in Electrophoresis", Band III (Hrsg. A. Chrambach et al. VCH, Weinheim, 273-347)) ausgeführt.

Die herkömmliche IEF ist aus den folgenden Gründen nachteilig und in der Anwendbarkeit beschränkt. Die Rückgewinnung der getrennten Substanzen aus einem Trägermaterial, insbesondere für weitere Bearbeitungsschritte wie weitere Analysen, Medikamentanwendungen oder dergl., erfordert aufwendige Prozeduren, durch die gegebenenfalls die getrennten Substanzen selbst modifiziert werden oder die zu Substanzverlusten führen. Der notwendige Einsatz von Zusatzstoffen zur Bildung eines möglichst breit und linear geformten pH-Gradienten führt zu Beschränkungen in Bezug auf die weitere Verwendbarkeit der aufgetrennten Proben. Die als Zusatzstoffe eingesetzten, sogenannten Carrier-Ampholyte sind eine chemisch sehr diverse Substanzmischung, die schwer von den getrennten Proteinfractionen trennbar ist. Die cIEF ist darüber hinaus auf geringste Probenmengen beschränkt, die nicht gesondert aufgefangen werden können und nicht von den Carrier-Ampholyten trennbar sind.

Speziell beim Einsatz von sogenannten IPG-Membranen zur Bildung des pH-Gradienten besteht das Problem darin, daß Proteine beim notwendigen Durchtritt durch eine solche Membran ein Milieu passieren müssen, dessen Ionenstärke sehr gering ist. Daher können empfindliche Proteine in diesem Bereich denaturieren oder ausfallen. Aus diesem Grunde werden bei der IEF an die Gleichmäßigkeit der Spannungsgradienten in der Trennstrecke höchste Anforderungen gestellt. Schließlich können bei der IEF Probleme in Form elektroosmotischer Erscheinungen in extremen pH-Bereichen auftreten, wobei sich beispielsweise das Trägermittel (Gel) stark aufheizt und verändert (Zerstörung des Gels).

Zur Überwindung der genannten Nachteile wurden Systeme entwickelt, bei denen eine Ampholytentrennung unter Wirkung eines äußeren elektrischen Feldes unter Ausschluß modifizierender Zusatzstoffe erzielt wird. Es ist beispielsweise ein Trennsystem bekannt, das nach der Methode der sogenannten elektrischen Feld-Fluß-Fraktionierung (eFFF) arbeitet (s. K.D. Caldwell et al. in "Science", Band 176, 1972, S. 296-298). Bei diesem Trennsystem wird durch einen schmalen Kanal zwischen zwei ionenstromdurchlässigen Membranen ein kontinuierlicher Flüssigkeitsstrom geführt, in den die zu trennende Probe als schmale Bande eingespritzt wird. Äußere Elektroden, die über eine Umgebungsflüssigkeit mit dem Kanal in elektrischem Kontakt stehen, bewirken eine ladungsabhängig verschieden starke Retardierung der Proteinmoleküle im Flüssigkeitsstrom. Die Anwendung dieses Verfahrens ist jedoch auf Proteinmoleküle mit relativ weit auseinander liegenden IP's beschränkt. Außerdem konnte keine vollständige Proteintrennung erzielt werden. Eine Steuerung des pH-Werts des Flüssigkeitsstroms (und somit des Molekülladungszustands) erfolgt bei diesem bekannten Trennsystem nicht.

Das eFFF-System ist in der Praxis nicht anwendbar. Die Proben konnten zwar (unvollständig) getrennt werden. Jedoch wurde ein Auffangen der getrennten Fraktionen nicht realisiert. Außerdem treten inakzeptable hohe Trennzeiten auf. So lieferte eine Weiterentwicklung des oben erwähnten eFFF-Systems (L.F. Kesner et al. in "Analytical Chemistry", Band 48, 1976, S. 1834-1839) selbst im Labormaßstab Analyse- oder Trennzeiten im Bereich mehrerer Stunden.

Ein von Lightfoot et al. ("Separation Science and Technology", Band 16, 1981, S. 619-656) beschriebenes, abgewandeltes eFFF-System verwendet eine zylindrische Kanalgeometrie. Dieses System zeigte ebenfalls für die Praxis inakzeptable Trennleistungen. Ferner ergab sich eine komplexe Abhängigkeit der Proteinretardierung von einer Vielzahl von Parametern, wie z. B. den verwendeten Pufferionen, der Probenmenge, der

Proteinsorte und Eigenschaften der Kanalwand. Ferner ist auch dieses bekannte System nicht für eine pH-Steuerung oder etwa zur Trennung von Proteinen mit unterschiedlichen IP's vorgesehen.

Es besteht ein starkes Interesse an der Substanztrennung zur Herstellung hochreiner Substanzen über die Labordimension hinaus im industriellen Maßstab. Wegen der genannten Beschränkungen und Nachteile ist jedoch mit den genannten Systemen bislang keine kontinuierliche Substanztrennung mit einer für die Praxis ausreichenden Trennleistung und Trenngeschwindigkeit bekannt.

Aufgabe der Erfindung ist es, verbesserte Verfahren zur isoelektrischen Teilchentrennung anzugeben, die sich insbesondere durch eine erhöhte Trenngeschwindigkeit, eine erhöhte Zuverlässigkeit und einen erweiterten Einsatzbereich in Bezug auf die trennbaren Teilchen und die eingesetzten Umgebungslösungsmittel auszeichnet. Aufgabe der Erfindung ist es ferner, entsprechende kontinuierliche isoelektrische Reinigungsverfahren anzugeben. Die Aufgabe der Erfindung besteht auch darin, Vorrichtungen zur Implementierung der Verfahren zur Teilchentrennung und weitere Anwendungsmöglichkeiten anzugeben.

Die genannten Aufgaben werden durch Verfahren mit den Merkmalen entsprechend Patentanspruch 1 bzw. mit Vorrichtungen mit den Merkmalen entsprechend Patentanspruch 12 gelöst. Vorteilhafte Ausführungsformen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

Die erfindungsgemäße Trenntechnik basiert auf der Idee, in einer Führungsflüssigkeit, in der die zu trennenden Teilchen elektrischen Feldkräften ausgesetzt sind, eine pH-Wertsteuerung oder -einstellung vorzunehmen, so daß alle Teilchenarten mit einer Nettoladung eine ladungsabhängige Bewegung ausführen und die übrigen, im wesentlichen neutralen Teilchen keine Änderung ihres Bewegungszustandes erfahren, wobei die

ladungsabhängig bewegten Teilchen zu Auffangmitteln (Auffangeinrichtung) bewegt werden. An den Auffangmitteln werden die Teilchen zumindest zeitweilig festgehalten. Das Festhalten umfaßt ein Fixieren auf der Oberfläche oder im Volumen der Auffangmittel. Die Dauer der Fixierung wird durch die Trennbedingungen, insbesondere eine zeitliche Modulation der elektrischen Feldkräfte, einer Veränderung des pH-Wertes die Struktur der Auffangmittel und/oder eine relative Bewegung zwischen den Auffangmitteln und der Führungsflüssigkeit bestimmt.

Ein wesentlicher Unterschied gegenüber der oben beschriebenen eFFF-Technik besteht somit darin, daß die Teilchen nicht ladungsabhängig verschieden retardiert werden, sondern daß durch die pH-Wertsteuerung in der Führungsflüssigkeit eine Bedingung eingestellt wird, mit der festgelegt wird, welche Teilchenart unter Wirkung eines äußeren elektrischen Feldes in einen zumindest zeitweilig fixierten Zustand bewegt und ggf. wieder freigegeben wird. Im Unterschied zur eFFF-Technik wird die erfindungsgemäße isoelektrische Trennung daher die pH-gesteuerte Elektoretentions-Chromatographie genannt. Die Auffangmittel wirken als echte Rückhaltemittel. Es wird somit ein Verfahren zur inversen isoelektrischen Teilchentrennung angegeben, bei dem Teilchen mit pH-Wert abhängiger Ladung in einer Führungsflüssigkeit an einem Auffangmittel vorbeigeführt werden und der pH-Wert der Führungsflüssigkeit so eingestellt bzw. modifiziert wird, daß nur die ungeladenen Teilchen in der Führungsflüssigkeit verbleiben, während die geladenen Teilchen durch ein elektrisches Feld gegen das Auffangmittel bewegt und somit zumindest temporär pH-abhängig fixiert werden.

Die erfindungsgemäß induzierte Bewegungsänderung der vorbestimmten Teilchenart ist so auf die Auffangmittel gerichtet, daß sich die vorbestimmte, zu trennende Teilchenart an oder hinter den Auffangmitteln anordnet oder sammelt. Die Auffangmittel werden beispielsweise durch eine Auffanganordnung gebildet, die zwischen Elektrodenmitteln zur Erzeugung des

äußeren elektrischen Feldes und der Führungsflüssigkeit angeordnet ist. Es ist möglich, das Auffangmittel in Bezug auf die Führungsflüssigkeit zu bewegen.

Die Auffanganordnung ist vorzugsweise substanzabhängig teildurchlässig. Die Teildurchlässigkeit kann zum Beispiel bedeuten, daß die Auffanganordnung für die Moleküle der Führungsflüssigkeit bzw. für in der Führungsflüssigkeit gelöste Ionen durchlässig, für die abzutrennende Substanz oder Teilchenart jedoch undurchlässig ist (Barrierewirkung). Es kann auch vorgesehen sein, daß die Teildurchlässigkeit so eingerichtet ist, daß ein Teil der abzutrennenden Teilchenart mit kleineren Teilchengrößen durchgelassen und der Rest der abzutrennenden Teilchen mit größeren Teilchengrößen nicht durchgelassen wird. Die Auffanganordnung stellt vorzugsweise eine Begrenzung der Führungsflüssigkeit mit den zu trennenden Teilchen dar. Außerhalb der Auffanganordnung sind in einer Umgebungslösung mit einstellbarem pH-Wert die Elektrodenmittel zur Bildung des elektrischen Feldes vorgesehen.

Die Erfindung kann mit einer ruhenden oder mit einer strömenden Führungsflüssigkeit realisiert werden. In beiden Fällen bildet die Auffanganordnung ein Kompartiment oder ein Gefäß, das mindestens eine Öffnung zur Zufuhr bzw. Abfuhr der zu trennenden Probe besitzt.

