



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 100 63 097 B4 2007.04.19**

(12)

Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **100 63 097.9**
 (22) Anmeldetag: **18.12.2000**
 (43) Offenlegungstag: **04.07.2002**
 (45) Veröffentlichungstag
 der Patenterteilung: **19.04.2007**

(51) Int Cl.⁸: **B01D 57/02 (2006.01)**

Innerhalb von drei Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 2 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:
**Becton, Dickinson and Co., Franklin Lakes, N.J.,
 US**

(72) Erfinder:
Weber, Gerhard, Dr., 85551 Kirchheim, DE

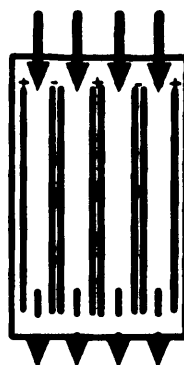
(74) Vertreter:
**Patentanwälte von Kreisler, Selting, Werner et col.,
 50667 Köln**

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
 gezogene Druckschriften:
DE 22 15 761 A1
EP 04 97 077 A1
EP 02 03 713 A2

(54) Bezeichnung: **Elektrophoresevorrichtung**

(57) Hauptanspruch: Elektrophoresevorrichtung zur trägerfreien elektrophoretischen Trennung einer Probensubstanz in ihre Analyten mit

- einer ersten Trennstufe zur Grobfractionierung der Probensubstanz, die einen Probeneingang und einen Fraktionsausgang aufweist, und
- wenigstens einer zweiten Trennstufe zur Feinfraktionierung der Probensubstanz, wobei
- der Fraktionsausgang wenigstens einer Trennstufe eine Verbindung zum Probeneingang einer anderen Trennstufe hat,
- gekennzeichnet durch
- wenigstens eine Trennkammer, in der mehrere separate Trennräume mit separaten Elektroden, separaten Fraktionsausgängen und separaten Probeneingängen ausgebildet sind, die zu einer oder mehreren Stufen gehören.



4 separate Medienzuführungen

4 separate Trennräume

**4 separate Fraktionierungen
 mit je n-Fraktionierstellen
 n < 15**

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft eine Elektrophoresevorrichtung zur trägerfreien elektrophoretischen Trennung einer Probensubstanz nach dem Gattungsbegriff des Patentanspruchs 1. Eine derartige Elektrophoresevorrichtung ist aus der EP 0 497 077 A1 bekannt.

[0002] Wenn die trägerfreie Elektrophorese FFE im Bereich der Proteomics-Forschung eingesetzt werden soll, muß es möglich sein, eine Vielzahl von unterschiedlichen Probesubstanzen in kurzer Zeit, mit größtmöglicher Trennleistung und bei größtmöglichem Durchsatz an Probenmenge zu trennen.

[0003] Wie bei den meisten Trennverfahren ist jedoch auch bei der FFE eine gleichzeitige Optimierung der Elektrophoresevorrichtung hinsichtlich der Trennleistung und des Probendurchsatzes nur in sehr engen Grenzen möglich, da eine Erhöhung der Menge der Probesubstanz eine Minderung der Trennleistung zur Folge hat.

[0004] Die Optimierung der Trennleistung erfordert weiterhin einen Trennraum mit einem möglichst engen und präzisen Trennkammerspalt sowie besondere Randbedingungen der Trennung wie z.B. eine relativ geringe lineare Flußgeschwindigkeit, eine möglichst lange Trennzeit und möglichst viele Fraktionierstellen über die gesamte Breite des Trennraumes bzw. über den Bereich des Trennraumes, in dem die interessierende Probesubstanz fraktioniert werden soll. Da aber die lineare Flußgeschwindigkeit nicht beliebig reduziert werden kann, erfordert eine Verlängerung der Trennzeit eine entsprechende Vergrößerung der Länge der Elektroden. Das wiederum bedeutet eine gleichzeitige Erhöhung der Außendimensionen der Trennkammer, was es schwierig bis unmöglich macht, den Trennkammerspalt mit der geforderten Präzision zu fertigen.

Stand der Technik

[0005] Aus der DE 2215761 A1 ist eine Elektrophoresevorrichtung bekannt, die nach dem Elektrofiltrationsverfahren arbeitet.

