ABSTRAKT
Epitachoforéza je nově vyvíjená metoda, která umožňuje separaci a koncentraci analytů z velkých objemů komplexních vzorků. Svým principem vychází z isotachoforézy a využívá diskontinuální elektrolytický systém. Rozdíl je v designu zařízení, které je kruhové a tím dochází ke zvyšování rychlosti migrace zón analytů v průběhu separace směrem ke středu zařízení a zároveň k jejich rozšiřování.
Fokusace, koncentrace a separace analytů mezi vedoucí a koncový elektrolyt probíhá od okraje zařízení směrem k jeho středu. Aby nedocházelo k míchání vedoucího a koncového elektrolytu je potřeba toto rozhraní stabilizovat. Cílem této diplomové práce je optimalizace podmínek epitachoforézy, především možnostmi stabilizace rozhraní vedoucího a koncového elektrolytu. Jako stabilizační médium byly testovány agarózové gely, pak disky z napěněných polymerů a PDMS sloupky.
Všechna média stabilizující rozhraní vedoucího a koncového elektrolytu prošla řadou optimalizací, aby byla vybrána nejlepší varianta s ohledem na jejich další aplikaci. Jako modelový analyt sloužila DNA a byla vybrána média s největší výtěžností koncentrace DNA. Nejlepších výsledků bylo dosaženo s NEEO a PFEG agarózovými gely a napěněným polymerem Dyneema s výtěžky nad 70 %. Další zajímavou alternativou jsou PDMS sloupky, jejichž otevřená struktura umožňuje koncentraci i velkých analytů jako jsou třeba mikroorganismy.

ABSTRACT
Epitachophoresis is newly developed method, which allows to separate and concentrate analytes from large volumes of complex samples. Principle is based on isotachophoresis and utilize discontinuous electrolyte system. Different design of device is used, its round shaped and due to that acceleration of analytes zone migration occurs during separation towards centre of device and at the same time widening of zones happens.
Focusation, concentration and separation of analytes between leading and terminating electrolyte progress from outer line of device towards its centre. It is necessary to stabilize this boundary to prevent mixing of leading and terminating electrolyte. Main target of this diploma thesis is optimization of epitachophoretic conditions, mainly electrolyte boundary stabilization options. Tested stabilizing media were agarose gels, foamed polymer disks and PDMS columns.
All leading and terminating electrolyte boundary stabilizing media undergo several optimizations so the best option can be selected for concreate applications. DNA was used as a model analyte and the media with the highest recovery were selected. The best results offered NEEO and PFEG agarose gels and Dyneema foamed polymer with recovery over 70%. Another interesting alternative are PDMS columns, with their open structure that allow concentration of large volume analytes such as microorganisms.

KLÍČOVÁ SLOVA
Epitachoforéza, velké objemy vzorku, stabilizační médium, DNA

KEY WORDS
Epitachophoresis, large volume samples, stabilizing medium, DNA

KOCIANOVÁ, Vanda. *Prekoncentrace iontových složek vzorku pomocí epitachoforézy*. Brno, 2020. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně. Vedoucí práce Mgr. Ivona Voráčová, Ph.D., konzultant Ing. Jaromír Pořízka, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a všechny použité zdroje jsou správně odcitovány. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucí diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Velmi ráda bych poděkovala vedoucí své diplomové práce Mgr. Ivoně Voráčové, Ph.D. za její odborné vedení a za čas, který mi věnovala při zpracování této diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala Ing. Jaromírovi Pořízkovi, Ph.D., který v roli konzultanta zastřešil tuto diplomovou práci pod univerzitou a umožnil, tak její realizaci. V neposlední řadě bych ještě ráda poděkovala Ing. Františkovi Foretovi, DSc., řediteli Ústavu analytické chemie, za možnost se podílet na tomto projektu.

OBSAH

1 ÚVOD 7
2 TEORETICKÁ ČÁST 8
2.1 Elektromigrační separační metody 8
2.1.1 Elektroforéza 8
2.1.1.1 Kapilární elektroforéza (CE) 8
2.1.1.2 Gelová elektroforéza (GE) 9
2.1.2 Kapilární elektrochromatogefie (CEC) 9
2.1.2.1 Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) 10
2.1.3 Izoelektrická fokusace 10
2.1.4 Elektrická frakcionace tokem v poli (EIFFF) 10
2.2 Izotachoforéza 11
2.2.1 Historie [22, 23] 12
2.2.2 Princip 13
2.2.3 Instrumentace 14
2.3 Epitachoforéza 15
2.3.1 Separace 15
2.4 DNA 18
2.4.1 Metody koncentrace DNA 19
2.4.2 Cirkulující tumorová DNA 19
2.4.3 DNA plodu z krve matky 20
2.4.4 DNA v moči 20
3 CÍL PRÁCE 22
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 23
4.1 Materiál a přístroje 23
4.1.1 Chemikálie 23
4.1.2 Přístroje 23
4.1.2.1 Zařízení s kanálkem 23
4.1.2.2 Zařízení z nádob 24
4.1.2.3 Zařízení z nádob pro vysoké gely 25
4.1.3 Médium stabilizující rozhraní LE/TE 25
4.2 Příprava roztoků 26
4.2.1 Příprava elektrolytů 26
4.2.1.1 Příprava vedoucího elektrolytu NH_4Ac + HAc 26
4.2.1.2 Příprava roztoku HAc 27
4.2.1.3 Příprava vedoucího elektrolytu HCl · His 27
4.2.1.4 Příprava TAPS · TRIS 27
4.2.2 Příprava separačních médií 27
4.2.2.1 Agarózový gel 27
4.2.2.2 PDMS sloupky 27
4.2.2.3 Disky z napěněných polymerů 28

4.3 Spuštění analýzy ... 28
4.4 Měření koncentrace DNA ... 29
4.5 Výpočet výtěžnosti ... 30
5 VÝSLEDKY A DISKUZE ... 31
5.1 Optimalizace podmínek epitachoforézy ... 31
5.1.1 Koncentrace elektrolytů pro kationty ... 31
5.1.2 Výběr koncentrace elektrolytů pro anionty ... 32
5.2 Přídavek barnatých iontů ... 32
5.2.1 Vliv barnatých kationtů na separaci kationtů ... 32
5.2.2 Vliv barnatých kationtů na separaci aniontů a srážení gelu ... 33
5.3 Teplotní změny v průběhu separace na zařízení s kanálkem ... 36
5.4 Testování zařízení z nádob ... 37
5.5 Teplotní změny během separace na zařízení z nádob ... 38
5.6 Vliv výkonu na rychlost separace a srážení gelu ... 38
5.7 Agaróza pro pulzní elektrické pole (PFGE - Pulsed-Field Gel Electrophoresis) ... 39
5.8 Vliv hustoty gelu na srážení ... 40
5.9 Vliv soli na srážení gelu ... 41
5.10 Alternativní materiály místo agarózového gelu ... 44
5.10.1 PDMS sloupky ... 44
5.10.1.1 Modifikace PDMS sloupků plasmou ... 44
5.10.1.2 Modifikace silikonových skupin činidly ... 46
5.10.1.3 Změna koncentrace vedoucího a koncového elektrolytu ... 48
5.10.2 Polypropylén (PP) ... 48
5.10.3 Polytetrafluorethylén (PTFE) – teflon ... 51
5.10.4 Polyethylén (PE) ... 53
5.10.5 Ultra-high-molecular-weight polyethylene (UHMWPE) - Dyneema ... 57
5.11 Aplikace epitachoforézy pro koncentraci DNA ... 60
5.11.1 Separace DNA na gelu ... 61
5.11.2 Separace DNA na PDMS sloupcích ... 61
5.11.3 Separace DNA na PTFE ... 62
5.11.4 Separace DNA na Dyneema disku ... 63
6 ZÁVĚR ... 65
7 ZDROJE ... 72

1 ÚVOD

Příprava vzorku je klíčovou částí analytického procesu, častokrát je však tato část opomíjená. Důvodem může být, že příprava vzorku není brána jako samostatná část analytické vědy, ale spíše jako rutinní proces potřebný k vývoji analytické metody. Proto také často nedochází k vývoji nových technik přípravy vzorku, ale spíše k úpravě technik již existujících [1]. Přitom příprava vzorku je důležitou částí analytického procesu, protože jen správně připravený vzorek poskytne správný výsledek.

Častokrát je tato část největším zdrojem chyb, protože nezahrnuje pouze přípravu vzorku na analýzu, ale i odběr vzorku, jeho přepravu a uskladnění. Především u biologických vzorků může dojít k jejich snadnému znehodnocení [2].

Účelem samotné analýzy je získání informací o analyzované substanci. Cílené informace se mohou lišit. Může se jednat o chemické složení, strukturní a povrchové vlastnosti, nebo sekvenování proteinů či genetického materiálu [3]. Ať už je výsledek analýzy jakýkoli, není možné vzorek analyzovat bez prvotní přípravy, kdy je vzorek přečištěn, případně koncentrován. Základními cíli, které je nutno splnit během přípravy je odstranění nežádoucích komponent ze vzorku, které mohou interferovat se zařízením během analýzy nebo se vzorkem během skladování a způsobit tak jeho nestabilitu. Dále to je koncentrace analytu pro zlepšení detekčních limitů, nebo také extrakce analytu z původního vzorku a jeho rozpuštění ve vhodném rozpouštědle pro danou analytickou metodu [4].

Dalším problémem, který se může vyskytnout, především u biologických vzorků, je objem vzorku. Většina analytických instrumentálních technik pracuje se vzorky v řádu μl, kdežto získávané objemy biologických vzorků jako plazma, sérum či moč jsou v řádu ml [2].

Epitachoforéza je metoda, která umožňuje současné oddělení cílové složky od zbytku vzorku a její koncentrování. Protože separace neprobíhá v kapiláře, ale na kruhovém zařízení je možno analyzovat vzorky v řádech ml. Metoda pracuje na podobném principu jako izotachoforéza, čili v diskontinuálním elektrolytovém systému, kdy jednotlivé složky se řadí dle klesající elektroforetické mobility v pořadí vedoucí elektrolyt – analyt – koncový elektrolyt. Na rozdíl od izotachoforézy, epitachoforetický systém obsahuje stabilizační médium, kde probíhá fokusace analytů do zón.

Diplomová práce se zaobírá především optimalizací tohoto stabilizačního média. Nejprve byly testovány gely, které jsou jednoduché na přípravu. Následně byly testovány disky z napěněných polymerů, které jsou stabilnější v čase a umožňují opakovatelné použití, a proto jsou z komerčního hlediska vhodnější. Testovány byly také PDMS sloupky, které představují otevřený systém, který umožňuje separaci velkých molekul, částic až mikroorganizmů. Zde by v případě použití gelu nebo polymerních disků jako stabilizačního média mohlo dojít k zadržení těchto analytů na okraji nebo ve struktuře stabilizačního média.

Epitachoforéza tedy představuje slibnou metodu přípravy vzorku se širokou škálou využití. Poskytuje vysoké výtěžky analytů a umožňuje separovat velkou variaci nabitých složek od jednoduchých organických a anorganických iontů, přes velké molekuly jako je například DNA nebo proteiny až po celé organismy jako bakterie a kvasinky.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Elektromigrační separační metody

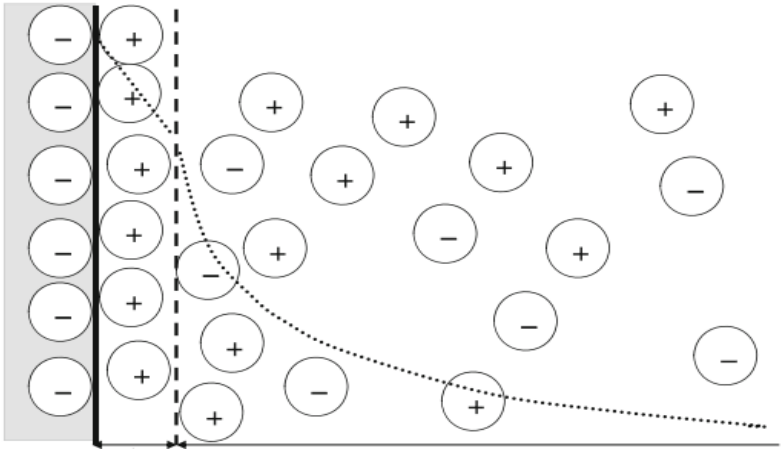
Takto se nazývá skupina separačních technik separujících analyty na základě jejich rozdílné rychlosti pohybu v elektrickém poli. Dochází zde ke dvěma jevům: elektroforéze - pohybu nabitých částic v elektrickém poli směrem k opačně nabité elektrodě a elektroosmóze - pohybu kapaliny k elektrodě vlivem elektrického pole. Podstatou separace je tedy rozdílná rychlost migrace nabitých částic v určitém prostředí vlivem elektrického pole.
Jednotlivé techniky se liší principem, instrumentálním provedením, použitým pracovním elektrolytem atd. [5, 6].

2.1.1 Elektroforéza

Elektroforéza je separační technika založená na rozdílných rychlostech migrace nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Tuto rychlost migrace nabitých částic nazýváme elektroforetická mobilita a označujeme písmenem μ. Elektroforetická mobilita závisí na různých parametrech separované látky, jako je náboj, velikost a tvar molekuly. Taktéž závisí na některých vlastnostech média, ve kterém separace probíhá, například viskozita a pH. Migraci také ovlivňuje síla elektrického pole.
Separace zpravidla probíhá ve dvou základních módech. První možností je, že separace probíhá ve volném roztoku v zařízení s malým průměrem jako je kapilára nebo mikročip. Jedná se o kapilární elektroforézu (CE). Ve druhém případě je separační médium hydrogel a mluvíme o gelové elektroforéze (GE) [7, 8, 9].

2.1.1.1 Kapilární elektroforéza (CE)

Jak název napovídá, separace probíhá v kapiláře. Jedná se o trubičku z křemenného skla pokrytou polyimidem, aby se zabránilo rozbití. Délka kapiláry je zpravidla 40–100 cm a průměr 10–100 μm. Podobný typ kapiláry se využívá i při plynové chromatografii.
Kapilára je naplněna elektrolytem a oba konce jsou ponořeny do nádobek s elektrolytem. V rezervoárech jsou ponořeny i elektrody, které vytváří potřebné elektrické pole v kapiláře. Ionty pufru pak přechází z jednoho rezervoáru - inletu do druhého rezervoáru - outletu. Analyt je dávkován na inletu, separován v kapiláře a detekován před jeho výstupem z kapiláry.
Elektroosmotický tok je jev typický pro kapilární elektroforézu a hraje významnou roli při separaci. Způsobuje plochý rychlostní profil toku, místo parabolického, co umožňuje separaci analytů do ostrých zón. Protože se jedná o tok celé kapaliny, umožňuje separaci všech iontů. První budou detekovány ionty opačně nabité než je elektroda na outletu, dále budou detekovány neutrální molekuly a na závěr ionty stejně nabité jako elektroda na outletu, tyto ionty jsou nejpomalejší, protože běží „proti proudu“ elektroosmotického toku. Elektroosmotický tok vzniká v důsledku existence elektrické dvojvrstvy. Ta se tvoří na rozhraní křemene a roztoku. Při pH vyšším než 3 dochází k disociaci silanových skupin (- Si – OH) na povrchu kapiláry a vzniku záporného náboje. Kationty pufru pak vytváří elektrickou dvojvrstvu (Obrázek 1). První vrstva, Sternova, je pevně vázaná na kapiláru. Na druhou vrstvu, difuzní, stále působí náboj stěny kapiláry, ne však dostatečně silně, to umožňuje její pohyb směrem k elektrodě, katodě, na outletu. Solvatace těchto iontů způsobuje strhávání všech iontů v kapiláře a tím tok celého objemu kapaliny [5, 7, 8].



Obrázek 1: Grafické znázornění elektrické dvojvrstvy [5]

2.1.1.2 Gelová elektroforéza (GE)

Jak už bylo vzpomenuto, separačním médiem je v tomto případě hydrogel. Hlavní výhodou gelu je možnost změny velikosti pórů a taktéž možnost tvorby gradientu gelu.

Zpočátku se používaly i škrobové a dextranové gely, v současnosti je to výhradně agaróza a polyakrylamid.

Agaróza je lineární polymer extrahovaný z řasy. Připravuje se rozpuštěním ve vroucí vodě, častěji však v pufru, a při následném chladnutí se tvoří gelovitá struktura. Z toho vyplývá, že polymerace agarózy nevyžaduje žádný katalyzátor. Velikost pórů je závislá na procentuální koncentraci agarózy. Více procentní gel má menší póry, zatím co méně procentní gel je má větší. Agarózové gely se přednostně využívají pro separaci nukleových kyselin.

Polyakrylamidový gel je kopolymer složený z akrylamidu a N,N'- methylenbisakrylamidu, který slouží jako síťovací činidlo. Reakce běží jako volná radikálová polymerizace. Vyžaduje však iniciátor, kterým je persíran amonný a katalyzátor, N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED), který poskytuje terciární aminoskupinu pro uvolnění aminoskupiny. Velikost pórů je ovlivněná poměrem koncentrace akrylamidu a síťovacího činidla. Navzdory neurotoxicitě monomeru se doposud nenašel vhodnější gel pro separaci proteinů. Polyakrylamid umožňuje separaci nízkomolekulárních fragmentů v dobré kvalitě, čehož naopak agarózový gel není schopen.