Die Trennwirkung ist besonders gut und schnell, wenn der Verschiebeweg der Teilchen vom Probenort in der (ggf. tangential zu den angrenzenden Auffangmitteln strömenden) Führungsflüssigkeit zu den Auffangmitteln möglichst klein gehalten wird. Die Auffanganordnung besitzt vorzugsweise charakteristische Dimensionen, die in Strömungsrichtung der Führungsflüssigkeit wesentlich größer als der Verschiebeweg sind. Der Verschiebeweg bzw. die Innenmaße der Kompartimente sind beispielsweise in der Größenordnung von mm oder geringer.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist als Auffanganordnung mindestens ein längliches, hohles Element (z. B. rohrförmig) vorgesehen, das eine teildurchlässige oder poröse Wandung besitzt und von der Führungsflüssigkeit mit der zu trennenden Teilchenprobe durchströmt wird. Es sind jedoch auch Auffanganordnungen mit anderen Gestalten, insbesondere mit nicht-kreisrunden, sondern eckigen Querschnitten möglich. Gemäß einer besonders vorteilhaften und bevorzugten Ausführungsform besteht die Auffanganordnung aus mindestens einer geraden oder gekrümmten Hohlfaser mit einer zumindest in Teilbereichen teildurchlässigen Wandung.

Die erfindungsgemäße isoelektrische Trennung ist mit ampholytischen Molekülen oder allen anderen synthetischen oder biologischen Teilchen (insbesondere Zellen oder Viren) realisierbar, die entsprechende elektrische Eigenschaften wie ampholytische Moleküle, insbesondere eine pH-Abhängigkeit der Nettoladung oder der Ladungsdichte von der Umgebung, aufweisen.

Je nach Anwendungsfall kann das Ziel der erfindungsgemäßen isoelektrischen Trennung darauf gerichtet sein, die vorbestimmte Teilchenart, die eine ladungsabhängige Bewegungsänderung im elektrischen Feld erfährt, oder die restlichen Teilchen ohne Änderung des Bewegungszustandes zu gewinnen.

Eine erfindungsgemäße Vorrichtung zur isoelektrischen Teilchentrennung enthält Elektrodenmittel zur Bildung eines elektrischen Feldes in einer Führungsflüssigkeit mit den zu trennenden Teilchen und pH-Einstellmittel, die zur Steuerung oder Einstellung des pH-Werts in der Führungsflüssigkeit eingerichtet sind. Es sind ferner Auffangmittel zwischen den Elektrodenmitteln und der Führungsflüssigkeit vorgesehen, die neben einer Sammlungsfunktion für eine abzutrennende Teilchenart eine Abgrenzungsfunktion gegenüber einer Umgebungslösung mit einstellbarem pH-Wert besitzt. Die Auffangmittel sind mindestens für Ionen, die in der Umgebungslösung und der Führungsflüssigkeit gelöst sind, durchlässig, so daß durch

Einstellung des pH-Wertes der Umgebungslösung auch der pH-Wert der Führungsflüssigkeit einstellbar oder steuerbar ist.

Bevorzugte Anwendungsformen der Erfindung sind alle Trennvorgänge an Probengemischen, die mindestens eine Teilchenart mit ampholytischen Eigenschaften enthalten, und/oder Untersuchungen von bestimmten Substanzen zur Ermittlung des isoelektrischen Punktes, von Titrationskurven oder des Aggregationsverhaltens. Die erfindungsgemäße Vorrichtung ist auch zur Verringerung der Ionenstärke der Führungsflüssigkeit im Bereich der pH-gesteuerten Elektrodialyse einsetzbar.

Die erfindungsgemäße isoelektrische Teilchentrennung besitzt die folgenden Vorteile.

Die Fraktionierung oder Trennung erfolgt ohne Zusatzsubstanzen, insbesondere ohne Carrier-Ampholyte oder andere Mittel, etwa zur Erzeugung eines pH-Gradienten. Da kein pH-Gradient erzeugt wird, ergibt sich eine wesentliche Erleichterung einer präparativen Verfahrensweise im Durchflußsystem bzw. eine erleichterte Sammlung der gewünschten (ggf. aller) getrennten Fraktionen. Die getrennten oder gereinigten Fraktionen stehen nach der Trennung für weitere Manipulationen zur Verfügung, ohne gegenüber der ursprünglichen Form verändert zu sein. Die getrennten Fraktionen befinden sich insbesondere immer in demselben Lösungsmittel mit gleicher, ggf. geringfügig verringerter oder sogar höherer Konzentration. Das erfindungsgemäße System ist sowohl für die diskontinuierliche als auch für die kontinuierliche Trennung von Teilchen in Abhängigkeit von deren IP's einsetzbar und automatisierbar. Es sind sowohl räumliche als auch durch Variation des pH-Wertes während des Trennvorgangs zeitliche Fraktionierungen möglich. Es ergibt sich eine hohe Trenngeschwindigkeit im Bereich von Minuten, wie es im einzelnen unten beispielhaft angegeben wird. Das Trennsystem ermöglicht eine Anordnung der Elektrodenmittel auf engstem Raum, so daß im Vergleich zu herkömmlichen Trennverfahren mit verhältnismäßig geringen Spannungen genügend

große Feldstärken erzielbar sind. Damit wird der Energieverbrauch erfindungsgemäßer Systeme minimiert und eine Schonung temperaturempfindlicher Proben erzielt.

Weitere Merkmale und Vorteile der Erfindung werden aus der folgenden Beschreibung von Ausführungsformen unter Bezug auf die beigelegten Zeichnungen ersichtlich. Es zeigen:

Fig. 1: eine Prinzipdarstellung zur Erläuterung der bei der erfindungsgemäßen Trennung auftretenden Kräfte;

Fig. 2: eine Kurvendarstellung zur Illustration einer erfindungsgemäßen Proteintrennung;

Fig. 3: eine Kurvendarstellung zur Illustration einer weiteren erfindungsgemäßen Proteintrennung;

Fig. 4: eine Kurvendarstellung einer Modellrechnung zur Illustration der erfindungsgemäß erzielbaren Trennschärfe;

Fig. 5: eine Kurvendarstellung zur Illustration einer weiteren erfindungsgemäßen Proteintrennung;

Fig. 6: eine schematische Darstellung einer erfindungsgemäßen Trennvorrichtung;

Fig. 7, 8 und 9: schematische Darstellungen zu modifizierten Hohlfaseranordnungen;

Fig. 10 eine schematische Darstellung einer kombinierten Trenn- und Konzentrierungsvorrichtung;

Fig. 11: eine schematische Darstellung eines erfindungsgemäßen Multikompartimentsystems; und

Fig. 12: eine schematische Darstellung einer modifizierten Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Trennvorrichtung.

Bei der folgenden Erläuterung wird beispielhaft auf eine Realisierung der Erfindung Bezug genommen, bei der die Auffangmittel durch eine Hohlfaser gebildet werden. Die erläuterten Prinzipien sind jedoch in gleicher Weise auch bei anderen geometrischen Formen der Auffangmittel realisierbar. Ferner ist die Erfindung nicht auf die beispielhaft erwähnte Proteintrennung beschränkt, sondern mit beliebigen Teilchen oder Partikeln mit ampholytischen Eigenschaften implementierbar.

Entsprechend einer Ausführungsform der Erfindung (Einzelheiten siehe unten, Figur 6) wird ein Reaktionsraum, der die Umgebungslösung, mindestens zwei Elektroden und pH-Einstellmittel enthält, von einer dünnen Hohlfaser durchsetzt. Die Elektroden sind dazu eingerichtet, mit einer vorbestimmten Gleichspannung beaufschlagt zu werden. Die Wandung der Hohlfaser ist zur Bildung der Teildurchlässigkeit mit einer Vielzahl von Poren definierter Größe versehen. Die Porengröße ist derart gewählt, daß das Lösungsmittel (zum Beispiel Wasser) und den elektrischen Strom transportierende Ionen durchgelassen werden, jedoch die zu trennenden Moleküle nicht durch die Wandung hindurchtreten können. Die Hohlfaser kann beispielsweise einen Innendurchmesser (oder lichte Weite oder sogenanntes Lumen) im Bereich von Millimeter bis Mikrometer besitzen. Die pH-Einstellmittel sind dazu vorgesehen, den pH-Wert der Umgebungslösung mit einem an sich bekannten, herkömmlichen Verfahren, z. B. elektrisch oder titratorisch, zu steuern oder einzustellen.

Die zu trennende Probe wird mit einer zweiten Flüssigkeit, der Führungsflüssigkeit, durch das Lumen der Hohlfaser geführt. Die Führungsflüssigkeit besitzt vorzugsweise denselben pH-Wert oder dieselbe Ionenzusammensetzung wie die Umgebungslösung. Hierzu kann die Führungsflüssigkeit beispiels-

weise dem Reaktionsraum entnommen werden. Es ist jedoch alternativ auch möglich, daß die Führungsflüssigkeit einen anderen pH-Wert besitzt. Am stromaufwärts gelegenen Ende der Hohlaser sind Mittel zur Einführung der zu trennenden Probe in die Führungsflüssigkeit und am stromabwärts gelegenen Ende der Hohlaser Detektor- und/oder Sammlermittel vorgesehen. Im folgenden werden die bei der erfindungsgemäßen Trennung auftretenden Kräfte unter Bezug auf Fig. 1 erläutert.

Fig. 1 zeigt in schematischer Schnittdarstellung einen Abschnitt einer Hohlaser 11, die von der Führungsflüssigkeit mit einem bestimmten pH-Wert und der zu trennenden Probe 13a, 13b und 13c durchströmt wird. Die Hohlaser 11 ist zwischen zwei Gleichspannungselektroden 12a, 12b angeordnet, so daß die Führungsflüssigkeit mit der Probe ein elektrisches Feld durchströmt.

