



CONFÉDÉRATION SUISSE

OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

⑤ Int. Cl.³: C 25 B

7/00

Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein
 Traité sur les brevets, du 22 décembre 1978, entre la Suisse et le Liechtenstein



⑫ FASCICULE DU BREVET A5

⑪

627 496

⑫ Numéro de la demande: 6028/77

⑫ Date de dépôt: 13.05.1977

⑫ Priorité(s): 18.05.1976 NL 7605315

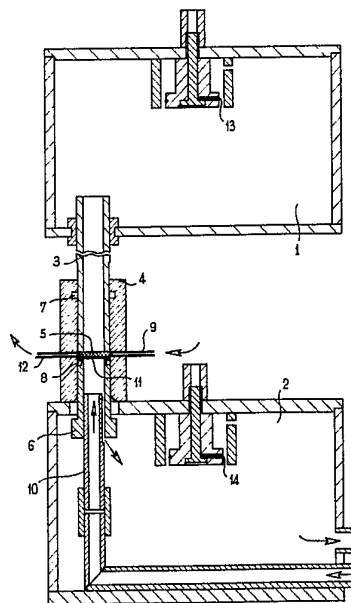
⑫ Brevet délivré le: 15.01.1982

⑫ Fascicule du brevet
publié le: 15.01.1982⑦ Titulaire(s):
Willem Gerrit Roskam, Paris (FR)⑦ Inventeur(s):
Willem Gerrit Roskam, Paris (FR)⑦ Mandataire:
Dr. A.R. Egli & Co., Patentanwälte, Zürich

⑤ Appareil d'électrophorèse.

⑤ L'appareil d'électrophorèse préparative comprend un tube (3) et une plaque de matériel solide mais poreux comme le verre fritté qui forme une chambre d'élution (5) à une extrémité du tube. La face de la plaque (11) la plus éloignée du tube est exposée à un réservoir de liquide d'une telle manière que ce dernier puisse pénétrer dans la plaque.

L'appareil permet d'obtenir une séparation et une récupération efficaces de composants qui peuvent être séparés par électrophorèse, notamment des protéines et des acides nucléiques.



REVENDICATIONS

1. Appareil d'électrophorèse, caractérisé en ce qu'il comprend un tube (3), ayant deux extrémités et destiné à recevoir la colonne de gel, un dispositif définissant une chambre d'élution (5) à une première extrémité du tube (3), une entrée primaire (9) permettant le passage de la solution de tampon dans la chambre d'élution (5) et une sortie (12) pour l'évacuation de la solution de tampon de la chambre d'élution et disposée de telle manière, vis-à-vis de l'entrée primaire, que la solution de tampon passe de l'entrée primaire à la sortie (12) d'une manière substantiellement perpendiculaire à l'axe central du tube (3), le dispositif définissant la chambre d'élution (5) comprenant une pièce en forme de plaque en matériau solide et poreux (5) ayant deux surfaces principales s'étendant d'une manière substantiellement perpendiculaire à l'axe central du tube (3) et l'appareil comprenant une entrée auxiliaire (10) pour le passage d'un courant secondaire de solution de tampon dans la chambre d'élution à travers la surface principale de la pièce en forme de plaque, qui est la plus éloignée de la première extrémité du tube (3).
2. Appareil selon la revendication 1, comprenant une couche de matériau poreux (11) entre la chambre d'élution (5) et l'entrée auxiliaire (10), le matériau poreux de ladite couche (11) ayant une plus grande résistance à la solution de tampon que le matériau poreux de la pièce en forme de plaque (5).
3. Appareil selon la revendication 2, dans lequel la pièce en forme de plaque (5) est du verre fritté.
4. Appareil selon la revendication 3, dans lequel la couche en matériau poreux (11) est du verre fritté.
5. Appareil selon la revendication 4, dans lequel la pièce en forme de plaque et la couche de matériau poreux sont frittées ensemble.
6. Appareil selon la revendication 1, dans lequel une couche de caoutchouc silicone polymérisé adhérent à la pièce en forme de plaque constitue l'étanchéité des contacts de la pièce en forme de plaque avec le tube (3), une pièce tubulaire (6) étant adjacente à la surface principale de la pièce en forme de plaque qui est la plus éloignée de la première extrémité du tube (3), et une enveloppe (4) entourant le tube (3) et la pièce tubulaire (6).
7. Appareil selon la revendication 6, dans lequel la pièce tubulaire (6) définit avec la surface principale de la plaque qui est la plus éloignée du tube (3) un réservoir de solution tampon, de sorte que la solution traverse la plaque en formant la seule entrée de passage vers la chambre d'élution.
8. Appareil selon la revendication 7, dans lequel le corps de la pièce en forme de plaque est en verre fritté.
9. Appareil selon la revendication 7, dans lequel la pièce en forme de plaque est en contact étanche avec ladite pièce tubulaire et avec l'enveloppe qui l'entoure grâce à une couche de caoutchouc silicone adhérent à la pièce en forme de plaque.
10. Procédé de fabrication de l'appareil d'électrophorèse selon la revendication 6, dans lequel une couche de caoutchouc silicone non polymérisé est appliquée sur la pièce en forme de plaque de matériau solide et poreux, dans lequel on laisse le caoutchouc silicone se polymériser et dans lequel la pièce en forme de plaque est mise en contact avec le tube (3), la pièce tubulaire (6) et l'enveloppe (4) qui entourent la pièce en forme de plaque, le caoutchouc silicone polymérisé constituant un joint étanche entre la pièce en forme de plaque, le tube (3), la pièce tubulaire (6) et l'enveloppe (4).