Samotná separace v gelu je závislá na dvou faktorech: elektroforetické mobilitě a velikosti molekuly. Elektroforetická mobilita je základem elektroforézy a velikost molekul ovlivňuje rychlost migrace v závislosti na její schopnosti migrovat póry gelu.

Pro separaci proteinů se často používá detergent dodecyl sulfát (SDS), který linearizuje proteiny a dává jim uniformní záporný náboj. Separace potom probíhá jen na základě velikosti molekul [9, 10, 11].

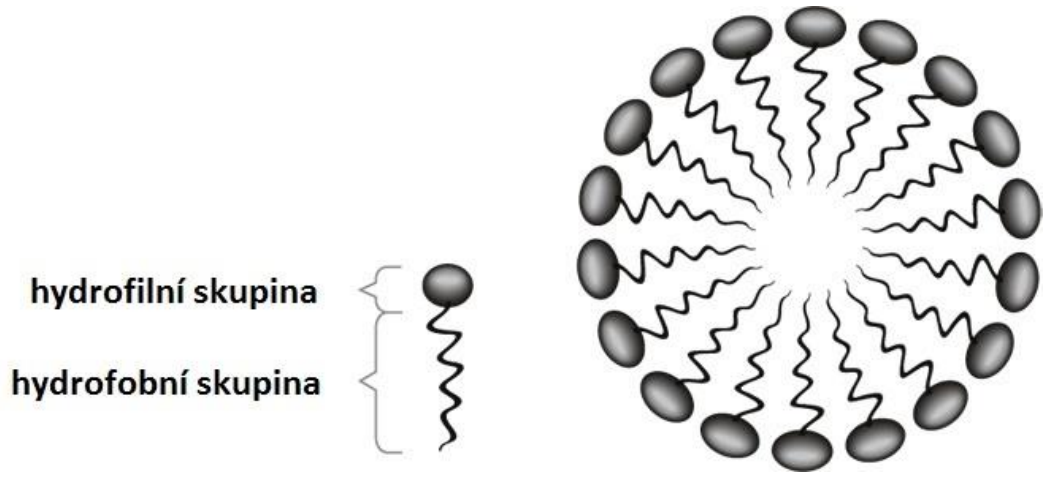
2.1.2 Kapilární elektrochromatogefie (CEC)

Tato metoda spojuje výhody kapilární elektroforézy (CE) a kapalinové chromatografie, konkrétně vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Vlastnosti převzaté z HPLC jsou možnost separace neutrálních látek a využití stacionární a mobilní fáze. Díky elektroosmotickému toku, vlastnosti kapilární elektroforézy, nemusí být separace poháněna tlakem. Z této skutečnosti vyplývá další výhoda, a to plochý rychlostní profil toku. Ten umožňuje, na rozdíl od parabolického profilu toku hnaného tlakem, získat úzké zóny analytu. Díky tomu, se jedná o vysoce účinnou separaci. Samotná separace je efektivnější než CE a HPLC, protože využívá obou principů separace. Uplatňuje se jak interakce analytu s mobilní a stacionární fází, tak separace na základě elektroforetické mobility. Navíc, protože se jedná o kapilární metodu, nevyžaduje velké množství analytu ani činidel použitých na separaci.

Instrumentace se skládá z několika základních částí: kapilára s elektrodovou částí a termostatem, zdroj napětí, detektor (UV nebo fluorescenční), systém pro kontrolu zařízení a zpracování dat [7, 12].

2.1.2.1 Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC)

Micelární elektrokinetická chromatografie je formou kapilární elektrochromatografie. Micely vznikají v základním elektrolytu přidáním povrchově aktivní látky o koncentraci vyšší než je kritická micelární koncentrace. Povrchově aktivní látky se zpravidla orientují hydrofobní částí dovnitř a hydrofilní ven (Obrázek 2). Micely tvoří pseudo – stacionární fázi, která je v koloně pohyblivá. Separace pak probíhá na principu CE a HPLC. Neutrální molekuly jsou separovány pouze na principu interakce s mobilní (elektrolyt) a stacionární (micely) fází. Nabité částice se pak separují i na základě mobility v elektrickém poli [13, 14].



Obrázek 2: Orientace povrchově aktivních látek za vzniku micely

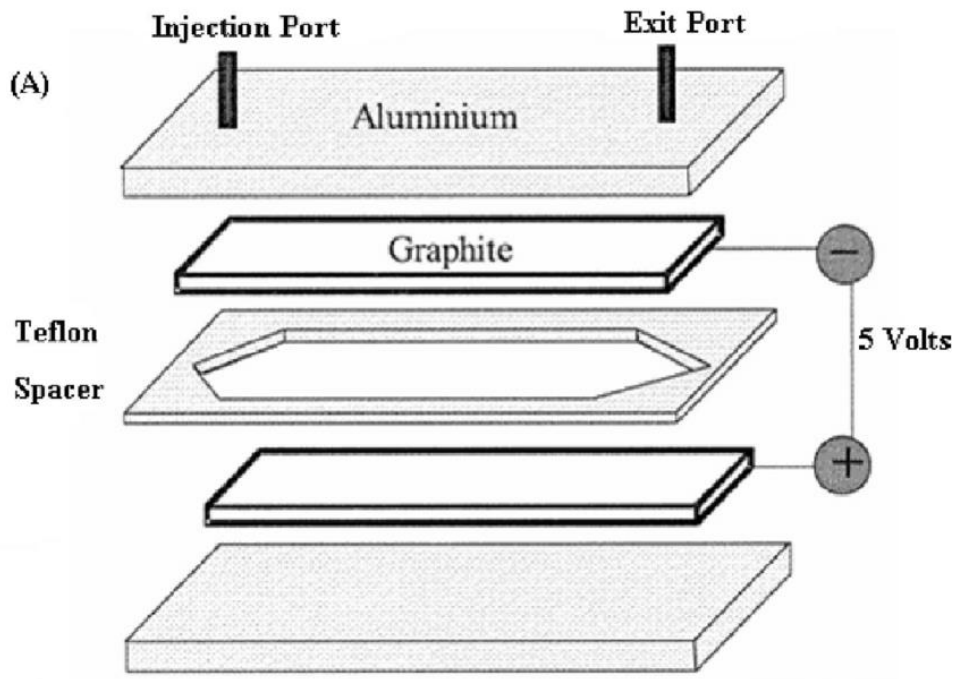
2.1.3 Izoelektrická fokusace

Tato metoda využívá vlastnosti látek obsahujících současně kladnou i zápornou funkční skupinu a schopných tvořit jak kationy, tak i aniony v závislosti na pH – tzv. amfionů/zwitterionů. Mezi amfolyty patří například proteiny, které jsou hlavním analytem separovaným touto metodou.

Metoda využívá imobilizované pH gradientové proužky. Před začátkem separace se zvolí vhodné místo v gradientu, vhodné pH, kde vložíme směs analytů. pH volíme tak, aby nedošlo k agregaci analytů či jejich nestabilitě. Následně se aplikuje elektrické pole. Analyty mají různý náboj v počáteční poloze v závislosti na zvoleném pH. V závislosti na náboji se analyty začnou pohybovat ke kladné nebo záporné elektrodě. Jejich pohyb se zastaví po dosažení isoelektrického bodu, kdy jsou neutrální. V izoelektrickém bodě je elektroforetická mobilita rovná nule. Z toho vyplývá, že izoelektrická mobilita je funkcí pH [10, 15, 16].

2.1.4 Elektrická frakcionace tokem v poli (EIFFF)

K separaci dochází uvnitř průtočného kanálu zpravidla o délce 25 – 100 cm, šířce 1 – 3 cm a výšce 50 – 500 μm. Kanál je obvykle vyříznut z distanční fólie a umístěn mezi dvě grafitové desky. Nákres zařízení můžeme vidět na Obrázku 3.

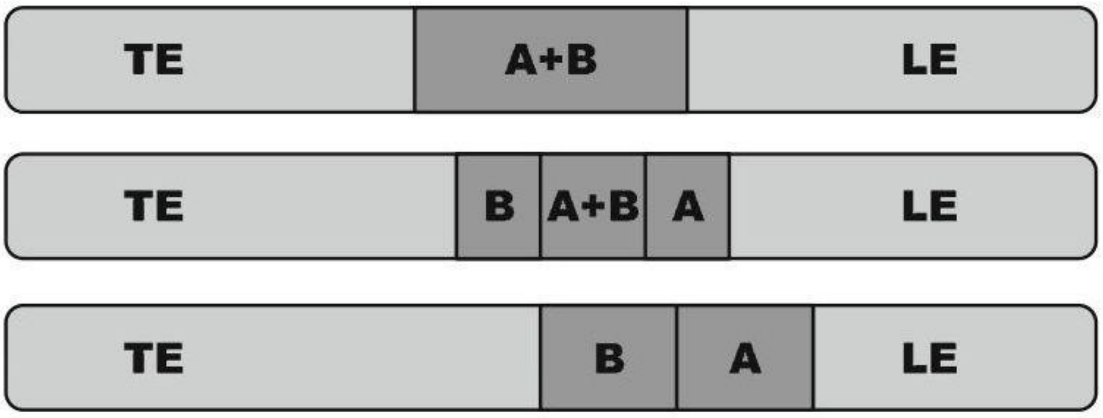


Obrázek 3: Separační kanál pro elektrickou frakcionaci tokem v poli [17]

Princip separace je podobný kapalinové chromatografii. Separace, však probíhá jen v kapalné fázi bez přítomnosti stacionární fáze. Metodě se občas říká jednofázová nebo polarizační chromatografie. Ani jedno z těchto pojmenování však není úplně vhodné.
Analyt je injektován do přístroje na jednom konci kanálu a vychází druhým koncem, který vede k detektoru. Tok v kanálu je laminární s parabolickým rychlostním profilem podobně jako u kapalinové chromatografie. Nejrychlejší je tok ve středu kanálu a nejpomalejší u stěn. Tato skutečnost spolu s elektrickým polem vkládaným kolmo na kanál tvoří základní princip separace. Složky, které více reagují s elektrickým polem, látky s vyšším nábojem, jsou stlačovány k akumulační stěně, zatímco složky, které méně reagují s polem, látky s nižším nábojem, jsou unášeny tokem dále do kanálu. Nejméně nabité látky jsou, proto eluovány jako první a nejvíce nabité látky jsou zadržovány nejdéle. Hlavním principem separace je velikost částic a hustota povrchového náboje [7, 18, 19].
Separace může probíhat ve dvou módech. V tradičním (direct current DC), kdy na kanál působí konstantní napětí nebo cyklickým (alternating current AC), kdy se na kanál působí oscilujícím elektrickým polem [20, 21].

2.2 Izotachoforéza

Izotachoforéza je separační metoda, která patří do skupiny elektromigračních technik. Separace probíhá v diskontinuálním elektrolytickém systému tvořeném vedoucím a koncovým elektrolytem. Vedoucí elektrolyt, elektrolyt s nejvyšší elektroforetickou mobilitou v systému, tvoří přední zónu během separace. Tento elektrolyt musí mít pufrovací kapacitu v oblasti pH, kde analýza probíhá. Poslední zónou je pak elektrolyt s nejmenší elektroforetickou mobilitou v systému, tedy koncový elektrolyt. Mezi těmito zónami se pak nachází vzorek. Po aplikaci elektrického proudu se začnou analyty separovat na základě rozdílné elektroforetické mobility. V první fázi separace se začínají formovat zóny jednotlivých analytů. Tyto zóny se však z počátku překrývají a tvoří ještě směsné zóny. Ty se však v dalším průběhu separace vytratí. Získáme pak zóny, které obsahují pouze jednu složku, elektrolyt na pozadí není přítomen. Průběh separace je zobrazen na Obrázku 4 [22, 23].



Obrázek 4:Schematický průběh separace během izotachoforézy [5]

2.2.1 Historie [22, 23]

Izotachoféza jako separační metoda se začala formovat už v polovině 19. století, avšak oficiálního uznání a začlenění mezi běžné separační techniky se dočkala až v roce 1970. Pozorování a experimenty, které vedly k izotachoforéze, jak ji známe dnes, jsou následující:

Polovina 19. století

- Wiedeman, Buff – pozorována migrace nabitých částic v roztoku po aplikaci elektrického pole
- Lodge, Whetham – „moving boundary method" – metoda, kdy v diskontinuálním elektrolytickém systému dojde k uspořádání látek tak, že vedoucí má nevětší mobilitu a poslední nejmenší
- Kohlraush – na základě experimentů Lodge a Whethama byla formulována teorie o iontové migraci a představená regulační funkce
- Hardy – objevení faktu, že mnoho biokoloidů, například proteiny, vykazují charakteristické mobility, které výrazně závisí na pH – tato práce měla za následek zvýšený zájem o elektroforetické separační techniky

1923 Kendall, Crittenden – popsání „ion migrační metody", dnes známé jako isotachoforéza – separovány byly kovy alkalických zemin a jednoduché kyseliny

1932 Longsworth, Innes – představení diferenciální rovnice popisující „moving boundary" pro silné elektrolyty, taktéž popsání samozaostřovacího efektu

1942 Martin – další popis izotachoforézy, tentokrát pojmenované jako „vytěsňovací elektroforéza" – separace chloridu, acetátu, glutamátu a aspartátu

1953 Longsworth – v návaznosti na práci Kendalla byla popsána separace směsi kationtů (Ca^{2+}, Ba^{2+}, Mg^{2+}) mezi dvěma zónami, které byly označené jako vedoucí roztok (leading) a stopovací roztok (trailing)

1963 Konstantinov, Oshurkova – popsaná aplikace „moving boundary method" v praxi
Everaerts, Martin – kniha o isotachoforéze

1964 Ornstein, Davis – představení „diskové elektroforézy" – směs proteínů byla vložena mezi elektrolyt s nízkou mobilitou a elektrolyt s vysokou mobilitou – vytvoření úzkých zón však komplikovalo detekci
Schumacher, Studer – separace 10 karboxylových kyselin pomocí izotachoforézy na papírovém proužku, bylo popsáno pH jednotlivých zón a návrh možnosti kvantifikace

1966 Vestermark – termínem „cons elektroforéza" označil elektroforetické techniky, které využívají Kohlraushovu regulační funkci

Preetz – představil „protiproudovou iontoforézu“ a její princip

1967 Preetz, Pfeifer - popsání instrumentace pro měření gradientu a iontové koncentrace
Martin, Everaerts – sestavení instrumentace pro kapilární izotachoforézu využívající skleněnou kapiláru

1970 Sumarizace principu a instrumentace izotachoforézy a zavedení pojmu „izotachoforéza“

2.2.2 Princip

Slovo izotachoforéza se skládá z několika slovních základů a to: *iso* = stejný, *tachos* = rychlost, *phoresis* = migrace, v překladu tento název teda značí migraci se stejnou rychlostí. Migrace stejnou rychlostí je jeden ze čtyř základních principů, které se uplatňují během izotachoforetické separace [5, 10].
Tyto principy jsou:

1. Všechny ionty migrují stejnou rychlostí
2. Separace analytů probíhá na základě jejich rozdílné elektroforetické mobility
3. Probíhá samozaostřování zón
4. Uplatňuje se koncentrační efekt

Všechny ionty migrují stejnou rychlostí jako koncový elektrolyt, čili jako iont s nejmenší mobilitou. Vedoucí elektrolyt ani analyty nemohou migrovat větší rychlostí, protože by došlo k iontové mezeře a přerušení proudu. Rychlost migrace iontů je možno matematicky vyjádřit (Rovnice 1) jako rovnu elektroforetické mobilitě vynásobenou intenzitou elektrického pole.

$$v = \mu \cdot E \tag{1}$$

kde, v je rychlost pohybu chemických látek [m s^{-1}]; μ značí elektroforetickou mobilitu, která je charakteristická pro každou látku v daném roztoku [m^2 $V^{-1}s^{-1}$]; E je intenzita elektrického pole vztažená na jednotku délky [V m^{-1}]. Značení zůstává stejné i u ostatních rovnic.
První podmínku můžeme popsat Rovnicí 2:

$$v = \mu_{LE} \cdot E_{LE} = \mu_A \cdot E_A = \mu_{TE} \cdot E_{TE} \tag{2}$$

kde, LE značí vedoucí (leading) elektrolyt, A značí analyt, TE značí koncový (terminating) elektrolyt. Pokud chceme mezi jednotlivými analyty vytvořit mezeru, musíme přidat látku, kterou nazýváme „spacer“. „Spacer“ je iont, který má střední mobilitu mezi dvěma analyty, proto se v separaci zařadí mezi tyto dva analyty a vytvoří mezi těmito zónami prostor [5, 10, 23, 24]. Zóny se tvoří na základě elektroforetické mobility. První je vedoucí elektrolyt s největší mobilitou, následují analyty podle klesající mobility a na konci je koncový elektrolyt s nejmenší mobilitou (Rovnice 3).

$$\mu_{LE} > \mu_A > \mu_{TE} \tag{3}$$

Jak bylo uvedeno v první podmínce a Rovnici 2, rychlost migrace je pro všechny složky stejná. Protože rychlost je stejná a elektroforetická mobilita rozdílná, bude rozdílná i intenzita elektrického pole pro jednotlivé zóny, aby byla zachována rovnováha. Vyšší intenzita pole bude v oblasti iontů s nižší mobilitou a opačně, nižší intenzita pole bude v oblasti iontů s vyšší mobilitou [5, 10]. Na tuto skutečnost navazuje samozaostřovací efekt. Během separace dochází k vytvoření ostrých zón. Šířka zón se během separace nemění bez ohledu na sílu elektrického pole. Díky samozaostřovacímu efektu nedochází k difuzi jedné zóny do druhé. Pokud nějaký iont difunduje do zóny s vyšší mobilitou, tak bude zpomalen vlivem nižší intenzity elektrického pole. Pokud iont zaostává za svojí zónou, tak bude urychlen vyšší intenzitou elektrického pole [10, 23].
Koncentrace analyzované látky během isotachoforézy je konstantní a nezávislá na původní koncentraci ve vzorku. Isotachoforéza umožňuje separaci vzorků o velkém objemu se

stopovým množstvím žádané látky. Požadovaná látka i navzdory malé koncentraci ve vzorku je schopná vytvořit zónu o relativně vysoké koncentraci během separace. Tuto vlastnost nazýváme koncentrační efekt. Zóna daného analytu bude mít za daných podmínek vždy stejnou koncentraci. V závislosti na množství analytu v původním vzorku se bude měnit délka zóny. Díky tomu je následně možné provést kvalitativní i kvantitativní analýzu dané látky.
Koncentraci komponentů je pak možno určit na základě Kohlrauschovy regulační funkce (Rovnice 4).

$$\frac{c_A}{c_B} = \frac{\mu_A}{\mu_A + \mu_B} \cdot \frac{\mu_B + \mu_Q}{\mu_B} \cdot \frac{z_A}{z_B} \qquad (4)$$

kde, c je koncentrace iontů A^- a B^-, které se nahází v sousedících zónách; μ je pak elektroforetická mobilita iontů A^-, B^-a jejich proti-iontu Q^+; z je náboj iontů A^- a B^-.
Protože tato rovnice využívá sousedící zóny, je možné si nejdříve vzít zónu vedoucího elektrolytu a zónu složky A a získat koncentraci složky A. Následně pak můžeme postoupit na další zónu [5, 10, 23].