Entsprechend dem pH-Wert der Führungsflüssigkeit umfaßt die Probe negativ geladene Moleküle 13a, positiv geladene Moleküle 13b und ungeladene Moleküle 13. Unter der Wirkung der elektrischen Feldkräfte werden die geladenen Moleküle an den Rand der Führungsflüssigkeit bewegt. Am Rand des Flüssigkeitsstromes, d. h. an der als Auffangmittel wirkenden Hohlaser werden die geladenen Moleküle vom Weitertransport mit der Führungsflüssigkeit ausgeschlossen und somit örtlich fixiert. Die örtliche Fixierung kann generell mit einem genügend starken elektrischen Feld, das eine Komponente senkrecht zur Strömungsrichtung der Führungsflüssigkeit (v_h) besitzt, und eine haftungsfördernde (z. B. rauhe oder poröse) Innenoberfläche der Hohlaser erzielt werden. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden die Geometrie der Hohlaser und die Strömungsgeschwindigkeit der Führungsflüssigkeit jedoch so ausgewählt, daß das in Fig. 1 illustrierte Strömungsprofil mit einer im wesentlichen parabelförmigen Gestalt gebildet wird. Ein solches Strömungsprofil ist dadurch gekennzeichnet, daß die Strömungsgeschwindigkeit in der Mitte der Führungsflüssigkeit, d. h. in der Mitte der Hohlaser am

größten ist und zum Rand hin abnimmt. Ein solches Strömungsprofil wird beispielsweise bei Erzeugung einer laminaren Führungsflüssigkeitsströmung durch die Hohlfaser erzielt. In unmittelbarer Nachbarschaft zur Wandung der Hohlfaser ist die Strömungsgeschwindigkeit gleich null. In diesem Fall werden die Moleküle vollständig vom Weitertransport im Führungsflüssigkeitsstrom ausgeschlossen (Elektroretention).

Ein Molekül, dessen IP mit dem in der Führungsflüssigkeit herrschenden pH-Wert übereinstimmt, besitzt keine elektrische Nettoladung und bleibt daher vom elektrischen Feld unbeeinflusst. Somit wird in Abhängigkeit vom pH-Wert eine bestimmte Molekülart durch die Hohlfaser zum Beispiel zu einem Detektor oder Sammler geführt, während die geladenen Teilchen an der Hohlfaserwandung zurückgehalten werden.

Die Fig. 2 und 3 zeigen experimentelle Ergebnisse zur Proteintrennung. Die Kurvendarstellungen zeigen Absorptionswerte, die mit einem Detektor am stromabwärts gelegenen Ende der Hohlfaser in Abhängigkeit von der Zeit aufgenommen werden. In Fig. 2 wird bei Punkt 1 der Führungsflüssigkeit eine definierte Proteinmenge zugeführt und ohne elektrische Feldeinwirkung im Zeitverlauf (Maximum bei rd. 5 min) detektiert. Bei Punkt 2 wird erneut eine Proteinmenge der Führungsflüssigkeit zugeführt, jetzt aber mit einem elektrischen Feldeinfluß. Es zeigt sich keine (bzw. eine meßsystembedingt geringe negative) Absorptionsänderung, da das Protein zurückgehalten wird. Erst nach Abschalten des elektrischen Feldes (Punkt 3) wird das zurückgehaltene Protein dem Trägerstrom wieder zugeführt und somit detektiert (Maximum bei rd. 20 min).

Fig. 3 zeigt einen entsprechenden Versuch, wobei hier jedoch das Protein einen IP besitzt, der mit dem pH-Wert der Umgebungslösung bzw. der Führungsflüssigkeit übereinstimmt. Zwischen den Punkten 1 und 2 (ohne Feldeinfluß) bzw. 2 und 3 (mit Feldeinfluß) zeigt sich jetzt, daß das Protein wegen der fehlenden Nettoladung unbeeinflusst bleibt und unverändert den

Detektor erreicht. Bei Abschalten des Feldes (Punkt 3) wird keine Absorption des Proteins detektiert, sondern nur noch Verunreinigungen, die in der Ausgangsprobe enthalten sind. Dies zeigt den Reinigungseffekt, der durch den Proteindurchlauf durch das elektrische Feld, in dessen Verlauf die Verunreinigungen aus der Probe gezogen wurden, erzielt wurde.

Neben der Abtrennung von Proteinen mit einem vom pH-Wert abweichenden IP gemäß Fig. 2 oder der Abtrennung von Verunreinigungen gemäß Fig. 3 sind folgende Varianten der erfindungsgemäßen Verfahrensweisen möglich.

Es ist möglich, den pH-Wert der Umgebungslösung und somit der Führungsflüssigkeit zeitlich zu verändern. Wird die zeitliche Variation auf die Hohlfaserlänge bzw. die Strömungsgeschwindigkeit der Führungsflüssigkeit abgestimmt, so kann bei kontinuierlicher Feldeinwirkung durch die Variation des pH-Wertes eine zeitlich versetzte Trennung von Komponenten aus der Probe in der Reihenfolge ihrer IP's erfolgen. Die kontrollierte, trägerfreie pH-Variation läßt sich über einen weiten Bereich mit einer Genauigkeit von rd. 0,1 bis zu 0,01 pH-Einheiten mit einem pH-Staten erzielen. Bei dieser zeitlichen Fraktionierung wird somit der pH-Wert in Abhängigkeit von der Zeit derart vergrößert oder verkleinert, daß der pH-Wert jeweils für die Dauer eines Zeitbereiches einem IP einer Komponente der Probe entspricht. Der Zeitbereich ist so gewählt, daß eine vollständige Trennung der jeweiligen Komponente aus der Probe erfolgen kann und eine räumliche Trennung der Auftragung auf der Innenwandung der Hohlfaser von der jeweils nächsten Komponente realisiert wird (Fraktionierung eines Substanzgemisches).

Neben der pH-Variation zur Ladungsvariation der Moleküle bzw. Teilchen ist es ferner möglich, anstelle der oben genannten Gleichspannung zwischen den Elektroden eine zeitliche und/oder räumliche Modulation des elektrischen Feldes vorzusehen. Im Ergebnis läßt sich wiederum die Trennung der Probe optimieren.

Eine weitere Alternative besteht in der Variation der hydrodynamischen Strömung durch die Hohlfaser (Variation der Strömungsgeschwindigkeit). So ist es möglich, die Führungsflüssigkeitsströmung zeitlich zu begrenzen oder anzuhalten, wenn sich die Probe im Hohlfaserelement unter Feldeinwirkung befindet.

Eine Variation eines erfindungsgemäßen Trenn- oder Reinigungsverfahrens wird bei Ausbildung einer Teildurchlässigkeit der Hohlfaser (Wahl der Porengröße) derart ermöglicht, daß auch ein Durchtritt zumindest eines Teils der gelösten, voneinander zu trennenden Moleküle möglich ist. In der Umgebungslösung der Führungsflüssigkeit wird ein pH-Wert eingestellt, der dem IP der zu isolierenden Komponente entspricht. Nach Einspritzung der Probe als schmale Bande oder bei kontinuierlicher Probenzuführung werden alle Komponenten, deren IP nicht dem eingestellten pH-Wert entspricht, aus dem Hohlfaserlumen durch die Wandporen in die Umgebungslösung verschoben. Die in der Hohlfaser verbleibende, nun gereinigte Komponente kann mit dem Führungsflüssigkeitsstrom hinter der Trennstrecke aufgefangen werden. Die Konzentration der gereinigten Komponente nimmt lediglich durch die Diffusion durch die Hohlfaserwand geringfügig ab, kann jedoch über eine nachgeschaltete Aufkonzentrierungseinheit (s. Fig. 10) wieder erhöht werden.

Fig. 4 zeigt das Ergebnis einer Modellrechnung zur Illustration der Wirkung des elektrischen Feldes auf Moleküle, deren IP nicht mit dem pH-Wert der Führungsflüssigkeit übereinstimmt. Parameter der graphischen Darstellung sind die Zeit, die relative Konzentrationsänderung c/c_0 und der Betrag oder die Absolutabweichung zwischen dem IP und dem pH-Wert ($\text{abs}(\text{pH}-\text{IP})$). Es zeigt sich, daß bereits bei geringfügigen Abweichungen des IP vom pH-Wert die Konzentration der jeweiligen Komponente aufgrund der starken elektrischen Feldwirkung in kurzer Zeit auf null abnimmt.

Bei der kontinuierlichen Verfahrensweise wird die sich mit den abgetrennten Komponenten anreichernde Umgebungslösung simultan durch frische Umgebungslösung ersetzt.

Fig. 5 zeigt die experimentelle Bestätigung der hohen Trennungsgeschwindigkeit am Beispiel mit einer für die Komponenten durchlässigen Hohl-faser. Ein kontinuierliche Probestrom wird durch die Hohl-faser geführt und an deren stromabwärts gelegenen Ende noch ohne Feldeinfluß detektiert (Punkt 1 bis Punkt 2). Nach Anlegen des elektrischen Feldes (Punkt 2) wird das Protein mit einer geringen Ansprechzeit (Größenordnung: Minute) vollständig aus der Hohl-faser entfernt (Rückgang der Absorption), da der pH-Wert der Umgebungslösung nicht dem IP des Proteins entspricht.

Fig. 6 zeigt schematisch den Aufbau einer erfindungsgemäßen Trennvorrichtung zur IP-abhängigen Trennung ampholytischer Moleküle. In einem Reaktionsraum 64 sind die Hohl-faser 61 und zwei Elektroden 62a, 62b angeordnet. Die Hohl-faser und die Elektroden verlaufen parallel zueinander, wobei sich die Hohl-faser zwischen den Elektroden befindet. Der Reaktionsraum 64 ist mit der Umgebungslösung 63 gefüllt und mit einem Reservoir 66 verbunden. Mit der pH-Einstellvorrichtung 67 wird der pH-Wert der Umgebungslösung eingestellt. Wegen der Teildurchlässigkeit der Hohl-faser folgt der pH-Wert der Führungsflüssigkeit dem pH-Wert der Umgebungslösung. Zur Gewährleistung der räumlichen pH-Konstanz ist mindestens ein Rührmittel 65 vorgesehen. Am stromaufwärts gelegenen Ende der Hohl-faser 61 ist eine Pumpe 68 zur Förderung der Führungsflüssigkeit 69 vorgesehen. Die Pumpe 68 ist über eine Verbindung 610 (z. B. Verbindungsschlauch) mit dem Reaktionsraum 64 und/oder mit einem separaten Flüssigkeitsreservoir 611 verbunden. Alternativ zu der Pumpe 68 zum Führungsflüssigkeitsvorschub kann auch am stromabwärts gelegenen Ende der Hohl-faser eine Saugvorrichtung vorgesehen sein, die für die erforderliche Bewegung der Führungsflüssigkeit in Strömungsrichtung sorgt.