L'invention concerne un appareil d'électrophorèse et un procédé pour sa fabrication.

Les appareils d'électrophorèse préparative se composent en général d'un compartiment supérieur avec une électrode, d'un endroit de séparation où un gel peut être mis, d'une chambre

d'élution ou réceptacle et d'un compartiment inférieur avec une électrode. Les différents composants du matériel à traiter (à purifier ou à séparer) migrent à travers le gel sous l'influence du champ électrique appliqué à des vitesses différentes, afin qu'ils sortent du gel

5 l'un après l'autre et entrent dans la chambre d'élution. Une solution de tampon passe à travers la chambre d'élution et transporte les composants hors de la chambre d'élution, par exemple vers un collecteur de fraction, duquel ils peuvent être sortis pour un examen approfondi.

10 Une grande variété de construction d'appareils d'électrophorèse préparative existe et beaucoup d'attention a été consacrée au dessin de la chambre d'élution. Cependant, dans les appareils faits suivant l'état de la technique, l'élution n'est pas satisfaisante dans beaucoup de cas. Dans la plupart des appareils qui existent déjà, le fond de la

15 chambre d'élution est perméable au courant électrique d'électrophorèse. La raison principale d'une mauvaise élution dans les systèmes précédents est que les composants, après la sortie du gel, ne restent pas à l'endroit où le transport hydrodynamique par le tampon d'élution est le plus efficace, cela parce qu'ils sont soumis aux effets de l'électrophorèse libre, des phénomènes de convection et de la migration causée par la gravité.

Quant à l'électrophorèse libre, il est nécessaire pour une bonne élution que les composants, après leur sortie du gel, migrent hors de la proximité du fond du gel sous l'influence d'une rapide électrophorèse libre parce que la vitesse d'écoulement du tampon est basse à proximité du gel (S. Hjerten et coauteurs, «Annal. Biochem.», 27 (1969) 108-129), et par conséquent l'élution est inefficace près du fond du gel, la migration rapide de l'électrophorèse libre peut être

25 obtenue en faisant passer un tampon d'une faible force ionique frôlant le fond du gel [J.W. Nelson et coauteurs, «ISCO Applications Research Bulletin», 19 (1975)]. Les appareils selon l'état de la technique, dans lesquels un disque solide et poreux est entre le gel et la chambre d'élution et soutient le

30 gel, ne donnent pas une bonne élution. Cela est dû au fait que les composants, après être sortis du gel, doivent migrer sur une longue distance avant le début de leur élution, et durant cette migration la diffusion n'est plus limitée par la matrice du gel, cette diffusion donnant un élargissement des bandes, alors que la migration ne peut

40 être accélérée en passant un tampon d'une faible force ionique le long de la surface inférieure du gel (J.W. Nelson et coauteurs, *loc. cit.*). Dans les appareils selon l'état de la technique, seulement une vitesse d'écoulement élevée du tampon d'élution peut empêcher les composants de migrer vers la proximité du fond de la chambre

45 d'élution sous l'influence de la migration rapide d'électrophorèse libre nécessaire pour les raisons déjà mentionnées, sous l'influence du phénomène de convection ou sous celui de gravité. Cependant, une vitesse d'écoulement élevée du tampon d'élution entraîne inévitablement une dilution importante des composants, ce qui est désastreux pour beaucoup d'applications. Il est également désavantageux d'agrandir les dimensions de la chambre d'élution pour empêcher la migration vers le fond, parce que cela diminue la vitesse d'écoulement du tampon d'élution.

