



|  |           |  |
|--|-----------|--|
| <p>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :<br/>C07H 1/08, C12Q 1/68, C12N 15/10,<br/>C12M 1/00</p>   | <p>A1</p> | <p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 97/34908</b><br/><br/>(43) Internationales<br/>Veröffentlichungsdatum: 25. September 1997 (25.09.97)</p>   |
| <p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE97/00517<br/>(22) Internationales Anmeldedatum: 14. März 1997 (14.03.97)<br/><br/>(30) Prioritätsdaten:<br/>196 10 354.1 15. März 1996 (15.03.96) DE<br/><br/>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): IN-<br/>NOVA GESELLSCHAFT ZUR ENTWICKLUNG UND<br/>VERMARKTUNG INNOVATIVER PRODUKTE MBH<br/>[DE/DE]; Rebhuhnstrasse 15, D-68307 Mannheim (DE).<br/><br/>(72) Erfinder; und<br/>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LANGE, Hans [DE/DE];<br/>Römerstrasse 99 D, D-68623 Lampertheim (DE).<br/><br/>(74) Anwalt: GASSNER, Wolfgang; Bissel Salleck &amp; Partner,<br/>Nürnberger Strasse 71, D-91052 Erlangen (DE).</p> |           | <p>(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE,<br/>CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL,<br/>PT, SE).<br/><br/><b>Veröffentlicht</b><br/><i>Mit internationalem Recherchenbericht.<br/>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen<br/>Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen<br/>eintreffen.</i></p> |

(54) Title: PROCESS AND DEVICE FOR ISOLATING NUCLEIC ACIDS

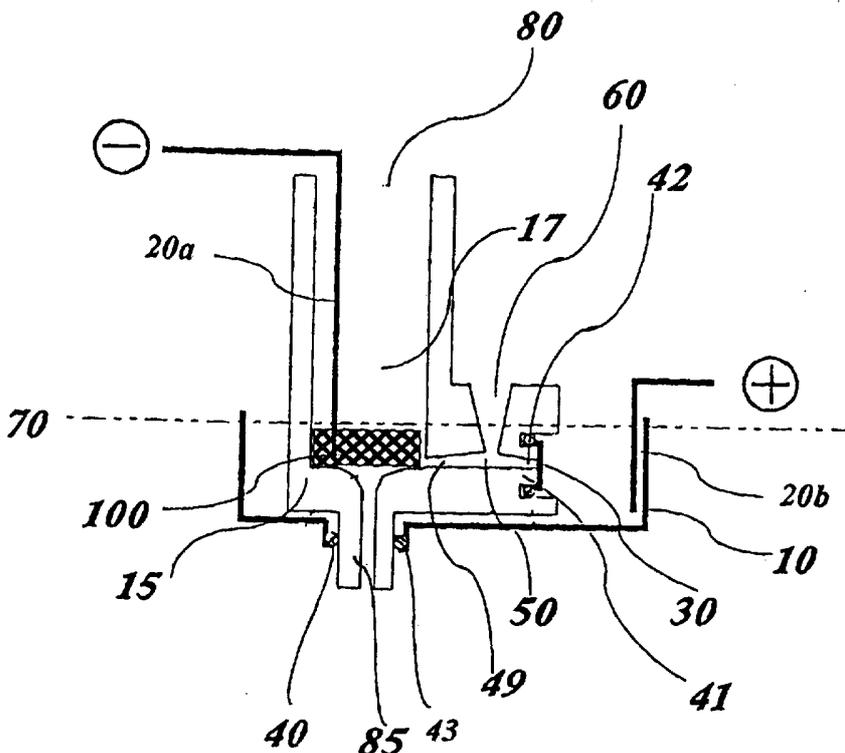
(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR ISOLIERUNG VON NUKLEINSÄUREN

(57) Abstract

The invention relates a device for isolating nucleic acids from biological fluids and suspensions which contain nucleic acids. In the device, a reaction chamber (17) containing an adsorbent (100) is connected to a discharge chamber (50) and the nucleic acids can, by means of an electrophoresis device (20a, 20b), be transferred from the reaction chamber (17) to the discharge chamber (50) and concentrated.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Isolierung von Nukleinsäuren aus biologischen nukleinsäurehaltigen Flüssigkeiten und Suspensionen, wobei ein Reaktionsraum (17) zur Aufnahme eines Adsorptionsmittels (100) mit einem Entnahmeraum (50) verbunden ist, und wobei die Nukleinsäuren vom Reaktionsraum (17) in den Entnahmeraum (50) mittels einer Elektrophoresevorrichtung (20a, 20b) beweg- und anreicherbar sind.



**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 | Aserbaidtschan               | 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<br>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<br>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<br>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 Isolierung von Nukleinsäuren**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur  
5 Isolierung von Nukleinsäuren.

Vor der Analyse von aus Zellen gewonnenen Nukleinsäuren  
mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) ist es erforderlich,  
die Nukleinsäuren aufzureinigen und aufzukonzentrieren.  
10 Ferner kann es notwendig sein, aus der zu analysierenden  
Probe bestimmte die Polymerasekettenreaktion störende  
Substanzen, wie die prosthetische Gruppe von Hämoglobin, von  
der Probe abzutrennen.

15 Daneben spielt auch bei anderen Techniken zur Analyse von  
Nukleinsäuren, bsp. der Hybridisierung, eine Aufreinigung und  
Aufkonzentration der zu analysierenden Nukleinsäuren eine  
wichtige Rolle.

20 Aus "Methods of Enzymology", Vol. 68, S. 170 - 182, ist es  
bekannt, zur Isolierung von Nukleinsäuren sog. "Spin-columns"  
zu verwenden. Dabei werden in einer aus der DE 41 39 664 A1  
bekannten Variante folgende Arbeitsschritte verwendet:

- 25 aa) Zellaufschluß,  
bb) Adsorption der Nukleinsäuren an einem Glasfaservlies in  
Gegenwart eines Puffers mit hoher Ionenstärke und  
cc) Elution der Nukleinsäuren mit einem Puffer geringer  
Ionenstärke.

30 Beim Schritt lit.aa) wird die flüssige Probe durch ein  
Glasfaservlies geleitet, an dem die Nukleinsäuren  
adsorbieren. Anschließend wird das Glasfaservlies mit

verschiedenen Lösungen gewaschen. Schließlich werden die Nukleinsäuren in Anwesenheit von Puffern geringer Ionenstärke von der Festphase eluiert.

5 Das bekannte Verfahren ist in mehrfacher Hinsicht nachteilig: Beim Waschen der Festphase kann es zur Kontamination der Probe kommen. Außerdem können wegen der im Glasfaservlies herrschenden Kapillarkräfte die Nukleinsäuren nur zum Teil daraus zurückgewonnen werden.

10

Des Weiteren sind aus "Methods in Enzymology 65" (1980), S. 371 - 380 gelelektrophoretische Methoden bekannt, bei denen Nukleinsäuren an Gele gebunden und danach mittels Elektroelution wieder in Lösung gebracht werden. Auch dabei  
15 kann es zu Kontamination der Lösung kommen. Die Nukleinsäuren liegen in der Lösung in hoher Verdünnung vor. Eine Aufkonzentration findet nicht statt.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren und  
20 eine Vorrichtung anzugeben, mit denen die Nachteile des Stands der Technik vermieden werden. Insbesondere soll ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Isolierung von Nukleinsäuren angegeben werden, die eine einfache und kostengünstige Aufreinigung und Aufkonzentration von  
25 Nukleinsäuren ermöglichen. Außerdem soll eine weitgehend automatisierte Isolation und Aufkonzentration von Nukleinsäuren durchführbar sein. Schließlich bezweckt die Erfindung die Vermeidung von Kontaminationen.

30 Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1 und 12 gelöst. Zweckmäßige Ausgestaltungen des Verfahrens bzw. der Vorrichtung ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 bis 11 sowie 13 bis 41.

Nach Maßgabe der Erfindung ist ein Verfahren zur Isolierung von Nucleinsäuren aus biologischen nucleinsäurehaltigen Flüssigkeiten und Suspensionen vorgesehen, wobei

5

a) die Nucleinsäuren an ein Adsorptionsmittel gebunden werden,

b) die Nucleinsäuren vom Adsorptionsmittel eluiert und

10

c) durch Elektrophorese von einem Reaktionsraum in einen damit verbundenen Entnahmeraum bewegt und dort angereichert werden.

15 Das Verfahren ermöglicht auf einfachem Weg eine Aufreinigung und Aufkonzentration von Nucleinsäuren aus Flüssigkeiten. Insbesondere bei einer automatischen Verfahrensführung kann das Risiko einer Kontamination weitgehend ausgeschlossen werden. Die Elution kann durch Pufferwechsel oder elektrisch  
20 durch Elektroelution bzw. Elektrophorese erfolgen.

Nach weiterer Maßgabe der Erfindung ist eine Vorrichtung zur Isolierung von Nucleinsäuren aus biologischen nucleinsäurehaltigen Flüssigkeiten und Suspensionen  
25 vorgesehen, wobei ein Reaktionsraum zur Aufnahme eines mit Nucleinsäuren beladenen Adsorptionsmittels mit einem Entnahmeraum verbunden ist, und wobei die Nucleinsäuren mittels einer Elektrophoreseeinrichtung vom Reaktions- in den Entnahmeraum bewegbar und dort anreicherbar sind. - Diese  
30 Vorrichtung ermöglicht eine einfach und kostengünstig durchführbare Aufkonzentration und Isolierung von Nucleinsäuren. Durch das Vorsehen eines besonderen

Entnahmeraums kann eine Kontamination weitgehend ausgeschlossen werden.

Nachfolgend werden Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand  
5 der Zeichnung näher erläutert. Hier zeigen:

- Fig. 1 eine schematische Querschnittsansicht eines ersten Ausführungsbeispiels der Vorrichtung,
- 10 Fig. 2 das Ausführungsbeispiel gemäß Fig. 1 mit "Spin-Column",
- Fig. 3 eine schematische Querschnittsansicht eines zweiten Ausführungsbeispiels der Vorrichtung,
- 15 Fig. 4 eine schematische Querschnittsansicht durch ein erstes Ausführungsbeispiel einer Aufreinigungs- und Anreicherungs Vorrichtung mit einer Vorrichtung gemäß Fig. 3,
- 20 Fig. 5 eine Draufsicht auf ein Agaroseflachbettgel,
- Fig. 6a eine schematische Querschnittsansicht eines dritten Ausführungsbeispiels der Vorrichtung,
- 25 Fig. 6b eine Abwandlung des in Fig. 6a gezeigten Ausführungsbeispiels,
- Fig. 6c eine schematische Querschnittsansicht eines vierten Ausführungsbeispiels der Vorrichtung,
- 30 Fig. 7a eine Untersicht eines fünften Ausführungsbeispiels der Vorrichtung,

- Fig. 7b eine Draufsicht auf das Ausführungsbeispiel gemäß Fig. 7a,
- 5 Fig. 7c eine schematische Seitenansicht des Ausführungsbeispiels gemäß Fig. 7a,
- Fig. 7d eine perspektivische Ansicht eines Deckels für ein erstes Ausführungsbeispiel einer Elutionsvorrichtung,
- 10 Fig. 7e eine perspektivische Ansicht des ersten Ausführungsbeispiels der Elutionsvorrichtung ohne Deckel,
- 15 Fig. 7f eine perspektivische Ansicht des Ausführungsbeispiels gemäß Fig. 7a bis 7c,
- Fig. 8 eine schematische Querschnittsansicht durch ein sechstes Ausführungsbeispiel der Vorrichtung,
- 20 Fig. 9 eine schematische Querschnittsansicht durch eine beschichtete Elektrode,
- Fig. 10 eine schematische Querschnittsansicht durch ein siebtes Ausführungsbeispiel der Vorrichtung,
- 25 Fig. 11 eine schematische Querschnittsansicht durch ein achttes Ausführungsbeispiel der Vorrichtung,
- 30 Fig. 12 eine Draufsicht auf ein zweites Ausführungsbeispiel einer Elutionsvorrichtung und
- Fig. 13 eine schematische Querschnittsansicht durch ein zweites Ausführungsbeispiel einer Aufreinigungs- und Anreicherungs-  
35 vorrichtung.

In Fig. 1 ist ein schematischer Querschnitt eines ersten Ausführungsbeispiels der Vorrichtung gezeigt. In einem Elektrophoresepuffertank 10 mit einem bodenseitigen Durchbruch 43 ist ein Behälter 15 aufgenommen. Der Behälter 15 umschließt einen Reaktionsraum 17, welcher über einen Kanal 49 mit einem Entnahmeraum 50 verbunden ist. Das Volumen des Reaktionsraums 17 beträgt vorzugsweise 1 bis 20 ml. Der Entnahmeraum 50 ist mittels einer ersten Öffnung 42 verschließenden ersten permeablen Membran 30 ionenleitend mit einem im Elektrophoresepuffertank 10 aufgenommenen Elektrophoresepuffer verbunden. Das Volumen des Entnahmeraums 50 beträgt vorzugsweise 0,005 bis 0,1 ml. Die erste permeable Membran 30 ist z.B. aus einer Dialysemembran gebildet, welche für Nukleinsäuren nicht durchlässig, für Salze, insbesondere chaotrope Salze, jedoch durchlässig ist. Die erste permeable Membran 30 ist mittels eines flexiblen Rings, bsp. eines O-Rings, auf einem ersten Stutzen 41 befestigt. Im Reaktionsraum 17 ist ein Adsorptionsmittel 100, bsp. ein Glasfaservlies, Silika, Glasperlen, mit Glas umfangene magnetische Partikel, Anionenaustauscher o. dgl., aufgenommen. In den Reaktionsraum 17 ragt durch eine zweite Öffnung 80 eine Kathode 20a. Eine Anode 20b taucht in den im Elektrophoresepuffertank 10 befindlichen Elektrophoresepuffer ein, dessen Füllstand mit 70 bezeichnet ist. Unterhalb des Adsorptionsmittels 100 erstreckt sich vom Behälter 15 ein zweiter Stutzen 85, der den Durchbruch 43 durchgreift. Der zweite Stutzen 85 ist mittels eines O-Rings 40 gegenüber dem Elektrophoresepuffertank 10 abgedichtet. - Der Entnahmeraum 50 weist eine Entnahmeöffnung 60 auf. Er ist so ausgebildet, daß Lufteinschlüsse vermieden werden. Der Entnahmeraum 50 kann insbesondere als Kapillare ausgebildet sein.

Fig. 2 zeigt im wesentlichen das in Fig. 1 gezeigte erste Ausführungsbeispiel. Dabei ist im Reaktionsraum 17 ein "Spin-

column" 90 aufgenommen. Ein den Elektrophoresepuffertank 10 durchgreifender zweiter Stutzen 85 ist hier nicht vorgesehen.