Die Zufuhr der Probe 612 in den Führungsflüssigkeitsstrom als schmale Bande erfolgt über einen Dreiwege-Einspritzblock 613, der mit einem Dosiermittel (zum Beispiel Hamilton-Spritze 614) ausgestattet ist. Es können jedoch auch Mikrokanäle in der Hohlaserwand zur Probenzufuhr vorgesehen sein.

Am stromabwärts gelegenen Ende der Hohlaser befindet sich eine Detektoreinheit 615 zur Identifizierung der sich nach Durchtritt durch die Hohlaser im Lumen befindlichen Substanzen sowie ein Dreiwegehahn 616 zur kontrollierten Überführung von Flüssigkeit aus der Hohlaser in einen Fraktionssammler 617. Die Detektoreinheit 615 kann z.B. für eine optisch-spektroskopische Messung eingerichtet sein. Besteht die Hohlaser aus UV-durchlässigem Glas, so können Proteine mit einer Absorption im UV-Bereich direkt in der Hohlaser detektiert werden.

Teilchen mit einem vom pH-Wert abweichenden IP werden an der Faserinnenwand fixiert. Teilchen mit einem IP entsprechend dem pH-Wert durchlaufen die Faser ungehindert. Durch Variation des pH-Wertes während der Trennung lassen sich einzelne Fraktionen trennen, die dann in Folge aus dem Faservolumen gespült werden.

Die Vorrichtung gemäß Fig. 6 ist je nach Gestaltung der Hohlaser sowohl als Trennvorrichtung als auch als Reinigungsvorrichtung gemäß den oben erläuterten Verfahrensweisen einsetzbar. Es ist möglich, den Reaktionsraum zur Aufnahme mehrerer Umgebungslösungen zu unterteilen, die sich in ihrem pH-Wert unterscheiden. Die Elektroden werden dann entsprechend unterbrochen und getrennt ansteuerbar. Es können mehrere Vorrichtungen gemäß Fig. 6 als Kaskade angeordnet werden.

Bei der erfindungsgemäßen Gestaltung der Auffanganordnung als Hohlaser besitzt die Führungsflüssigkeit einen Strömungsquerschnitt, der wesentlich geringer als die Länge der Trennstrecke ist. Damit können die Elektroden, zwischen denen sich die Hohlaser befindet, mit einem geringen Abstand

angeordnet werden, so daß geringe Spannungen zur Erzeugung einer hohen Feldstärke ausreichen. Übliche Trennanordnungen können beispielsweise mit einer Spannung im Bereich von 1 bis 10 V betrieben werden. Bei derart geringen Spannungen kann eine übermäßige Wärmeproduktion und die Erzeugung von Elektrolyseprodukten vermieden werden, so daß hitzeempfindliche Proben geschont werden. Im Vergleich zu der eingangs erläuterten cIFF-Technik wird die Strecke, über die ein elektrisches Feld angelegt wird, erfindungsgemäß um rd. drei Größenordnungen verringert.

Weitere Vorteile der Erfindung liegen in den geringen Analyse- oder Trennzeiten (rd. 10 Minuten oder weniger). Der Möglichkeit zur automatisierten und permanenten Detektierbarkeit im Durchflußsystem sowie der leichten Handhabbarkeit mit herkömmlichen, aufwendigen Gel- oder IPG-IEF-Techniken. Ferner lassen sich erfindungsgemäß abgetrennte Komponente zeitweilig festhalten und nach vorbestimmter Feld- oder pH-Änderung wieder freigeben.

Eine weitere Variante der erfindungsgemäßen isoelektrischen Trennung besteht in einer Konzentrierungsprozedur. Eine verdünnte Lösung mit einer oder mehreren Komponenten wird kontinuierlich durch die Hohlleiter geströmt und dem Feldeinfluß ausgesetzt. Die nicht-isoelektrischen Komponenten werden an der Hohlleiterwand räumlich fixiert. Nach der Durchströmung wird das Feld abgeschaltet und die Hohlleiter mit einem Lösungsmittelvolumen (Spülvolumen) durchströmt, das kleiner als Gesamtvolumen der vorher verdünnten Lösung ist. Das Spülvolumen löst die an der Wand fixierten Moleküle, die somit gleichzeitig freigegeben werden und das Faservolumen verlassen, worauf sich eine resultierende Lösung höherer Konzentration als der ursprünglichen verdünnten Lösung ergibt.

Eine weitere Anwendung besteht in der Beschleunigung von Dialyseprozessen. Besitzt die Umgebungslösung eine geringere Ionenstärke (Ionenkonzentration) als die Führungsflüssigkeit,

so werden Ionen aus der Hohlleiter diffundiert. Der Vorgang kann durch das elektrische Feld stark beschleunigt werden.

Mit der dargestellten Vorrichtung lässt sich aber auch eine Substanz hinsichtlich ihrer isoelektrischen Parameter charakterisieren. Dies ist insbesondere bei der Charakterisierung von Isoenzymen von Interesse.

Im folgenden werden Modifizierungen der Vorrichtung gemäß Fig. 6 unter Bezug auf die Fign. 7 bis 12 erläutert.

Die Fig. 7 zeigt ein Ausführungsbeispiel, bei dem im Reaktionsraum 72 eine gekrümmte Hohlleiter 71 angeordnet ist. Die Hohlleiter besitzt eine spiralförmige Geometrie. Die Elektroden 73a, 73b sind an die Geometrie der Hohlleiter angepasst. Beim dargestellten Beispiel sind die Elektroden 73 Ringelektroden, mit denen der Spiralquerschnitt gerade abgedeckt wird. Die spiralförmige Fasergestaltung erlaubt es, größere Probenmengen simultan zu trennen, da eine größere Probenmenge im Wandbereich, in dem die Strömungsgeschwindigkeit null ist, (s. Fig. 1) festgehalten werden kann. Im mikropräparativen Maßstab ist hierdurch auch eine kontinuierliche Probenzufuhr möglich.

Fig. 8 zeigt ebenfalls eine spiralförmig gestaltete Hohlleiter 81, die auf eine zylindrisch geformte Elektrode 82a aufgewickelt ist. Die Gegenelektrode 82b (gepunktet dargestellt) kann z. B. als Hohlzylinder über die Anordnung geschoben werden. Der zwischen den Elektroden verbleibende Spalt kann von der Umgebungslösung durchströmt werden. Die Anordnung gemäß Fig. 8 ist durch hohe Lade- oder Trennkapazitäten bei gleichzeitig geringem Platzbedarf und niedrigen Spannungen gekennzeichnet.

Die bisher als separate Bauteile beschriebenen Elektroden- und Auffangmittel können gemäß Fig. 9 auch miteinander verbunden werden. Fig. 9 zeigt den Querschnitt einer Hohlleiter

91 mit Elektroden 92a, 92b, die als dünne Schicht auf die Hohlfaseraußenwand aufgebracht worden sind. Damit lassen sich noch geringere Spannungen zum Erzielen hoher Feldstärken einstellen. Die Umgebungslösung beeinflußt das Hohlfaserinnere durch die frei gebliebenen Bereiche der Hohlfaser. Es ist jedoch auch möglich, das erfindungsgemäße System ohne die Umgebungslösung zu betreiben.

Fig. 10 zeigt die Kombination einer Trennvorrichtung (Reaktionsraum 101 mit Hohlfaser und Elektroden 102a, 102b) mit einer Aufkonzentrierungsvorrichtung 104. Diese kombinierte Anordnung wird derart betrieben, daß zunächst im Trennbereich eine erfindungsgemäße Fraktionierung eines Substanzgemisches erfolgt. In der Aufkonzentrierungsvorrichtung 104, deren Umgebungslösung 105 einen anderen pH-Wert als die Umgebungslösung 103 im Trennbereich besitzt, kann die gereinigte Fraktion mit den Elektroden 106a, 106b als schmale Bande fixiert und nach Abschalten des elektrischen Feldes an diesen Elektroden als konzentrierte Fraktion dem Fraktionssammler 107 zugeführt werden.

Das Multikompartimentsystem gemäß Fig. 11 realisiert ein Gegenstromprinzip, bei dem die Umgebungslösung 114 im jeweiligen Reaktionsraum in eine Strömungsbewegung versetzt wird. Die Strömungsrichtung ist vorzugsweise der Strömungsrichtung in der Hohlfaser 112 entgegengesetzt. Um eventuell an den Elektroden 111a, 111b auftretende Elektrolyseprodukte aufzufangen, wird zwischen den Elektroden und der Hohlfaser 112 eine Membran 113a, 113b angebracht. Die Strömung der Umgebungslösung dient auch der pH-Stabilisierung im Reaktionsraum.

Erfindungsgemäß ist es nicht unbedingt erforderlich, daß die Führungsflüssigkeit eine Strömung aufweist. Die Führungsflüssigkeit kann auch ruhen. Es ist auch möglich, das Auffangmittel relativ zur Führungsflüssigkeit zu bewegen. Dies wird in Fig. 12 illustriert. Eine Kammer 123 ist mit einem Protein-

gemisch 121 gefüllt und wird durch stromdurchlässige Membranen 122 begrenzt. Die Kammer 123 wird in den pH-regulierten Bereich 124 gebracht. Unter Anlegung des elektrischen Feldes über die Elektroden 125a, 125b wandern einzelne Proteine nach dem erfindungsgemäßen Prinzip zu den Membranen 122. Die Membranen können mit beweglichen, proteinbindenden Zwischenmembranen versehen sein, die nach Belegung mit den getrennten Proteinen in Pfeilrichtung abgezogen werden. Es ist alternativ auch möglich, einen Elutionsstrom in Pfeilrichtung vorzusehen, um die getrennten Proteine aus dem Membranbereich zu spülen.

Erfindungsgemäß kann eine Trennvorrichtung auch mit mehreren, kaskadenartig angeordneten Auffangmitteln oder mehreren hintereinander oder parallel angeordneten Trennbereichen ausgerüstet sein. Die Auffangmittel können statt durch die beschriebene Hohlfaser auch durch beliebige poröse Membranen oder Lamellen gebildet werden, die entsprechende Kompartimente zur Aufnahme der Führungsflüssigkeit bilden, neben denen die Elektrodenmittel platziert sind.