Suivant l'état de la technique, la perte par électrophorèse à travers le fond de la chambre d'élution des composants qui sont à la proximité du fond de la chambre d'élution est évitée en mettant une membrane de dialyse (par exemple, brevet américain No 3773745), ou un filtre en verre fritté semi-perméable (brevet américain No 3539493), ou un gel fait dans un tampon d'une force ionique

60 élevée (brevet allemand No 2221242) sous la chambre d'élution, ou en passant un tampon à contre-courant de l'électrophorèse à travers le fond de la chambre d'élution (P.H. Duesberg et coauteurs, «Annal. Biochem.», 11 (1965) 342-361).

Cependant, une bonne élution n'est pas possible si les composants peuvent s'approcher du fond de la chambre d'élution, parce que la vitesse d'écoulement du tampon d'élution vers la sortie est plus basse au voisinage du fond de la chambre d'élution qu'au centre de la chambre d'élution, par exemple. De plus, il y a un danger de

dénaturation, d'absorption et d'adsorption des composants si le fond de la chambre d'élution est formé d'une membrane de dialyse (S. Hjerten et coauteurs, *loc. cit.*).

Les appareils selon le modèle décrit par I. Schenkein et coauteurs («Annal. Biochem.», 25 (1968) 387-395) ont le désavantage que la migration par électrophorèse libre des composants est dans le sens opposé du courant du tampon d'élution. Dans ce cas, une chambre d'un petit volume (voir demande de brevet hollandaise No 71-15364) crée un gradient de potentiel élevé dans la chambre d'élution et la direction du gradient de potentiel est telle que les composants ont tendance à migrer dans le sens contraire du courant du tampon d'élution; ce dernier phénomène fait que les bons effets d'une chambre d'élution ayant un petit volume seront perdus.

La présente invention a pour but de fournir un appareil d'électrophorèse simple qui peut être utilisé facilement, qui n'a pas les inconvénients mentionnés plus haut et qui permet une bonne élution à la fois avec des gels mous ou durs et avec des composants ayant une mobilité d'électrophorèse libre aussi bien haute que basse.

L'appareil de l'électrophorèse selon l'invention est caractérisé à la revendication 1.

Pour une meilleure compréhension de l'appareil de l'électrophorèse selon l'invention et pour montrer comment celui-ci peut être mis en action, référence sera faite, à titre d'exemple, aux figures ci-jointes dans lesquelles:

la fig. 1 montre une vue sectionnée et verticale d'un appareil d'électrophorèse préparative,

les fig. 2, 3 et 4 montrent des graphes,

la fig. 5 montre une vue démontée et en perspective d'une partie de l'appareil,

la fig. 6 montre une vue sectionnée et agrandie de l'appareil avec l'illustration des lignes d'écoulement.

L'appareil montré dans la fig. 1 comprend un compartiment supérieur 1 avec une électrode 13 et un compartiment inférieur 2 avec une électrode 14. Les électrodes 13 et 14 sont en platine et elles sont introduites dans des rainures circulaires dans les parties isolantes respectives, ce qui protège les électrodes des dommages. Des pièces cylindriques isolantes avec une sortie pour les gaz dégagés entourent les électrodes pour éviter un contact inopportun.

Entre les récipients 1 et 2, il y a un tube cylindrique 3 (de diamètre intérieur de 10 mm) pour le gel, un logement 4 pour la chambre d'élution 5 (ce logement ayant un diamètre de 15 mm et une épaisseur de 1,5 mm) et une pièce tubulaire 6. La chambre d'élution 5, qui a une couche poreuse 11 à sa face inférieure, est fixée en la poussant grâce à la pièce 6 dans la pièce 4 jusqu'à son immobilisation. Les joints toriques en Viton 7 et 8 assurent une bonne étanchéité et une position fixe du tube de gel 3 et de la pièce 6 dans leur logement 4. Le tampon d'élution entre par trois tubes en acier inoxydable 9 (un seul est montré dans la fig. 1) qui font entre chaque paire de tubes adjacents un angle de 45°. Un courant de tampon d'élution auxiliaire est obtenu en forçant à travers le tube 10 un tampon contre la face inférieure de la couche poreuse 11. Le courant venant du tube 10, qui circule à haute vitesse, sert aussi à refroidir la chambre d'élution et le gel. Le surplus de tampon, fourni à travers le tube 10, revient au compartiment avec électrode 2 par un petit espace entre le tube 10 et la pièce 6 et est mis à nouveau en circulation. Les lignes de courant du tampon d'élution dans la chambre d'élution sont montrées dans la fig. 6. Le courant électrique pour l'électrophorèse passe par le petit espace déjà mentionné.