In Fig. 3 ist eine schematische Querschnittsansicht durch ein  
5 zweites Ausführungsbeispiel der Vorrichtung gezeigt. Dabei befindet sich die Kathode 20a außerhalb des Reaktionsraums 17. Sie taucht direkt in den Elektrophoresepuffertank 10 ein. Am den Reaktionsraum 17 umgreifenden Teil des Behälters 15 ist ein dritter Stutzen 45 vorgesehen, dessen dritte Öffnung  
10 46 durch eine zweite permeable Membran 31 verschlossen ist.

Fig. 4 zeigt eine schematische Querschnittsansicht durch ein  
erstes Ausführungsbeispiel einer Aufreinigungs- und  
Anreicherungs Vorrichtung mit der Vorrichtung gemäß Fig. 3.  
15 Die Vorrichtung gemäß Fig. 3 befindet sich im Wirkungsbereich eines x, y, z-Pipettors, dessen x, y, z-Pipettierarm mit 190 bezeichnet ist. Der x, y, z-Pipettierarm 190 nimmt eine Pipettierspitze 180, vorzugsweise eine Wegwerfspitze, auf. Ein geeigneter x, y, z-Pipettor wird bsp. von der Firma TECAN  
20 AG, Schweiz, angeboten. Ferner ist im Wirkungsbereich des x, y, z-Pipettors ein heizbarer Schüttelbock 170 angeordnet. Im Schüttelbock 170 sind Reaktionsröhrchen 150 für die Lyse aufgenommen. Daneben befinden sich ein erstes Gefäß 160 für die Lyse, ein zweites Gefäß 162 zur Aufnahme für eine  
25 Waschlösung sowie Probengefäße 165. Mit 185 ist ein Vorrat an Pipettenspitzen und mit 210 sind PCR-Gefäße bezeichnet.

Der Elektrophoresepuffertank 10 ist mit einem Füllstutzen 125 versehen, der mit einem Elektrophoresepuffervorrat 110 unter  
30 Zwischenschaltung einer Pumpe 120 verbunden ist. Der zweite Stutzen 85 sowie eine am Boden des Elektrophoresepuffertanks 10 vorgesehene Ableitung 140 stehen mit einer zweiten Pumpe 130 in Verbindung. Die zweite Pumpe 130 ist vorzugsweise als Schlauchpumpe ausgeführt. Eine geeignete Schlauchpumpe wird  
35 bsp. von der Firma Cavro, Kalifornien, USA, angeboten. Die



Kunststoffpipettenspitzen ausgebildeten Elektroden 20a bzw. 20b verschlossen.

In den Fig. 7a bis 7c ist ein fünftes Ausführungsbeispiel der  
5 Vorrichtung in verschiedenen Ansichten gezeigt. Dabei besteht  
der Behälter 15 aus einem quaderförmigen Teil. Der  
Reaktionsraum 17 ist durch eine Bohrung gebildet. An beiden  
Seiten sind neben dem Reaktionsraum 17 Ausnehmungen 320, 321  
zur Aufnahme der Kathode 20a bzw. der Anode 20b vorgesehen.  
10 Die Wand zwischen den Ausnehmungen 320, 321 und dem  
Reaktionsraum 17 ist ionenleitend ausgebildet. Die  
Ausnehmungen 320 dienen zur Aufnahme von  
Elektrophoresepuffer. Sie sind mit Stopfen 340 verschlossen.  
Der Elektrophoresepuffertank besteht bei dieser  
15 Ausführungsform aus zwei Teilbehältern, welche den  
Reaktionsraum 17 umgeben. Eine Mehrzahl derartiger  
Vorrichtungen, von denen in Fig. 7f nochmals eine  
perspektivisch gezeigt ist, können Bestandteile des in den  
Fig. 7d und 7e gezeigten ersten Ausführungsbeispiels einer  
20 Elutionsvorrichtung sein. Die Elutionsvorrichtung besteht im  
wesentlichen aus einem Mehrfachbehälter 410 zur Aufnahme  
mehrerer Vorrichtungen gemäß Fig. 7f. Der Mehrfachbehälter  
410 weist einen Vakuumanschluß 401 sowie Anschlüsse 402 für  
einen Flüssigkeitskreislauf zum Beheizen der  
25 Elutionsvorrichtung auf. Ein in Fig. 7d gezeigter Deckel 400  
ist mit Zuleitungen 226a, 226b für die Elektroden versehen.

In Fig. 8 ist ein sechstes Ausführungsbeispiel der  
Vorrichtung gezeigt. Dabei ist die Kathode 20a in die Wand  
30 des Reaktionsraums 17 und die Anode 20b in die  
gegenüberliegende Wand des Entnahmeraums 50 integriert. Im  
Entnahmeraum 50 ist eine permeable, insbesondere eine  
semipermeable, Membran 310 vorgesehen, welche für  
Nukleinsäuren undurchlässig ist. Die Membran 310 verhindert,  
35 daß die Nukleinsäuren direkt an die Anode 20b gelangen und

dort durch Redoxprozesse zerstört werden. - Das Adsorptionsmittel 100 ist über ein Stützvlies 302 am Eingang des zweiten Stutzens 85 abgestützt.

5 Fig. 9 zeigt eine schematische Querschnittsansicht durch eine beschichtete Elektrode. Eine aus einem Edelmetall, wie Gold, Silber oder Platin, oder elektrisch leitfähigem Kunststoff hergestellte Kathode oder Anode 20a bzw. 20b ist mit einer aus mehreren Lagen bestehenden Beschichtung versehen. Eine  
10 erste 323 auf das Edelmetall oder den Kunststoff aufgebraachte Lage besteht aus biotinyliertem Rinderserum Albumin, eine darauf auflagernde zweite Lage 325 besteht aus einem Streptavidin oder Polystreptavidin und eine äußere dritte Lage 324 ist aus einem Oligonukleotid gebildet.

15

Bei dem in Fig. 10 gezeigten siebten Ausführungsbeispiel der Vorrichtung ist ein beweglicher Permanentmagnet 312 an der Außenseite des Behälters 15 so angeordnet, daß sein Nordpol in der Nähe der Kathode 20a sich befindet. Der Reaktionsraum  
20 17 ist mit einem durchsichtigen Schnappdeckel 316 verschlossen. Der Entnahmeraum 50 ist mit einem Schnappdeckel 326 verschlossen, der mit einem Septum 328 versehen ist. Das Septum 328 kann zur Entnahme bzw. zur Zugabe von Flüssigkeit mittels einer Nadel 327 durchstochen werden. So kann eine  
25 Kontamination der in der Vorrichtung befindlichen Flüssigkeit vermieden werden. Mit 314 ist ein Photomultiplier bezeichnet, der oberhalb des durchsichtigen Schnappdeckels 316 angeordnet ist.

30 In Fig. 11 ist ein schematischer Querschnitt eines achten Ausführungsbeispiels gezeigt. Im Gegensatz zum siebten Ausführungsbeispiel ist hier der bewegliche Permanentmagnet 312 mit seinem Südpol in der Nähe der Außenseite der Anode 20b angeordnet. Der Boden des Entnahmeraums 50 ist  
35 durchsichtig. Gegenüber der Entnahmeöffnung 60 befindet sich

unterhalb des Bodens des Entnahmeraums 50 der Photomultiplier 314.

Fig. 12 zeigt eine Draufsicht auf ein zweites Ausführungsbeispiel einer Elutionsvorrichtung. Dabei sind eine Mehrzahl der in Fig. 11 gezeigten Vorrichtungen nebeneinander angeordnet. An den Längsseiten der Vorrichtungen sind jeweils Thermostatplatten 329 vorgesehen, mit denen die Temperatur einstellbar ist.

10

Fig. 13 zeigt in schematischer Querschnittsansicht ein zweites Ausführungsbeispiel einer Aufreinigungs- und Anreicherungs Vorrichtung. Dabei sind die Elektroden 20a und 20b einer Vorrichtung gemäß Fig. 11 mit einer Spannungsquelle 220 verbunden. Die Vorrichtung gemäß Fig. 11 befindet sich im Wirkungsbereich eines x,y,z-Pipettierarms 190 eines x,y,z-Pipettierroboters. Die Spannungsquelle 220, die zweite Pumpe 130 zur Entsorgung von zu verwerfenden Lösungen, eine Vorrichtung (hier nicht gezeigt) zur Bewegung eines Permanentmagneten 312 sowie der x,y,z-Pipettierroboter sind mittels eines Prozeßrechners, bsp. eines Personal-Computers, vollautomatisch steuerbar.

15

20

Die Funktion der beschriebenen Vorrichtungen ist die folgende:

25

Zu analysierende biologische nukleinsäurehaltige Flüssigkeiten werden mit einem Adsorptionsmittel 100 in Kontakt gebracht. Dabei adsorbieren die in der Lösung befindlichen Nukleinsäuren am Adsorptionsmittel 100. Das mit den Nukleinsäuren beladene Adsorptionsmittel 100, bsp. ein Spin-column 90, wird durch die zweite Öffnung 80 in den Reaktionsraum 17 eingesetzt. Anschließend wird an die Elektroden 20a, 20b eine Gleichspannung im Bereich von 1 bis 5000 V, vorzugsweise von 25 bis 500 V, angelegt. Die negativ

30

35

geladenen Nukleinsäuren werden dadurch vom Adsorptionsmittel 100 gelöst und in Richtung der in der Nähe des Entnahmeraums 50 angeordneten Anode 20b bewegt. Um einen direkten Kontakt der Nukleinsäuren mit der Anode 20b zu vermeiden, ist eine für Nukleinsäuren undurchlässige erste permeable Membran 30 vorgesehen. Infolge der in Richtung der Anode 20b gerichteten Bewegung der Nukleinsäuren reichern sich diese im Entnahmeraum 50 an. Nach einer Elektrophoresedauer von 1 bis 180 min. wird der durch den Elektrophoresepuffer geleitete Strom abgeschaltet. Durch die Entnahmeöffnung 60 des Entnahmeraums 50 kann nun ein angereicherte Nukleinsäuren enthaltendes Elutionsvolumen entnommen werden.

Um Kontaminationen zu vermeiden, kann die Entnahmeöffnung 60 mit dem Schnappdeckel 326 verschlossen werden, der mit einem Septum 328 versehen ist. Zur Entnahme von Elutionsvolumen kann das Septum 328 mit einer Nadel 327 durchstoßen werden.

Je nach Art der zu isolierenden Nukleinsäuren können verschiedenartig gestaltete Elektroden 20a, 20b verwendet werden. In Frage kommt die Verwendung von aus Edelmetall oder aus leitfähigen Kunststoffen hergestellten Elektroden, die beschichtet sein können.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung kann mit einer Einrichtung zur Detektion der Chemilumineszenz kombiniert werden. Dazu ist ein Photomultiplier 314 in der Nähe des Behälters 15 angeordnet. Zunächst werden die Nukleinsäuren elektrophoretisch vom Adsorptionsmittel 100 in Richtung der Anode 20b bewegt. Im Bereich der Anode 20b kann sodann, bsp. nach der Polymerasekettenreaktion, eine Amplifikation der Nukleinsäuren durchgeführt werden. Die amplifizierten Nukleinsäuren werden dann durch Zugabe von Magnetpartikeln gebunden. Durch Heranführen des Permanentmagneten 312 an die Anode 20b werden die mit Nukleinsäuren beladenen

Magnetpartikel an die Anode 20b angezogen. Nach Zugabe eines Chemilumineszenzpuffers und Anlegen einer Spannung über den Elektroden 20a, 20b wird eine Chemilumineszenz ausgelöst. Das dabei ausgesendete Licht wird durch den Photomultiplier 314  
5 detektiert.

Die vorerwähnten Funktionen können mittels eines x,y,z-Pipettierroboters automatisiert werden. Damit ist es möglich, eine Mehrzahl der erfindungsgemäßen Vorrichtungen  
10 nacheinander automatisch zu bedienen.

Eine automatische Isolation von Nukleinsäuren kann mit den in den Fig. 4 und 13 gezeigten Aufreinigungs- und Anreicherungs-  
15 vorrichtungen durchgeführt werden. Dabei hat sich folgendes Steuerungsprogramm als zweckmäßig erwiesen:

| Schritt Nr. | Gerätemodul    | Arbeitsschritt                     |
|-------------|----------------|------------------------------------|
| 1           | x,y,z-Pipettor | hole Pipettenspitze aus Vorrat 185 |
| 2           | x,y,z-Pipettor | gehe zu Probengefäß 165            |
| 3           | x,y,z-Pipettor | nehme 210 µl Probe auf             |
| 4           | x,y,z-Pipettor | gehe zu Reaktionsröhrchen 150      |
| 5           | x,y,z-Pipettor | dispensiere 200 µl                 |
| 6           | x,y,z-Pipettor | verwerfe Pipettenspitze            |
| 7           | x,y,z-Pipettor | hole Pipettenspitze aus Vorrat 185 |
| 8           | x,y,z-Pipettor | gehe zu erstem Gefäß 160           |
| 9           | x,y,z-Pipettor | nehme 710 µl Lyse-Reagenz auf      |
| 10          | x,y,z-Pipettor | gehe zu Reaktionsröhrchen 150      |
| 11          | x,y,z-Pipettor | dispensiere 700 µl Lyse-Reagenz    |
| 12          | x,y,z-Pipettor | verwerfe Pipettenspitze            |
| 13          | Thermomixer    | schüttele für 1 min                |
| 14          | Thermomixer    | erhitze auf 75 °C                  |
| 15          | Steuerung      | warte 10 min.                      |
| 16          | Thermomixer    | kühle auf 25 °C                    |

|    |                              |  |
|----|------------------------------|--|
| 17 | x,y,z-Pipettor               | hole Pipettenspitze aus Vorrat 185                               |
| 18 | x,y,z,-Pipettor              | gehe zu Reaktionsröhrchen 150                                    |
| 19 | x,y,z-Pipettor               | nehme 810 µl Lysemischung auf                                    |
| 20 | x,y,z-Pipettor               | gehe zu zweiter Öffnung 80                                       |
| 21 | x,y,z-Pipettor               | dispensiere 800 µl Lysemischung                                  |
| 22 | x,y,z-Pipettor               | verwerfe Pipettenspitze  |
| 23 | Pumpe (130)                  | pumpe Lysemischung durch Adsorbtionsmittel und verwerfe          |
| 24 | x,y,z-Pipettor               | hole Pipettenspitze aus Vorrat 185                               |
| 25 | x,y,z-Pipettor               | gehe zu zweitem Gefäß 162  |
| 26 | x,y,z-Pipettor               | nehme 710 µl Wasch-Reagenz auf                                   |
| 27 | x,y,z-Pipettor               | gehe zu zweiter Öffnung 80                                       |
| 28 | x,y,z-Pipettor               | dispensiere 700 µl Waschlösung                                   |
| 29 | x,y,z-Pipettor               | verwerfe Pipettenspitze  |
| 30 | zweite Pumpe 130             | pumpe Waschlösung durch Adsorbtionsmittel und verwerfe           |
| 31 | erste Pumpe 120              | pumpe Elektrophoresepuffer in den Tank                           |
| 32 | x,y,z-Pipettor               | hole Pipettenspitze aus Vorrat 185                               |
| 33 | x,y,z-Pipettor               | gehe zu Elektrophoresepuffervorrat 110                           |
| 34 | x,y,z-Pipettor               | nehme 250 µl Elektrophoresepuffer auf                            |
| 35 | x,y,z-Pipettor               | gehe zu zweiter Öffnung 80                                       |
| 36 | x,y,z-Pipettor               | verwerfe Pipettenspitze  |
| 37 | Spannungsver-<br>sorgung 220 | lege Spannung an Elektroden 20a, 20b                             |
| 38 | Steuerung                    | warte 20 min   |
| 39 | x,y,z-Pipettor               | hole Pipettenspitze aus Vorrat 185                               |
| 40 | x,y,z-Pipettor               | nehme 60 µl isolierte Nukleinsäure aus Entnahmeöffnung 60<br>auf |
| 41 | x,y,z-Pipettor               | gehe zu PCR-Gefäßen 210  |
| 42 | x,y,z-Pipettor               | dispensiere 50 µl in PCR-Gefäße 210                              |
| 43 | x,y,z-Pipettor               | verwerfe Pipettenspitze  |
| 44 | zweite Pumpe 130             | pumpe Elektrophoresepuffer aus dem Tank und verwerfe             |