Die Teildurchlässigkeit des Auffangmittels (z. B. der Hohlfaser) kann über die Länge in Durchströmungsrichtung variieren, so daß abschnittsweise bestimmte Ionen der Führungsflüssigkeit und/oder Umgebungslösung und/oder nur bestimmte Moleküle durchgelassen werden.

Es ist ferner möglich, die Innenwandung der Hohlfaser durch chemische oder physikalische Methoden zu modifizieren, um die Wirkung des elektrischen Feldes zu verändern. Es ist möglich, die Hohlfaser innen mit Gelen, Mikropartikelsuspensionen oder Granulaten zu füllen oder auch im Reaktionsraum ein Gel vorzusehen. Es ist möglich, die Hohlfaser in einem bestimmten Abstand um eine beliebig geformte Elektrode zu wickeln und die Gegenelektrode an diese Geometrie anzupassen.

Die Auffangmittel können durch ein mehrfaseriges Array gebildet werden, das aus einer Vielzahl von Hohlfasern besteht,

die sämtlich mit der Führungsflüssigkeit durchströmt werden. Die Durchströmung erfolgt jedoch in den Fasern verschieden schnell, so daß substanzabhängig die Trenneffektivität beeinflußt werden kann.

Die mindestens zwei Elektroden können mit einer Gleichspannung oder Wechselspannung oder mit einem anderen, frei programmierbaren Spannungsverlauf beaufschlagt werden, so daß die Feldstärke in der Führungsflüssigkeit entsprechend variiert wird. Dies erlaubt die Bildung vorbestimmter Trennmuster auf den Auffangmitteln.

Die Elektroden können zur Reduzierung ggf. auftretender elektrolytischer Reaktionen wie folgt modifizierte Oberflächen bzw. Materialien aufweisen. Die Elektroden können porös ausgeführt sein oder Beschichtungen (z. B. Gele, Spacer) tragen.

Die Auffangmittel können durch flächige Membranen umgrenzt werden, die ein Kompartiment für die Führungsflüssigkeit bilden. Das Kompartiment kann mit Hilfe weiterer Membranen unterteilt sein, die jeweils für die Aufnahme verschiedener Proteinfractionen vorgesehen sind. Bei einer derartigen Anordnung kann die Zufuhr der zu trennenden Probe durch Einführung einer Membran realisiert werden, auf der die Probe adsorbiert ist.

Ein besonderer Vorteil der erfindungsgemäßen Trennvorrichtung besteht in ihrer Miniaturisierbarkeit. Es ist daher gemäß einer bevorzugten Ausführungsform vorgesehen, mindestens Teile der Elektroden durch elektronische Bauelemente wie Transistoren oder Dioden zu bilden und anzusteuern und die dreidimensionale Anordnung der Elektroden, Kanäle, Hohlfaserhalterungen und des Reaktionsraumes mit den Technologien der Halbleiterstrukturierung herzustellen.

Patentansprüche

1. Verfahren zur isoelektrischen Teilchentrennung, bei dem Teilchen mit einer Nettoladung oder Ladungsdichte, die vom pH-Wert der Umgebung abhängig ist, in einer an Auffangmittel angrenzenden Führungsflüssigkeit elektrischen Feldkräften ausgesetzt werden, wobei der pH-Wert der Führungsflüssigkeit derart eingestellt wird, daß mindestens eine vorbestimmte Teilchenart unter Wirkung der elektrischen Feldkräfte eine ladungsabhängige Bewegungsänderung erfährt und zu den Auffangmitteln bewegt wird, die für eine lösbare Fixierung der geladenen Teilchen eingerichtet sind.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem die bewegte Teilchenart Teilchen umfaßt, deren isoelektrischer Punkt nicht mit dem pH-Wert der Führungsflüssigkeit übereinstimmt.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, bei dem die Führungsflüssigkeit und die Auffangmittel relativ zueinander bewegt werden.
4. Verfahren gemäß Anspruch 3, bei dem die Auffangmittel mindestens eine poröse Wand umfassen, an der die Führungsflüssigkeit mit den zu trennenden Teilchen vorbeiströmt.
5. Verfahren gemäß Anspruch 4, bei dem die elektrischen Feldkräfte durch Elektrodenmittel erzeugt werden, die sich mindestens teilweise entlang der Strömungsrichtung über die Länge der porösen Wand erstrecken, wobei während des Strömens der Führungsflüssigkeit mit den zu trennenden Teilchen durch die poröse Wand die Strömungsgeschwindigkeit, der pH-Wert und/oder die elektrischen Felder der Elektrodenmittel variiert werden.

6. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die zu trennenden Teilchen ampholytische Moleküle oder andere Teilchen, synthetische Partikel oder biologische Zellen, Viren oder andere biologische Objekte umfassen, deren elektrische Eigenschaften den elektrischen Eigenschaften ampholytischer Moleküle entsprechen.

7. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 2 bis 6, bei dem zur Reinigung der Führungsflüssigkeit Teilchen, die aus der Führungsflüssigkeit entfernt werden sollen, durch die Auffangmittel aus der Führungsflüssigkeit bewegt werden.

8. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 4 bis 7, bei dem die Strömungsgeschwindigkeit der Führungsflüssigkeit zumindest zeitweise verringert oder auf null abgesenkt wird, wenn die zu trennenden Teilchen den elektrischen Feldkräften ausgesetzt sind.

9. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 4 bis 8, bei dem eine Probe mit den zu trennenden Teilchen und/oder die Führungsflüssigkeit über Mikrokanäle in der porösen Wand zugeführt werden.

10. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem der pH-Wert einer Probenlösung, mit der die Teilchen der Führungsflüssigkeit zugeführt werden, der Führungsflüssigkeit und/oder der Umgebungslösung unabhängig eingestellt werden, so daß sich am Auffangmittel vorbestimmte pH-Gradienten bilden.

11. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, bei dem der pH-Wert einer Probenlösung, in der die zu trennenden Teilchen der Führungsflüssigkeit zugeführt werden, und/oder der Führungsflüssigkeit durch diffusive Austauschprozesse mit der Umgebungslösung eingestellt wird.

12. Vorrichtung zur isoelektrischen Teilchentrennung, die enthält:

- Elektrodenmittel zur Bildung eines elektrischen Feldes in einer Führungsflüssigkeit mit Teilchen, deren elektrische Nettoladung oder Ladungsdichte vom pH-Wert der Führungsflüssigkeit abhängt,
- pH-Einstellmittel, die dazu eingerichtet sind, den pH-Wert der Führungsflüssigkeit derart einzustellen, daß mindestens eine vorbestimmte Teilchenart von den Teilchen in der Führungsflüssigkeit unter Wirkung des elektrischen Feldes eine ladungsabhängige Bewegungsänderung erfährt, und
- Auffangmittel, die zwischen den Elektrodenmitteln und der Führungsflüssigkeit angeordnet und zur lösbaren Fixierung geladener Teilchen eingerichtet sind.

13. Vorrichtung gemäß Anspruch 12, bei der die Auffangmittel mindestens ein Kompartiment zur Aufnahme der Führungsflüssigkeit oder zur Führung einer Führungsflüssigkeitsströmung bilden.

14. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 12 oder 13, bei der die Auffangmittel eine teildurchlässige oder poröse Wandung besitzen.

15. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 12 bis 14, bei der die Auffangmittel durch mindestens eine Hohlfaser mit poröser Wandung und/oder poröse Membranen oder Lamellen gebildet werden.

16. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 12 bis 15, bei der die Auffangmittel mit den Elektrodenmitteln in einem Reaktionsraum angebracht sind, der eine Umgebungslösung enthält, deren pH-Wert mit den pH-Einstellmitteln einstellbar ist.

17. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 14 bis 16, bei der die Durchlässigkeit der Wandung durch Variation der Größe und/oder der Form der Poren in der Wandung entlang eines von der Führungsflüssigkeit durchströmten Bereiches derart verändert ist, daß die Wandung mindestens abschnittsweise nur für vorbestimmte Ionen der Führungsflüssigkeit und Umgebungslösung und/oder für mindestens eine Teilchenart der zu trennenden Teilchen durchlässig ist.

18. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 12 bis 17, bei der die Auffangmittel auf der zur Führungsflüssigkeit gewandten Seite eine Modifizierungsschicht aufweisen, die zum Anhaften oder zur Aufnahme der abzutrennenden Teilchen eingerichtet ist.

19. Vorrichtung gemäß Anspruch 18, bei der die Modifizierungsschicht durch Gele, Mikropartikelsuspensionen und/oder Granulate gebildet wird.

20. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 12 bis 19, bei der die Elektrodenmittel eine Vielzahl von Elektroden umfassen, die auf der der Führungsflüssigkeit abgewandten Seite entlang der Strömungsrichtung der Führungsflüssigkeit an den Auffangmitteln angeordnet sind.

21. Vorrichtung gemäß Anspruch 20, bei der eine Steuereinrichtung vorgesehen ist, mit der die Elektroden selektiv derart ansteuerbar sind, daß ein zeitlich und räumlich veränderliches Spannungsgefälle ausgebildet wird.

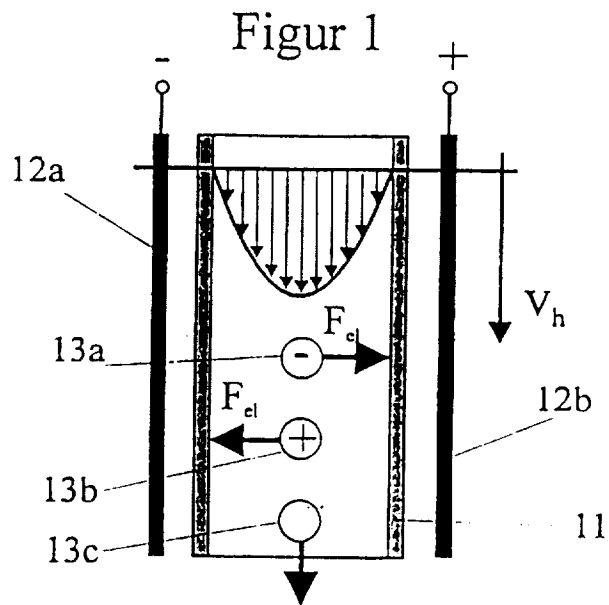
22. Vorrichtung gemäß Anspruch 20, bei der die Auffangmittel durch eine Hohlfaser gebildet werden, die in vorbestimmtem Abstand um mindestens eine der Elektroden wie eine Umwicklung gelegt ist.