Soit en changeant le courant du tampon passant à travers le tube 10, soit en changeant l'espace entre le tube 10 et la pièce 6, la pression du courant auxiliaire du tampon d'élution peut être ajustée à volonté et, par conséquent, le courant du tampon d'élution passant par la couche poreuse dans la chambre d'élution est aussi ajusté.

Les tampons d'élution sont libérés de la chambre d'élution à travers un tube en acier inoxydable 12 vers une pompe précise et réglable (non montrée) et passant de là à un collecteur de fraction, par exemple *via* un spectrophotomètre.

La chambre d'élution 5 est faite d'un matériel solide mais poreux comme le verre fritté, de préférence du Pyrex P2; dans l'appareil montré, le volume en liquide de la chambre d'élution est de l'ordre de 0,13 ml. La couche poreuse 11 en dessous de la chambre d'élution peut être une membrane de dialyse; dans ce cas, le courant auxiliaire du tampon d'élution est maintenu par une pression élevée sous la membrane. Cependant, la couche poreuse 11 est par préférence une couche de verre fritté de porosité différente de la chambre 5, d'épaisseur de 0,5 mm, qui peut avantageusement être frittée contre la chambre d'élution. La couche poreuse 11 est de préférence en Pyrex P5. L'étanchéité entre la chambre d'élution 5 (ou, de préférence, la chambre d'élution 5 avec la couche poreuse 11) et les trois pièces respectives — le tube de gel 3, l'enveloppe 4 et la pièce 6 — est obtenue en formant une couche de forme adaptée en matériel élastique, de préférence du caoutchouc silicone polymérisé. Pour ce but, du caoutchouc silicone non polymérisé (Rhône-Poulenc Rhodorsil CAF 4 par exemple) est appliqué sur les endroits importants de la chambre d'élution 5, ou de la chambre d'élution 5 et de la couche poreuse 11 combinées, et ensuite l'ensemble est de préférence placé dans un moule, en Teflon par exemple, pour la polymérisation du caoutchouc silicone avec le verre fritté. L'excès de caoutchouc silicone est arraché automatiquement en sortant du moule la chambre d'élution ou l'ensemble de la chambre d'élution et de la couche poreuse, ou il peut être ôté avec une lame de rasoir et une fraise en carbure de tungstène là où sont les conduits de tampon.

En dehors des tubes en acier inoxydables 9 et 12, des joints toriques en Viton 7 et 8, de la chambre d'élution en verre fritté 5 avec ses joints en caoutchouc silicone et de la couche poreuse 11, tous les éléments composant l'appareil sont faits en Perspex (polyméthacrylate).

La colonne de gel reste directement sur la chambre d'élution 5, ou sur une feuille en papier de fibre de verre, au-dessus de la chambre d'élution, et n'est pas nécessairement supportée par une pression hydrostatique du tampon d'élution.

La présente invention peut aussi être utilisée avec avantage dans d'autres appareils, comme des appareils pour électrophorèse préparative à grande échelle avec une élution centrale et un refroidissement du gel. Dans une telle réalisation, la fabrication et le contrôle sont également simples. Dans l'appareil décrit d'électrophorèse préparative, le tampon passe dans la chambre poreuse d'élution d'une manière homogène pour empêcher les composants d'atteindre le fond de la chambre d'élution, que ce soit par un phénomène de convection, ou par une haute mobilité d'électrophorèse libre, ou par la migration due à la gravité; en cela, il est possible d'adapter la force ionique du tampon passant juste sous le gel pour que les composants émigrent rapidement loin de la proximité; en cela, l'effet ralentissant sur la migration de l'électrophorèse par le tampon auxiliaire, passant dans la direction opposée de la migration, peut être accru en sélectionnant par exemple la force ionique, le pH, la viscosité et la densité du tampon. Cela se traduit par une haute efficacité de l'élution et évite les désavantages des composants allant au fond de la chambre d'élution.

La chambre d'élution poreuse prévient les phénomènes de convection, de migration des composants causée par la gravité et des flux préférés des tampons d'élution dans la chambre d'élution.