Beispiel 1

### **Aufarbeitung einer Vollblutprobe mit Spin-column und Elektrophorese:**

Alle Reagenzien sind aus dem QIAamp™Blood Kit (Kat.Nr. 5 29104) der Firma Qiagen, Hilden entnommen. Nach Lyse und Adsorption der Nukleinsäure laut Protokoll des Herstellers wurde das Glasfaservlies aus dem QIAamp spin column herausgenommen und in ein speziell präpariertes Agaroseflachbettgel gemäß Fig. 5 gegeben. Die erste 10 Ausnehmung 81 dient zur Aufnahme des Glasvlieses und die zweite Ausnehmung 61 ist mit Elektrophorespuffer befüllt. Auf diese Weise kann die Nukleinsäure elektrophoretisch aus dem Glasvlies eluiert und in das anschließende Agarosegel und in die zweite Ausnehmung 61 überführt werden. Aus der zweiten 15 Ausnehmung 61 wurde die isolierte konzentrierte Nukleinsäure entnommen.

### **Beispiel 2**

20

### **Aufarbeitung einer Plasmaprobe**

Alle Reagenzien sind aus dem QIAamp™Blood Kit (Kat.Nr. 25 29104) der Firma Qiagen, Hilden entnommen. Zur Aufarbeitung wurde das Glasfaservlies aus dem QIAamp spin column entfernt und in die Vorrichtung gemäß Fig.1 so eingesetzt, daß es am unteren Auslaß positioniert war. Das Volumen des gesamten Reaktionsgefäßes war 2 ml. Es wurden 200 µl Plasma laut 30 Arbeitsanweisung des Herstellers verarbeitet. Statt Zentrifugation erfolgte das Absaugen mit einer Membranpumpe der Fa. Eppendorf. Zur elektrophoretischen Elution wurde ein Elektrophoresepuffer nach Andrews A.T. (Andrew A.T.: Electrophoresis, Claredon Press, Oxford, 1985, S. 160) verwendet. Als permeable Membran diente ein Dialyseschlauch 35 der Fa. Neolab, Heidelberg (Best.Nr.: 2-9022). Als Elektroden

20a, 20b wurden Drähte mit 0,3 mm Durchmesser einer Platin-Ruthenium-Legierung verwendet und als Spannungsgeber der Elektrophoresespannungsgeber der Fa. Hölzel, Dorfen. Aus der Entnahmeöffnung 60 wurden 30 µl Elutionsvolumen mit der Nukleinsäure entnommen.

### Beispiel 3

#### 10 Isolierung von DNA aus Hühnerblut

Von einem frisch geschlachteten weißen Masthuhn wurde Vollblut aus der Halsschlagader aufgefangen und sofort mit Ethylendiamintetraessigsäure (Fa. Sigma, München Best. Nr. E-5513) in einer Konzentration von 0,06 g EDTA/ml Vollblut versetzt. Das EDTA-Vollblut wurde portioniert eingefroren und bei -15°C gelagert. Alle Reagenzien sind dem "High Pure PCR Template Preparation Kit" der Fa. Boehringer Mannheim (Best. Nr. 1 796 828) entnommen. 100 µl EDTA-Vollblut (s.o.) wurden mit 200 µl Lyse-Puffer und 60 µl Proteinase K jeweils aus dem o.g. Reagenziensatz gemischt und 15 min. bei 70°C inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur werden 100 µl Isopropanol (Fa. Roth, Karlsruhe Best.Nr. 9866) hinzugegeben und kräftig gemischt. Anschließend wird die zähflüssige Reaktionsmischung mit einer Vakuumpumpe (Eppendorf, Hamburg Nr. 4151) durch das Glasvlies gesaugt. Danach wurde das Vlies mit fünfmal 500 µl Waschpuffer (aus Kit s.o.) mit 80 % Ethanol (Fa. Roth, Karlsruhe Best. Nr. 5054) gewaschen. Dann wurde das Vlies aus dem Filter-Tube entfernt und in eine Vorrichtung gemäß Fig.5 in die erste Ausnehmung 81 überführt. Anschließend wurden ca. 0,5 ml Elektrophoresepuffer (10 mM Tris-HCl [Fa. Sigma, München Best.Nr. T-8529] 5 mM Natrium-Acetat [Fa Sigma, München Best. Nr. S-3272] 0,5 mM EDTA [s.o.] pH 8,2) auf das Vlies in die erste Ausnehmung 81 zupipettiert, der zuvor auf 70 °C erhitzt worden war. Danach wurde die Elektroelution

durch Anlegen einer Gleichspannung von max. 10 mA bei ca. 60  
grd. C durchgeführt. Als Spannungsquelle diente ein  
Elektrophoresetransformator der Fa Hölzel, Dorfen (Nr. 0 628/  
1985). Die Elution erfolgte in Fraktionen 1-7, wobei nach  
5 definierter Zeit (10-15 min) mit einer Eppendorfpipette  
Fraktionen von ca 50 µl aus der Öffnung (61) entnommen und  
gesammelt wurden. Die Fraktionen wurden auf einem Agarosegel  
(0,05 mg Agarose in 60 ml Elektrophoresepuffer mit 40 µl  
Ethidiumbromidlösung [100 mg Ethidiumbromid (Fa. Sigma,  
10 München Nr. E-8751) in dest. Wasser] analysiert. Als  
Kontrolle wurden 40 µl Lysemischung verwendet. Die Kontrolle  
und Fraktionen nach 15 min. Elektroelution zeigten eine  
fluoreszierende Bande nach Elektrophorese von 5 min. bei ca.  
40 V und max. 50 mA unter Beleuchtung mit einer UV-Lampe der  
15 Fa. Roger Electronic Products (Nr. MD-1782GS). Als  
Spannungsquelle diente ein Elektrophoresetransformator der Fa  
Hölzel, Dorfen (Nr. 0 628/ 1985).

## 20 **Beispiel 5**

### **Herstellung einer beschichteten elektrisch leitfähigen Kunststoffelektrode (Fig. 9)**

25 Zunächst wird biotinyliertem Rinder-Immunglobulin G (R-IgG)  
hergestellt. Dazu werden 0,5 ml einer R-IgG-Lösung (2mg R-IgG  
(Boehringer Mannheim Cat.No. 1293621103 in 1 ml PBS (  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*1 H<sub>2</sub>O 2,76 g/l; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O 3,56 g/l; NaCl 8 g/l; pH  
7,25)) mit 6 µl D-Biotinoyl-ε-aminocaprinsäure-N-  
30 hydroxysuccinimidesterlösung in PBS und DMSO (Ansatz laut  
Biotin Labeling Kit von Boehringer Mannheim Best. Nr.  
1418165) vermischt und 2,5 h bei Raumtemperatur auf einem  
Magnetrührer gerührt und anschließend über Nacht stehen  
lassen. Das molare Verhältnis von Biotin: R-IgG beträgt 20:1  
35 bei diesem Ansatz.

Zur Beschichtung von elektrisch leitfähigem Kunststoff mit biotinyliertem R-IgG werden aus einem Rohling, hergestellt im Spritzgußverfahren aus PRE-ELEC TP 4474 (Premix Oy, 5 Finnland), Scheiben von 4 mm Durchmesser ausgeschnitten, in einen Napf einer unbeschichteten Mikrotiterplatte gelegt und in einer Lösung von 0,2 ml Beschichtungspuffer (NaHCO<sub>3</sub> 4,2 g/l; pH 9,6) dreimal, dann in einer Lösung von 40 ml Beschichtungspuffer (NaHCO<sub>3</sub> 4,2 g/l;pH 9,6) und 6 µl R-IgG- 10 Biotin-Lösung gewaschen. Die Beschichtung erfolgt über Nacht.

Anschließend werden die Scheiben 3 x mit je 100 ml Milli-Q-Wasser gewaschen, wobei durch Sedimentation oder Zentrifugation die Trennung von fester und flüssiger Phase 15 erfolgt. Anschließend werden die Scheiben in 40 ml PBS wieder aufgenommen.

**Beispiel 6**

20 Durchführung einer Probenvorbereitung mit Elektroelution, Amplifikation und Elektrochemilumineszenz-Messung zum Nachweis von PCR-Amplifikaten

25 Die in Fig. 14 gezeigte Vorrichtung wurde zur Durchführung der Isolierung, Amplifikation und Chemilumineszenzmessung automatisch mit einem Computer-Programm mit den folgenden Programmschritten gesteuert:

| Prozeßmodule              | Einzel Schritte   |
|---------------------------|---|
| <b>Probenvorbereitung</b> |   |
| Lyse                      | Probe, Lysemischung, Proteinase K in Reaktionsraum 17 pipettieren |
|                           | Reaktionsraum 17 verschließen                                     |
|                           | Reaktionsraum 17 auf 70 °C temperieren                            |
|                           | Reaktionsraum 17 auf RT kühlen                                    |

|  |  |
|--|--|
|  | Reaktionsraum 17 öffnen  |
|  | Isopropanol zugeben  |
|  | Reaktionsmischung aus Reaktionsraum 17 durch zweiten Stutzen 85 absaugen       |
| <b>Elektroelution</b>                  | Elutionspuffer zugeben   |
|  | Spannung an Elektroden 20a, 20b anlegen  |
|  | Nukleinsäure wandert in den Entnahmeraum 50                                    |
| <b>Amplifikation</b>                   | Zugabe von PCR-Mix in den Entnahmeraum 50                                      |
|  | Verschließen von zweitem Stutzen 85, zweiter Öffnung 80 und Entnahmeöffnung 60 |
|  | zyklisches Heizen und Abkühlen des Entnahmeraums 50                            |
| <b>Denaturierung</b>                   | Öffnen der Entnahmeöffnung 60  |
| <b>Sonden annealing</b>                | Zugabe von Ru-Sonde  |
|  | Verschließen von Entnahmeöffnung 60  |
|  | Aufheizen und Abkühlen des Entnahmeraums 50                                    |
| <b>Detektion</b>                       | Öffnen von Entnahmeöffnung 60  |
|  | Zugabe von SA-Magnetpartikel durch Entnahmeöffnung 60                          |
|  | Verschließen von Entnahmeöffnung 60  |
| <b>Magnetseparation</b>                | Anlegen von Dauermagnet 312 mit Magnetfeld für den Entnahmeraum 50             |
|  | Absaugen von Reaktionsmischung aus dem Entnahmeraum 50                         |
| <b>Magnetpartikel waschen (Option)</b> | Zugabe von Waschlösung durch Entnahmeöffnung 60                                |
|  | Entfernen des Magnetfeldes für den Entnahmeraum 50                             |
|  | Absaugen der Waschlösung durch zweiten Stutzen 85                              |
|  | Zugabe von Assay-puffer durch Entnahmeöffnung 60                               |
| <b>Elektrochemilumineszenz-Messung</b> | Anlegen von Spannung an die Elektroden 20a,b                                   |
|  | Messung der Lumineszenz mittels Photomultiplier 314                            |

## Bezugszeichenliste

|    |     |                            |
|----|-----|----------------------------|
| 10 |     | Elektrophorosepuffertank   |
| 11 |     | Agaroseflachbettgel        |
| 5  | 15  | Behälter                   |
|    | 17  | Reaktionsraum              |
|    | 20a | Kathode                    |
|    | 20b | Anode                      |
|    | 30  | erste permeable Membran    |
| 10 | 31  | zweite permeable Membran   |
|    | 40  | O-Ring                     |
|    | 41  | erster Stutzen             |
|    | 42  | erste Öffnung              |
|    | 43  | Durchbruch                 |
| 15 | 44  | zweiter Stutzen            |
|    | 45  | dritter Stutzen            |
|    | 46  | dritte Öffnung             |
|    | 49  | Kanal                      |
|    | 50  | Entnahmeraum               |
| 20 | 60  | Entnahmeöffnung            |
|    | 61  | zweite Ausnehmung          |
|    | 70  | Füllstand                  |
|    | 80  | zweite Öffnung             |
|    | 81  | erste Ausnehmung           |
| 25 | 85  | zweiter Stutzen            |
|    | 90  | Spin-column                |
|    | 100 | Adsorptionsmittel          |
|    | 110 | Elektrophoresepuffervorrat |
|    | 120 | erste Pumpe                |
| 30 | 125 | Füllstutzen                |
|    | 130 | zweite Pumpe               |
|    | 140 | Ableitung                  |
|    | 150 | Reaktionsröhrchen          |
|    | 160 | erstes Gefäß               |
| 35 | 162 | zweites Gefäß              |

|    |          |                              |
|----|----------|------------------------------|
|    | 165      | Probengefäß                  |
|    | 170      | Schüttelbock                 |
|    | 180      | Pipettenspitze               |
|    | 185      | Vorrat an Pipettenspitzen    |
| 5  | 190      | x,y,z-Pipettierarm           |
|    | 210      | PCR-Gefäße                   |
|    | 220      | Spannungsquelle              |
|    | 225a, b  | elektrische Zuleitungen      |
|    | 302      | Stützvlies                   |
| 10 | 303      | weiteres Stützvlies          |
|    | 310      | semipermeable Membran        |
|    | 312      | Permanentmagnet              |
|    | 313      | Magnetpartikel               |
|    | 314      | Photomultiplier              |
| 15 | 316      | durchsichtiger Schnappdeckel |
|    | 318      | Schlauchstück                |
|    | 320, 321 | Ausnehmungen                 |
|    | 323      | erste Lage                   |
|    | 324      | dritte Lage                  |
| 20 | 325      | zweite Lage                  |
|    | 326      | Schnappdeckel                |
|    | 327      | Nadel                        |
|    | 328      | Septum                       |
|    | 329      | Heizplatten                  |
| 25 | 340      | Stopfen                      |
|    | 400      | Deckel                       |
|    | 401      | Vakuumschluß                 |
|    | 402      | Anschlüsse                   |
|    | 410      | Mehrfachbehälter             |
| 30 |          |                              |