[0006] Die bekannte Elektrophoresevorrichtung weist eine Trennkammer, auf beiden Seiten der Trennkammer angeordnete Elektroden, Fraktionierstellen und Probeaufgabestellen auf, wobei in der Trennkammer mehrere Membrane vorgesehen sind, die die Trennkammer in eine Vielzahl von miteinander in Verbindung stehende Trennräume unterteilt. Die Membranen dienen als Filter und sind für die jeweils abzutrennenden Spezies permeabel.

[0007] Aus der EP 0203713 A2 ist es weiterhin bekannt, bei einer derartigen Elektrophoresevorrich-

tung für jeden der von den Membranen begrenzten Trennräume ein eigenes Elektrodenpaar vorzusehen.

Aufgabenstellung

[0008] Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe besteht daher darin, eine Elektrophoresevorrichtung nach dem Gattungsbegriff des Patentanspruchs 1 zu schaffen, die eine serielle und/oder parallele Arbeit der Trennstufen mit höherer Trennleistung, kürzerer Trennzeit und einem größeren Durchsatz erlaubt.

[0009] Diese Aufgabe wird gemäß der Erfindung durch eine Elektrophoresevorrichtung gelöst, die im Anspruch 1 angegeben ist. Besonders bevorzugte Weiterbildungen und Ausgestaltungen der erfindungsgemäßen Elektrophoresevorrichtung sind Gegenstand der Ansprüche 2 bis 10.

Ausführungsbeispiel

[0010] Im Folgenden werden anhand der zugehörigen Zeichnungen besonders bevorzugte Ausführungsbeispiele der Erfindung näher beschrieben. Es zeigen

[0011] [Fig. 1](#), [Fig. 2](#) und [Fig. 3](#) schematische Ansichten der Ausbildung der Trennkammer bei drei Ausführungsbeispielen der Erfindung,

[0012] [Fig. 4](#) und [Fig. 5](#) schematische Schnittansichten der Trennkammer bei einem Ausführungsbeispiel der Erfindung,

[0013] [Fig. 6](#) und [Fig. 7](#) den Aufbau des Trennkammervorderteils und des Trennkammerrückteils im Bereich der Medienzuführungen und Fraktionierung jeweils,

[0014] [Fig. 8](#), [Fig. 9](#) und [Fig. 10](#) die relative räumliche Anordnung der verschiedenen Fraktionierstellen und der Zuleitungen der Querströmungen und

[0015] [Fig. 11](#), [Fig. 12](#) und [Fig. 13](#) die Beeinflussung des Strömungsprofils mittels der Querströmung.

[0016] In den [Fig. 1](#), [Fig. 2](#) und [Fig. 3](#) sind schematisch drei Beispiele der Trennkammer bei verschiedenen Ausführungsbeispielen der erfindungsgemäßen Elektrophoresevorrichtung dargestellt. Damit die Trennkammer eine Außenabmessung hat, die eine Fertigung des Trennkammerspaltes mit der notwendigen Präzision erlaubt, sind in der Trennkammer mehrere separate Trennräume vorgesehen. Gemäß [Fig. 1](#) sind vier separate Trennräume mit vier separaten Medienzuführungen und vier separaten Fraktionierungen mit jeweils n Fraktionierstellen vorgese-

hen, wobei n kleiner 15 ist. [Fig. 2](#) zeigt eine Trennkammer mit zwei separaten Trennräumen und zwei separaten Medieneinlässen bei zwei separaten Fraktionierungen mit jeweils n Fraktionierstellen, wobei n größer 50 ist. [Fig. 3](#) zeigt schließlich eine Trennkammer mit drei separaten Trennräumen, drei separaten Medieneinlässen, zwei separaten Fraktionierungen mit n_1 und n_3 Fraktionierstellen, wobei n_1 kleiner 15 und n_3 größer 50 ist, und einer weiteren separaten Fraktionierung mit n_2 Fraktionierstellen, wobei n_2 größer 15 ist.

[0017] Die in den [Fig. 1](#) bis [Fig. 3](#) dargestellten Trennräume haben je nach Ausführungsform separate Elektroden oder gemeinsame Elektroden mit den benachbarten Trennräumen, wenn identische Medien in den jeweiligen Elektrodenräumen verwendet werden können.