Les courants du tampon d'élution ayant les caractéristiques ci-dessus sont obtenus par le passage de deux tampons d'élution dans la chambre d'élution: un tampon réparti de manière homogène sur la surface de la chambre d'élution, dans la direction opposée à celle de l'électrophorèse dans la chambre d'élution, et un tampon perpendiculaire à la direction de l'électrophorèse et réparti de manière homogène. Une répartition homogène du courant du tampon d'élution sur la surface de la chambre d'élution est obtenue en pompant ou en aspirant le tampon en question à travers une couche poreuse appliquée contre la face inférieure de la chambre d'élution, la résistance du courant pour le tampon d'élution étant principalement déterminée par la couche poreuse.

Les constructions décrites ci-dessus de la chambre d'élution et des pièces correspondantes simplifient considérablement la fabrication et la manutention des appareils d'électrophorèse préparative. Les appareils sont flexibles et peuvent être adaptés d'une manière simple à un procédé de purification spécifique, par exemple en choisissant une autre chambre d'élution ou une autre enveloppe pour le gel. Refroidir le gel est simple. L'appareil peut être aisément et parfaitement nettoyé à cause de sa construction simple.

Les exemples suivants décrivent des utilisations de l'appareil.

Exemple 1

Des échantillons d'un mélange de molécules de poly(uridine) tritiées de tailles voisines étaient chargés sur des gels de 9% de polyacrylamide hauts de 3 mm. Auparavant, il avait été déterminé que toute la radioactivité sous les conditions appliquées sortirait du gel en moins de 8,5 min. La totalité des flux des deux tampons d'élution variait entre 2 et 10 ml/h. Le flux du tampon d'élution auxiliaire, à contre-courant de la direction de l'électrophorèse, était maintenu à 1,5 ml/h. Ce flux était déterminé en mesurant le transport d'eau tritiée pendant l'électrophorèse. Le flux du tampon d'élution auxiliaire entraîne une migration de tampon dans la chambre d'élution avec la même rapidité que l'électrophorèse des ARN, mais dans la direction opposée (contre-courant). Le gradient de potentiel dans le gel était environ de 6 V/cm pour un courant de 10 mA. La concentration des tampons d'élution était 3 fois supérieure à la concentration du tampon du gel sauf pour la concentration de sodium dodécylsulfate qui était partout de 0,2%.

Les résultats

En déterminant pour tous les flux testés la radioactivité dans des fractions collectées, il est apparu que, avec 0,6 ml de tampon d'élution, une élution de plus de 99% de la radioactivité était obtenue, si une correction était faite pour la largeur de la bande de l'échantillon. Cette valeur n'est pas corrigée pour l'influence négative de la diffusion dans le gel ni pour la diffusion dans les tubes vers le collecteur, et elle est donc une estimation supérieure. Le chiffre de 0,6 ml veut dire que la chambre d'élution est rincée par une quantité de tampon qui est environ cinq fois la contenance de la chambre d'élution ou neuf fois la contenance de la chambre d'élution sous le

gel. Par conséquent, l'élution est hautement efficace. La récupération de radioactivité était toujours plus importante que 96%. La fig. 3 montre la variation de radioactivité dans le tampon d'élution au flux total des tampons d'élution de 2 ml/h. Il apparaît de la forme de la courbe que l'élution se fait très bien malgré la haute mobilité de l'ARN en électrophorèse libre.

Exemple 2

Des échantillons d'ARN de faible poids moléculaire sont utilisés dans des gels analytiques et des gels préparatifs et ils sont soumis à une électrophorèse de gel préparative. Le gradient de potentiel dans les gels préparatifs était environ de 4 V/cm. Le flux du tampon d'élution auxiliaire, à contre-courant de la direction de l'électrophorèse, était de 1,5 ml/h. La totalité des deux flux des tampons d'élution était de 6 ml/h. Environ 50 µg d'ARN étaient posés sur le gel analytique et 150 µg d'ARN sur le gel préparatif. Le graphe supérieur de la fig. 3 montre les variations de l'extinction dans le gel analytique, et le graphe inférieur de la fig. 3 montre les variations de l'extinction dans le tampon d'élution. Le pouvoir de résolution n'est pas notablement détérioré par l'élution et les pics dans les graphes sont symétriques.