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren aus biologischen nukleinsäurehaltigen Flüssigkeiten und  
5 Suspensionen, wobei
- a) die Nukleinsäuren an ein Adsorptionsmittel (100) gebunden werden,
  - 10 b) die Nukleinsäuren vom Adsorptionsmittel (100) eluiert und
  - c) durch Elektrophorese von einem Reaktionsraum (17) in einen damit verbundenen Entnahmeraum (50) bewegt und  
15 dort angereichert werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Adsorptionsmittel (100) nach der Adsorption gewaschen wird.
- 20 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Elution der Nukleinsäuren vom Adsorptionsmittel (100) mittels Pufferwechsel oder durch Elektrophorese erfolgt.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das im  
25 Entnahmeraum (50) befindliche Elutionsvolumen kleiner ist als das Probenausgangsvolumen.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die  
30 Nukleinsäuren vor der Adsorption durch Lyse freigesetzt werden.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei biologischen Flüssigkeiten oder Suspensionen durch Verflüssigung aus festem Material hergestellt werden.
- 35

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Adsorptionsmittel (100) aus Silicagel, Glaspartikeln, Glasfaservlies oder Ionenaustauschmaterial besteht.
- 5 8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Adsorptionsmittel (100) aus mit Glas umfangenen magnetischen Partikeln besteht, und die an magnetischen Partikel adsorbierten Nukleinsäuren mittels eines Magneten (312) isoliert werden.
- 10 9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei nach der Elution eine Hybridisierung durchgeführt wird.
- 15 10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei nach der Elution eine Amplifikation durchgeführt wird.
- 20 11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei nach der Elution eine Chemilumineszenzdetektion durchgeführt wird.
- 25 12. Vorrichtung zur Isolierung von Nukleinsäuren aus biologischen nukleinsäurehaltigen Flüssigkeiten und Suspensionen, wobei ein Reaktionsraum (17) zur Aufnahme eines mit Nukleinsäuren beladenen Adsorptionsmittels (100) mit einem Entnahmeraum (50) verbunden ist, und wobei die Nukleinsäuren mittels einer Elektrophoreseeinrichtung (20a, 20b) vom Reaktions- (17) in den Entnahmeraum (50) bewegbar und dort anreicherbar sind.
- 30 13. Vorrichtung nach Anspruch 12, wobei der Reaktionsraum (17) von einem Elektrophoresepuffertank (10) umgeben ist.
- 35 14. Vorrichtung nach Anspruch 13, wobei der Reaktionsraum (17) mit dem Elektrophoresepuffertank (10) ionenleitend verbunden ist.

15. Vorrichtung nach Anspruch 13 oder 14, wobei der Reaktionsraum (17) sich im Elektrophoresepuffertank (10) befindet.

5

16. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 15, wobei der Reaktionsraum (17) über mindestens eine Öffnung (80) beschickbar und entsorgbar ist.

10 17. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 16, wobei im Reaktionsraum (17) ein Adsorptionsmittel (100) für Nukleinsäuren aufgenommen ist.

15 18. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 17, wobei die ionenleitende Verbindung durch mindestens eine permeable, Nukleinsäuren zurückhaltende Membran (31) gebildet ist.

19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 18, wobei die Vorrichtung aus thermoplastischem Kunststoff hergestellt  
20 ist.

20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 19, wobei die Elektrophoreseeinrichtung mindestens zwei Elektroden (20a, 20b) aufweist, von denen mindestens eine in den  
25 Elektrophoresepuffertank (10) ragt oder Bestandteil desselben ist.

21. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 19, wobei die Elektrophoreseeinrichtung mindestens zwei Elektroden  
30 (20a, 20b) aufweist, von denen mindestens eine in den Entnahmeraum (50) ragt oder Bestandteil eines den Entnahmeraum (50) umgreifenden Behälters (15) ist.

22. Vorrichtung nach Anspruch 20 oder 21, wobei eine der  
35 Elektroden (20a, 20b) in den Reaktionsraum (17) ragt oder

Bestandteil eines den Reaktionsraum (17) umgreifenden Behälters (15) ist.

23. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 20 bis 22, wobei  
5 mindestens eine der Elektroden (20a, 20b) aus einem elektrisch leitfähigen Kunststoff hergestellt ist.

24. Vorrichtung nach Anspruch 23, wobei der elektrisch leitfähige Kunststoff elektrisch leitfähige Zuschlagstoffe,  
10 wie Graphit, Eisen, Silber oder andere Metalle, enthält.

25. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 20 bis 24, wobei der Widerstand der Elektroden (20a, 20b) kleiner als 100 M $\Omega$  ist.  
15

26. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 20 bis 25, wobei die Elektroden (20a, 20b) eine Beschichtung aufweisen.

27. Vorrichtung nach Anspruch 26, wobei die Beschichtung aus  
20 mehreren Lagen (323, 324, 325) besteht.

28. Vorrichtung nach Anspruch 27, wobei mindestens eine Lage (323, 324, 325) aus einem biologischen Polymer gebildet ist, das vorzugsweise ein bindefähiges Protein ist.  
25

29. Vorrichtung nach Anspruch 28, wobei das bindefähige Protein ein Antikörper, ein Antigen oder eine Komponente eines anderen Ligand-Rezeptor-Paares ist.

30. Vorrichtung nach Anspruch 28, wobei das biologische Polymer derart ist, daß daran Nukleinsäuren bindbar sind.  
30

31. Vorrichtung nach Anspruch 28, wobei das biologische Polymer ein Oligonukleotid ist.  
35

32. Vorrichtung nach Anspruch 28, wobei das biologische Polymer ein proteinähnliches Aminosäure-Konstrukt (PNA-Konstrukt) ist.
- 5 33. Vorrichtung nach Anspruch 27, wobei eine der Lagen (323, 324, 325) aus chemisch reaktiven Linkermolekülen besteht.
34. Vorrichtung nach Anspruch 20 oder 21, wobei zwei Elektroden (20a, 20b) in Gegenüberstellung in der Wandung des  
10 Behälters (15) vorgesehen sind.
35. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 34, wobei Mittel (312) zu Erzeugung eines an- und abschaltbaren Magnetfelds so angeordnet sind, daß der Behälter (15) vom  
15 Magnetfeld durchdringbar sind.
36. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 35, wobei in der Nähe des Behälters (15) eine Detektionseinrichtung, vorzugsweise ein Photomultiplier (314), angeordnet ist.  
20
37. Vorrichtung nach Anspruch 36, wobei der Behälter (15) ein optisches Fenster (316) besitzt.
38. Elutionsvorrichtung mit einer Mehrzahl von Vorrichtungen  
25 nach einem der Ansprüche 12 bis 37, wobei die den Vorrichtungen zugeordneten Elektroden (20a, 20b) elektrisch miteinander und mit einer Stromquelle (220) verbunden sind.
39. Elutionsvorrichtung nach Anspruch 38, wobei die  
30 Vorrichtungen geometrisch im 96-Napf-Mikrotitrationsplattenformat angeordnet sind.
40. Aufreinigungs- und Anreicherungs Vorrichtung mit einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 37 oder einer

Elutionsvorrichtung nach Anspruch 38 oder 39, wobei mindestens eine der folgenden Einrichtungen vorgesehen ist:

- x,y,z-Pipettierarm (190),
- Thermo-Schüttelbock (170),
- 5 - Heiz-/Kühlmittel (329) zum zyklischen Heizen und Kühlen,
- Spannungsquelle (220),
- mindestens zwei Elektroden (20a, 20b),
- mindestens eine Pumpe (120, 130),
- 10 - mindestens ein Magnet (312),
- mindestens ein Photomultiplier (314).

41. Aufreinigungs- und Anreicherungs Vorrichtung nach Anspruch 40, wobei die Vorrichtung, die Elutionsvorrichtung und die  
15 Einrichtung/en mittels eines Prozeßrechners automatisch zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 11 steuerbar sind.