2.2.3 Instrumentace

V roku 1967 byla poprvé sestavena aparatura pro kapilární izotachoforézu. Separace v kapiláře je tak výhodná, že v současnosti se jiná než kapilární izotachoforéza téměř nevyužívá. Instrumentace pro tuto techniku se skládá z několika základních součástí:

- zdroj vysokého napětí
- dávkovač
- elektrody
- rezervoáry elektrolytů
- separační kapilára
- termostat
- detektor
- zařízení a software pro kontrolu zařízení a sběr dat

Pro jednoduchou kvalitativní a kvantitativní analýzu je preferován zdroj napětí, který poskytuje stálý elektrický proud. To umožňuje všem zónám migrovat se stejnou rychlostí. Pokud se aplikuje stálé napětí nebo stálý výkon dojde k poklesu rychlosti migrace v čase [12].
Metoda zavedení vzorku do izotachoforetického zařízení má velký vliv na délku analýzy. Existují dva základní přístupy dávkování vzorku a to pomocí stříkačky, nebo pomocí ventilu. Dávkování pomocí ventilu má vyšší reprodukovatelnost a umožňuje zavedení vzorku mezi vedoucí a koncový elektrolyt. V tomto případě je vliv iontů elektrolytů minimální a jejich pH nemá prakticky žádný účinek v počáteční fázi. Nevýhodou je konstantní dávkovaný objem vzorku. Změna objemu je možná v případě použití stříkačky.
Vzorek však je zaveden buď do vedoucího, nebo koncového elektrolytu. Pokud bude vzorek dávkován do vedoucího elektrolytu, můžeme očekávat smíšenou zónu vedoucího elektrolytu a analytu s největší elektroforetickou mobilitou. Pokud bude vzorek dávkován do koncového elektrolytu, tak ionty s nízkou hodnotou pKa (záporný dekadický logaritmus disociační konstanty kyseliny/zásady při 25°C [25]), v případě separace kationtů, nebo ionty s vysokou hodnotou pKa, v případě separace aniontů, můžou být zpomaleny natolik, že dojde k jejich ztrátě [22, 23].
Elektrody jsou zpravidla z platiny. Umístěny jsou v elektrodových nádobkách naplněných elektrolytem. Vedoucí elektrolyt je spojen s kapilárou přes semipermeabilní membránu. Membrána zabraňuje hydrodynamickému toku elektrolytů mezi elektrodami. Jak elektrodové nádobky, tak membrána musí být vyrobeny z materiálu, který je odolný vůči používanému rozpouštědlu [22, 23].

Kapilára je místem, kde probíhá samotná separace vzorku. Kapilára je vyrobena z inertního materiálu, protože nesmí docházet k adsorpci analytů na stěny kapiláry a její čistění by mělo být jednoduché. Dalšími požadavky na materiál kapiláry jsou teplotní vodivost, nízký zeta potenciál (potenciál vznikající na rozhraní pevná látka-kapalina), elektrická odolnost. Při průchodu elektrického proudu kapilárou, přesněji elektrolytem, dochází k jeho zahřívání. Zvýšená teplota ovlivňuje jak separaci, tak detekci, proto je nezbytnou součástí zařízení chlazení [5, 23, 26].

Další částí zařízení je detektor. Citlivost detektoru určuje, jak velké množství analytu je možno stanovit. Citlivost detektoru je možno zvýšit prodloužením zóny analytu. To docílíme zúžením kapiláry. Ideálně by však detektor měl být schopen zachytit i ty neužší zóny separovaných iontů. Měl by být schopen rozpoznat jednotlivé zóny, i když rozdíl mezi nimi je minimální. Odezva by měla být rychlá a korektní. Detekce by neměla být ovlivněna ději mimo detekční celu. Zpravidla rozeznáváme dva typy detektorů: bezkontaktní a kontaktní.

Mezi bezkontaktní detektory patří termočlánek, nebo optický detektor. Bezkontaktní detektory jsou univerzální a méně citlivé. Kontaktní detektory obsahují prvek, kov, který je v přímém kontaktu s elektrolytem. Kov, nejčastěji platina, je umístěna přímo ve stěně separační kapiláry. U kontaktních detektorů rozeznáváme dva typy detekce. První, kdy je měřena vodivost jednotlivých zón a druhý měří elektrický gradient, neboli napětí mezi elektrodami, jenž jsou v kontaktu s elektrolytem.

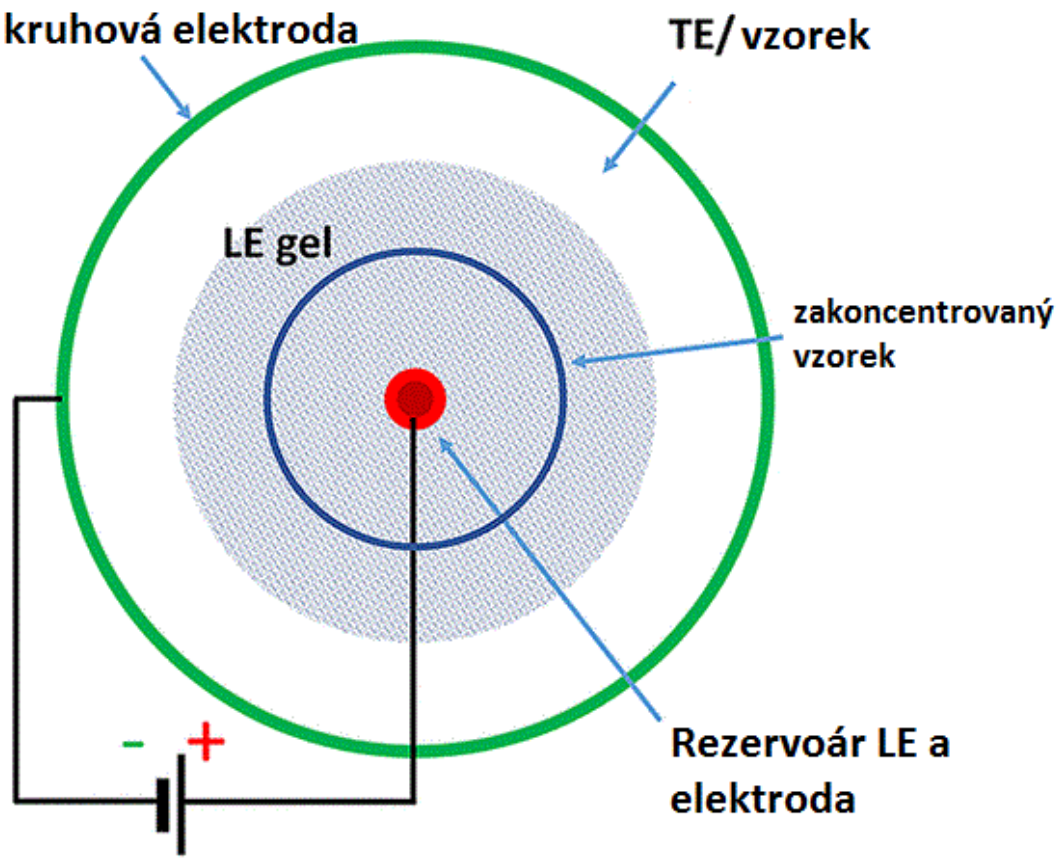
Další dělení detektorů může být dle analytu. Rozeznáváme univerzální detektory, které poskytují odezvu pro každý analyt, nebo specifické, které poskytují odezvu pouze na vybranou látku [5, 23].

2.3 Epitachoforéza

Epitachoforéza je nová separační a koncentrační metoda pracující na podobném principu jako izotachoforéza. Jedná se o separační metodu využívající vedoucího a koncového elektrolytu. Během separace dochází k tvorbě ostrých zón. Zařízení je kruhového tvaru a separace probíhá z vnějšího obvodu směrem do středu. Na rozdíl od izotachoforézy v průběhu epitachoforézy dochází k rozšiřování zón analytu a ke zvyšování rychlosti migrace iontů, čím blíže se nachází středu zařízení. Proto jako název pro tuto metodu bylo zvoleno slovo epitachoforéza, které vzniklo spojením řeckých slov *epitachýno*, což značí zrychlení a *phoresis*, což znamená migrace [27].

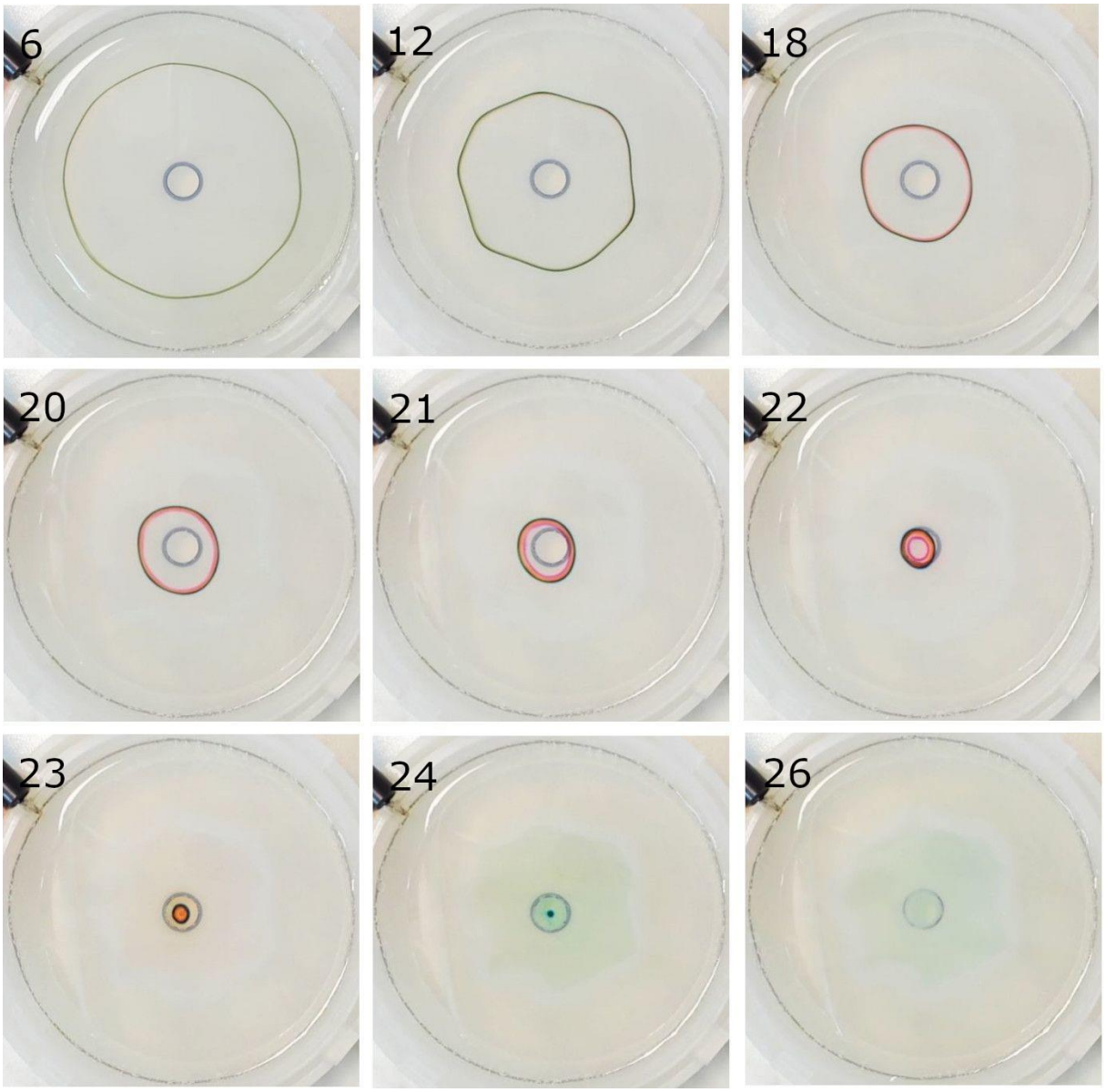
2.3.1 Separace

Jak už bylo vzpomenuto, zařízení je kruhového tvaru. Ve spodní části se nachází rezervoár pro vedoucí elektrolyt. Do rezervoáru je vložena elektroda, která je zpravidla vyrobena z platiny. Rezervoár s vedoucím elektrolytem musí mít dostatečný objem, aby v průběhu separace nedocházelo k vyčerpání elektrolytu. Horní část zařízení je vyfrézovaná kruhová nádoba, kam se vkládá disk gelu ve vodícím elektrolytu, který stabilizuje rozhraní mezi vedoucím a koncovým elektrolytem. Velikost gelu je menší než průměr kruhové nádoby. Do prostoru kolem gelu je nalit koncový elektrolyt se vzorkem. Na vnějším okraji nádoby je umístěna kruhová elektroda vyrobená z nerezové oceli nebo platiny. Oblast je spojená s rezervoárem vedoucího elektrolytu otvorem ve středu kruhu. Do otvoru je možné vložit kalíšek s polopropustnou membránou místo dna, který slouží ke sběru koncentrovaného vzorku. Schéma zařízení je na Obrázku 5.



Obrázek 5: Schéma zařízení pro epitachoforézu

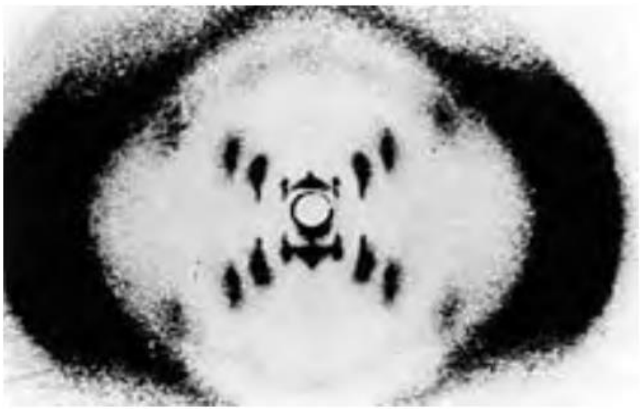
Po připojení zařízení ke zdroji může separace probíhat ve třech módech: za konstantního výkonu, konstantního napětí nebo konstantního proudu. Výběr ze tří módu je možný, protože ionty během separace nemají stálou rychlost migrace, jako tomu bylo u izotachoforézy.
Během separace nejdříve dojde k fokusování zón analytů na okraji gelu a pak putují gelem do středu zařízení. Během migrace gelem ještě dochází k zostření zón. Průběh separace je zobrazen na Obrázku 6.