Exemple 3

Des échantillons d'ARN nucléaire de haut poids moléculaire sont posés sur des gels extrêmement mous de 2,20% de polyacrylamide. Les gels sont polymérisés sur des disques en papier de fibre de verre (Whatman GF/C). Environ 6 µg d'ARN sont mis sur le gel analytique, et 24 µg d'ARN sur le gel préparatif, qui a une hauteur de 3 cm.

Dans le graphe supérieur de la fig. 4 est montrée la variation de l'extinction dans le gel analytique, et dans le graphe inférieur de la fig. 4, la variation de l'extinction dans le tampon d'élution.

Le support des gels par la chambre d'élution et par le papier en fibre de verre paraît convenir pour produire une bonne élution avec un gel très mou. Il faut remarquer que la hauteur relativement importante de la ligne de base entre les pics, sur le graphe préparatif, n'est pas due à une mauvaise résolution mais aux matières contenues dans le gel même, qui causent également des phénomènes d'extinction.

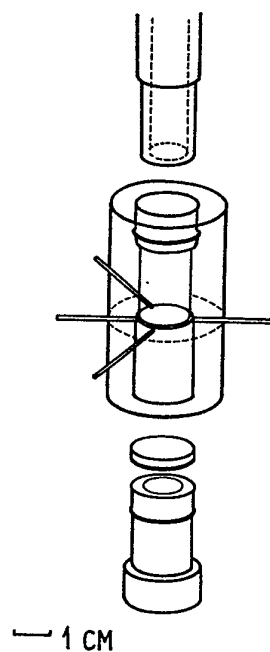
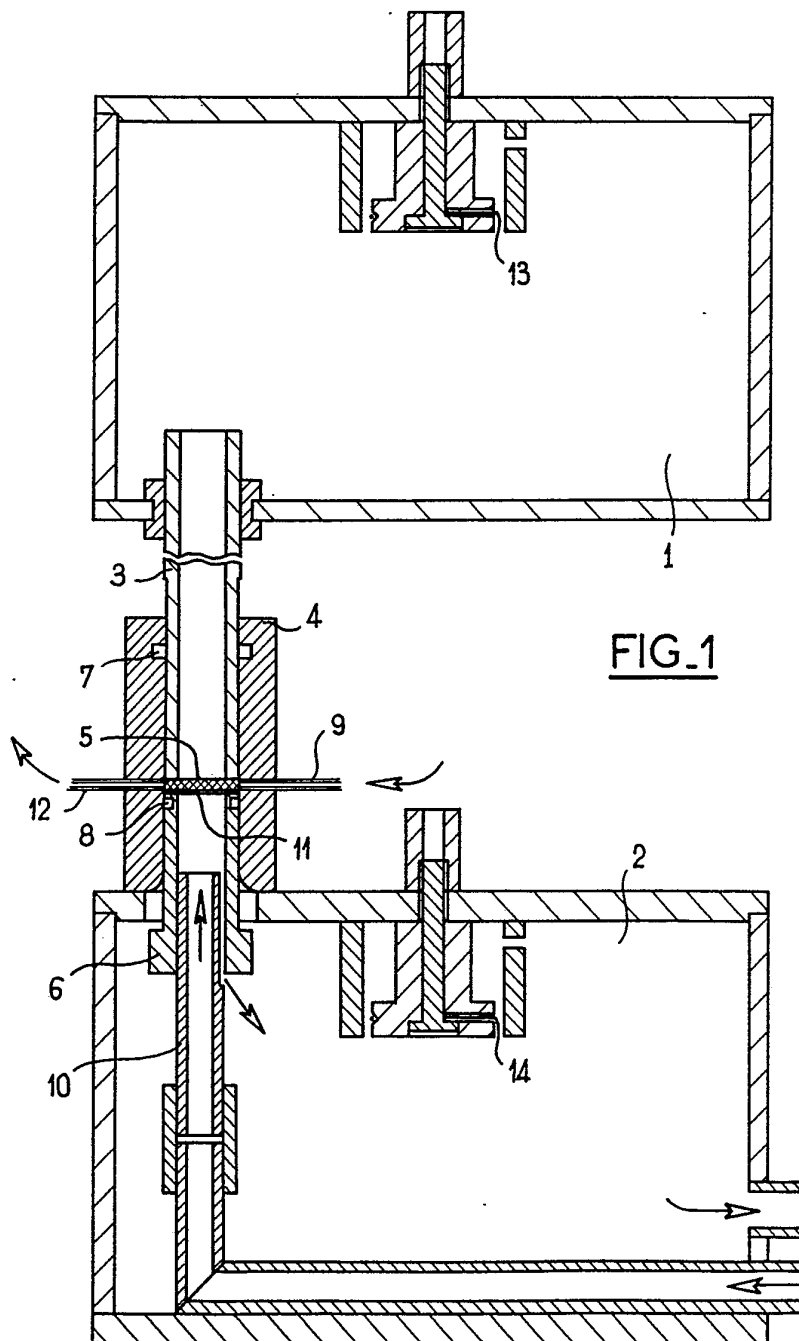