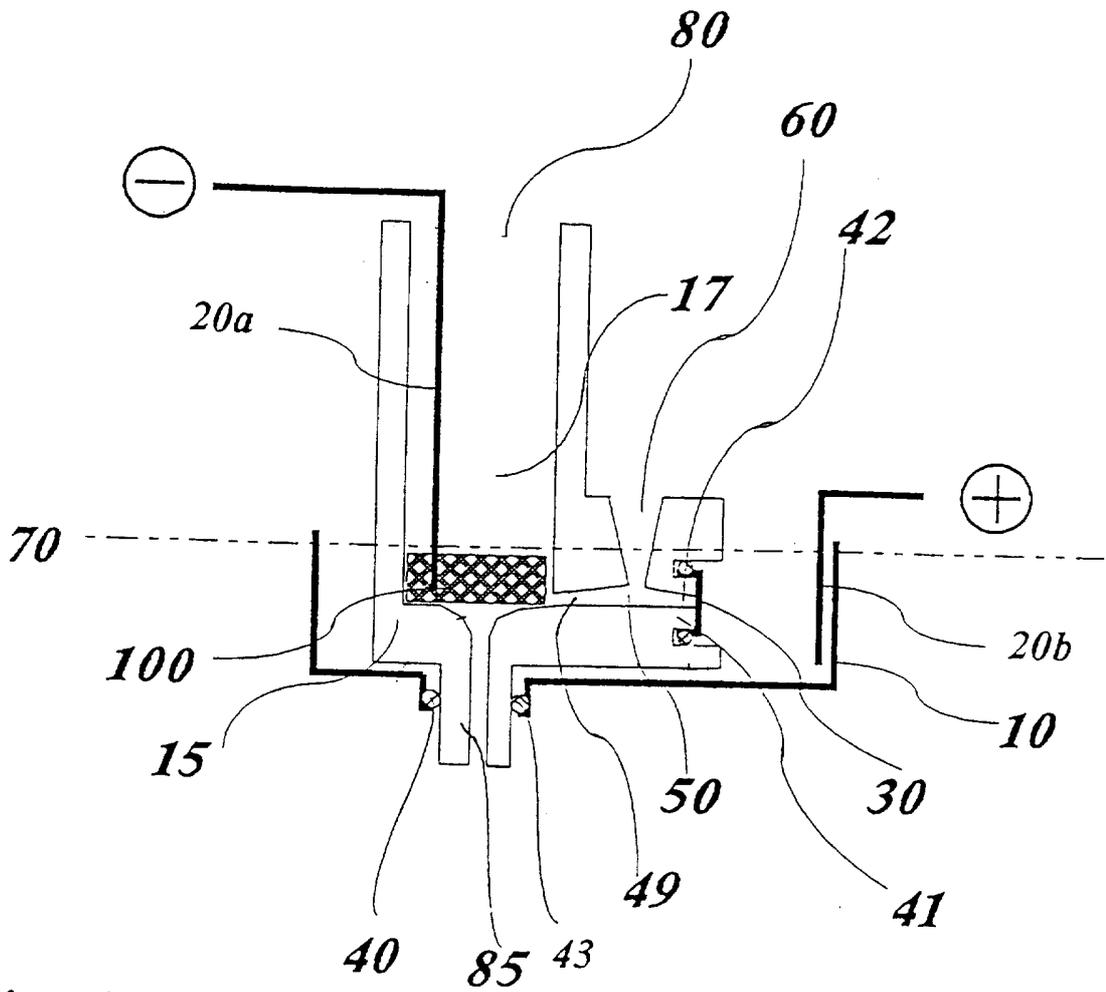


Fig. 1

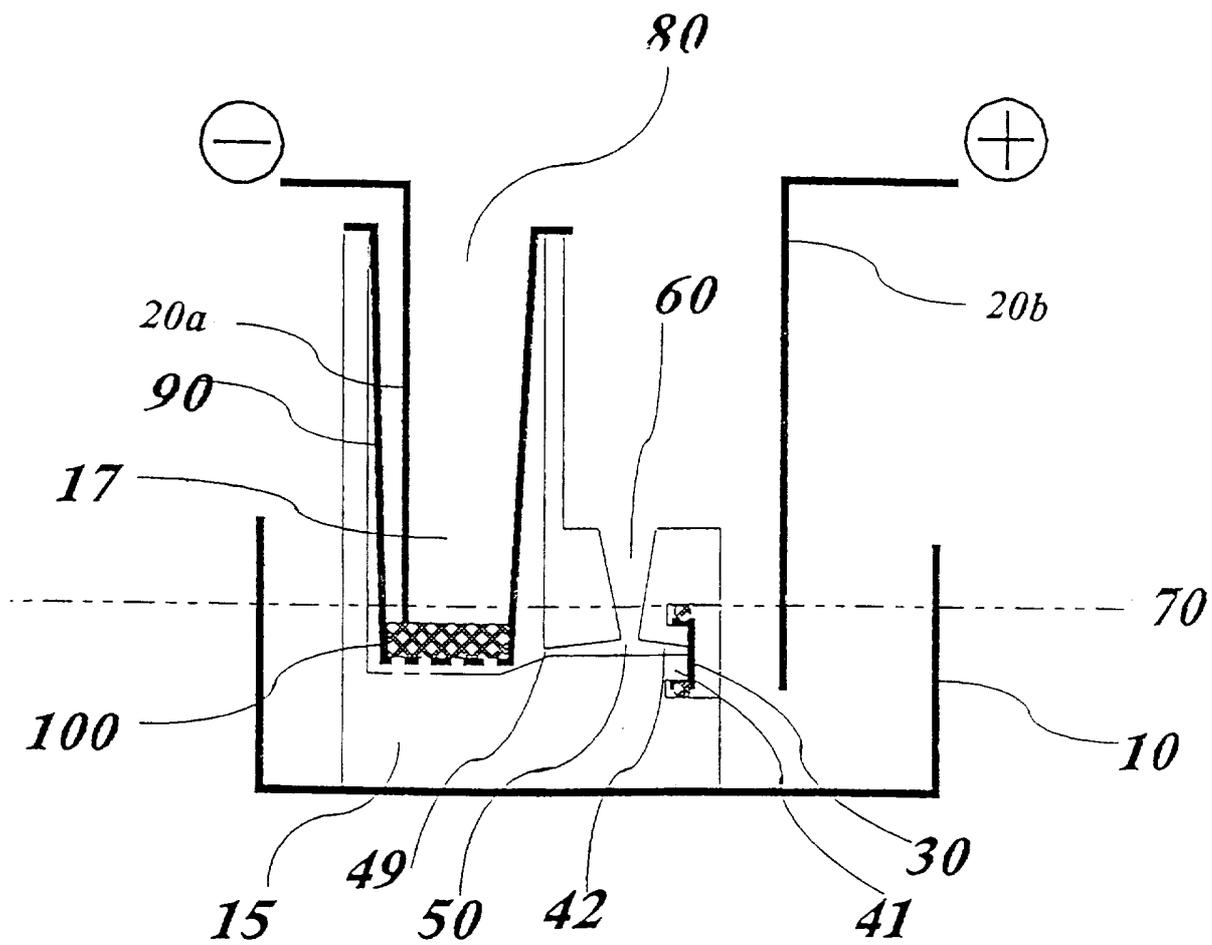


Fig. 2

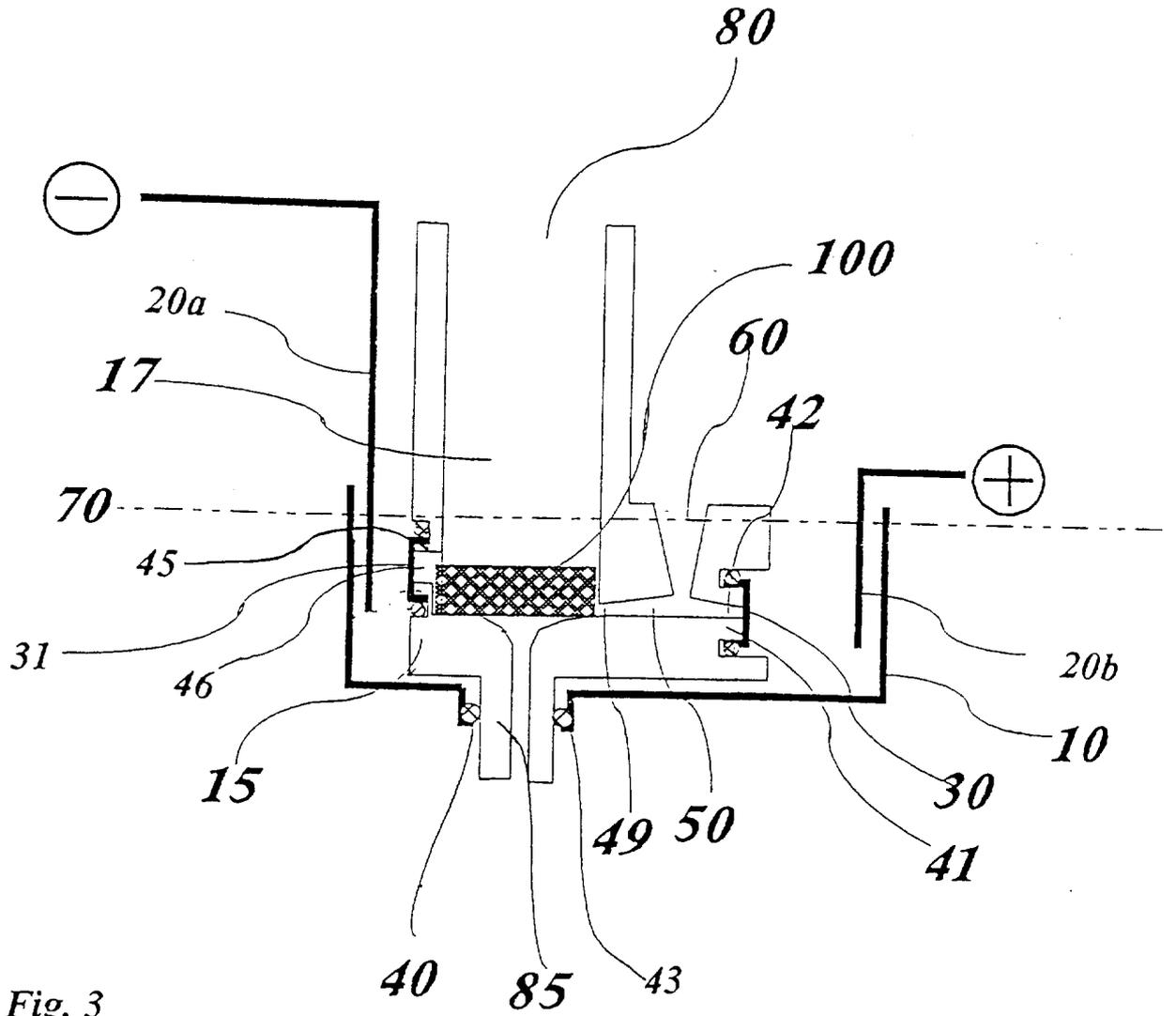


Fig. 3

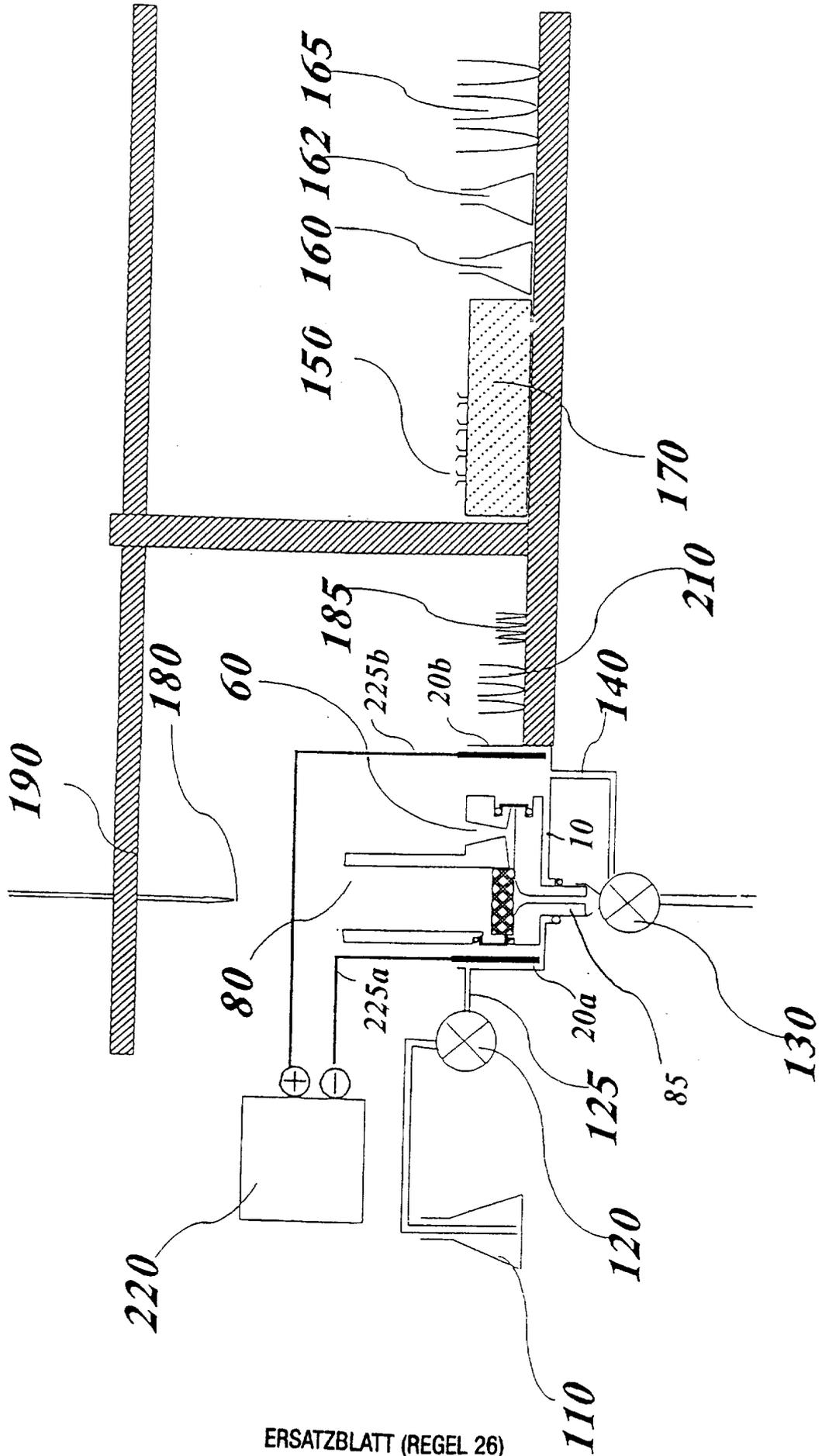


Fig. 4

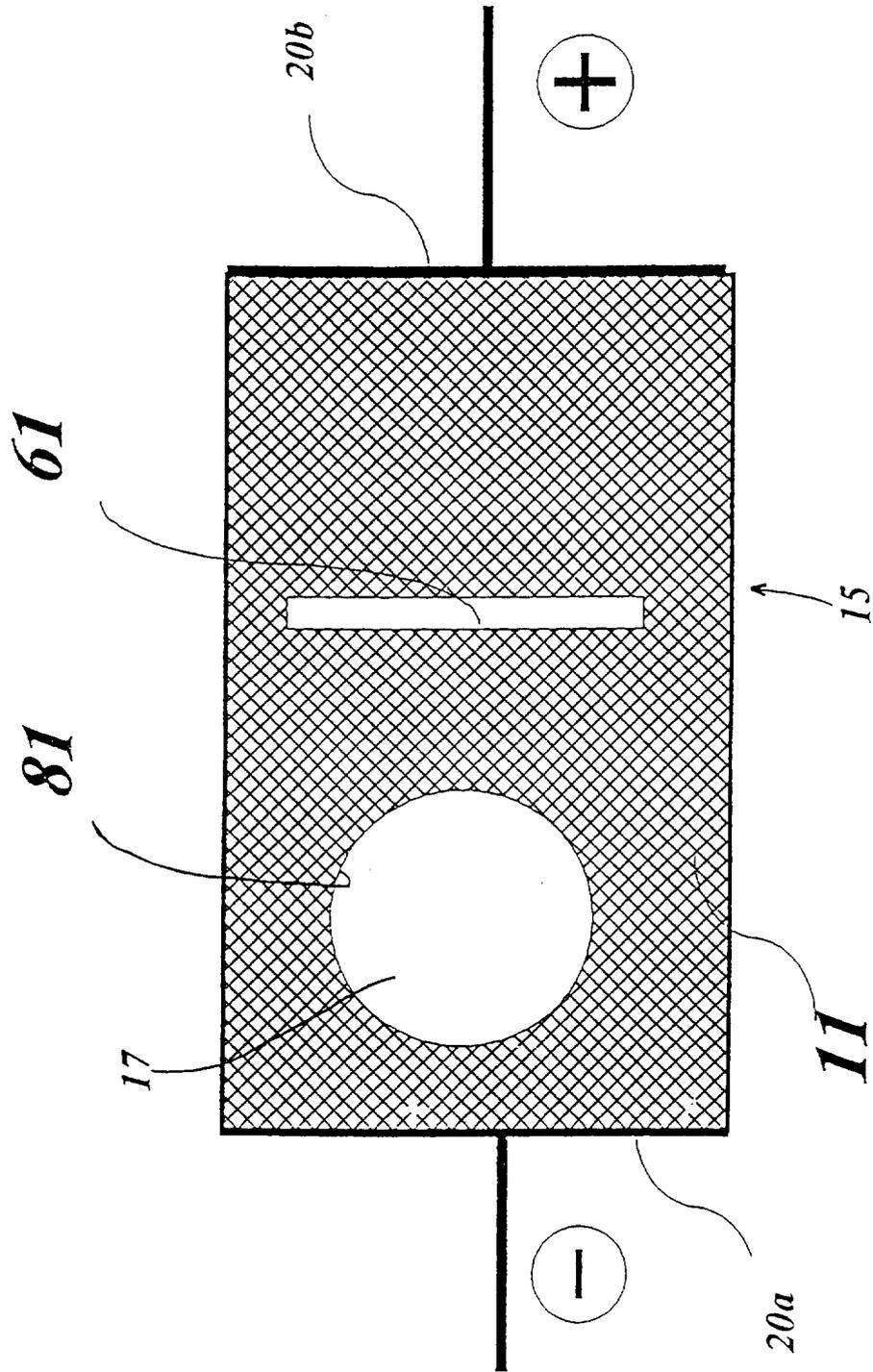


Fig. 5

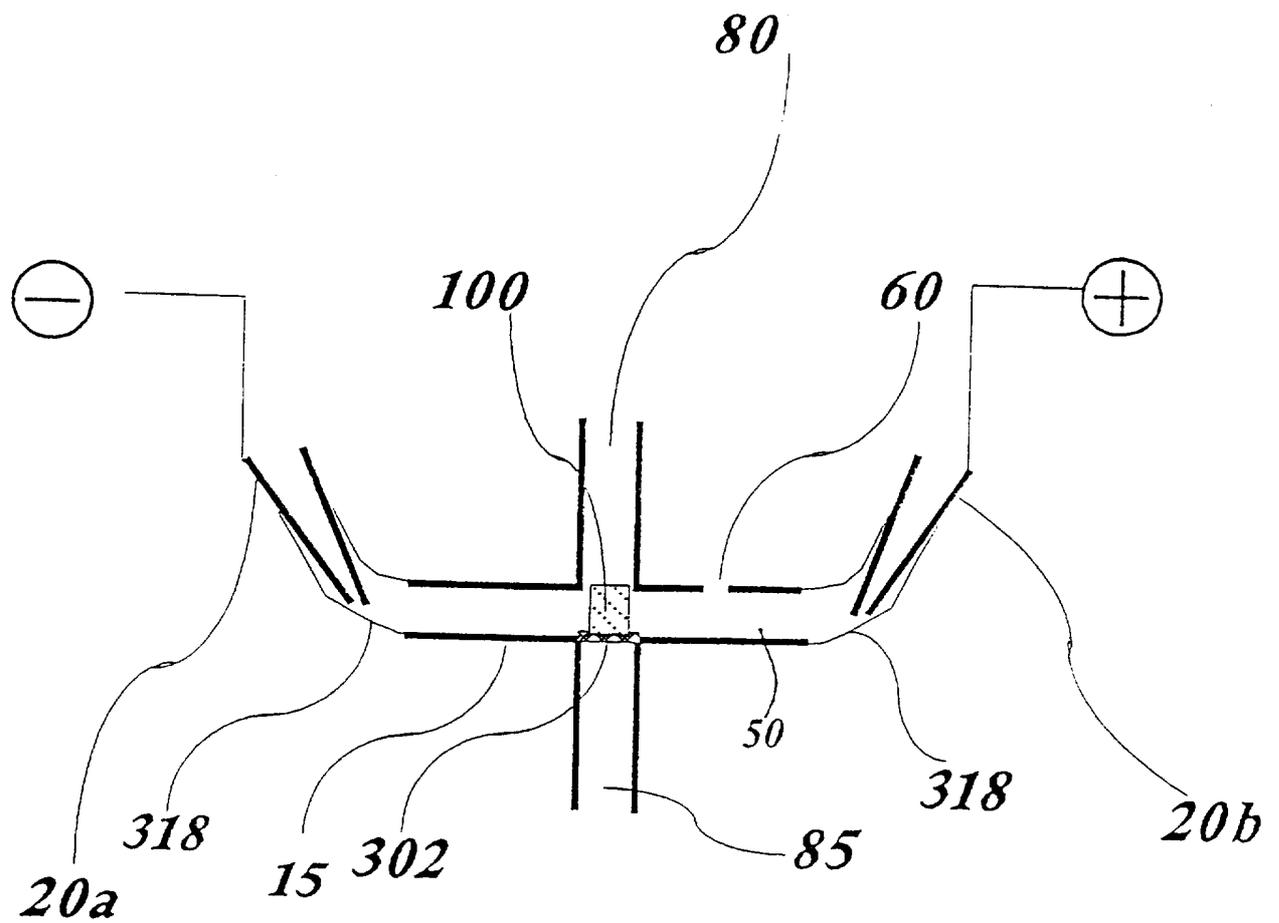