[0018] Mit den in den [Fig. 1](#) bis [Fig. 3](#) dargestellten Trennkammern, erfolgt eine trägerfreie Elektrophorese FFE zum Trennen von Probesubstanzen in ihre Analyten in Form eines wenigstens zweistufigen Verfahrens, wobei in der ersten Stufe eine Grobfraktionierung der Probesubstanz und in wenigstens einer zweiten Stufe eine Feinfraktionierung der grobfraktionierten Probesubstanz erfolgt.

[0019] Dieses Verfahren kann im parallelen Simultanbetrieb oder im seriellen Betrieb durchgeführt werden, wobei die in den [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#) dargestellten Trennräume im parallelen Simultanbetrieb als Trennraum für die Grobfraktionierung ([Fig. 1](#)) und als Trennraum für die Feinfraktionierung ([Fig. 2](#)) verwendet werden können. [Fig. 3](#) zeigt den Trennraum für den seriellen Betrieb in Form eines dreistufigen Verfahrens, bei dem die Grobfraktionierung in Serie mit einer zweistufigen Feinfraktionierung kombiniert ist.

[0020] Bei der parallelen Arbeitsweise kann entweder eine einzelne Probesubstanz gleichzeitig mehreren Trennräumen zudosiert werden oder es können verschiedene Probesubstanzen in die separaten Trennräume appliziert werden. Die Trennung der Probesubstanzen im parallelen Simultanverfahren ermöglicht eine Erhöhung des Durchsatzes der Probesubstanzen oder eine Erhöhung der Anzahl der Probesubstanzen.

[0021] Durch eine Verkürzung der Breite der separaten Trennräume lassen sich die Wanderungstrecken der Analyten verkürzen und können die Trennprozesse mit höherer Flußgeschwindigkeit der Trennmedien und der Probesubstanzen durchgeführt werden. Mit zunehmender Zahl der Trennräume wird die Breite der Trennräume wesentlich kleiner, was allerdings zur Folge hat, daß zwar nur eine Grobfraktionierung aber mit wesentlich höherem Probendurchsatz möglich ist.

[0022] Wenn die Trennräume mit völlig getrennten Elektrodenräumen in Serie geschaltet sind, werden die Fraktionen der Trennung aus einem Trennraum in den nachfolgenden Trennräumen unter, identischen Trennbedingungen weiter getrennt und läßt sich dadurch eine höhere Trennleistung erzielen. In den in Serie geschalteten Trennräumen können die Trennungen aber auch unter verschiedenen Bedingungen hinsichtlich der verwendeten Trenntechniken, der Trennmedien und/oder der allgemeinen elektrophoretischen Trennparameter durchgeführt werden.

[0023] Die Trennräume und die technischen Ausführungen der einzelnen Trennräume lassen sich mittels des oben beschriebenen Aufbaus fast beliebig kombinieren, wie es im Folgendem beschrieben wird.

[0024] Wie es in den [Fig. 4](#) und [Fig. 5](#) dargestellt ist, besteht eine Trennkammer üblicherweise aus zwei Baugruppen, nämlich dem Trennkammervorderteil und dem Trennkammerrückteil. Bei der erfindungsgemäßen Ausbildung bestehen die einzelnen Baugruppen jedoch aus mehreren separaten Bauelementen, die schematisch in [Fig. 4](#) und [Fig. 5](#) dargestellt sind.

[0025] Das heißt im Einzelnen, daß in der in [Fig. 4](#) dargestellten Weise ein Trennkammervorderteil aus einem Kunststoffblock **1** mit einer Hartplastikfolie **2** und eine Weichplastikfolie **3** sowie ein Trennkammerrückteil aus einem Metallblock **8** mit einer Glasfolie **10** und einer Weichplastikfolie **11** über Abstandhalter **5** aneinander angeordnet sind. Im Kunststoffblock **1** sind mehrere, bei dem dargestellten Ausführungsbeispiel vier, Elektrodenräume **4** vorgesehen. Im Metallblock **8** befinden sich Kühlrohre **9**. Es sind weiterhin Medieneinlässe **7** und eine Vielzahl von Fraktionierungsstellen **6** vorgesehen. [Fig. 5](#) zeigt die Übertragung **12** der vorfraktionierten Probe.