FIG. 5

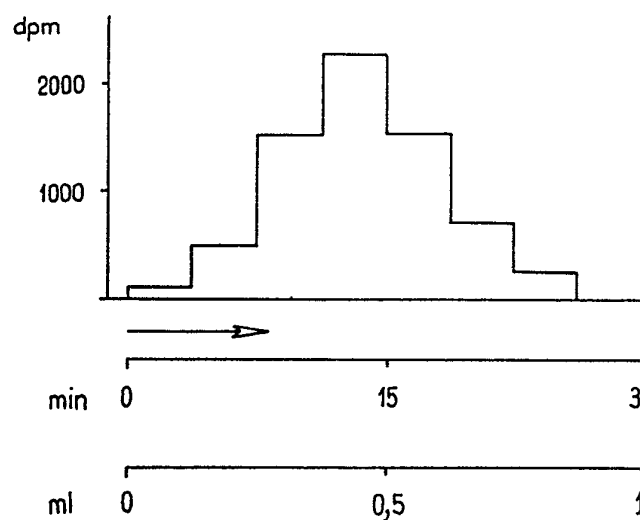


FIG.2

FIG.3

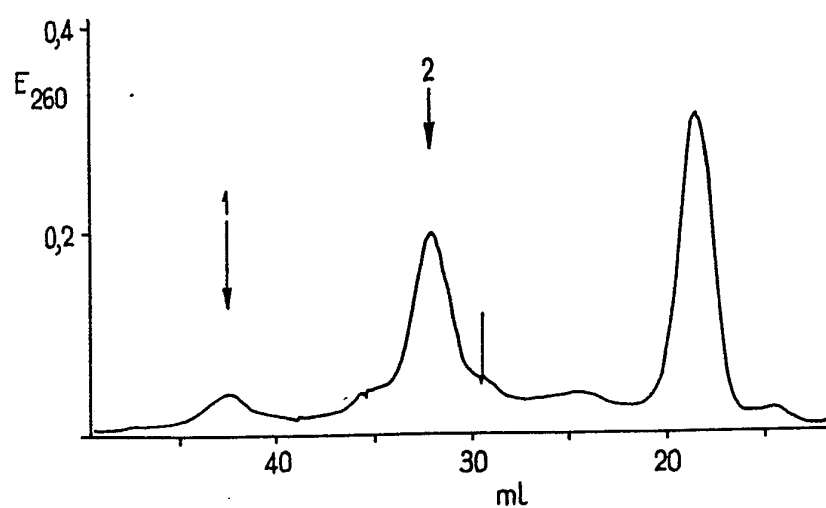
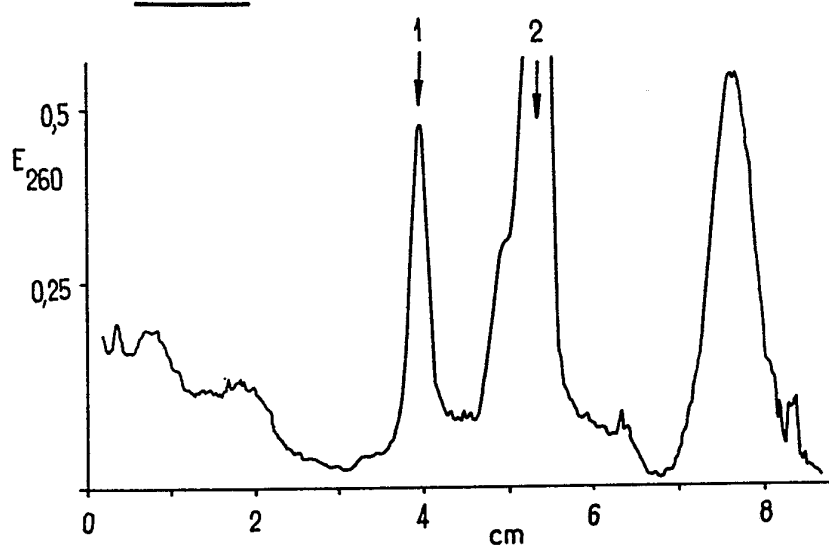