Fig. 6a

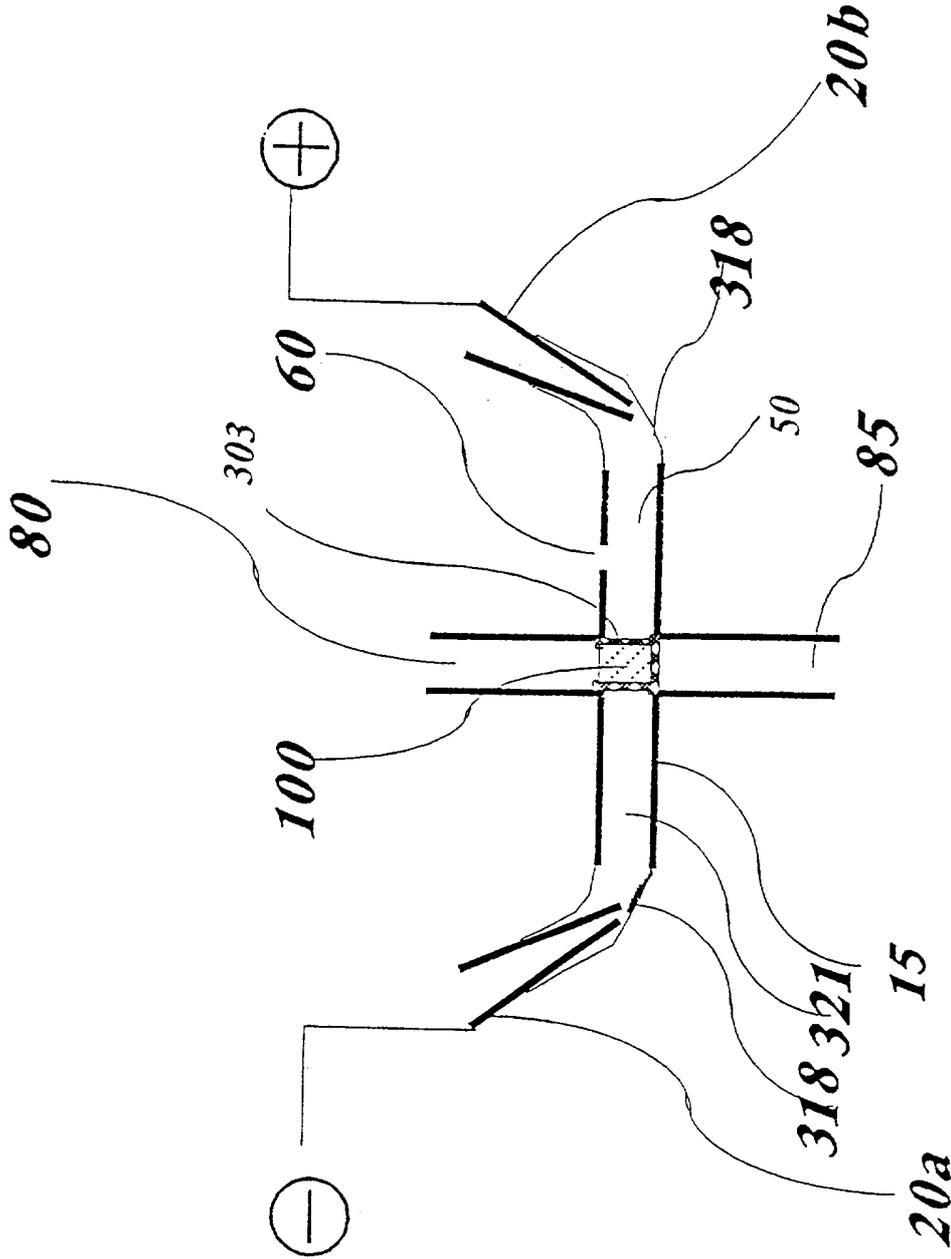


Fig. 6b

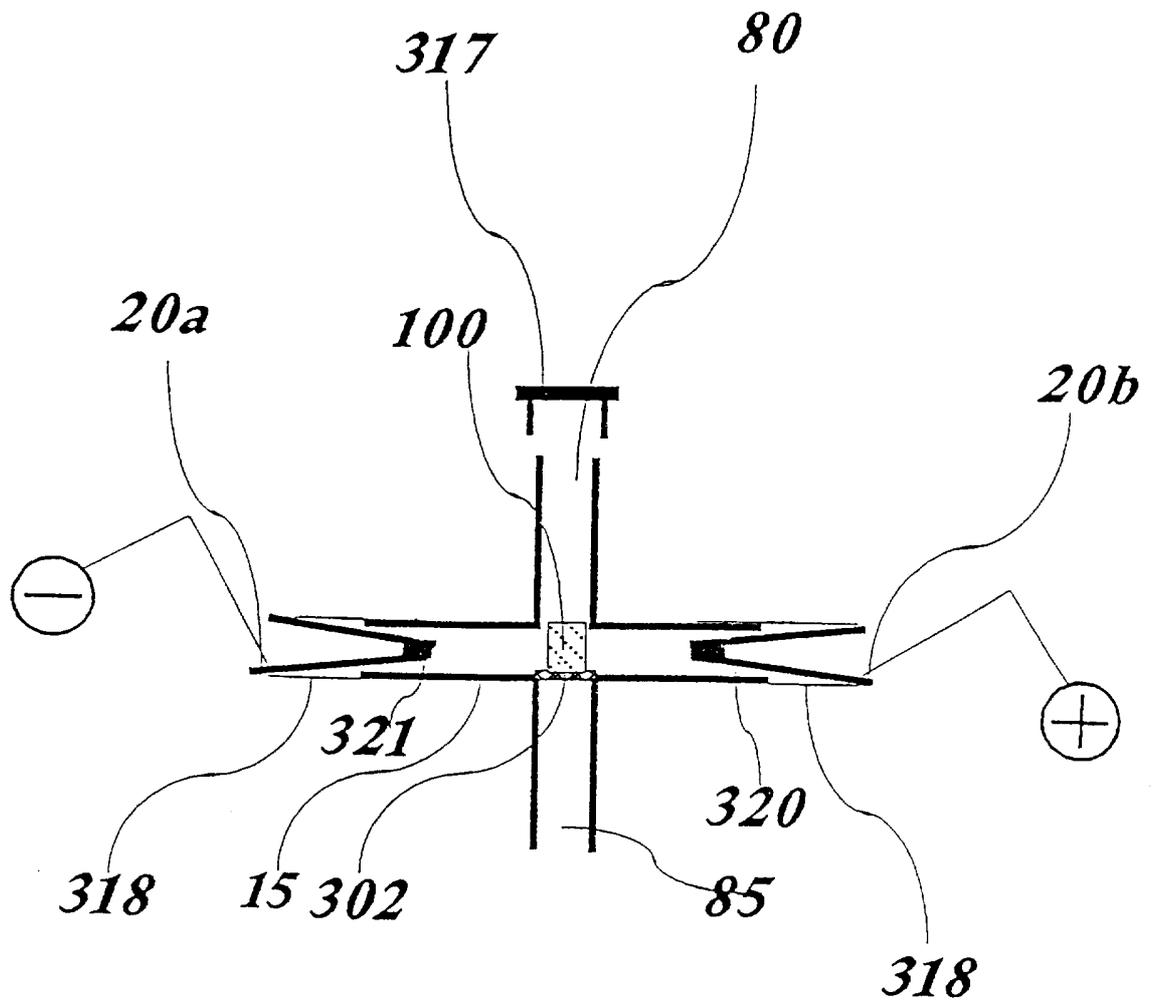


Fig. 6c

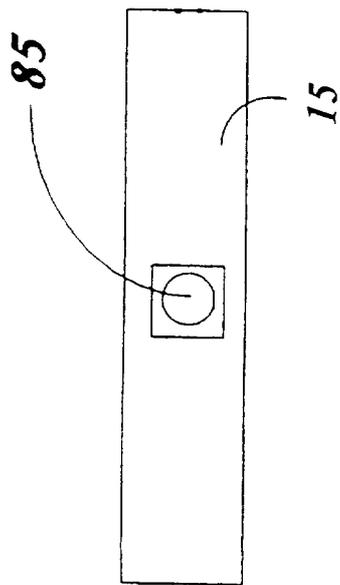


Fig. 7a

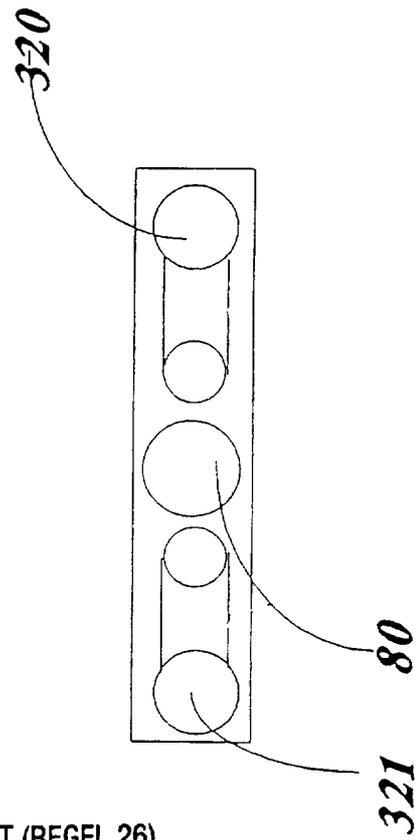


Fig. 7b

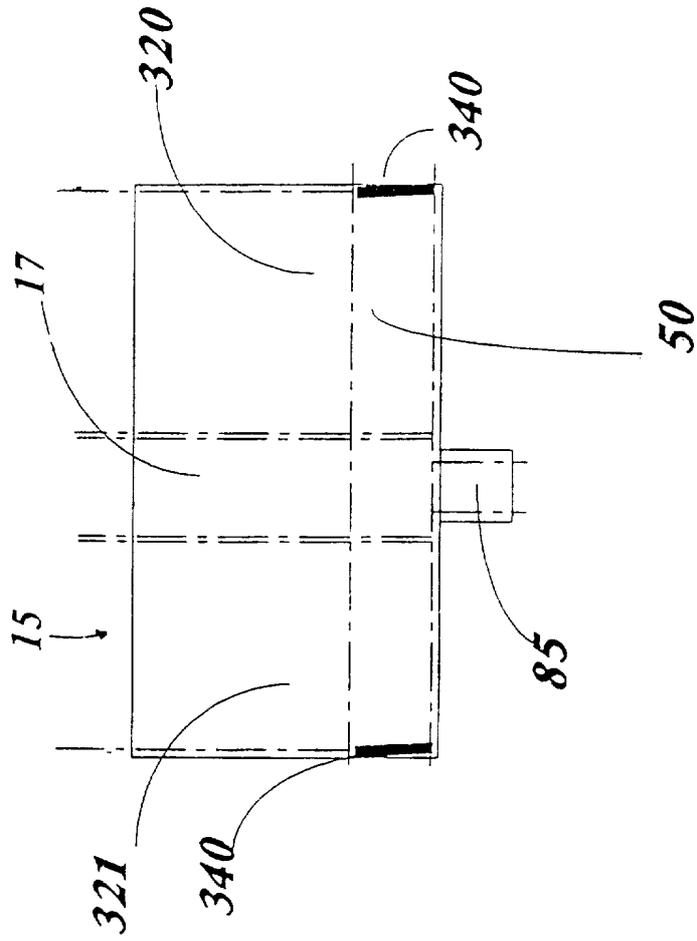
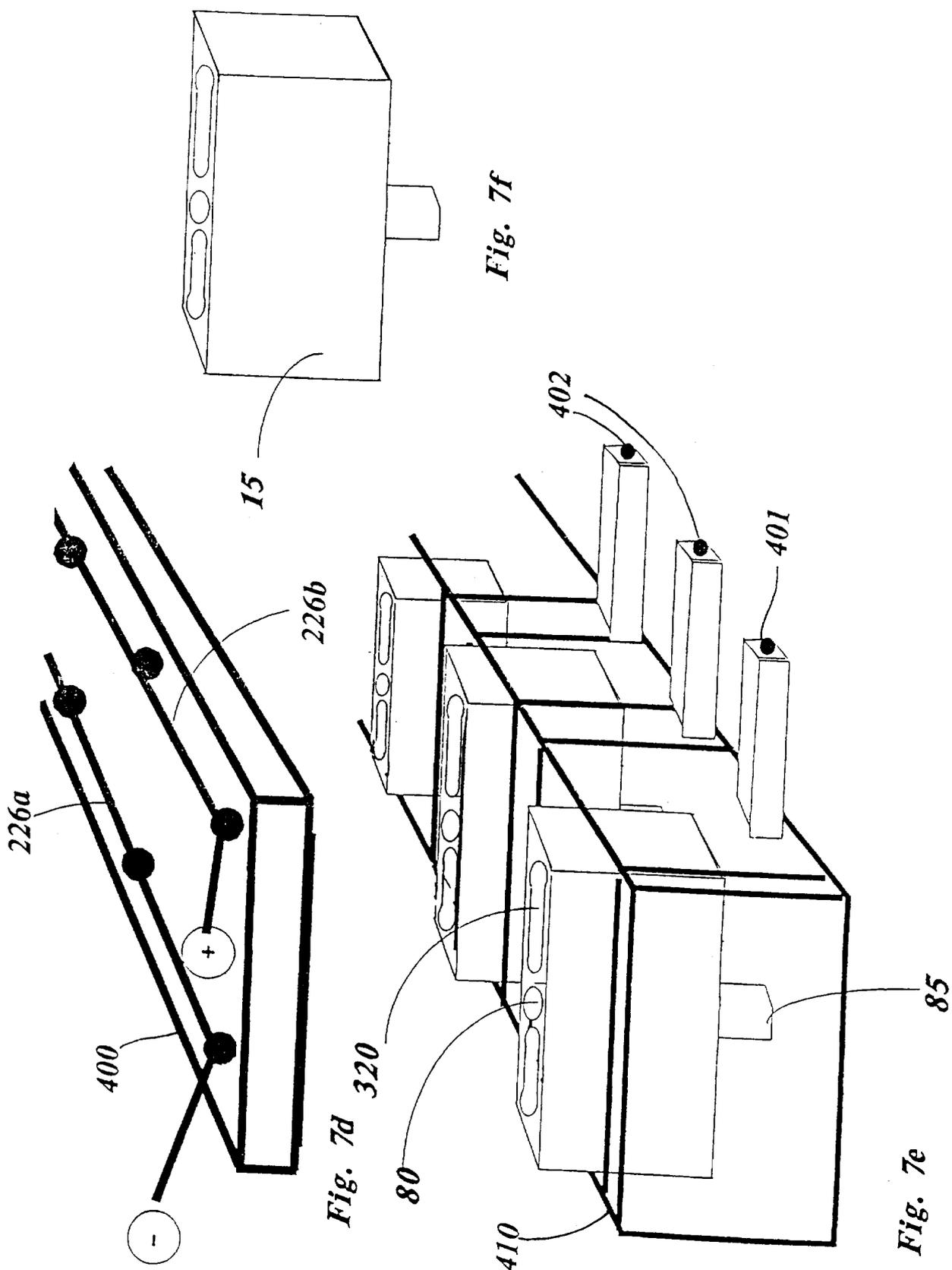