Obrázek 6: Separace barviv Patent blue, Methyl Orange, Methyl Red, Acid Fuchsin na agarózovém gelu, snímky z 6, 12, 18, 20, 21, 22, 23, 24 a 26 minut

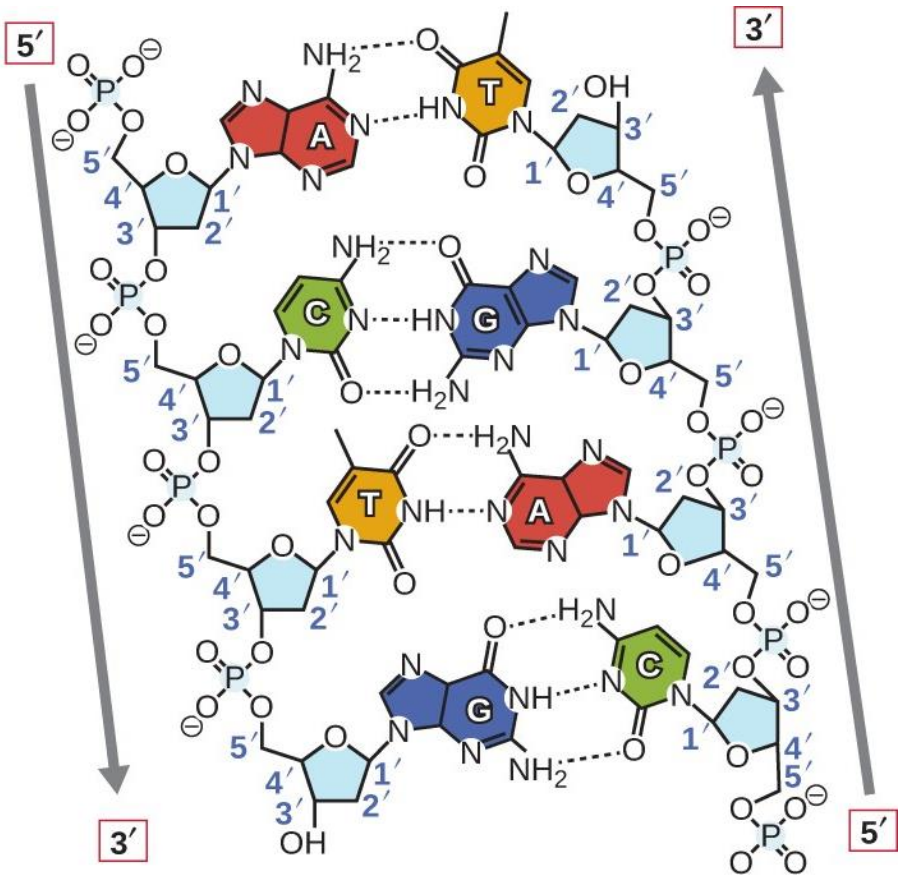
Mezi hlavní výhody epitachoforézy patří možnost separace vzorku o větším objemu (řádově ml). Příkladem je separace nukleových kyselin z biologických vzorků, která je klíčová pro aplikace v genetice a molekulární biologii. Z biologických vzorků, krve, moči, tkáně a dalších, je možno epitachoforézou koncentrovat široké spektrum analytů od malých organických nebo anorganických iontů přes různé metabolity, peptidy, velké biomolekuly jako DNA, bílkoviny a nabité oligosacharidy až po částice a viry nebo bakterie [2].
Další výhodou této metody je jednoduchý sběr koncentrovaného analytu po skončení separace. Analyt se jednoduše odpipetuje z kalíšku ve středu zařízení, kde byl zachycen díky polopropustné membráně [27].

2.4 DNA



Obrázek 7: rentgenový difrakční vzor DNA

Začátkem padesátých let minulého století Rosalind Franklin a Maurice Wilkins použili metodu rentgenové difrakce pro analýzu DNA vlákna a získali charakteristický difrakční vzor (Obrázek 7). Na základě tohoto vzoru bylo možné předpokládat, že DNA má helikální strukturu složenou ze dvou částí periodicky se opakujících podél osy. V roce 1953 pak Watson a Crick představili trojdimenzionální model DNA, který sestával ze dvou helikálních řetězců ovinutých kolem stejné osy [28]. Tato na první pohled komplexní struktura je tvořena jednoduchými složkami: cukrem, konkrétně se jedná o pentózu 2-deoxy-D-ribosu, fosfátovým zbytkem a dusíkatými bázemi. Na cukru jsou přes 5' a 3' uhlík diesterovou vazbou navázané fosfátové zbytky a tvoří tak základ řetězce. Na 1' uhlíku má pak cukr pomocí glykosidové vazby navázanou dusíkatou bázi. Dusíkaté báze, adenin, guanin, cytosin, tymin, se pak vodíkovými můstky na základě komplementarity spájí do dvoujřetězce. Tato primární struktura je zobrazena na Obrázku 8. Tyto dva řetězce pak formují sekundární strukturu α-helixu.



Obrázek 8: Primární struktura DNA

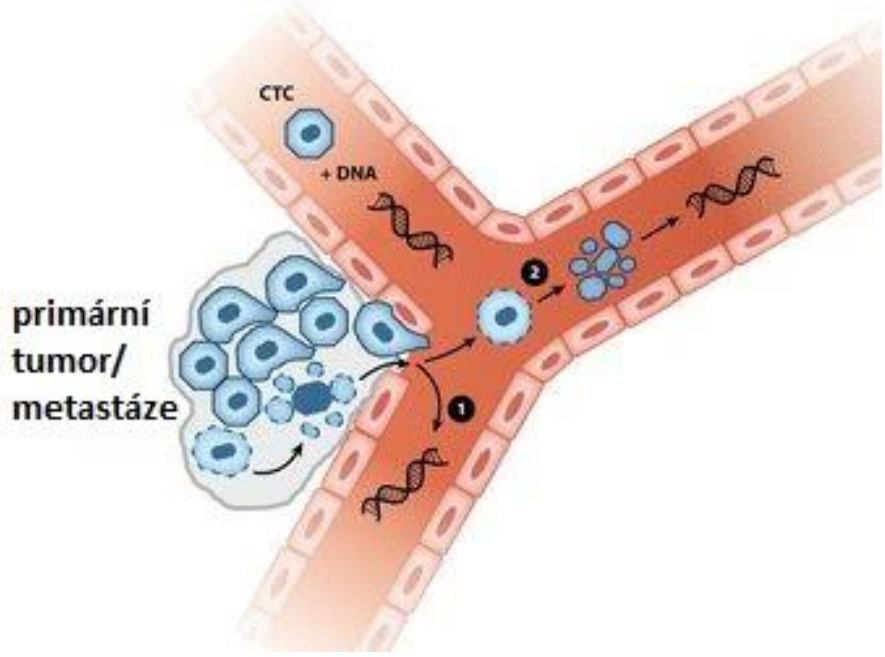
Díky své unikátní struktuře, DNA plní základní úlohu v živém světě a to, že je nositelem genetické informace. Pokud se jedná o složitější organizmus, platí, že DNA je ve všech buňkách stejná, proto je možné identifikovat cizorodou DNA.

2.4.1 Metody koncentrace DNA

Mezi základní metody purifikace a koncentrace DNA patří precipitační metody jako fenolová extrakce a následné srážení ethanolem nebo isopropanolem, dále také butanolová koncentrace, která je vhodná pro vzorky o velkém objemu [29].
Pro separaci volné DNA je k dispozici řada komerčně dostupných sad, které zpravidla fungují na principu specifické adsorbce DNA na silikonový matrix za přítomnosti pufrů s vysokou koncentrací solí [30].
Další skupina metod využívá mikrofluidní zařízení. Můžeme je rozdělit do dvou skupin – izolace pevnou fází a izolace kapalnou fází. Při izolaci pevnou fází je DNA zachytávána na funkční povrch, kterým mohou být samotné stěny mikrofluidního zařízení potažené silikonem nebo membrány z oxidu hlinitého integrované do mikrofluidního kanálu, nebo se DNA může zachytávat na imobilizované částice, zpravidla se jedná o silikonové částice [30, 31]. V případě izolace kapalnou fází je DNA zachytávána chemickým činidlem, nejčastěji se využívá fenol – chloroformová extrakce [32], nebo elektrickým polem [33]. Tyto metody však mají relativně nízkou výtěžnost, pokud je DNA ve vzorku přítomna pouze v malých množstvích. Jedním z možných řešení je použití metody, kdy dochází k co nejmenší interakci vzorku s povrchem zařízení. Příkladem může být separace DNA za pomoci izotachoforézy. Elektroforetickou mobilitu zabezpečuje fosfátová skupina, která má silný negativní náboj. Tato metoda je vhodná pro separaci krátkých oligonukleotidů, nejvhodnější jsou fragmenty DNA o velikosti 20 až 50 kDa [34]. Umožňuje však koncentraci DNA pouze z velmi omezeného množství vzorku, do stovek mikrolitrů [35].
Epitachoforéza umožňuje koncentrovat a odseparovat DNA od ostatních složek vzorku z objemů v řádech mililitrů. Jak již bylo popsáno dříve je princip této metody podobný isotachoforéze. Iony s opačným nábojem než DNA budou migrovat k opačně nabité elektrodě, neutrální látky nebudou migrovat a ionty se stejným nábojem, ale rozdílnou elektroforetickou mobilitu zůstanou ve vedoucím nebo koncovém elektrolytu a nebudou se koncentrovat na rozhraní LE/TE. Vzhledem k tomu, že rychlost migrace DNA v elektrickém poli téměř nezávisí na délce řetězce, je možné společně koncentrovat jak krátké tak i dlouhé fragmenty DNA. Je však také možné separovat pouze fragmenty požadované délky, pokud na místo stabilizačního média bude použit separační gel [2].
Jak možnost čistění a koncentrace DNA z komplexních vzorků velkého objemu, tak možnost separace různých délek řetězců nabízí řadu aplikací, především z medicínského prostředí. Možné aplikace jsou například izolace cirkulující tumorové DNA, DNA plodu z krve matky, DNA v moči. Běžný odběr krve a moči je v řádech ml, přitom podíl cílené DNA malý, což tyto vzorky dělá vhodnými analyty pro separaci epitachoforézou.

2.4.2 Cirkulující tumorová DNA

Během formování a růstu primárního tumoru dochází k uvolňování buněk do krevního oběhu. Tyto buňky nazýváme cirkulující tumorové buňky (CTC – circulating tumor cells). Pomocí krve jsou distribuovány do celého těla a mohou tvořit metastáze. Apoptózou (programovaná buněčná smrt) nebo nekrózou (odumření způsobeno vnějším faktorem) primárního tumoru, metastáz a CTC dochází k uvolňování DNA do krve (Obrázek 9). Zde se vyskytuje jako volná DNA. Protože tato DNA pochází z tumoru nebo jeho buněk nazýváme ji cirkulující tumorovou DNA (ctDNA – circulating tumor DNA).
Jednotlivé fragmenty DNA se mohou navzájem lišit, z důvodu rozdílného původu DNA a v důsledku možné mutace buněk.



Obrázek 9:Vznik ctDNA

V krvi se volná DNA (cfDNA – cell-free DNA) nachází běžně. Její hladina je u zdravého jedince relativně nízká. Mírné zvýšení této hladiny může způsobit zánět, cvičení nebo poškození tkáně. U pacientů s rakovinou je však tato hladina několikanásobně vyšší. Analýza ctDNA může pomoci při monitorování pacienta během léčby a být biomarkerem pro detekci pozůstatků nemoci [36, 37].

2.4.3 DNA plodu z krve matky

Pomocí prenatálního testování je možno zjistit chromozomální, genetické a biochemické abnormality plodu. Dříve se toto testování provádělo analýzou buněk plodu, které byly získány pomocí invazivních metod. To však představovalo určitý risk pro matku a plod. Alternativní, neinvazivní metodou, je analýza DNA plodu v krvi matky (ccffDNA – circulating cell-free fetal DNA). Navzdory tomu, že krevní oběh matky a plodu jsou odděleny, dochází k přestupu buněk plodu do krve matky.
Tento proces začíná už v počátečních týdnech prvního trimestru a jejich pozůstatky je možné detekovat i několik desetiletí po porodu. ccffDNA tvoří průměrně 10% volné DNA v krvi matky. Protože se jedná o tak malou frakci, tak pro získání této části jsou preferovány techniky založené na PCR [38, 39, 40, 41].

2.4.4 DNA v moči

Moč se skládá z 95% z vody a 5% organických a anorganických látek rozpustných ve vodě. Mezi organické části patří hlavně metabolický odpad z rozkladu proteinů a aminokyselin, creatinin a kyselina močová. Mezi anorganickou součást pak hlavně chloridy, sodík, draslík. V moči se dále vyskytují vitamíny, hormony a léčiva. Moč taktéž obsahuje buněčné elementy, válce, mikroorganizmy a krystaly [42].
Tyto složky nejsou součástí rutinních vyšetření, ale vyšetření močového sedimentu. Vyšetření se provádí zpravidla mikroskopickým vyšetřením nebo průtokovou cytometrií. Mezi buněčné elementy se řadí krevní buňky jako leukocyty a erytrocyty, epitelie a nádorové buňky. Leukocyty a erytrocyty se běžně vyskytují v malém množství v moči, hraniční hodnota pro leukocyty je 10 leukocytů/µl moči a pro erytrocyty to je 5 erytrocytů/µl moči. Proto je možné

z močového sedimentu extrahovat DNA a následně po PCR amplifikaci využít na genetickou analýzu [43, 44].
Amplifikovat je možné taktéž volnou DNA (cfDNA), která z krve přes ledviny prochází do moči [45]. Stejně jako volná DNA, tak i tumorová DNA (ctDNA) prochází do moči a může být detekována [46].
Válce jsou precipitáty cylindrického tvaru, které jsou tvořeny buněčnými nebo nebuněčnými elementy a zpravidla jsou přítomny pouze při výskytu onemocnění. Další součástí močového sedimentu jsou mikroorganizmy [44]. Za fyziologických okolností obsahuje moč bakterie v množství menším než 10^5/ml. Při ochoření je možné v moči detekovat DNA virů [47], bakterií [49], kvasinek [49].

3 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce je optimalizace podmínek separace a koncentrace kationtů a aniontů, zejména DNA. Používána separační metoda je epitachoforéza. Na separaci budou využívány speciální zařízení vyvinuté pro tuto metodu s externím zdrojem napětí. Přínosem metody je schopnost koncentrace velkých objemů vzorků (v řádech ml) na objemy v řádech µl.
Hlavním cíle práce:

- optimalizace gelu stabilizujícího rozhraní vedoucího a koncového elektrolytu.
- optimalizace podmínek separace
- výtěžnost DNA na vybraném gelu za optimalizovaných podmínek

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál a přístroje

V této kapitole budou představeny použité přístroje, chemikálie a separační média, které byly použity během měření.

4.1.1 Chemikálie

- Octan amonný, ≥98%, Lachner, Česká republika
- Kyselina octová, 99%, Lachner, Česká republika
- L-Histidin monohydrochlorid, čistý, PanReac AppliChem, Německo
- Histidin, čistý, PanReac AppliChem, Německo
- TAPS (N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]-3-aminopropanesulfonová kyselina), 99,5%, Sigma, Německo
- Tris (trisaminomethan), ultra čistý, ICN Biomedicals, USA
- Agarosa
    - NEEO, Carl Roth, Německo
    - PFEG (For pulsed field electrophoresis running gel), ≤ 10% vody, Sigma, USA
- Barviva I
    - Rhodamine B, Lachema, Česká republika
    - Safranine O, ≥ 85%, Sigma, India
    - Crystal Violet, Sigma – Aldrich, Belgicko
    - Methyl Green, 85%, Sigma – Aldrich, USA
- Barviva II
    - Methyl Red, 95%, Sigma – Aldrich, India
    - Methyl Orange, 85%, Sigma – Aldrich, USA
    - Fuchsine Acid, Sigma, India
    - Gallocyanine, 90%, Sigma – Aldrich, USA
    - Patent Blue V sodná sůl, Sigma, Anglie
    - SPADNS (Sulfanilic acid azochromotrop), ≥ 80%, India
- SYBR Gold
- MHEC (Methylhydroxyethyl celulóza) , 1%, Villa Labeco, Slovenská republika
- TRITON
- Poly(diallyldimethylamonium chlorid), 20%, Aldrich, Německo
- Hexadimetrin bromid, ≥ 95%, Aldrich, Německo
- Qubit dsDNA HS pufr, Invitrogen, USA
- Qubit dsDNA HS činidlo, 200× koncentrovaný, Invitrogen, USA
- NaCl, Lachema, Česká republika
- $Ba(NO_3)_2$, Lachema, Česká republika

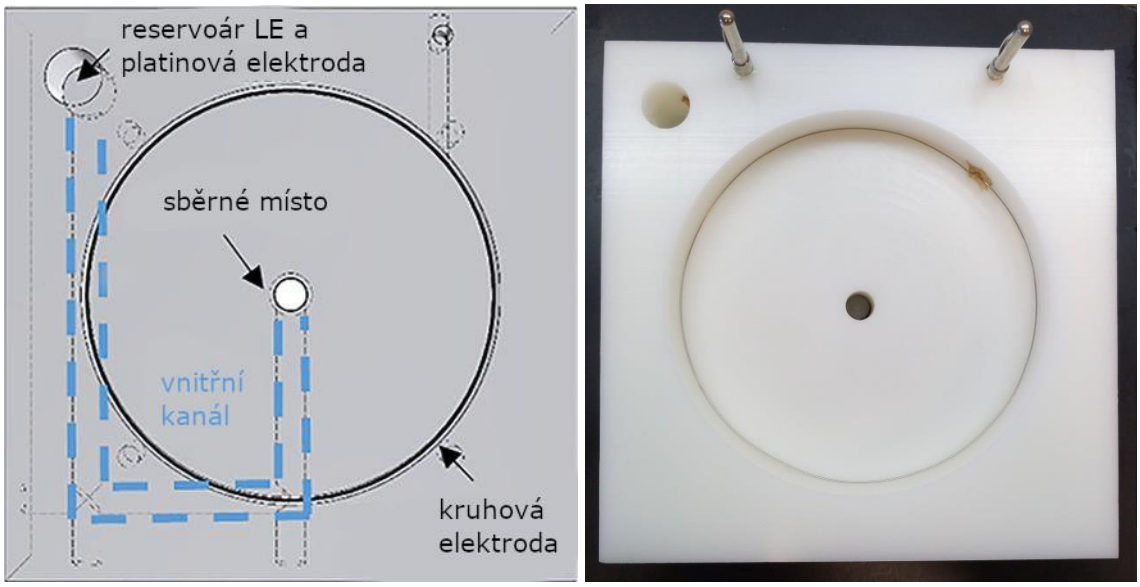
4.1.2 Přístroje

V této diplomové práci byly používány dva typy zařízení pro epitachoforézu. V prvním z nich je vedoucí elektrolyt v kanálku ve spodní části zařízení. Druhý typ je složen ze dvou nádob, které se vkládají do sebe a umožňují použití výrazně většího objemu vedoucího elektrolytu.