[0026] Die Baugruppe des Trennkammervorderteils in [Fig. 4](#) besteht somit aus einem Basisbaustein, nämlich einem massiven Plexiglasblock **1**, in dem bis zu acht Elektrodenräume **4** und die Öffnungen für spezifische Methodenmodule der Medienzuführungen und der Fraktionierungen untergebracht sind. Auf diesen Basisbaustein **1** ist eine dünne Folie **2** aus einem harten Kunststoffmaterial aufgebracht, wobei diese im Bereich der für die jeweiligen Anwendung benötigten Elektrodenräume des Kunststoffblockes **1** Öffnungen für den Stromtransport aufweist und die benötigten Elektrodenräume des Kunststoffblockes **1** nicht verschleißt. Das gleiche gilt für die Ausführung der Hartplastikfolie **2** im Bereich der Medienzuführungen **7** und der Fraktionierungen **6**. Die dem Trennraum zugewandte Fläche der Hartplastikfolie **2** kann entweder direkt chemisch modifiziert sein oder in der dargestellten Weise durch eine Kunststoffolie **3** abgedeckt sein, deren Oberfläche, die den Trennraum direkt begrenzt, soweit chemisch modifiziert ist, daß die

Effekte der Elektroosmose und der Sorption der Probenpezies minimiert sind.

[0027] Durch die beschriebene Kombination des Basisbausteines, nämlich des Kunststoffblockes **1**, mit den beiden Kunststoffolien **2**, **3**, die anwendungsspezifisch modifiziert sind, können alle beschriebenen Anforderungen hinsichtlich der Anzahl der notwendigen Trennstufen, der Geometrie des Trennraumes und der speziellen elektrophoretischen Randbedingungen in der jeweiligen Stufe des Trennprozesses erfüllt werden.

[0028] In den [Fig. 6](#) und [Fig. 7](#) ist der Aufbau des Trennkammervorderteils und Trennkammerrückteils jeweils im Einzelnen dargestellt. Wie es in [Fig. 7](#) dargestellt ist, besteht der Trennkammerrückteil aus mehreren Schichten, nämlich dem Metallblock **8**, der Glasfolie **10** und der Weichplastikfolie **11**. Diese Schichten können in verschiedener Weise kombiniert werden, um die Trennvorrichtung für die jeweilige Anwendung zu optimieren.

[0029] Der Basisbaustein des Trennkammerrückteils ist somit ein massiver Metallblock **8**, der in Verbindung mit einer externen Kühlung eine effektive Abführung der während der elektrophoretischen Trennung entwickelten Wärme ermöglicht. Die dem Trennraum zugewandte Oberfläche des Metallblockes **8** ist durch die elektrisch isolierende dünne Folie **10** aus Glas oder eine Keramikfolie abgedeckt, wobei diese elektrisch isolierte Folie durch die Kunststoffolie **11** abgedeckt ist, deren Oberfläche, die den Trennraum direkt begrenzt, chemisch so modifiziert ist, daß eine Optimierung des Trennvorganges erzielt ist. In der Regel können die dem Trennraum zugewandten Kunststoffolien, das heißt die Folien **3** und **11** hinsichtlich ihres Materials und der Art der chemischen Modifizierung identisch oder ähnlich sein, sie können bei bestimmten Verfahrenskombinationen aber auch unterschiedlich sein.

[0030] In den [Fig. 8](#), [Fig. 9](#) und [Fig. 10](#) sind verschiedene Fraktioniermodule dargestellte, die bei dem erfindungsgemäßen Verfahren verwandt werden können. Der Fraktionierungsmodul in [Fig. 8](#) enthält in der Standardausführung drei Auslässe für die Fraktionierung, wobei bei besonderen Anwendungen fünf oder sieben Fraktionsauslässe vorgesehen sind, wie es in [Fig. 9](#) und [Fig. 10](#) jeweils dargestellt ist. Dabei ist die Flußrichtung des Trennmediums durch einen Pfeil **13** wiedergegeben und sind die Zuführungsstellen **14** für die Querströmung, die n Fraktionierstellen **15** für die Probensubstanz, und $n + 1$ Auslässe **16** für das restliche Medium dargestellt.

[0031] Im Betrieb werden zwei separate Förderkanäle mit identischer Förderrate einer Dosierpumpe werden mit dem Trennraum jeweils im Bereich der elektrodennahen Fraktionierungsauslässe verbun-

den, wobei je nach Drehrichtung der Förderpumpe über eine Verbindung zu dem elektrodennahen Trennraum ein Medium zugegeben wird und gleichzeitig über eine zweite Verbindung ein Medium aus dem Trennraum mit derselben Volumenrate abgeführt wird. Durch die gleichzeitige Zugabe und Abführung des Mediums im elektrodennahen Trennraum wird das Strömungsprofil im Bereich der Fraktionierstelle der Probe verändert, wie es in den [Fig. 11](#), [Fig. 12](#) und [Fig. 13](#) dargestellt ist.