Fig. 7c



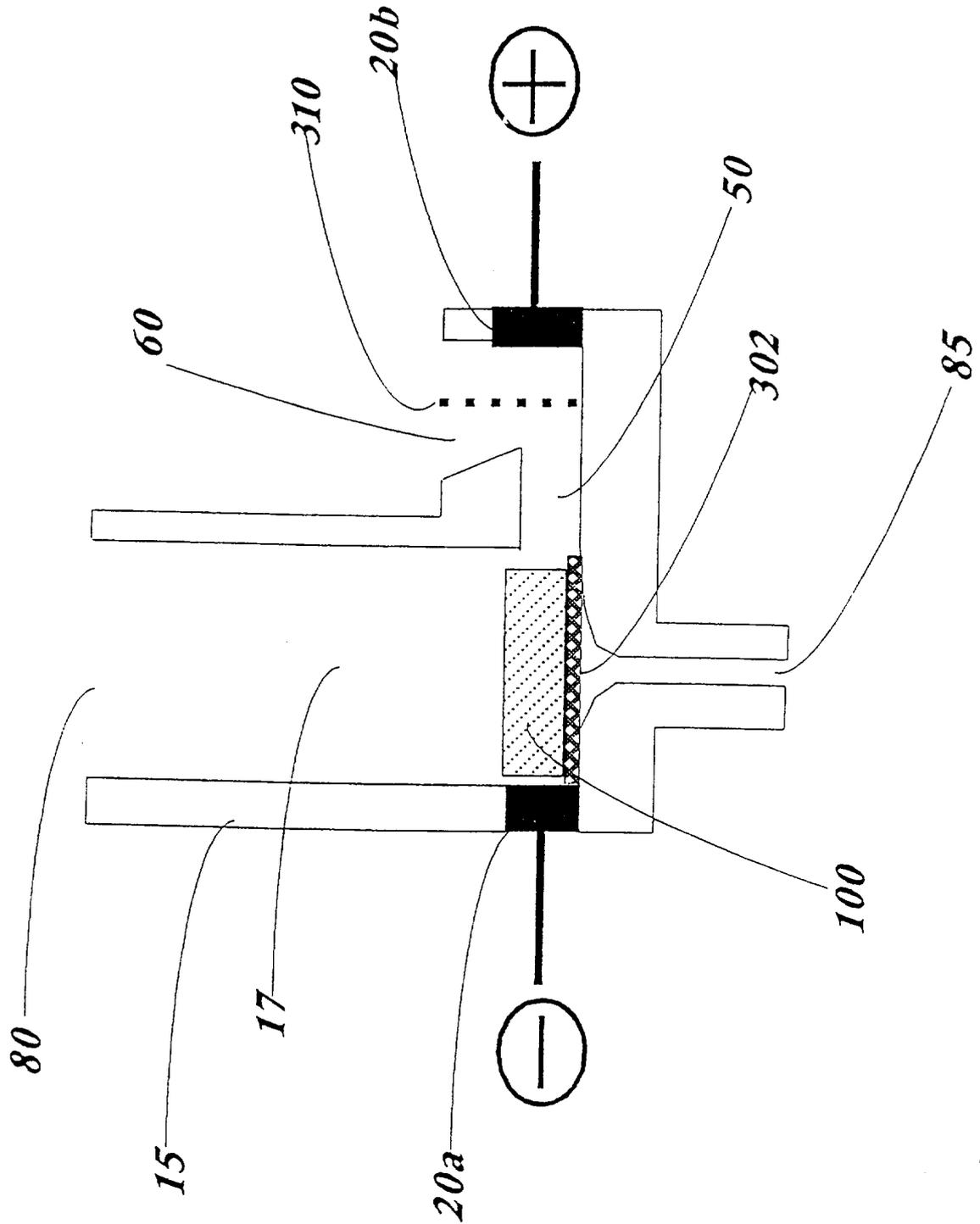
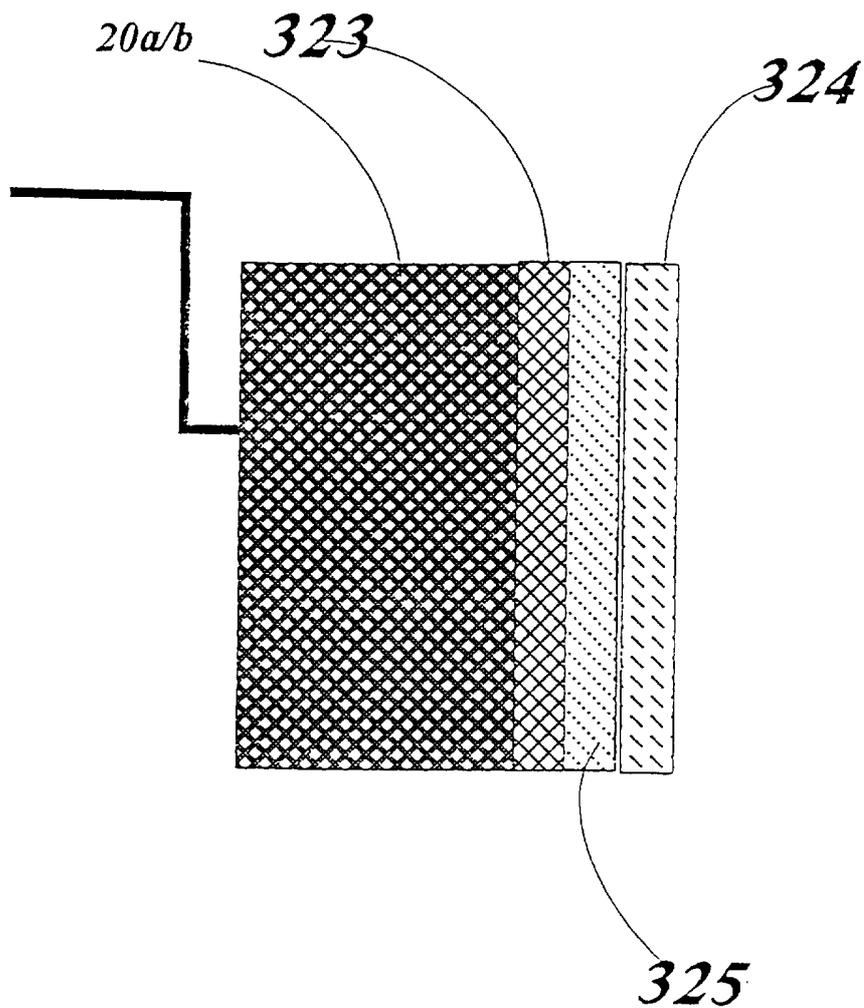