4.1.2.1 Zařízení s kanálkem

Zařízení (Obrázek 10) je vyrobeno v naší laboratoři ze čtvercového bloku Ertacetalu. V horní části zařízení je vyfrézována kruhová nádoba, na jejímž vnějším okraji je umístěna kruhová elektroda z nerezové oceli. Ve středu nádoby se nachází otvor, který slouží pro spojení se spodní částí zařízení. Do tohoto otvoru se vkládá kalíšek pro sběr koncentrovaného vzorku. Ve spodní části zařízení je vyvrtaný kanál, který slouží jako rezervoár pro vedoucí elektrolyt.

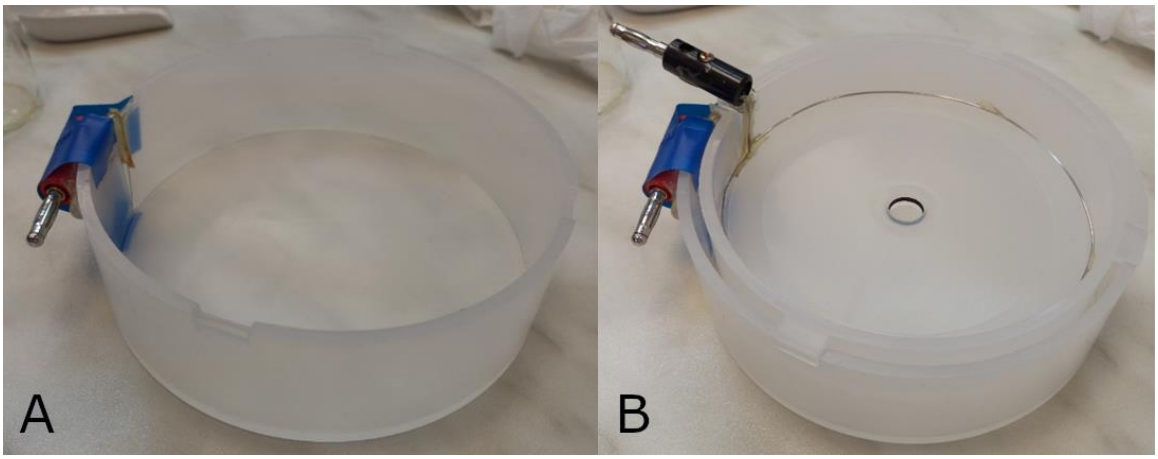
Objem kanálu je zhruba 20 ml a je do něj umístěna drátková platinová elektroda. Do středu horní kruhové nádoby se vkládá gelový disk z agarózy a vedoucího elektrolytu, kolem kterého je pak nalit koncový elektrolyt se vzorkem.



Obrázek 10:Vlevo se nachází návrh zařízení, kde možno vidět kanál, který slouží jako rezervoár pro LE; vpravo je pak skutečný obraz zařízení

4.1.2.2 Zařízení z nádob

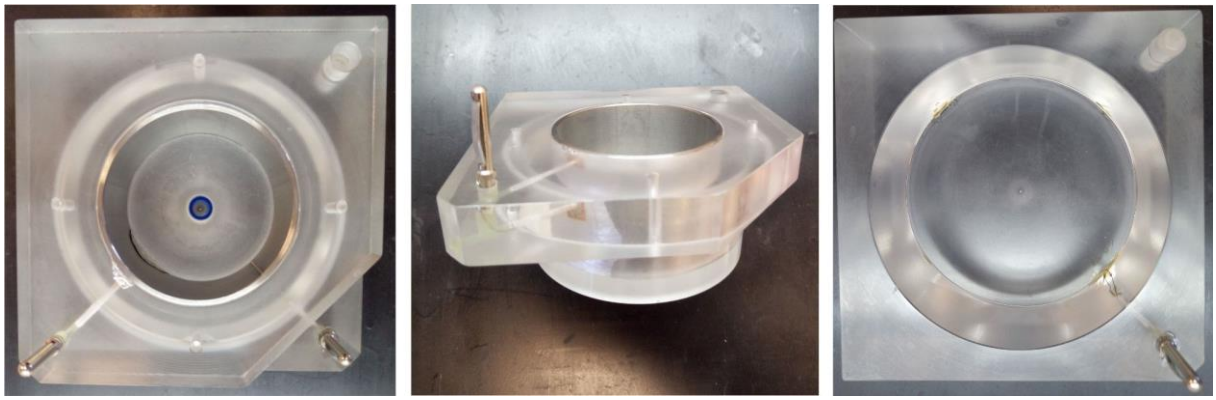
Druhé používané zařízení je složeno ze dvou nádob s drážkami na kruhové elektrody. Tento design byl vyvinut, protože u předchozího typu zařízení docházelo k vyčerpání LE. Tento problém byl zřetelný zejména u velmi dlouhých analýz velkého množství vzorku a vysokým obsahem anorganických solí. Spodní díl (Obrázek 11 A), o objemu 100 ml, je určen pro vedoucí elektrolyt. Horní díl se vkládá do spodního dílu a slouží jako podpora pro gel s vedoucím elektrolytem. Kolem gelu, který má menší průměr než horní díl, se nalévá koncový elektrolyt smíchaný se vzorkem. Obě nádoby (Obrázek 11 B) jsou spojeny otvorem ve středu horního dílu, kam se vkládá kalíšek pro sběr koncentrovaného vzorku. Ve spodní části je elektroda z platinového drátku a v horní části je prstencová elektroda z nerezové oceli.



Obrázek 11: Na obrázku vlevo je spodní část zařízení, na obrázku vpravo se nachází kompletní zařízení

4.1.2.3 Zařízení z nádob pro vysoké gely

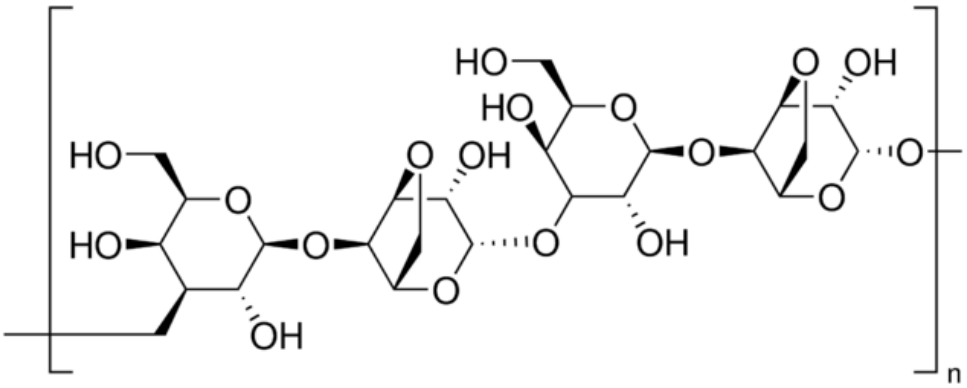
Toto zařízení je obdobou zařízení popsaného v kapitole 2.1.2.2. Hlavním rozdílem mezi těmito zařízeními je výška zařízení a průměr potřebného separačního média. Zařízení je zobrazeno na Obrázku 12.



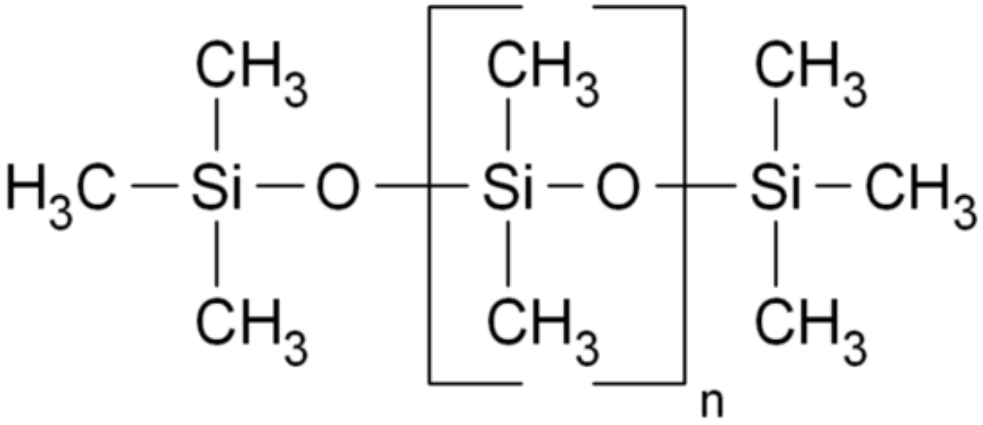
Obrázek 12: Zařízení složené z nádob pro vysoké gely

4.1.3 Médium stabilizující rozhraní LE/TE

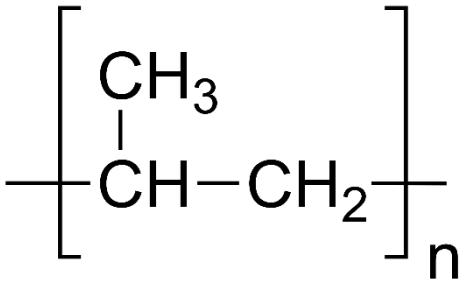
- Agaróza NEEO – agaróza s nízkou elektroendoosmózou, hodnota elektroendoosmózy deklarovaná výrobcem je ≤ 0,12 a sulfo skupiny, které jsou hlavním nositelem náboje, jsou ≤0,14 %
- Agaróza PFEG – agaróza pro pulzní pole s hodnotou elektroendoosmózy v rozpětí hodnot 0,04 – 0,10, sulfo skupiny jsou o hodnotě ≤ 0,20%



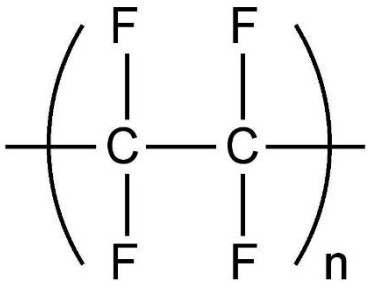
- Polydimetylsiloxan (PDMS sloupky)



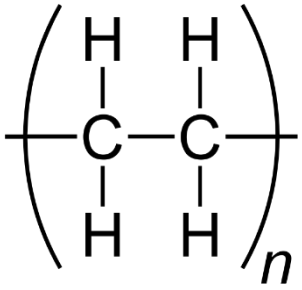
- Polypropylen (PP) – bylo pracováno se dvěma disky, velikost pórů byla v rozsahu 80 – 155 μm a 125 – 195 μm



- Polytetraflouretylen/ teflon (PTFE) – byl používán teflonový disk s velikostí pórů v rozsahu 10 – 45 μm



- Polyethylen (PE) – k dispozici byly disky s velikostí pórů 5, 20 a 40 μm



- Ultra-high-molecular-weight polyethylene/ Dyneema (UHMWPE) – disk, se kterým bylo pracováno, měl velikost pórů v rozsahu 7 – 12 μm

4.2 Příprava roztoků

4.2.1 Příprava elektrolytů

Pro separaci a koncentraci kationtů byl jako vedoucí elektrolyt zvolen roztok octanu amonného a jako koncový elektrolyt kyselina octová (HAc). Pro analyty se záporným nábojem (anionty) byl jako vedoucí elektrolyt použit roztok L-histidin monohydrochloridu a jako koncový elektrolyt roztok TAPS · Tris.

4.2.1.1 Příprava vedoucího elektrolytu NH_4Ac + HAc

Byl připraven zásobní roztok o koncentraci 100 mM do 500 ml odměrné baňky. Bylo naváženo 3,854 g NH_4Ac, převedeno do kádinky a rozpuštěno v 400 ml deionizované vody. Následně byla, za stálé kontroly pomocí pH-metru, kapátkem přidávána HAc až do pH = 5,2. Obsah kádinky byl následně převeden do odměrné baňky a doplněn na 500 ml.

4.2.1.2 Příprava roztoku HAc

Byl připraven zásobní roztok o koncentraci 100 mM a objemu 500 ml. Odměrnou baňku si naplníme přibližně do půlky deionizovanou vodou a přidáme vypočtený objem 99,8% HAc (2,86 ml). Následně byla odměrná baňka doplněna deionizovanou vodou na 500 ml.

4.2.1.3 Příprava vedoucího elektrolytu HCl · His

Byl připraven zásobní roztok o koncentraci 100 mM a objemu 500 ml. Bylo naváženo 10,48 g HCl · His, převedeno do velké kádinky a rozpuštěno v 400 ml deionizované vody. Následně bylo přidáno a rozpuštěno 10 g histidinu. Po úplném rozpuštění bylo změřeno pH a v případě potřeby přidán histidin, aby výsledné pH roztoku bylo 6,25. Obsah kádinky byl převeden do odměrné baňky a doplněn na 500 ml.

4.2.1.4 Příprava TAPS · TRIS

Byl připraven zásobní roztok o koncentraci 50 mM a objemu 500 ml. Bylo naváženo 6 g TAPS a 3 g TRIS. Obě látky byly kvantitativně převedeny do kádinky a rozpuštěny v 400 ml deionizované vody. Byla zkontrolována hodnota pH 8,3. Roztok byl převeden do odměrné baňky o objemu 500 ml a doplněn.

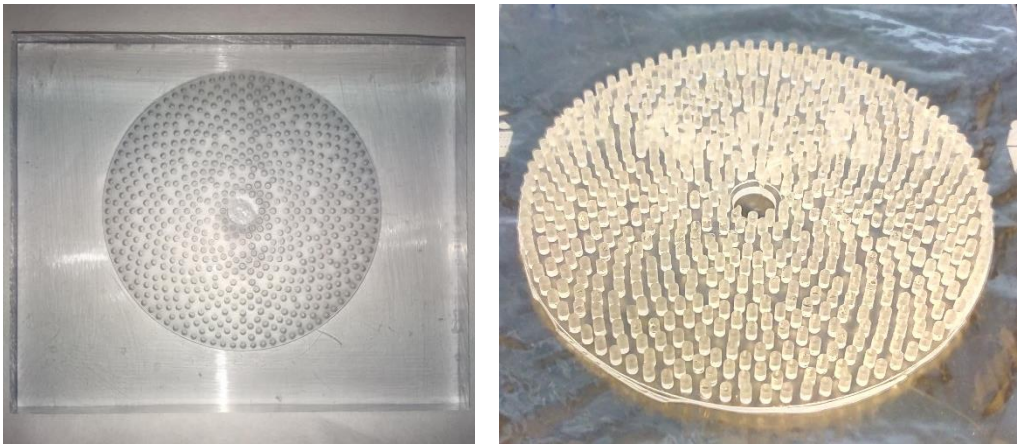
4.2.2 Příprava separačních médií

4.2.2.1 Agarózový gel

Byly připravovány agarózové gely o koncentracích v rozmezí 1 – 5%. Bylo naváženo odpovídající množství agarózy, např. 200 mg pro přípravu 1% gelu, a kvantitativně převedeno do kádinky za pomoci 20 ml vedoucího elektrolytu. Do kádinky bylo vloženo míchadlo. Roztok agarózy byl za stálého míchání přiveden k varu a vařen po dobu asi 30–60 s. Pokud byla použita fluorescenční značka SYBR Gold pro vizualizaci DNA, byla přidána až po uvaření gelu. Následně byl obsah kádinky vlit do formy o průměru 80 mm a výšce 4 mm pro zařízení s kanálkem nebo formy o průměru 66 mm a výšce 5 mm pro zařízení z nádobek. V případě potřeby byly špachtlí odstraněny vzniklé bubliny a gel byl ponechán tuhnout při pokojové teplotě po dobu nejméně 15 minut.