[0032] [Fig. 11](#) zeigt zwei Analyten **17**, **18**, eine Pumpe **21** für die Querströmung, die Zuleitung **20** für die Querströmung und die Maske **19** für das Strömungsprofil. In [Fig. 11](#) ist ein Strömungsprofil ohne Querströmung dargestellt, [Fig. 12](#) zeigt das Profil bei angeschalteter Querströmung und [Fig. 13](#) zeigt das Strömungsprofil bei angeschalteter Querströmung aber mit umgekehrter Drehrichtung der Pumpe **21**.

[0033] Im Folgendem wird ein präparativer Langzeitversuch, das heißt der Betrieb des Fraktionsmoduls bei zwei typischen alternativen Anwendungen, beschrieben:

Bei der präparativen Isolierung einer beliebigen getrennten Substanz wird die Förderrate der zweikanaligen Pumpe so gewählt, daß die zu isolierende Substanz über einen der dafür vorgesehenen Probenauslässe gesammelt werden kann. Die Förderrate der Zweikanalpumpe bleibt während der Dauer der präparativen Isolierung unverändert. Kann der im Probenfraktionierschlauch abfließende Analyt nur mit geringer Zeitverzögerung quantitativ detektiert werden, kann das Signal der Detektion für die Steuerung des Trennverfahrens dahingehend genutzt werden, daß der Analyt mit bester Ausbeute und Reinheit isoliert werden kann.

[0034] Wird während der elektrophoretischen Trennung die Förderrate der Pumpe jedoch kontinuierlich verändert, werden nacheinander getrennte Substanzen über die Probenfraktionierstelle gesammelt. Durch die Änderung der Förderrate und durch die Änderung der Drehrichtung der Zweikanalpumpe können alle getrennten Spezies nacheinander über die Fraktionierstelle eluiert werden und nachfolgend einem Detektionssystem und einem Fraktionssammler mit zeitgesteuertem oder peakgesteuertem Wechsel der Sammelgefäße zugeführt werden.

[0035] Wenn eine örtliche Verschiebung der Probenbande um mehr als 20 mm in Richtung der Probenfraktionierstelle erzielt werden muß, empfiehlt sich eine Erhöhung der Anzahl der Probenfraktionierungsauslässe, wobei diese Anzahl bei höheren Werten der Breite des Trennraumes beliebig erhöht werden kann, um eine optimale Qualität der Elution der Proben zu ermöglichen.

Patentansprüche

1. Elektrophoresevorrichtung zur trägerfreien elektrophoretischen Trennung einer Probensubstanz in ihre Analyten mit

– einer ersten Trennstufe zur Grobfractionierung der Probensubstanz, die einen Probeneingang und einen Fraktionsausgang aufweist, und wenigstens einer zweiten Trennstufe zur Feinfraktionierung der Probensubstanz, wobei

– der Fraktionsausgang wenigstens einer Trennstufe eine Verbindung zum Probeneingang einer anderen Trennstufe hat,

gekennzeichnet durch

– wenigstens eine Trennkammer, in der mehrere separate Trennräume mit separaten Elektroden, separaten Fraktionsausgängen und separaten Probeneingängen ausgebildet sind, die zu einer oder mehreren Stufen gehören.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass jede Trennstufe mehrere Trennräume umfasst, die in einer gemeinsamen Trennkammer jeweils ausgebildet sind.

3. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Trennstufen so geschaltet sind, dass Fraktionierungen parallel simultan zueinander ausgeführt werden können.

4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Trennstufen so geschaltet sind, dass parallele simultane Fraktionierungen kombiniert mit seriellen Fraktionierungen ausgeführt werden können.

5. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass für benachbarte Trennräume gemeinsame Elektroden vorgesehen sind.

6. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Fraktionsausgänge verschiedene Anzahlen von Fraktionierstellen haben.