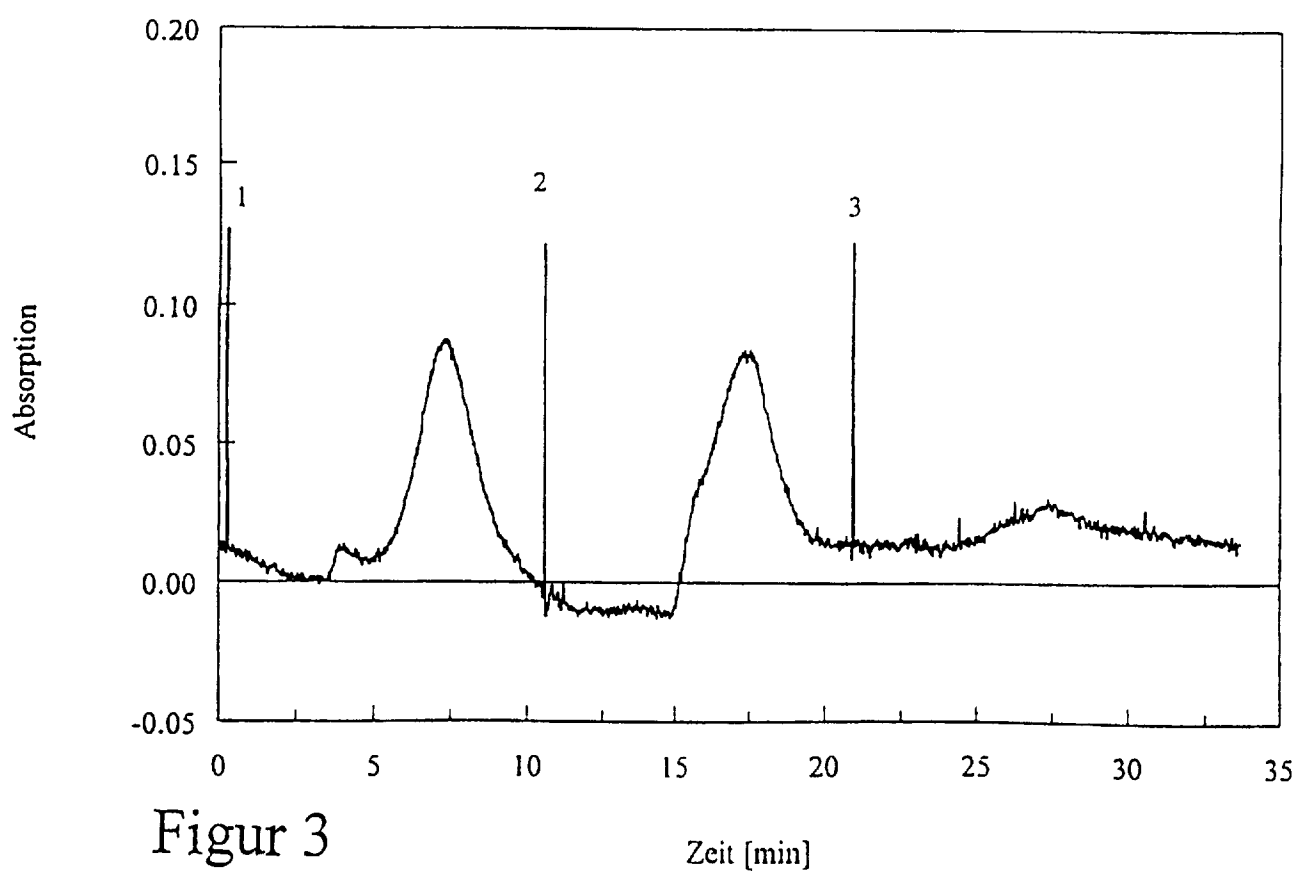
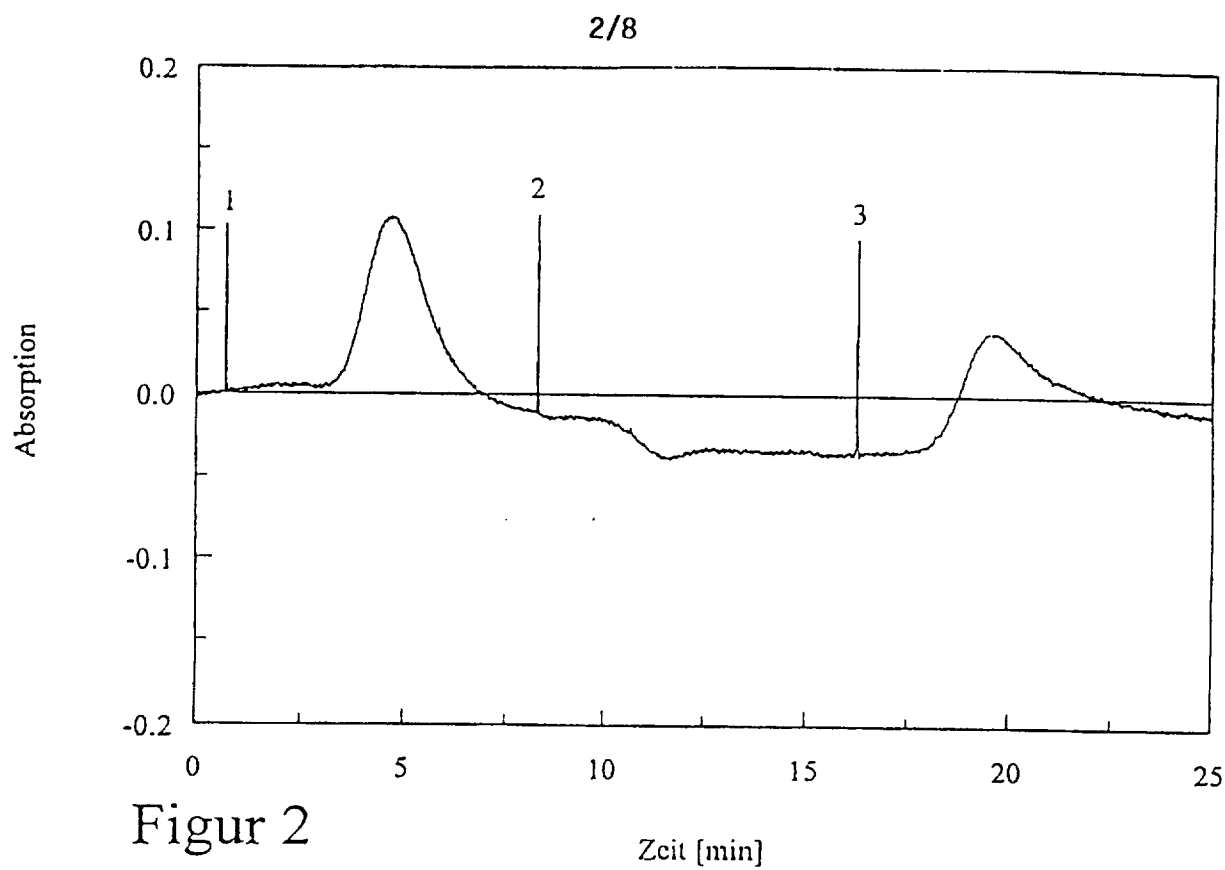
23. Vorrichtung gemäß Anspruch 20, bei der die Elektroden auf der von der Führungsflüssigkeit abgewandten Oberfläche der Auffangmittel befestigt sind und die Oberfläche zumindest teilweise bedecken.