4.2.2.2 PDMS sloupky

Forma pro výrobu PDMS sloupků (Obrázek 13) je vyrobena z polykarbonátu. Otvory pro tvorbu sloupků jsou 3 mm hluboké 1,5 mm široké v rádiusu každých 1 – 2 mm od středového kruhu velikosti 5 mm, který je ponechán bez sloupků. Vnější průměr je 74 mm. Celková hloubka formy je 4 mm, kde 3 mm je výška samotných sloupků a zbývající 1 mm je souvislá vrstva PDMS, která tvoří dno a spojuje jednotlivé sloupky.



Obrázek 13: Vlevo je forma na výrobu sloupků a vpravo jsou samotné sloupky

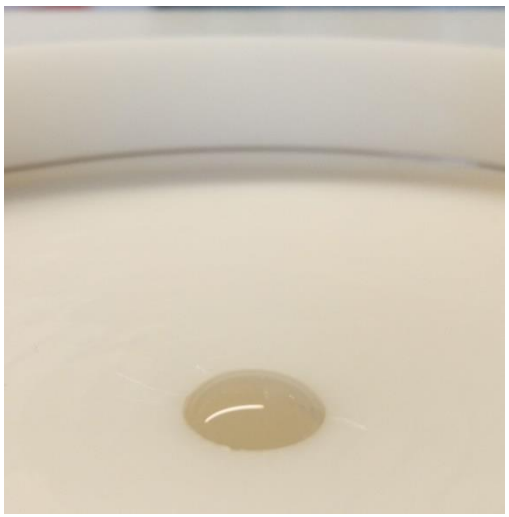
Před nalitím PDMS (Polydimethylsiloxan) musí být forma nejdříve pokrytá vrstvou glycerolu. Tento krok usnadňuje následné oddělování zpolymerovaného PDMS od formy a zabraňuje případnému roztržení sloupků během tohoto procesu.
Do takto předem připravené formy byl nalit PDMS, který byl připraven dle návodu od výrobce, smícháním 15 g PDMS s 1,5 ml iniciátoru. Po nalití do formy, je směs ještě odplyněna pomocí vakua. Polymerizace pak probíhá při 60 °C po dobu 20 minut.
Následně jsou sloupky odděleny od formy. Přebytečné PDMS je odřezáno a do středu je vyražena 5 mm díra.

4.2.2.3 Disky z napěněných polymerů

Disky z napěněných polymerů byly nejprve vyřezány do požadovaného tvaru a velikosti pomocí laserové řezačky. U každého polymeru byla nejdříve řešena hydrofobita materiálu. Disk byl buď modifikován plazmou po dobu 1 hodiny, nebo byl povrch modifikován činidlem MHEC případně byla použita kombinace obou metod. Opracovaný disk byl potom naplněn vedoucím elektrolytem a umístěn do zařízení.

4.3 Spuštění analýzy

Zřízení bylo naplněno vedoucím elektrolytem tak, aby v otvoru ve středu zařízení hladina elektrolytu tvořila konkávní linii (Obrázek 14).



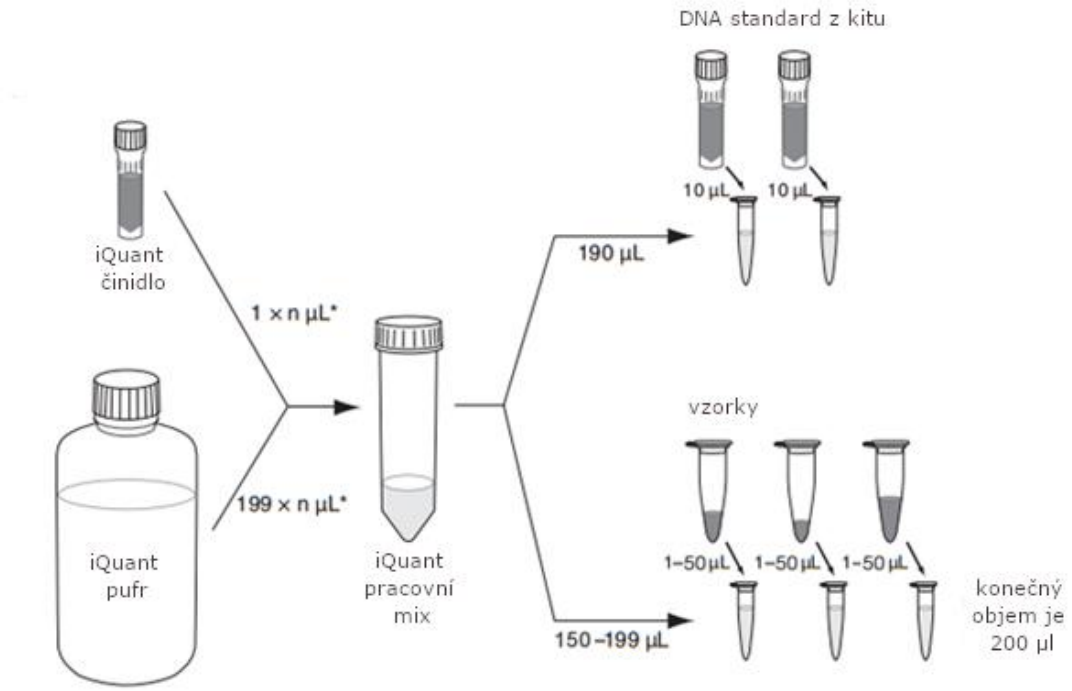
Obrázek 14: Konkávní tvar hladiny vedoucího elektrolytu

Zařízení s kanálkem je plněno otvorem nacházejícím se v rohu zařízení vedle připojení na zdroj, objem vedoucího elektrolytu je přibližně 20 ml. Pokud je odebírán koncentrovaný vzorek, je následně vložen do středu zařízení sběrný kalíšek. Ten je následně Pasteurovou pipetou také naplněn vedoucím elektrolytem. U zařízení složeného ze dvou nádob je nejdříve do spodní části nalito přibližně 100 ml vedoucího elektrolytu. Po nasazení horní části je pak pipetkou přidáno malé množství vedoucího elektrolytu pro dosažení konkávní hladiny. Pokud je použit kalíšek pro sběr DNA, je nejdříve umístěn do zařízení a následně je naplněn LE. Další krok se liší podle zvoleného stabilizujícího média.
Gel je umístěn do zařízení tak, aby nebyly přítomny žádné vzduchové bubliny mezi gelem a zařízením. Gel je pak překryt ochrannou folií. Pokud gel obsahuje otvor ve středu, je možné doplnit vedoucí elektrolyt, aby po překrytí folií nevznikla bublina.
Při práci se sloupky byl nejdříve vystřižen a vložen do zařízení kruh z oboustranné lepící pásky, aby nedošlo k podtékání elektrolytů, protože PDMS, ze kterého jsou sloupky vyrobeny, není tak přilnavý jako gel. Na daný kruh byly sloupky přilepeny a plněny až přímo v zařízení. Nejprve byl vedoucí elektrolyt pomocí kádinky nalit doprostřed, odkud se částečné

rozlil do sloupků. Následně byl elektrolyt manuálně rozdistribuován, tak aby vyplnil prostor mezi všemi sloupky. Naplněné sloupky byly na závěr překryty tenkou vrstvou PDMS vytvořenou zvlášť.
V případě disků byl vedoucí elektrolyt nejdříve nasát do disku a to tak, že byl opatrně nalit na disk, čehož následkem byla jeho migrace diskem. Přebytečný elektrolyt byl odsát Pasterovou pipetou. Dalším krokem bylo pak podlepení, které však nebylo tak účinné jak v případě sloupků. Jelikož se jedná o plasty, disky jsou častokrát z pevného, neohebného materiálu a občas nebyly samotné disky rovné. Toto, jak je později uvedeno, byl především případ polypropylénu, kdy musel být disk opatřen malou vrstvou PDMS na spodní straně, aby přilnul k zařízení. Naplněný disk byl pak umístěn do zařízení. Bylo nutné si dát pozor na hladinu vedoucího elektrolytu ve středu zařízení, jak v případě gelu, protože ne všechny disky měly ve středu otvor, kudy by bylo možné elektrolyt doplnit.
Poslední částí přípravy zařízení je nalití koncového elektrolytu se vzorkem do prostoru kolem stabilizačního média. Zařízení je pak připojeno ke zdroji napětí, pro kationty je kruhová elektroda zapojena kladně a pro anionty záporně. Separace a koncentrace je spuštěna vložením napětí.
Pokud byla stanovována výtěžnost DNA, pak po skončení separace je DNA z kalíšku odebrána do předem zvážené vialky a následně je vzorek opět zvážen. Po odečtení váhy vialky získáme odebraný objem DNA.

4.4 Měření koncentrace DNA

Pro měření koncentrace DNA byl použit fluorimetr Qubit 4 a k němu dodávaná sada roztoků na stanovení DNA. Postup přípravy vzorků na stanovení obsahu DNA na přístroji Qubit 4 zobrazen na Obrázku 15. Ve zkratce, nejdříve je potřeba připravit pracovní roztok smícháním pufru a fluorescenční značky. Na jeden vzorek je potřeba 199 µl iQuant pufru a 1 µl iQuant činidla. Měřený roztok se pak míchá ze 190 µl pracovního roztoku a 10 µl standartu DNA (2 µl zásobního roztoku DNA žebříku a 198 µl vody), nebo 20 µl posbíraného koncentrovaného vzorku a 180 µl pracovního roztoku, vždy na výsledný objem 200 µl. Takto připravené vzorky byly vloženy do fluorimetru Qubit 4 a změřena jejich koncentrace v ng/µl.



Obrázek 15: Příprava roztoků pro měření výtěžnosti na fluorimetru Qubit 4

4.5 Výpočet výtěžnosti

Výtěžnost koncentrace DNA pomocí epitachoforézy byla stanovena jako poměr DNA koncentrované k injektované. Výpočet je prezentován na konkrétním příkladu:
Ke koncovému elektrolytu bylo přidáno 0,5 µl a proběhla separace pomocí epitachoforézy. Z kalíšku ve středu zařízení byl odebrán objem 244,35 µl. Pomocí fluorimetru Qubit 4 byla změřena koncentrace standardu na 3,72 ng/µl a vzorku na 0,17 ng/µl dle kapitoly 4.4.
Nejdříve byla vypočítána hmotnost DNA ve vzorku a v standardu:

$$m_{vz} = c_{Qubit}\frac{ng}{\mu l} \cdot V_{odebrán}\,\mu l = 0{,}17\frac{ng}{\mu l} \cdot 244{,}35\,\mu l = 41{,}05\,ng$$

$$m_{DNA} = c_{Qubit}\frac{ng}{\mu l} \cdot V_{standardu}\,\mu l = 3{,}72\frac{ng}{\mu l} \cdot 200\,\mu l = 744\,ng$$

Následně byla vypočtena výtěžnost:

$$\frac{m_{vz}\,ng}{V_{DNA\,v\,experimntu}\,\mu l} \cdot \frac{V_{DNA\,v\,standardu}}{m_{DNA}} \cdot 100$$

$$\frac{41{,}05\,ng}{0{,}5\,\mu l} \cdot \frac{2\,\mu l}{744\,ng} \cdot 100 = 22\,\%$$

V tomto konkrétním případu byla stanovena výtěžnost koncentrace DNA pomocí epitachoforézy na 22%.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

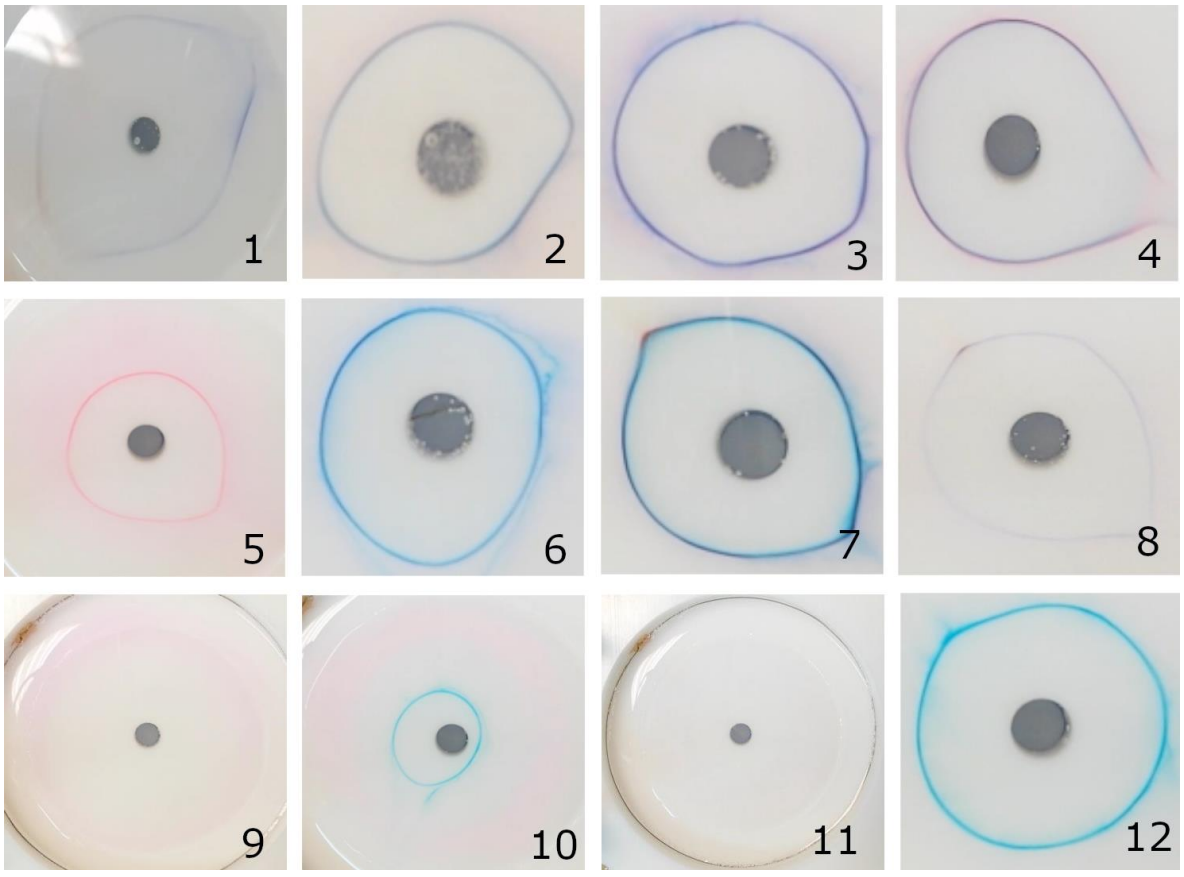
5.1 Optimalizace podmínek epitachoforézy

Úvodní krok, kterým je výběr vedoucího a koncového elektrolytu, už byl proveden dříve [27]. Výběr dodržoval základní pravidla, že vedoucí elektrolyt má větší elektroforetickou mobilitu než vzorek a koncový elektrolyt naopak menší, přičemž z důvodu urychlení analýzy, by jeho rychlost neměla být výrazně nižší, protiion vedoucího elektrolytu musí mít dobrou pufrační kapacitu při daném pH.

Bylo nutné zvolit vhodnou koncentraci vedoucího a koncového elektrolytu jak pro kationty, tak anionty. Vhodná kombinace koncentrace vedoucího a koncového elektrolytu umožňuje fokusaci vzorku do úzké zóny a taktéž ovlivňuje samotnou délku separace.

5.1.1 Koncentrace elektrolytů pro kationty

Byla prováděna separace a koncentrace barviv (Crystal Violet – CV, Rhodamine B – RhB, Safranine O – SafO, Methyl green – MetG) na 1% agarózovém gelu s použitím různé koncentrace vedoucího a koncového elektrolytu (Obrázek 16). Na základě předchozích zkušeností byl vedoucím elektrolytem zvolen octan amonný a pH na 5,2 bylo upraveno pomocí kyseliny octové. Byly testovány koncentrace 10 – 100 mM. Jako koncový elektrolyt byla vybrána kyselina octová o koncentraci od 10 mM do 100 mM.