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

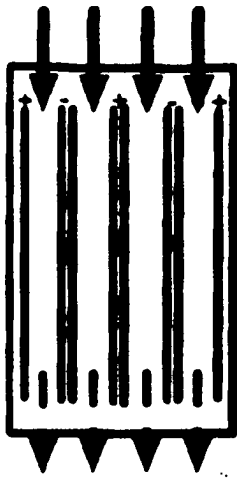
8. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Trennkammer aus einem Vorderteil und einem Rückteil aufgebaut ist, die aus mehreren separaten Kammerbauelementen jeweils bestehen.

9. Vorrichtung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Rückteil aus einem massiven Metallbock besteht.

10. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass im Metallblock Kühlrohre vorgesehen sind.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

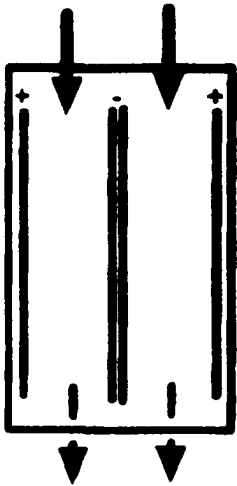


4 separate Medienzuführungen

4 separate Trennräume

4 separate Fraktionierungen
mit je n-Fraktionierstellen
 $n < 15$

Fig. 1



2 separate Medieneinlässe

2 separate Trennräume

2 separate Fraktionierungen
mit je n-Fraktionierstellen
 $n > 50$

Fig. 2



3 separate Medieneinlässe

1 separate Fraktionierung
mit Fraktionierstellen
 $n_2 > 15$

3 separate Trennräume

2 separate Fraktionierungen
mit Fraktionierstellen
 $n_1 < 15, n_3 > 50$

Fig. 3

→
Medieneinlässe

→
Fraktionierauslässe

---→
Teilstrom f. nächste Stufe

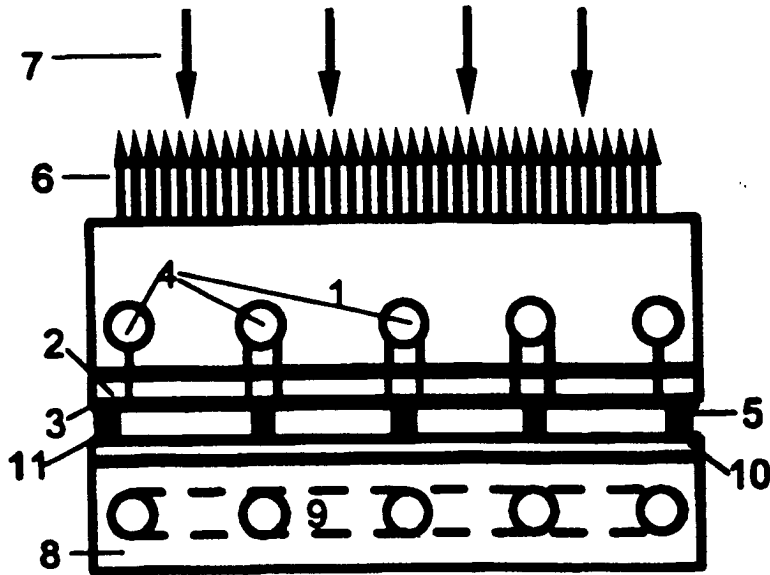


Fig. 4

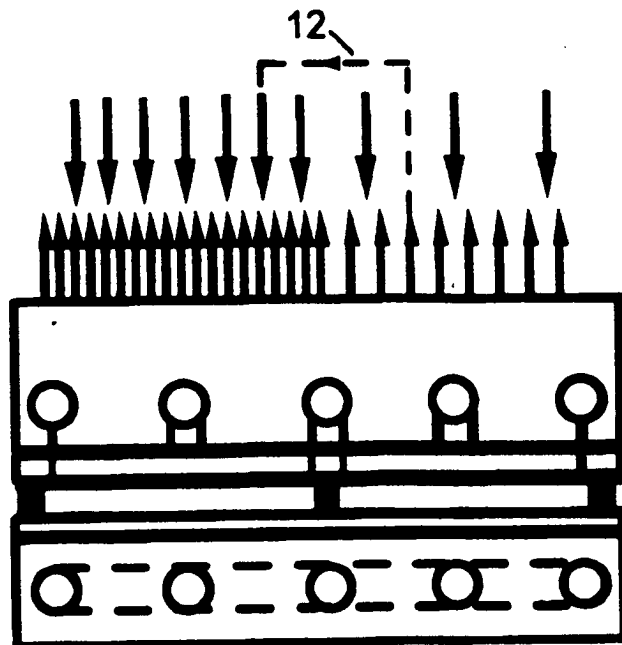


Fig. 5

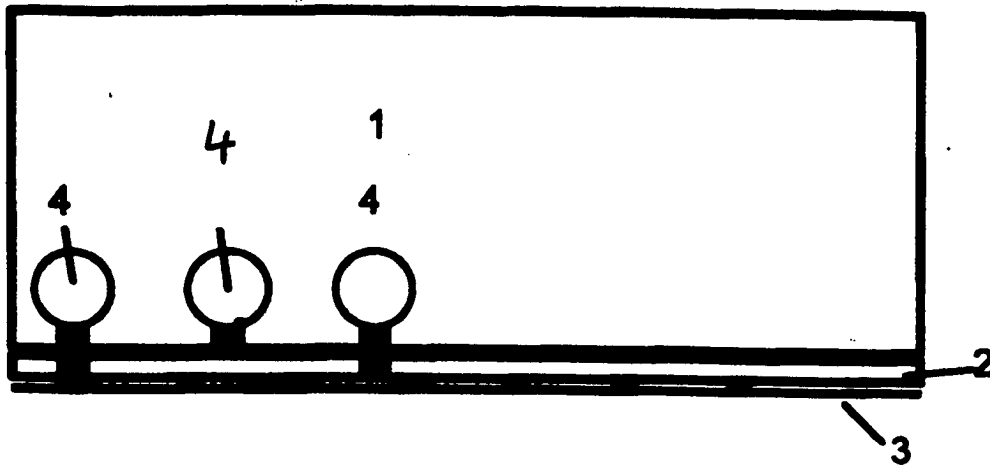


Fig. 6

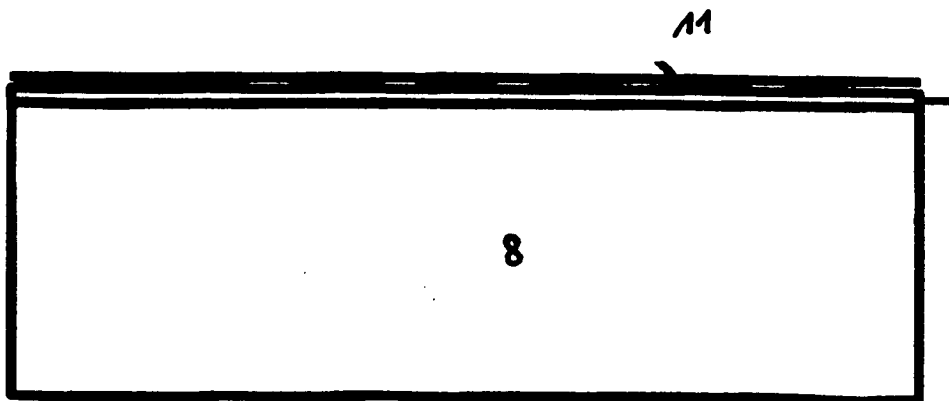
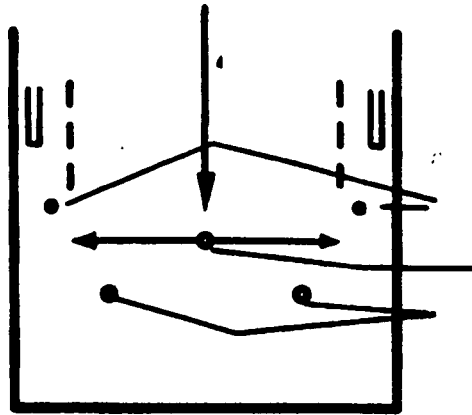
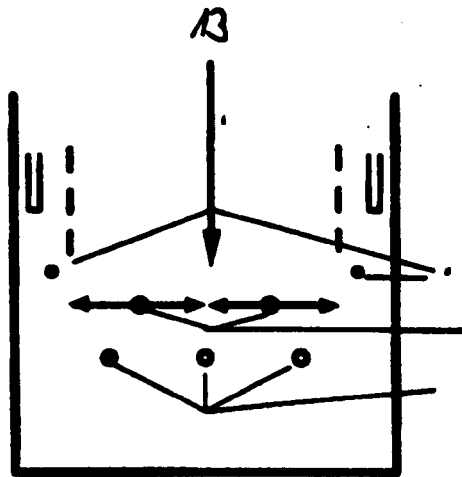