Fig. 8



*Fig. 9*

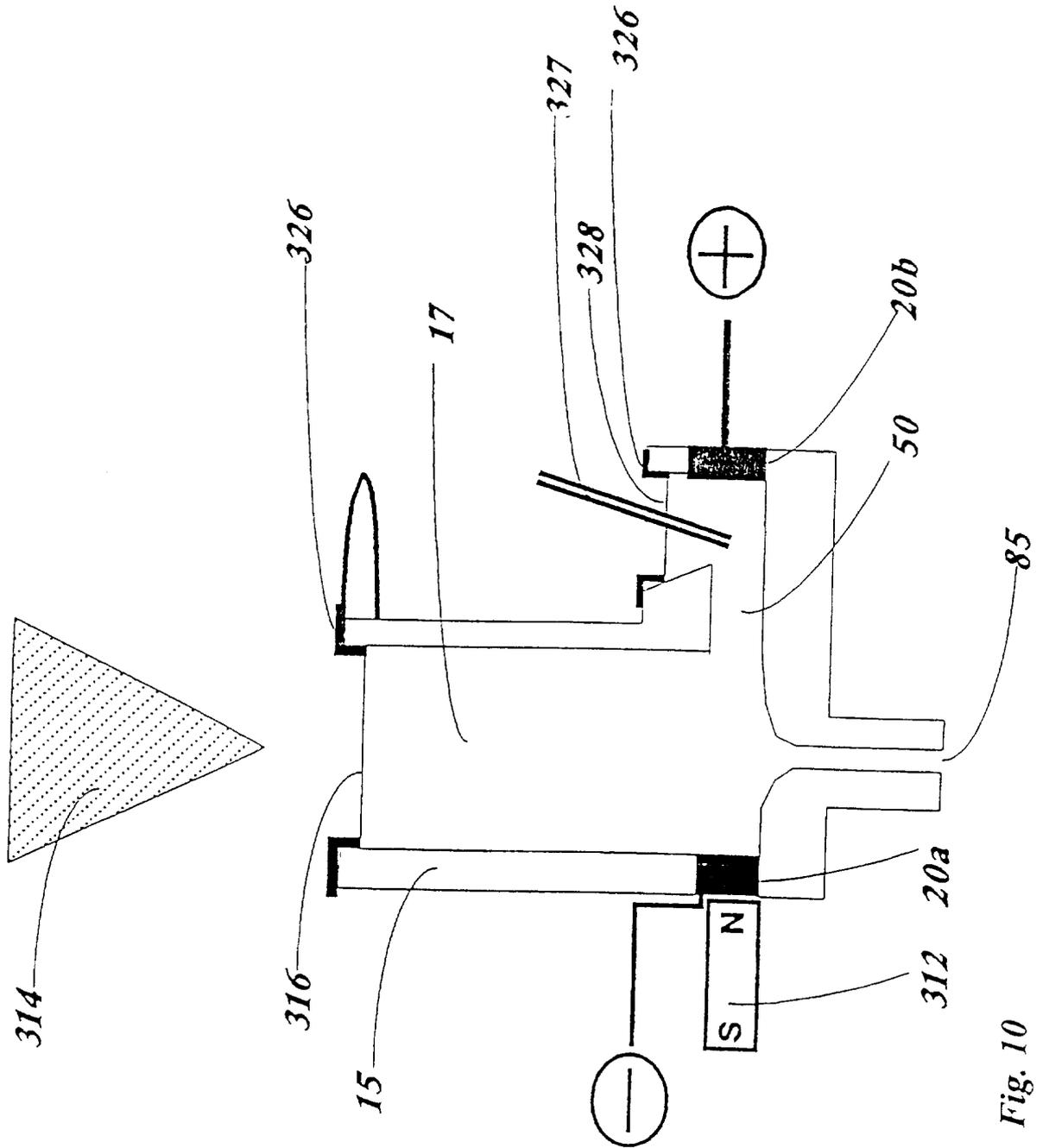


Fig. 10

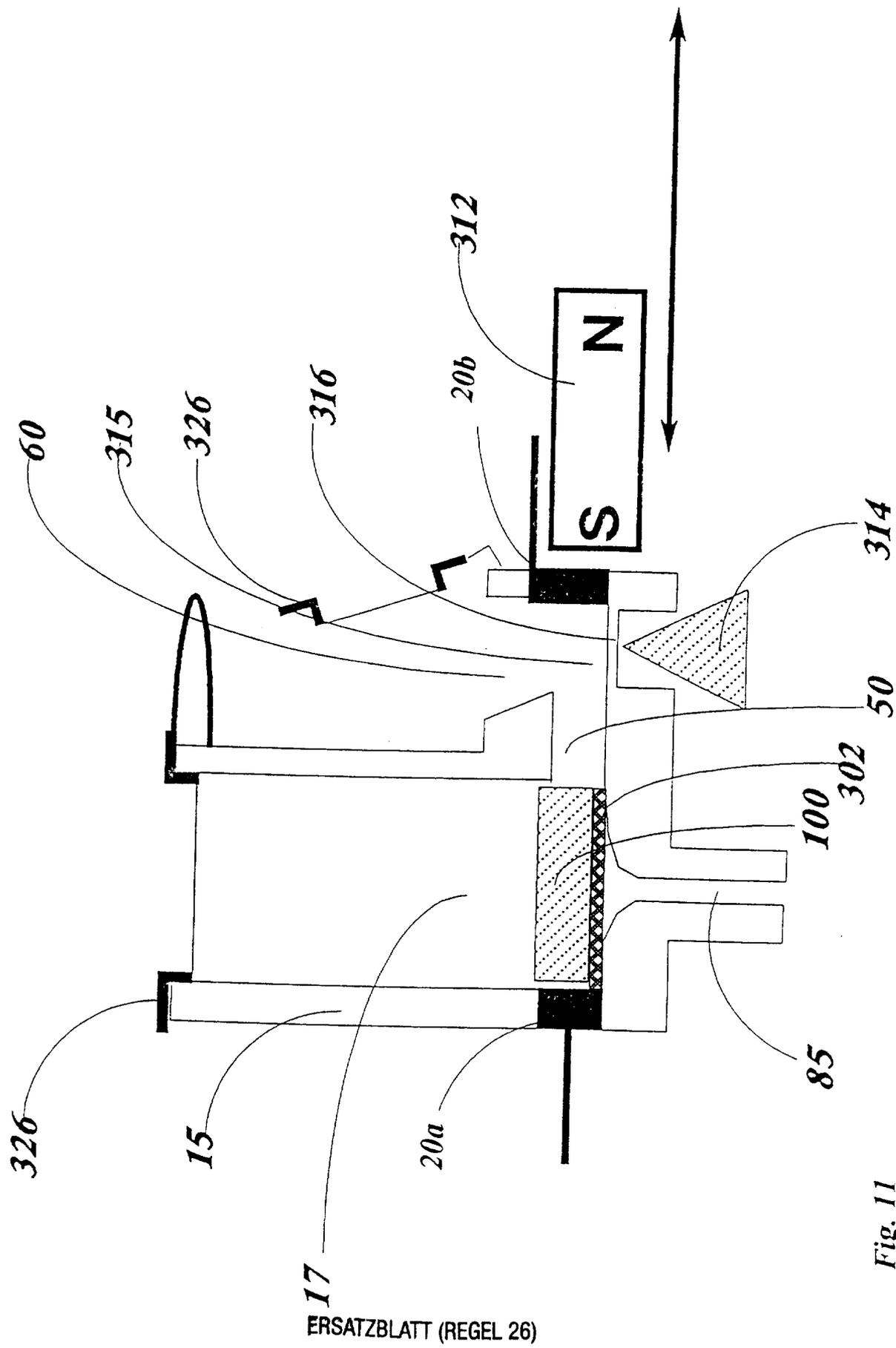


Fig. 11

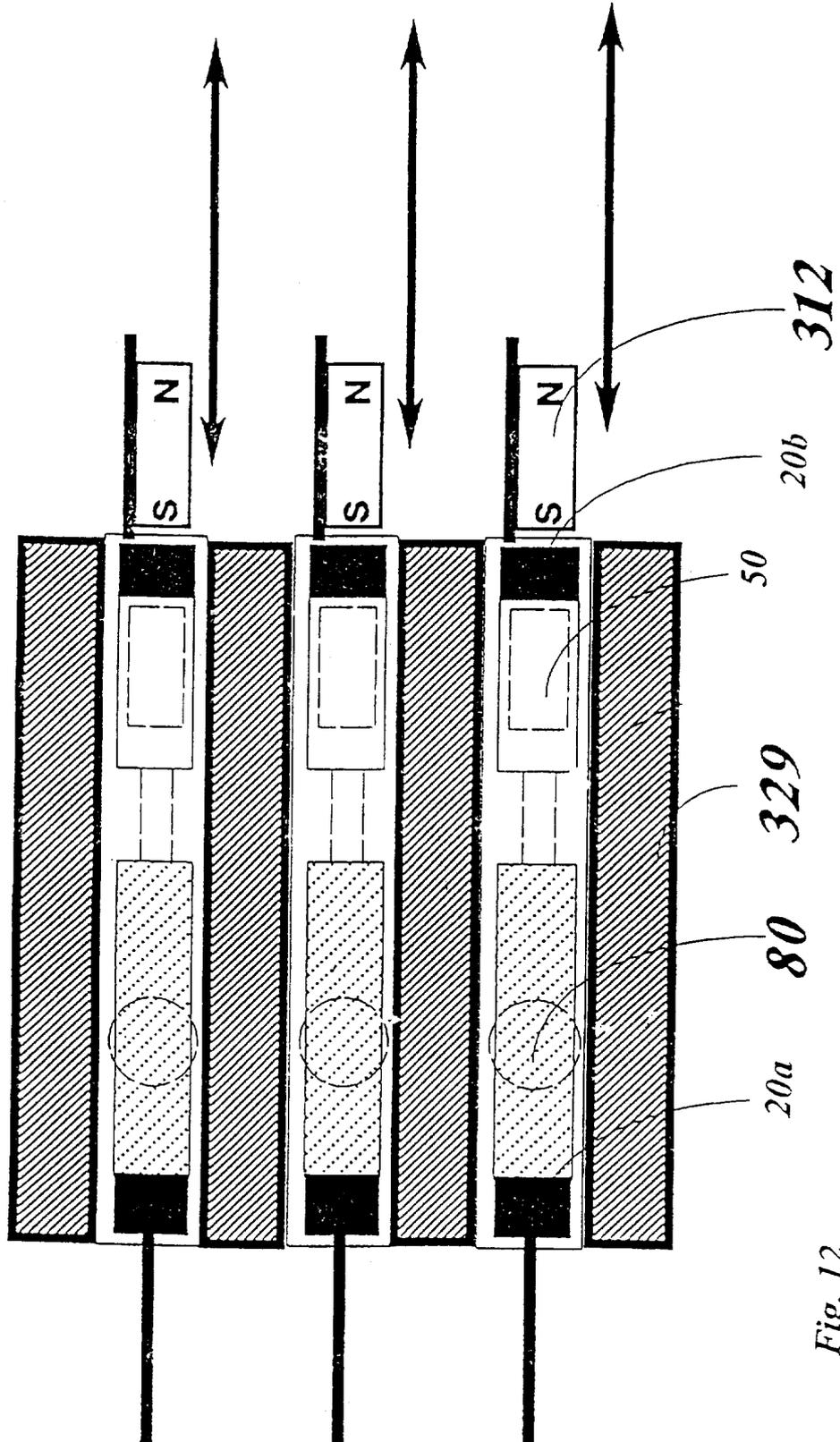


Fig. 12

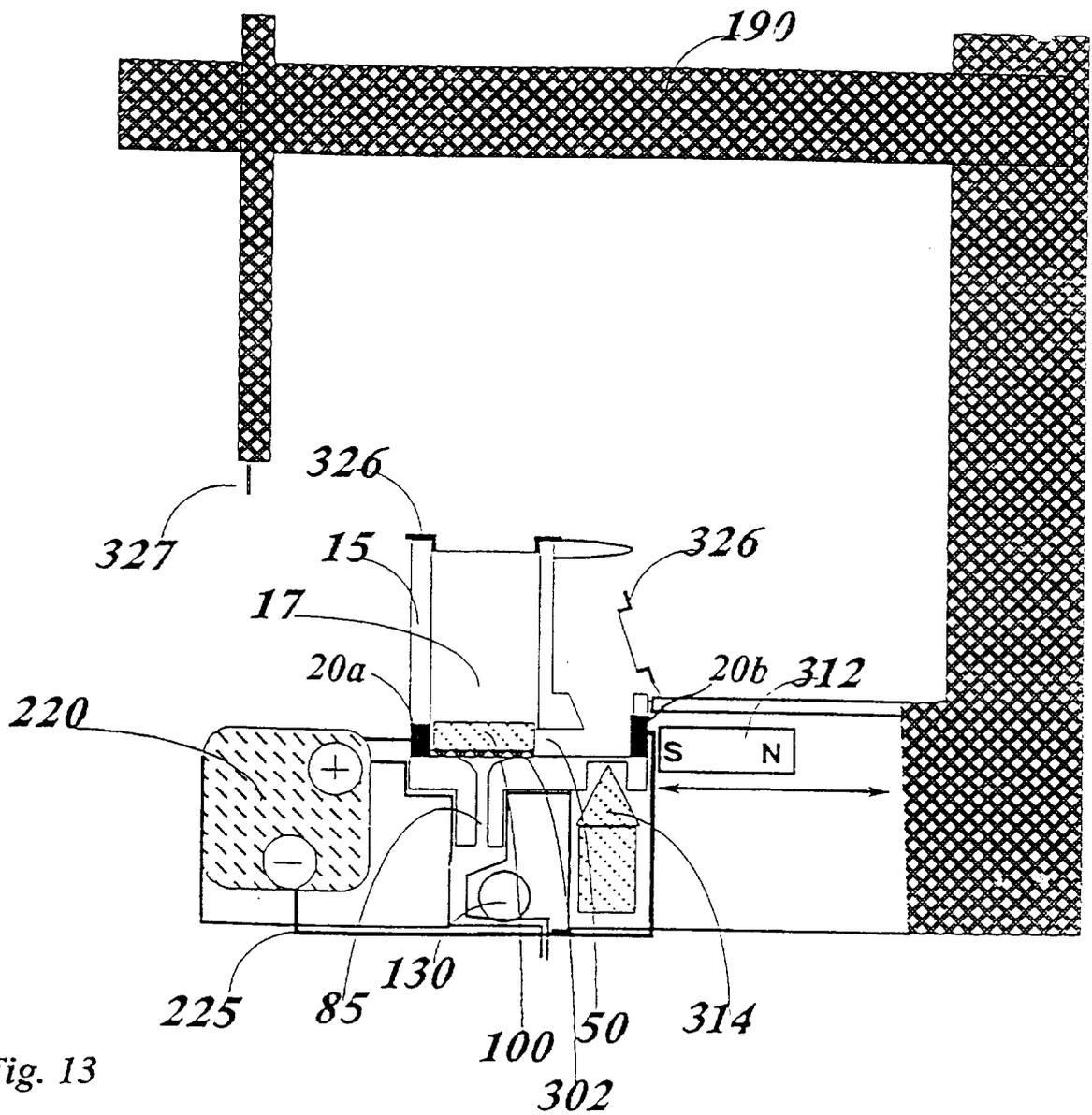


Fig. 13

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC1/DE 97/00517

|  |   |                       |   |   |
|--|---|-----------------------|---|---|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>IPC 6 C07H1/08 C12Q1/68 C12N15/10 C12M1/00   |   |                       |   |   |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC  |   |                       |   |   |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b>  |   |                       |   |   |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>IPC 6 C07H C12Q C12N C12M   |   |                       |   |   |
| 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)   |   |                       |   |   |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>  |   |                       |   |   |
| Category *   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |   |   |
| A  | EP 0 687 502 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH)<br>20 December 1995<br>see column 9 - column 10; claims; figures 4-6<br>---   | 1,12                  |   |   |
| A  | FR 2 402 716 A (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE) 6 April 1979<br>see page 3, line 16 - line 23; claims; examples<br>---   | 1,12                  |   |   |
| A  | US 5 340 449 A (SHUKLA A.K.) 23 August 1994<br>see the whole document<br>---  | 1,12                  |   |   |
| -/--   |   |                       |   |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.   |   |                       |   |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.   |   |                       |   |   |
| * Special categories of cited documents :  |   |                       |   |   |
| <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none;">                     "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br/>                     "E" earlier document but published on or after the international filing date<br/>                     "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)<br/>                     "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br/>                     "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed                 </td> <td style="width: 50%; border: none;">                     "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<br/>                     "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<br/>                     "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.<br/>                     "&amp;" document member of the same patent family                 </td> </tr> </table> |   |                       | "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier document but published on or after the international filing date<br>"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)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"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<br>"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<br>"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.<br>"&" document member of the same patent family |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier document but published on or after the international filing date<br>"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)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"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<br>"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<br>"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.<br>"&" document member of the same patent family |                       |   |   |
| Date of the actual completion of the international search  | Date of mailing of the international search report  |                       |   |   |
| 19 August 1997   | 27 -08- 1997  |                       |   |   |
| Name and mailing address of the ISA<br>European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,<br>Fax (+ 31-70) 340-3016  | Authorized officer<br><br>Day, G  |                       |   |   |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PC1/DE 97/00517

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| A          | DE 41 39 664 A (DIAGEN INSTITÜT FÜR<br>MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK GMBH) 3<br>June 1993<br>cited in the application<br>see claims<br>----- | 1,12                  |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 97/00517

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s)   | Publication date   |
|--|------------------|---|--|
| EP 687502 A                            | 20-12-95         | DE 4420732 A<br>JP 8009957 A  | 21-12-95<br>16-01-96   |
| -----                                  |                  |   |  |
| FR 2402716 A                           | 06-04-79         | NONE  |  |
| -----                                  |                  |   |  |
| US 5340449 A                           | 23-08-94         | NONE  |  |
| -----                                  |                  |   |  |
| DE 4139664 A                           | 03-06-93         | DE 59205979 D<br>WO 9311218 A<br>WO 9311221 A<br>EP 0616638 A<br>EP 0616639 A<br>JP 7501222 T<br>JP 7501223 T | 15-05-96<br>10-06-93<br>10-06-93<br>28-09-94<br>28-09-94<br>09-02-95<br>09-02-95 |
| -----                                  |                  |   |  |

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationale Aktenzeichen

PC1/DE 97/00517

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
 IPK 6 C07H1/08 C12Q1/68 C12N15/10 C12M1/00

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07H C12Q C12N C12M

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* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile  | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| A          | EP 0 687 502 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH)<br>20. Dezember 1995<br>siehe Spalte 9 - Spalte 10; Ansprüche;<br>Abbildungen 4-6                                   | 1,12               |
| A          | FR 2 402 716 A (INSTITUT NATIONAL DE LA<br>SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) 6. April<br>1979<br>siehe Seite 3, Zeile 16 - Zeile 23;<br>Ansprüche; Beispiele | 1,12               |
| A          | US 5 340 449 A (SHUKLA A.K.) 23. August<br>1994<br>siehe das ganze Dokument   | 1,12               |
|            | -/--  |                    |

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

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

\*E\* 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

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

19. August 1997

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

27 -08- 1997

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

Day, G

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/DE 97/00517

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile  | Betr. Anspruch Nr. |
|-----------|---|--------------------|
| A         | DE 41 39 664 A (DIAGEN INSTITÜT FÜR<br>MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK GMBH)<br>3.Juni 1993<br>in der Anmeldung erwähnt<br>siehe Ansprüche<br>----- | 1,12               |

1

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 97/00517

| Im Recherchenbericht<br>angeführtes Patentdokument | Datum der<br>Veröffentlichung | Mitglied(er) der<br>Patentfamilie   | Datum der<br>Veröffentlichung  |
|--|-------------------------------|---|--|
| EP 687502 A  | 20-12-95                      | DE 4420732 A<br>JP 8009957 A  | 21-12-95<br>16-01-96   |
| FR 2402716 A                                       | 06-04-79                      | KEINE   |  |
| US 5340449 A                                       | 23-08-94                      | KEINE   |  |
| DE 4139664 A                                       | 03-06-93                      | DE 59205979 D<br>WO 9311218 A<br>WO 9311221 A<br>EP 0616638 A<br>EP 0616639 A<br>JP 7501222 T<br>JP 7501223 T | 15-05-96<br>10-06-93<br>10-06-93<br>28-09-94<br>28-09-94<br>09-02-95<br>09-02-95 |