FIG.4

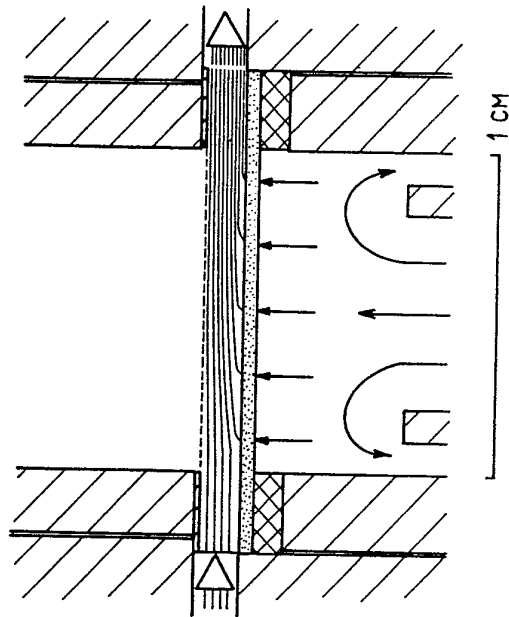
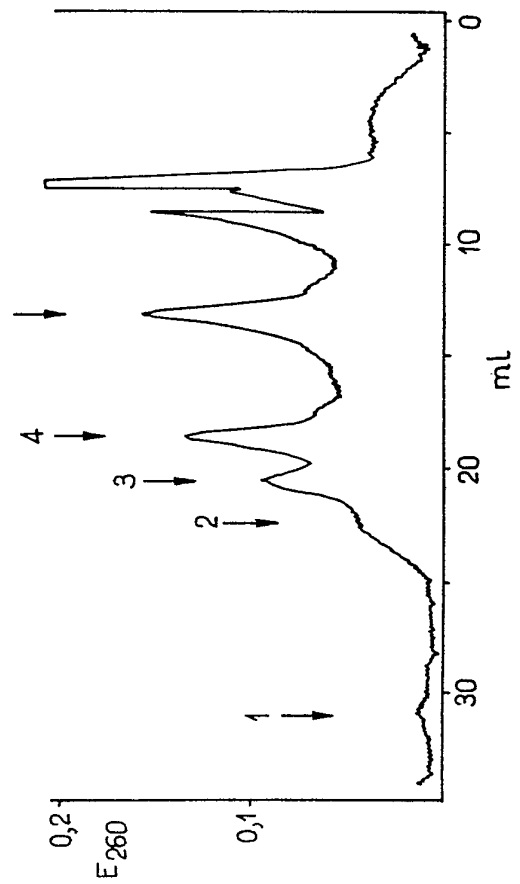
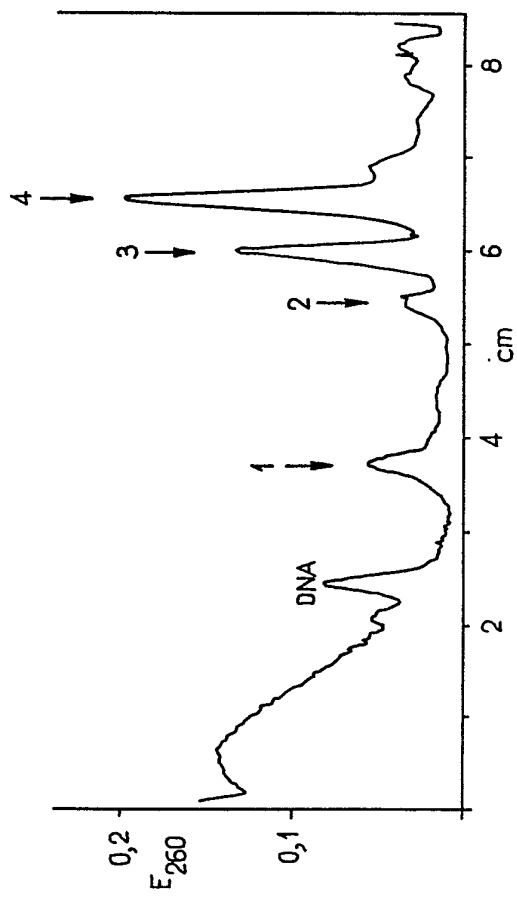


FIG.6