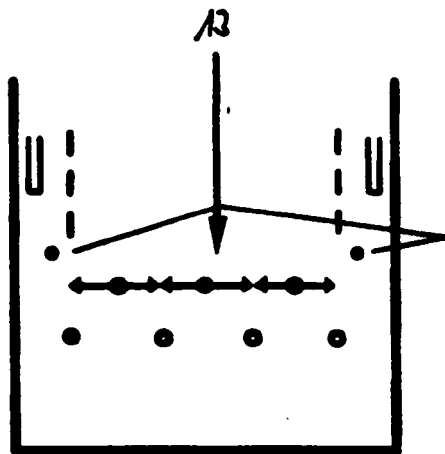
Fig. 7



14
15 Fig. 8
16



14
15 Fig. 9
16



14
15 Fig. 10
16

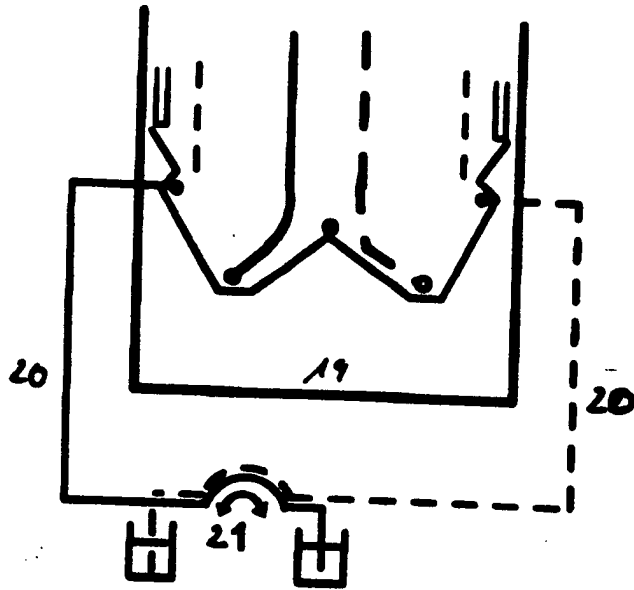


Fig. 11

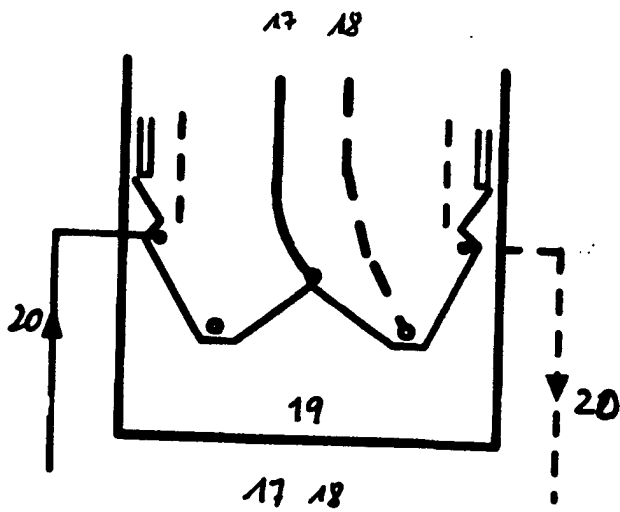


Fig. 12

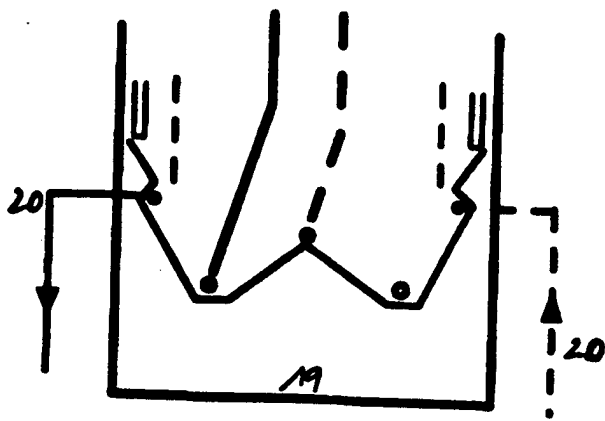


Fig. 13