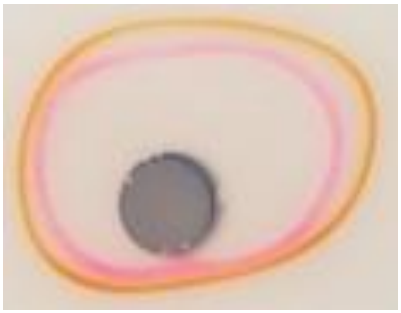
Obrázek 16:
1 - c_{LE} = 100 mM, c_{TE} = 10 mM, P = 4 W, t = 88 min, barviva CV, RhB;
2 - c_{LE} = 20 mM, c_{TE} = 100 mM, P = 4 W, t = 81 min, barviva MetG, SafO;
3 - c_{LE} = 20 mM, c_{TE} = 50 mM, P = 6 W, t = 65 min, barviva MetG, SafO, CV;
4 - c_{LE} = 20 mM, c_{TE} = 50 mM, P = 6 W, t = 76 min, barviva MetG, SafO;
5 - c_{LE} = 20 mM, c_{TE} = 50 mM, P = 4 W, t = 105 min, barviva RhB, SafO;
6 - c_{LE} = 20 mM, c_{TE} = 50 mM, P = 4 W, t = 78 min, barviva MetG, CV;

7 - c_{LE} = 20 mM, c_{TE} = 20 mM, P = 4 W, t = 85 min, barviva MetG, SafO;
8 - c_{LE} = 20 mM, c_{TE} = 20 mM, P = 4 W, t = 114 min, barviva CV, RhB;
9 - c_{LE} = 10 mM, c_{TE} = 100 mM, P = 4 W, t = 43 min, barviva RhB;
10 - c_{LE} = 10 mM, c_{TE} = 50 mM, P = 4 W, t = 79 min, barviva MetG, RhB;
11 - c_{LE} = 10 mM, c_{TE} = 20 mM, P = 4 W, t = 56 min, barviva CV, RhB;
12 - c_{LE} = 10 mM, c_{TE} = 20 mM, P = 4 W, t = 79 min, barviva MetG, SafO;

Po vyzkoušení různých koncentrací vedoucího a koncového analytu byla zvolena jako optimální koncentrace vedoucího elektrolytu c_{LE} = 20 mM a koncentrace koncového elektrolytu c_{TE} = 50 mM. Při těchto koncentracích docházelo k úspěšné fokusaci obou barviv (Methyl Green, Safranin O). Rozmytí zón je pravděpodobně způsobeno EOF, který způsobuje pohyb kapaliny ze středu směrem ke kraji. Tomuto rozmývání jsme se následně pokusili předejít a zabránit pomocí otvoru ve středu gelu a krycí folii.
V následujících experimentech při separaci kationtových barviv, pokud není uvedeno jinak, bude použit jako vedoucí elektrolyt NH_4 Ac + HAc o pH 5,2 a koncentraci 20 mM a koncový elektrolyt HAc o koncentraci 50 mM.

5.1.2 Výběr koncentrace elektrolytů pro anionty

Z předcházejícího výzkumu jsme získali koncentraci vedoucího elektrolytu 20 mM a koncového elektrolytu 10 mM [27]. Tento výběr koncentrace vedoucího a koncového elektrolytu byl ověřen separací barviv (Methyl red – MetR, Methyl Orange – MetO, Fuchsine Acid – Fuch, Gallocyanine – Gall, Patent Blue – PB) na 1% agarózovém gelu. Parametry měření a výsledky pozorování jsou ukázány na Obrázku 17.
Ve všech experimentech při separaci aniontových barviv, pokud není u experimentu uvedeno jinak, bude použit jako vedoucí elektrolyt HCl · His o pH 6,25 a koncentraci 20 mM a koncový elektrolyt TAPS · TRIS o pH 8,3 a koncentraci 10 mM.



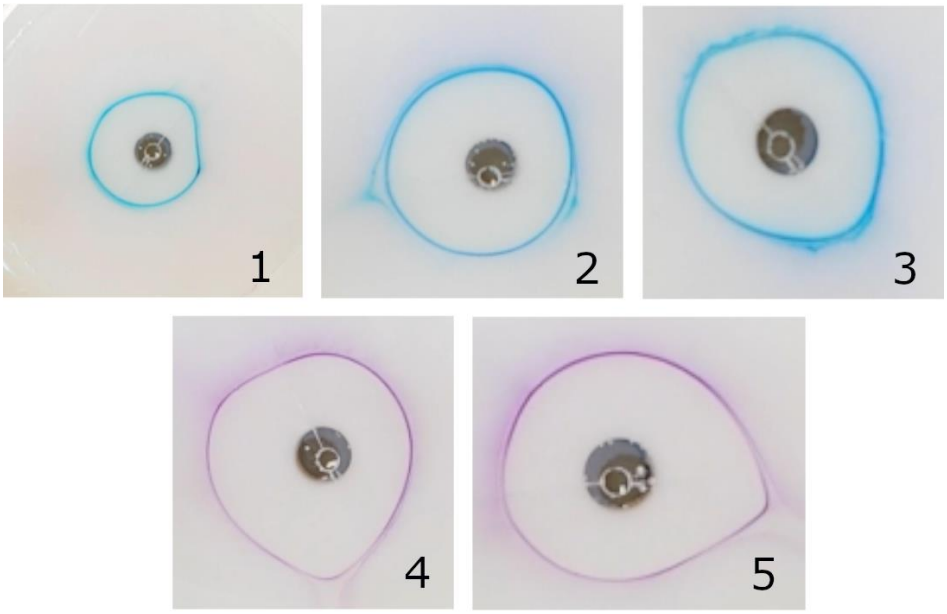
Obrázek 17: P = 4 W, t = 71 min, barviva MetO, Fuch

5.2 Přídavek barnatých iontů

U separací aniontů docházelo ke srážení gelu v průběhu separace. Protože tato deformace může ovlivnit samotnou separaci vzorku, a následně výtěžnost, bylo potřeba tento problém elimininovat. Bylo navrženo několik hypotéz o příčině srážení gelu v průběhu separace. Jedna z nich byla, že srážení gelu je způsobeno elektroosmotickým tokem v gelu, který vzniká během separace. Přicházelo v úvahu několik řešení, jak tento tok eliminovat. Jedním z nich bylo přidání barnatých iontů, které by se navázaly na záporně nabité sulfo skupiny v gelu a eliminovaly tak náboj.

5.2.1 Vliv barnatých kationtů na separaci kationtů

Byl zkoumán vliv přídavku iontů Ba^{2+} na separaci kationových barviv. Ba^{2+} byly přidány do gelu a vedoucího elektrolytu, složení a koncentrace elektrolytů byly optimalizovány v předchozím kroku. Byly testovány tři koncentrace Ba^{2+} a několik různých kombinací barviv, viz. Obrázek 18.

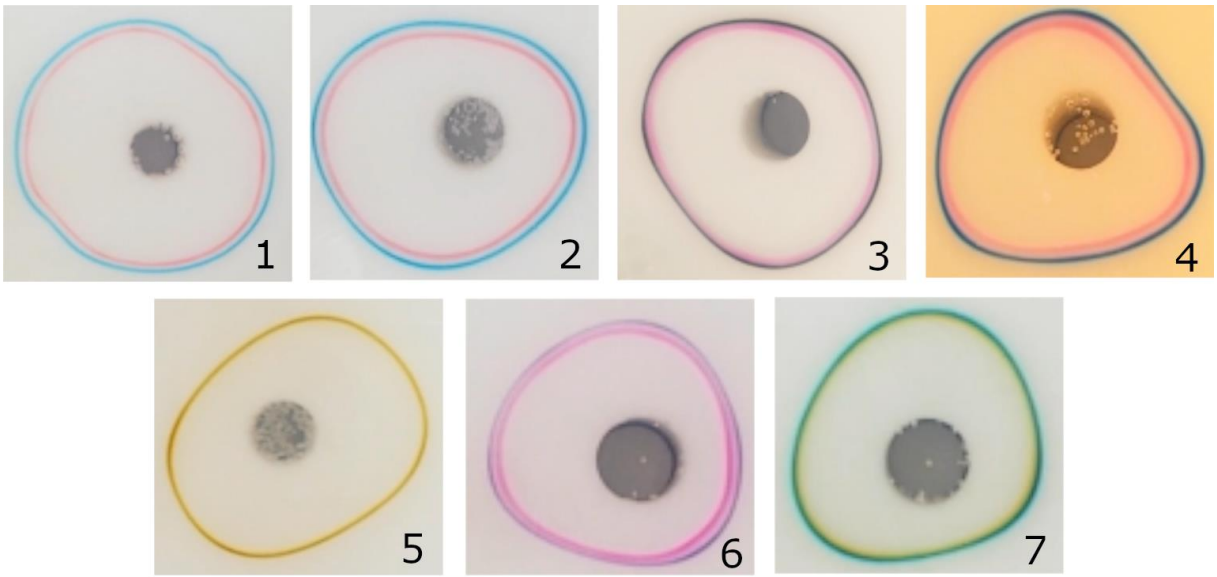


Obrázek 18:
1 – c (Ba^{2+} v gelu) = 2 mM, c (Ba^{2+} v LE) = 2 mM, P = 6 W, t = 79 min, barviva MetG, SafO;
2 - c (Ba^{2+} v gelu) = 1 mM, c (Ba^{2+} v LE) = 1 mM, P = 6 W, t = 65 min, barviva MetG, SafO;
3 - c (Ba^{2+} v gelu) = 1 mM, c (Ba^{2+} v LE) = 1 mM, P = 4 W, t = 89 min, barviva MetG, CV;
4 - c (Ba^{2+} v gelu) = 0,5 mM, c (Ba^{2+} v LE) = 0,5 mM, P = 6 W, t = 63 min, barviva CV, SafO;
5 - c (Ba^{2+} v gelu) = 0,2 mM, c (Ba^{2+} v LE) = 0,2 mM, P = 6 W, t = 71 min, barviva CV, SafO;

Na základě provedených experimentů jsem dospěla k závěru, že barnaté kationty neovlivňují, nebo mírně zhoršují separaci kationových barviv. Jak je možné vidět na Obrázku 18, nedochází k zlepšení rozlišení jednotlivých barviv a v případě krystalové violeti dochází spíše k rozpíjení zóny.

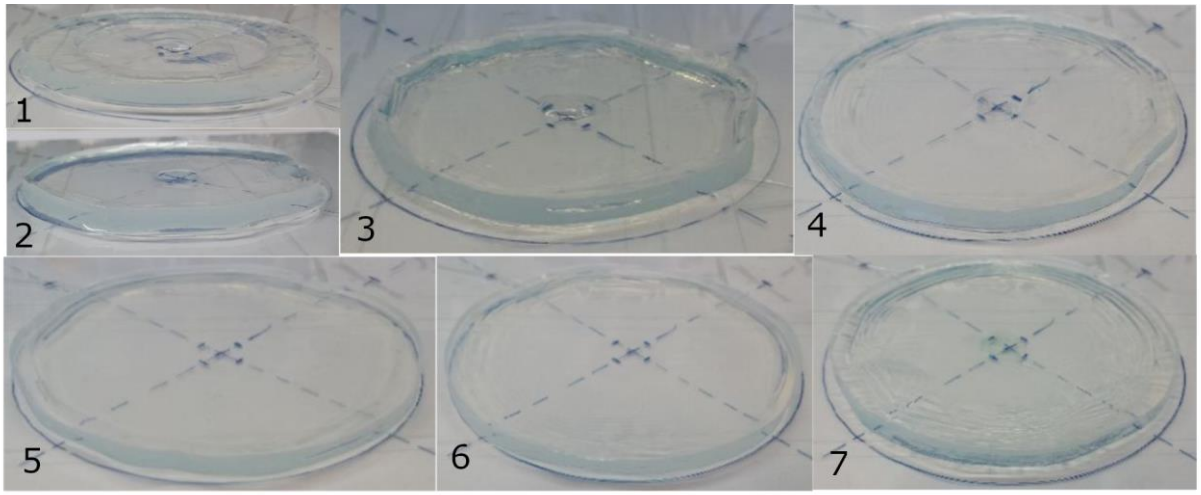
5.2.2 Vliv barnatých kationtů na separaci aniontů a srážení gelu

Byl zkoumán vliv Ba^{2+} na separaci a koncentraci anionových barviv. Do gelu a vedoucího elektrolytu byly přidány Ba^{2+} ionty o různých koncentracích. Byl sledován jejich vliv na separaci (Obrázek 19) a zejména na srážení gelu (Obrázek 20).



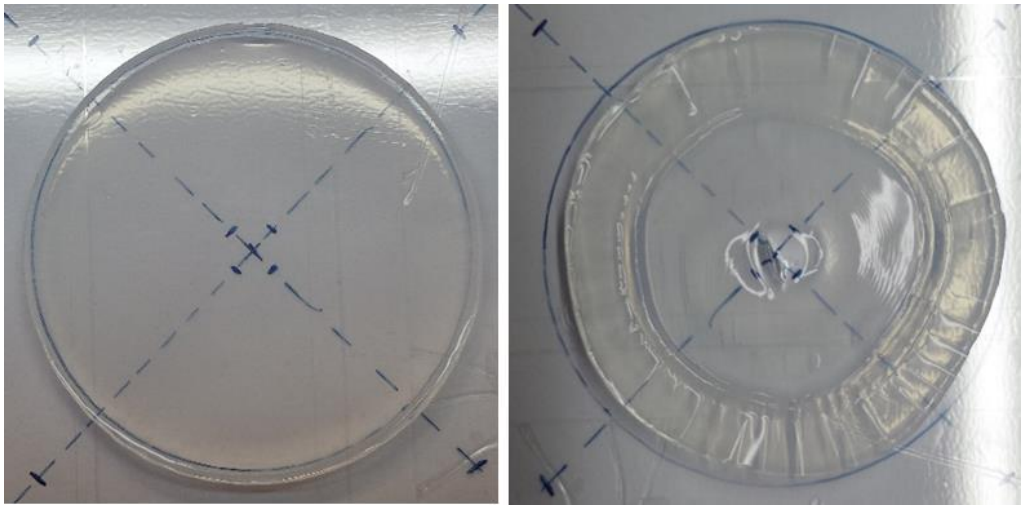
Obrázek 19:
1 - c(Ba^{2+} v gelu) = 10 mM, c(Ba^{2+} v LE) = x, P = 4 W, t = 108 min, barviva PB, SPA;
2 - c(Ba^{2+} v gelu) = 2 mM, c(Ba^{2+} v LE) = x, P = 4 W, t = 78 min, barviva PB, SPA;
3 - c(Ba^{2+} v gelu) = 1 mM, c(Ba^{2+} v LE) = x, P = 4 W, t = 77 min, barviva MetR, Fuch, Gall;
4 - c(Ba^{2+} v gelu) = 2 mM, c(Ba^{2+} v LE) = 2 mM, P = 4 W, t = 73 min, barviva PB, Fuch, Gall;
5 - c(Ba^{2+} v gelu) = 1 mM, c(Ba^{2+} v LE) = 1 mM, P = 4 W, t = 77 min, barviva MetO, MetR, Gall
6 - c(Ba^{2+} v gelu) = 0,5 mM, c(Ba^{2+} v LE) = 0,5 mM, P = 4 W, t = 70 min, barviva Fuch, Gall;
7 - c(Ba^{2+} v gelu) = 0,2 mM, c(Ba^{2+} v LE) = 0,2 mM, P = 4 W, t = 65 min, barviva MetO, PB;

Jak v případě kationtů, tak i v případě aniontů není pozorován vliv barnatých kationtů na samotnou separaci barviv. Nepozorujeme zlepšení ani zhoršení průběhu separace. V případě aniontů nebyl problém s tvorbou ostrých zón ani bez přídavku barnatých kationtů, avšak předpokládalo se, že zamezením vlivu elektroosmotického toku na separaci by mohlo dojít i k fokusaci některých hůře fokusovatelných barviv.



Obrázek 20:
1 - c(Ba^{2+} v gelu) = 10 mM, c(Ba^{2+} v LE) = x, P = 4 W, t = 108 min;
2 - c(Ba^{2+} v gelu) = 2 mM, c(Ba^{2+} v LE) = x, P = 4 W, t = 78 min;
3 - c(Ba^{2+} v gelu) = 1 mM, c(Ba^{2+} v LE) = x, P = 4 W, t = 77 min;
4 - c(Ba^{2+} v gelu) = 2 mM, c(Ba^{2+} v LE) = 2 mM, P = 4 W, t = 73 min;
5 - c(Ba^{2+} v gelu) = 1 mM, c(Ba^{2+} v LE) = 1 mM, P = 4 W, t = 77 min;
6 - c(Ba^{2+} v gelu) = 0,5 mM, c(Ba^{2+} v LE) = 0,5 mM, P = 4 W, t = 70 min;
7 - c(Ba^{2+} v gelu) = 0,2 mM, c(Ba^{2+} v LE) = 0,2 mM, P = 4 W, t = 65 min;

V případě prvního experimentu, kdy byly barnaté ionty přidány pouze do gelu v koncentraci 10 mM, sice nedošlo k výraznému sražení gelu, ale došlo k celkové deformaci gelu. Tato vysoká koncentrace barnatých kationtů způsobila výrazné prodloužení doby separace, vlivem čehož byl gel vystaven vysoké teplotě po dlouhou dobu a došlo k téměř protavení jeho středu. Porovnání gelu před a po separaci je zobrazeno na Obrázku 21.