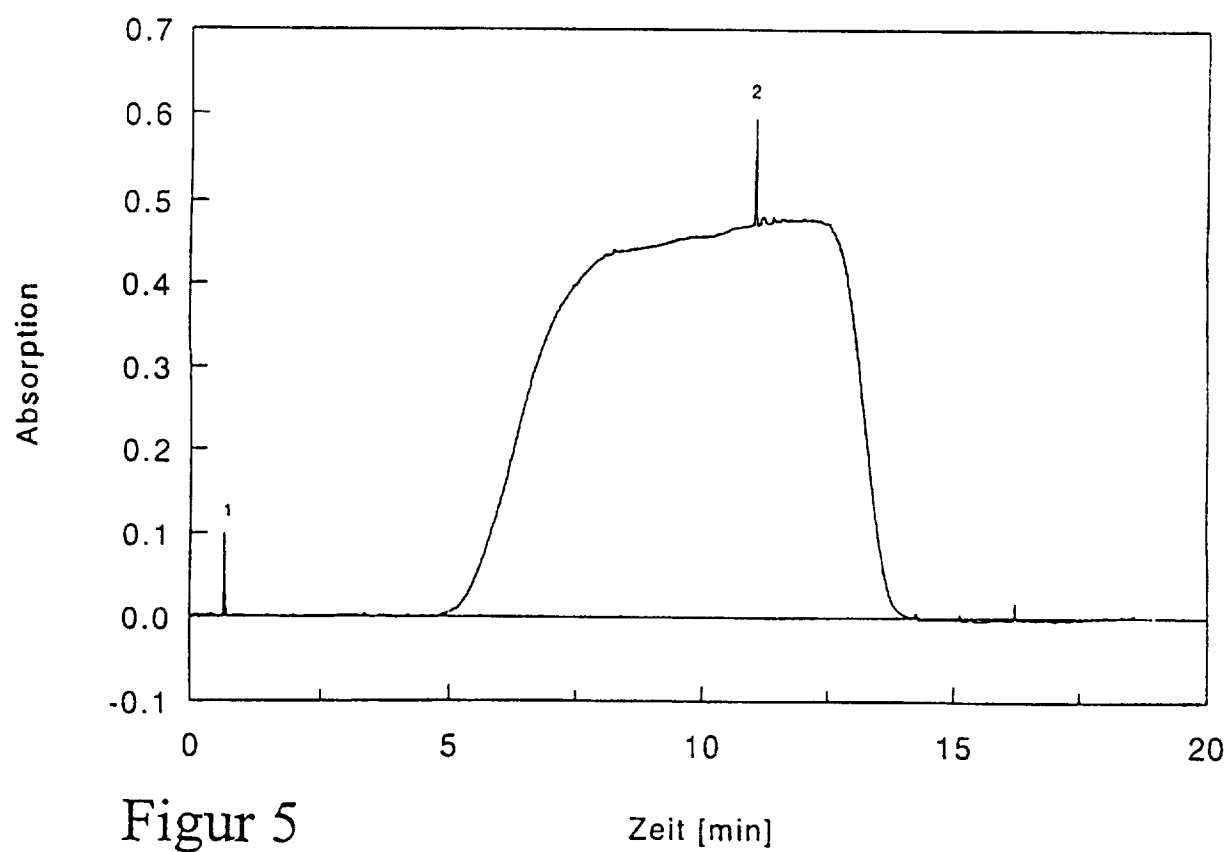
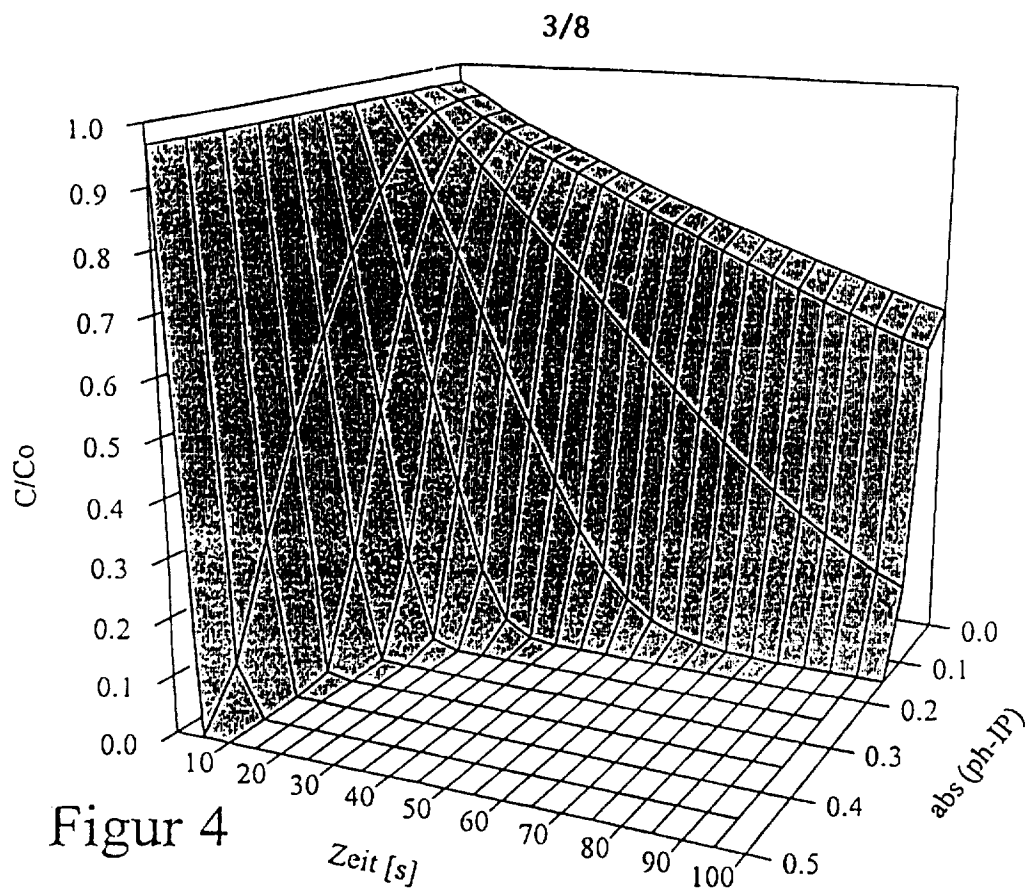
24. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 20 bis 23, bei der eine Mehrzahl von Trennräumen, die jeweils die Elektrodenmittel, die Auffangmittel und Kompartimente zur Führung der Führungsflüssigkeit enthalten, kaskadenartig, seriell oder parallel verbunden ist.

25. Verwendung einer Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 12 bis 24 für:

- die Trennung mindestens einer Teilchenart aus der Führungsflüssigkeit zur Gewinnung einer gereinigten Fraktion der abgetrennten Teilchen und/oder einer gereinigten Führungsflüssigkeit,
- die Ermittlung elektrischer und thermodynamischer Eigenschaften von Substanzen, wie die Ermittlung des isoelektrischen Punkts, von Titrationskurven oder des Aggregationsverhaltens,
- die Aufkonzentrierung einer Teilchenlösung oder -suspension, oder
- die Verringerung der Ionenstärke der Führungsflüssigkeit.

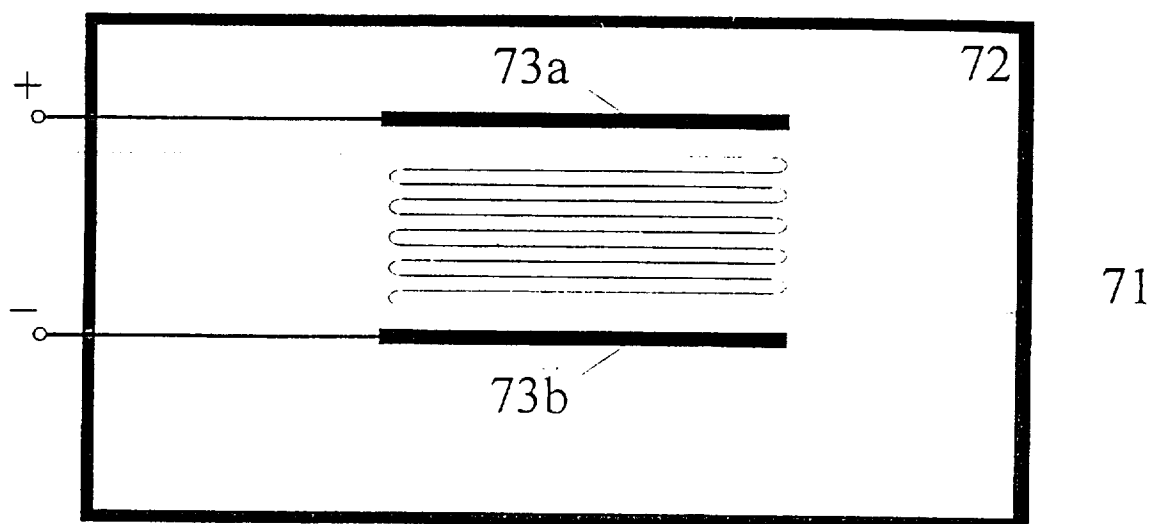






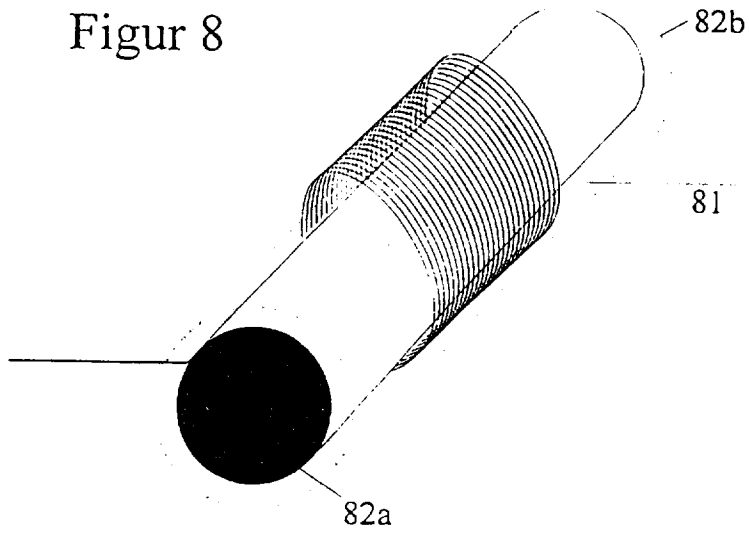
5/8

Figur 7

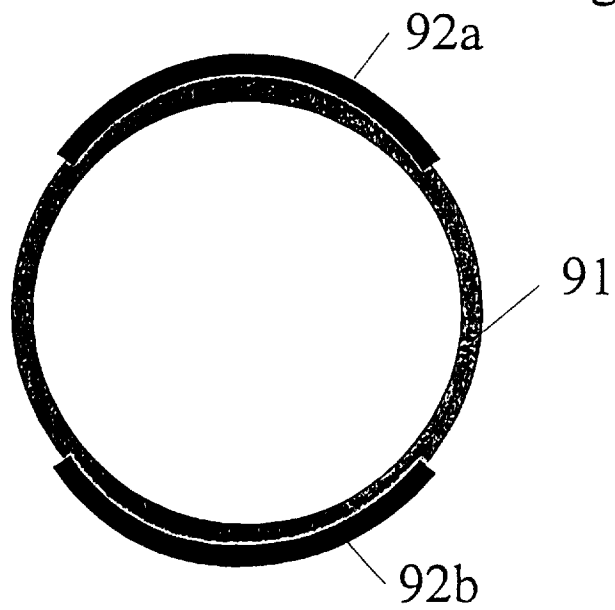


6/8

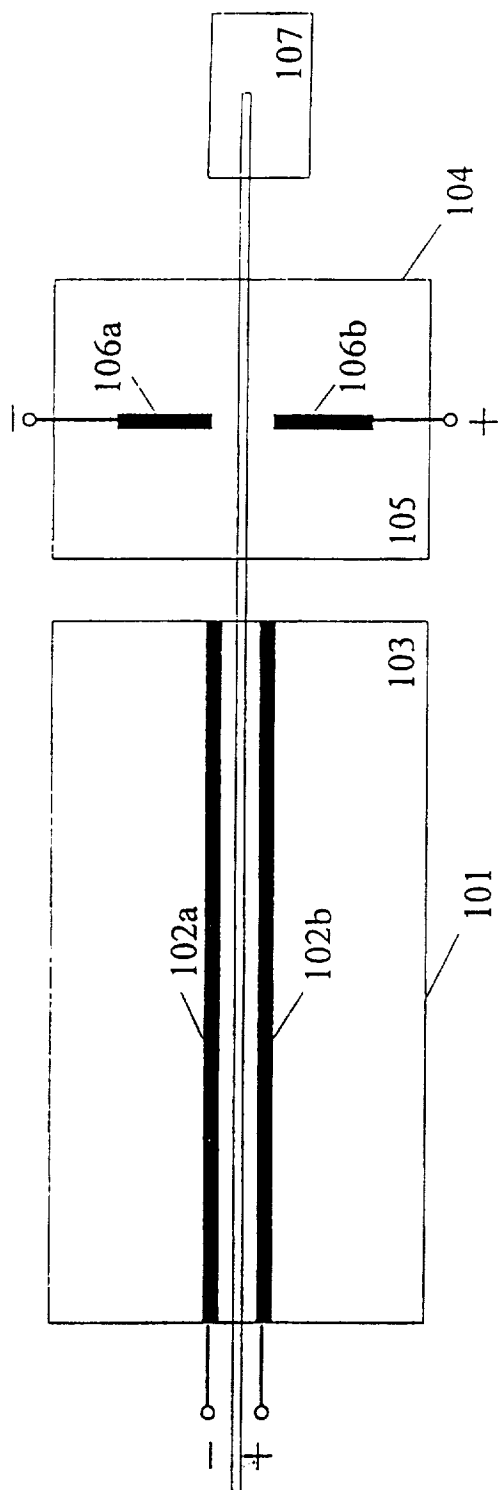
Figur 8



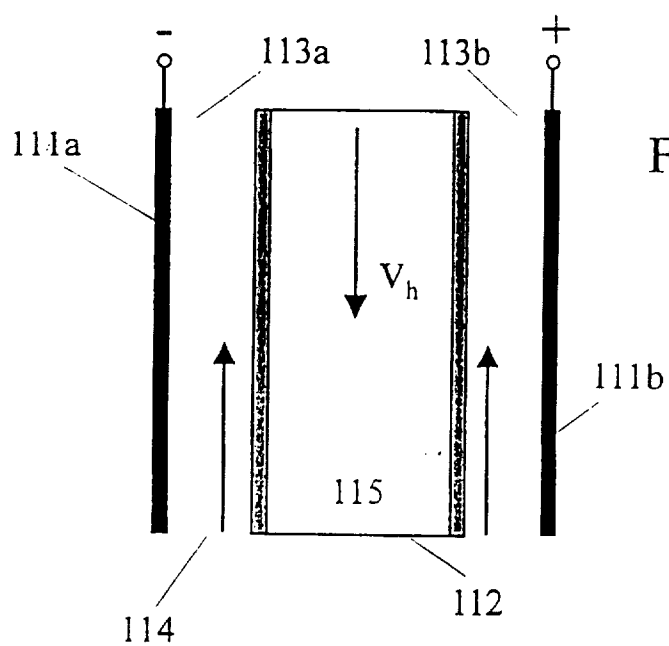
Figur 9



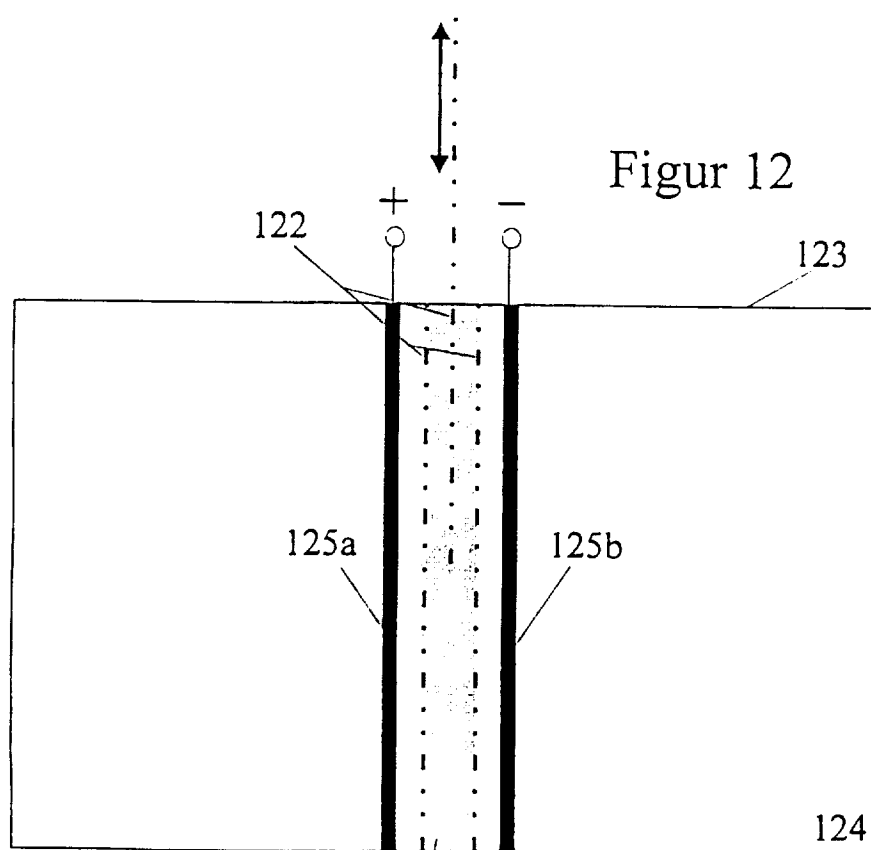
Figur 10



8/8



Figur 11



Figur 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC1/EP 97/05295

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 G01N30/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2 555 487 A (G. HAUGAARD ET AL.) 5 June 1951 see column 1, line 51 - column 2, line 20 see column 3, line 33-54 see figure 5	1-3, 12, 13, 25
A	--- CHMELIK J ET AL: "SEPARATION OF TWO COMPONENTS OF HORSE MYOGLOBIN BY ISOELECTRIC FOCUSING FIELD-FLOW FRACTIONATION" ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 61, no. 8, 15 April 1989, pages 912-914, XP000115300 --- -/-	1, 12

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"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

5 January 1998

Date of mailing of the international search report

15/01/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Zinngrebe, U

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PC1/EP 97/05295

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHMELIK J: "ISOELECTRIC FOCUSING FIELD-FLOW FRACTIONATION EXPERIMENTAL STUDY OF THE GENERATION OF PH GRADIENTA" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, vol. 539, no. 1, 8 February 1991, pages 111-121, XP000173656 ----	1,12
A	CHMELIK J: "ISOELECTRIC FOCUSING FIELD-FLOW FRACTIONATION II. EXPERIMENTAL STUDY OF FOCUSING OF METHYL RED IN THE TRAPEZOIDAL CROSS-SECTION CHANNEL" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, vol. 545, no. 2, 7 June 1991, pages 349-358, XP000216695 ----	1,12
A	US 5 160 625 A (JOENSSON JAN A ET AL) 3 November 1992 see column 3, line 1 - column 4, line 25; figure 2 ----	4,8,14, 15
A	US 5 133 844 A (STEVENS FRED J) 28 July 1992 see column 3, line 45 - column 4, line 10 see column 5, line 55 - column 7, line 4; figures 2A-2F ----	5
A	WO 94 00215 A (UNIV IOWA RES FOUND) 6 January 1994 see abstract; figure 1 -----	1,12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 97/05295

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2555487 A	05-06-51	NONE	
US 5160625 A	03-11-92	AT 119062 T DE 68921458 D DE 68921458 T EP 0380605 A JP 2504677 T WO 8911898 A	15-03-95 06-04-95 09-11-95 08-08-90 27-12-90 14-12-89
US 5133844 A	28-07-92	NONE	
WO 9400215 A	06-01-94	NONE	

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 6 G01N30/00

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 G01N

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)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 2 555 487 A (G. HAUGAARD ET AL.) 5. Juni 1951 siehe Spalte 1, Zeile 51 - Spalte 2, Zeile 20 siehe Spalte 3, Zeile 33-54 siehe Abbildung 5	1-3, 12, 13, 25
A	CHMELIK J ET AL: "SEPARATION OF TWO COMPONENTS OF HORSE MYOGLOBIN BY ISOELECTRIC FOCUSING FIELD-FLOW FRACTIONATION" ANALYTICAL CHEMISTRY, Bd. 61, Nr. 8, 15. April 1989, Seiten 912-914, XP000115300 --- -/--	1, 12



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

^o Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

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

"E" älteres Dokument, 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 erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

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

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

5. Januar 1998

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

15/01/1998

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Zinngrebe, U

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	CHMELIK J: "ISOELECTRIC FOCUSING FIELD-FLOW FRACTIONATION EXPERIMENTAL STUDY OF THE GENERATION OF PH GRADIENTA" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, Bd. 539, Nr. 1, 8. Februar 1991, Seiten 111-121, XP000173656 ---	1,12
A	CHMELIK J: "ISOELECTRIC FOCUSING FIELD-FLOW FRACTIONATION II. EXPERIMENTAL STUDY OF FOCUSING OF METHYL RED IN THE TRAPEZOIDAL CROSS-SECTION CHANNEL" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, Bd. 545, Nr. 2, 7. Juni 1991, Seiten 349-358, XP000216695 ---	1,12
A	US 5 160 625 A (JOENSSON JAN A ET AL) 3. November 1992 siehe Spalte 3, Zeile 1 - Spalte 4, Zeile 25; Abbildung 2 ---	4,8,14, 15
A	US 5 133 844 A (STEVENS FRED J) 28. Juli 1992 siehe Spalte 3, Zeile 45 - Spalte 4, Zeile 10 siehe Spalte 5, Zeile 55 - Spalte 7, Zeile 4; Abbildungen 2A-2F ---	5
A	WO 94 00215 A (UNIV IOWA RES FOUND) 6. Januar 1994 siehe Zusammenfassung; Abbildung 1 -----	1,12

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/05295

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 2555487 A	05-06-51	KEINE	
US 5160625 A	03-11-92	AT 119062 T	15-03-95
		DE 68921458 D	06-04-95
		DE 68921458 T	09-11-95
		EP 0380605 A	08-08-90
		JP 2504677 T	27-12-90
		WO 8911898 A	14-12-89
US 5133844 A	28-07-92	KEINE	
WO 9400215 A	06-01-94	KEINE	