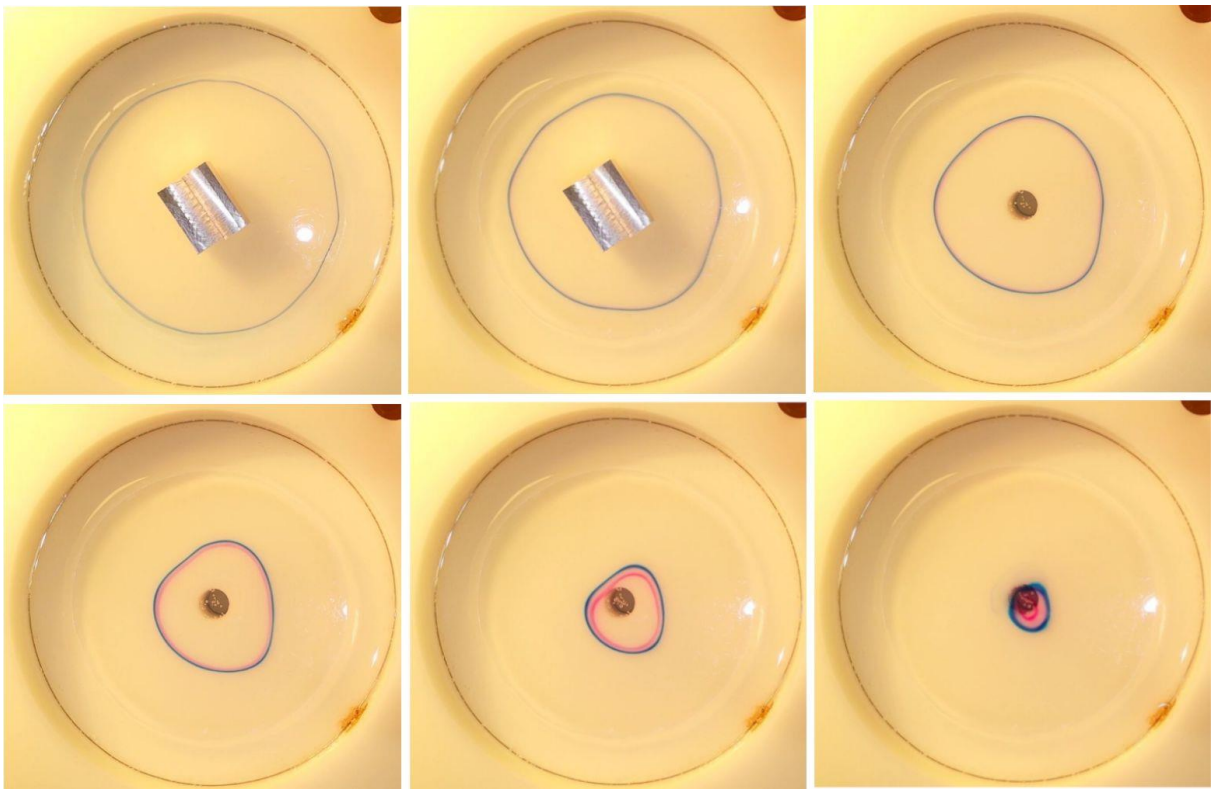
Obrázek 21: Gel s barnatými ionty (c = 10 mM) před a po separaci

V následujících experimentech byla proto využita menší koncentrace barnatých kationtů. V prvních třech případech, kdy byly ionty přidávány pouze do gelu, pozoruje výraznější deformaci především okrajů gelu než v případě přidání iontů do gelu i do vedoucího elektrolytu. Můžeme usuzovat, že stejné složení gelu a vedoucího elektrolytu umožňuje lepší stabilizaci systému. V případě koncentrace barnatých kationtů v koncentraci 0,2 mM je stabilizační vliv už o něco menší než v koncentracích 2, 1 a 0,5, ale stále patrný. Jako nejvhodnější koncentrace se jeví 0,5 mM, kdy je stabilizace systému efektivní a nedochází

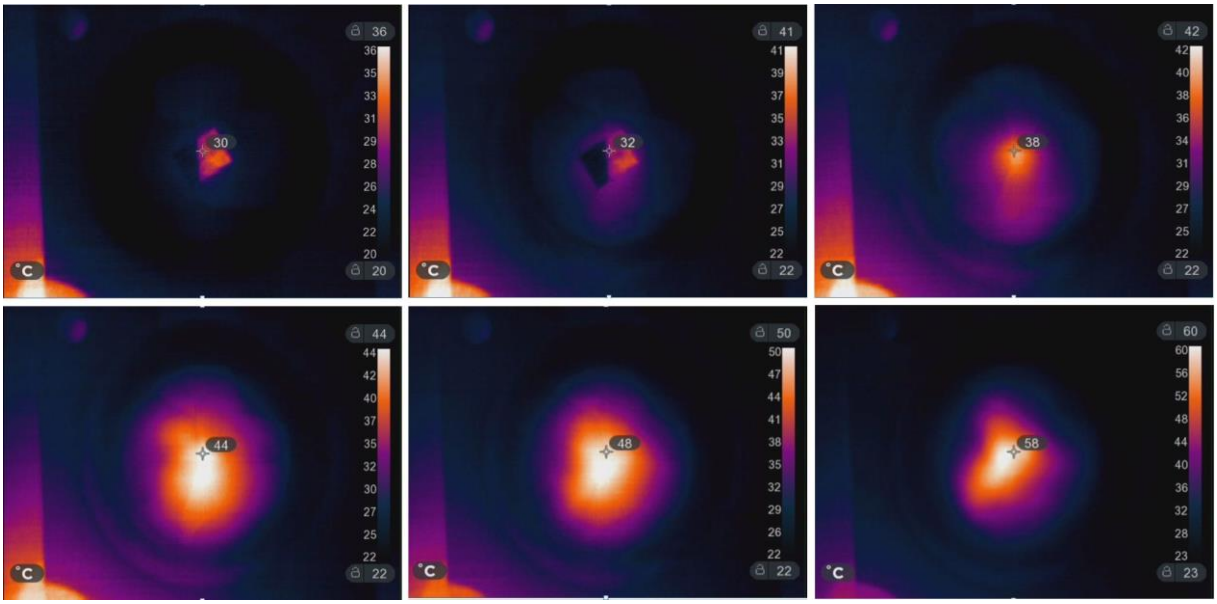
k sražení gelu, viz Obrázek 20 (gel 6). Díky malé koncentraci nedochází k výraznému zpomalení separace a tím se omezuje i vliv tepla na gel.

5.3 Teplotní změny v průběhu separace na zařízení s kanálkem

Pomocí termokamery InfraTech byly sledovány teplotní změny v průběhu separace. Separace byla provedena v 1% agarózovém gelu pro pulzní pole (PTFE) a separována byla barviva Patent Blue a Fuchsin. Separace probíhala za konstantního výkonu 4W, napětí bylo na začátku 300 V a na konci 238 V. Průběh separace je zobrazen na Obrázku 22 a teplotní průběh na Obrázku 23.



Obrázek 22: Separace barviv při sledování teplotní stopy

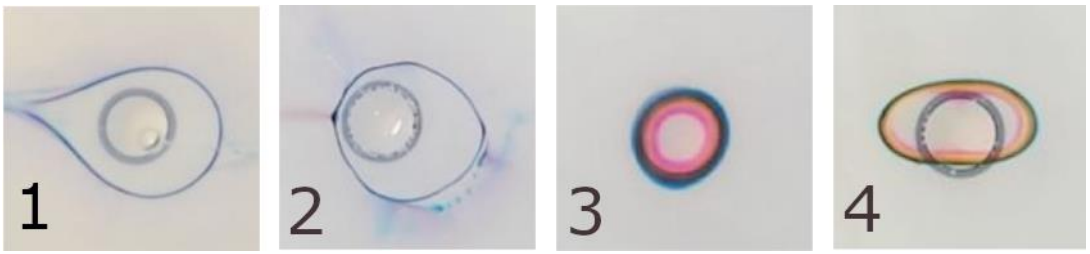


Obrázek 23: Teplotní záznam během separace

Během separace dochází k zahřívání celého systému. Jak bylo uvedeno v kapitole 2.2.2., intenzita elektrického pole je rozdílná pro jednotlivé zóny, přičemž na vedoucím elektrolytu je nejnižší a na koncovém elektrolytu nejvyšší. Tomu odpovídá také rozdělení vkládaného napětí. Na koncový elektrolyt působí největší napětí a tím pádem se přehřívá nejvíce. K výraznému přehřívání středu zařízení ke konci separace tedy připívá jednak přiblížení koncového elektrolytu a jednak zkoncentrování vkládaného napětí na jednotlivé zóny z velké plochy na začátku separace na malou plochu ke konci separace.
Na Obrázku 23 pak můžeme pozorovat nárůst teploty z původních 38 °C až na 58 °C. Termokamera je schopna zachytit teplotu pouze na povrchu zařízení/gelu a teplota přímo v jeho středu může být ještě o něco vyšší. Tento předpoklad byl potvrzen i částečným nebo až úplným zkapalněním agarózového gelu v průběhu separace. Tento gel byl následně vypipetován ze sběrného kelímku společně se vzorkem. K přehřívání středu přispívá použití vysokého výkonu při separaci (4 W), který způsobil, že i navzdory optimálnímu procházejícímu proudu (kolem 15 mA) bylo napětí během separace 300 – 238 V. Dalším příspěvkem k zahřívání je značná délka separace, která byla až 70 minut a vyčerpání LE u takto dlouhých separací. Tento problém můžeme částečně omezit použitím zařízení složeného z nádob, které umožňuje výrazně zvýšit množství použitého LE a snížit čas separace. Dále bylo přistoupeno ke snížení aplikovaného výkonu a případně k jeho programování, kdy byl výkon ke konci separace výrazně snižován tak, aby teplota nepřekročila 45 °C.

5.4 Testování zařízení z nádob

Všechny dosavadní experimenty byly prováděny na zařízení s kanálkem. V průběhu diplomové práce však bylo vyvinuto nové zařízení, zařízení z nádob. Separační prostor tohoto zařízení je totožný s předchozím, avšak místo kanálku pro LE obsahuje spodní nádobu, která je objemnější a umožňuje použití většího množství vedoucího elektrolytu. To zabraňuje jeho vyčerpání, urychluje analýzu a umožňuje efektivnější práci.
Pro potvrzení efektivity zařízení z nádob byly zopakovány experimenty separace kationtových a aniontových barviv.
Separace byly provedeny na 1% agarózovém gelu pomocí optimalizovaných koncentrací elektrolytů. V případě kationtových barviv byl použit vedoucí elektrolyt o koncentraci 20 mM a koncový elektrolyt o koncentraci 50 mM. V případě aniontových barviv byl použit vedoucí elektrolyt o koncentraci 20 mM a koncový elektrolyt o koncentraci 10 mM Parametry a výsledky pozorování jsou uvedeny na Obrázku 24.

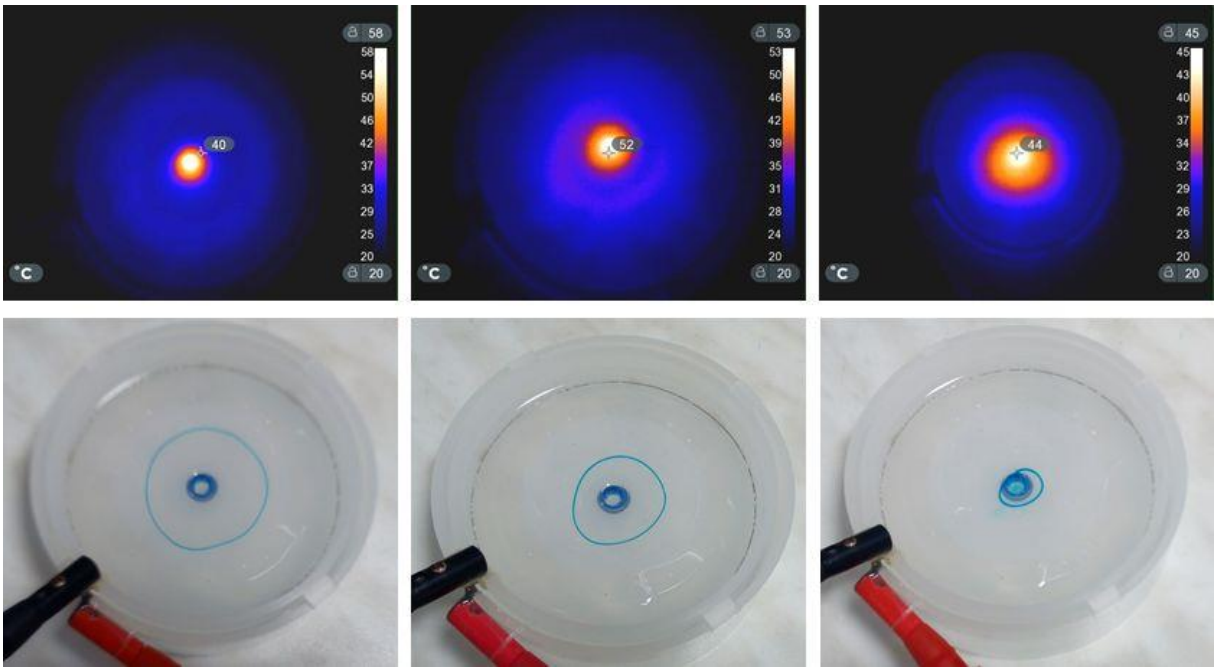


Obrázek 24:
1 – P = 2 W, t = 50 min, kationtová barviva MetG, SafO, CV;
2 - P = 6 W, t = 23 min, kationtová barviva MetG, SafO, CV;
3 – P = 2 W, t = 48 min, aniontová barviva PB, MetO, Gall, Fuch;
4 – P = 6 W, t = 23 min, aniontová barviva PB, MetO, MetR, Fuch;

Separace proběhla úspěšně za stejných podmínek jako v případě zařízení s kanálkem. Navíc, jak bylo přepokládáno, bylo pozorováno výrazné zrychlení separace vlivem většího množství vedoucího elektrolytu a to z 60 minut na 25 minut při výkonu 6 W. V případě kationtových i aniontových barviv došlo k úspěšné fokusaci všech barviv.

5.5 Teplotní změny během separace na zařízení z nádob

Pomocí termokamery InfraTech byly sledovány teplotní změny během separace. Separace byla provedena v 1,3% agarózovém gelu s přídavkem barnatých kationtů o koncentraci 0,5 mM, separována byla DNA a barvivo Patent Blue. Separace probíhala za konstantního napětí 100 V, procházející proud byl na začátku 22 V a ke konci 3 V. Separace trvala 58 minut. Průběh separace a teplotní průběh je zobrazen na Obrázku 25.

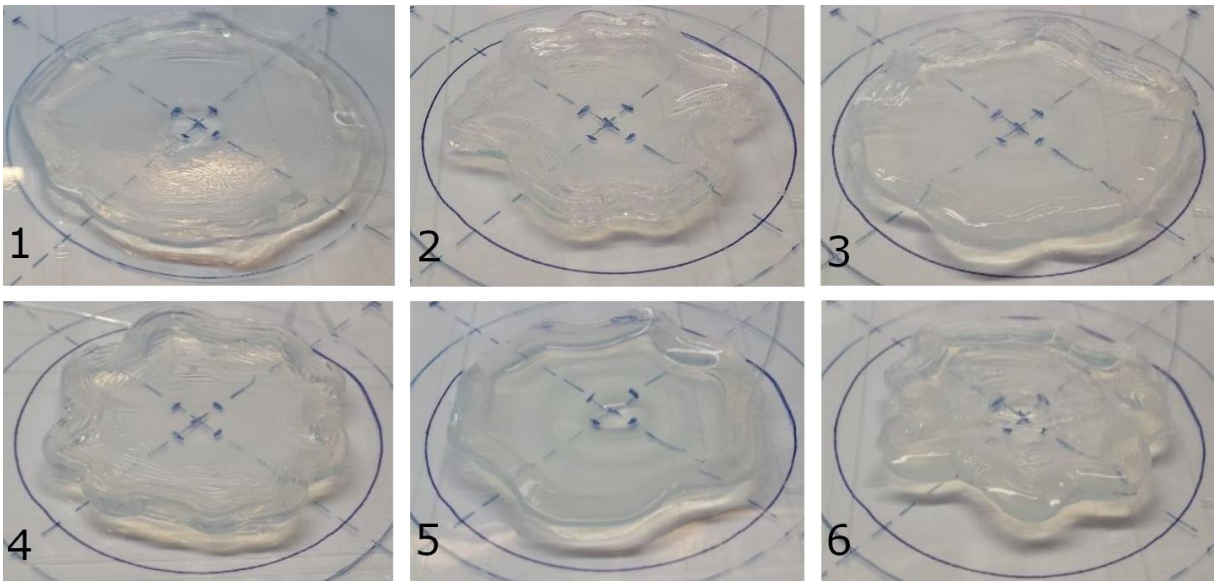


Obrázek 25: Teplotní záznam separace na zařízení z nádob

Nejvyšší teplota během separace byla 53 °C. V porovnání se zařízením s kanálkem, kde byla tato teplota 58 °C, to není výrazný rozdíl. Experiment ukázal, že zvýšením objemu vedoucího elektrolytu nedojde k výraznému snížení teploty ve středu zařízení a není tím možné použít vyšší výkon nebo napětí pro separaci a tím i zkrátit dobu jejího trvání. Jediným řešením tedy zůstává časový program, který bude měnit napětí tak, aby teplota nepřesáhla určitou hranici.

5.6 Vliv výkonu na rychlost separace a srážení gelu

Další teorií proč v průběhu koncentrace dochází k deformaci gelu bylo srážení v důsledku jeho přehřívání vlivem aplikace vysokého výkonu. Proto byly koncentrace prováděny za použití různých výkonů od nízkých až po vysoké a pozorován jejich vliv na deformaci gelu. Byla také sledována kombinace prevence srážení pomocí eliminace EOF ionty Ba^{2+} a různého výkonu. Testování bylo prováděno na separaci aniontových barviv za standartních koncentrací LE a TE na 1% agarózovém gelu. Byl pozorován vliv výkonu na rychlost separace a především na srážení gelu. Výsledky pozorování jsou uvedeny na Obrázku 26.

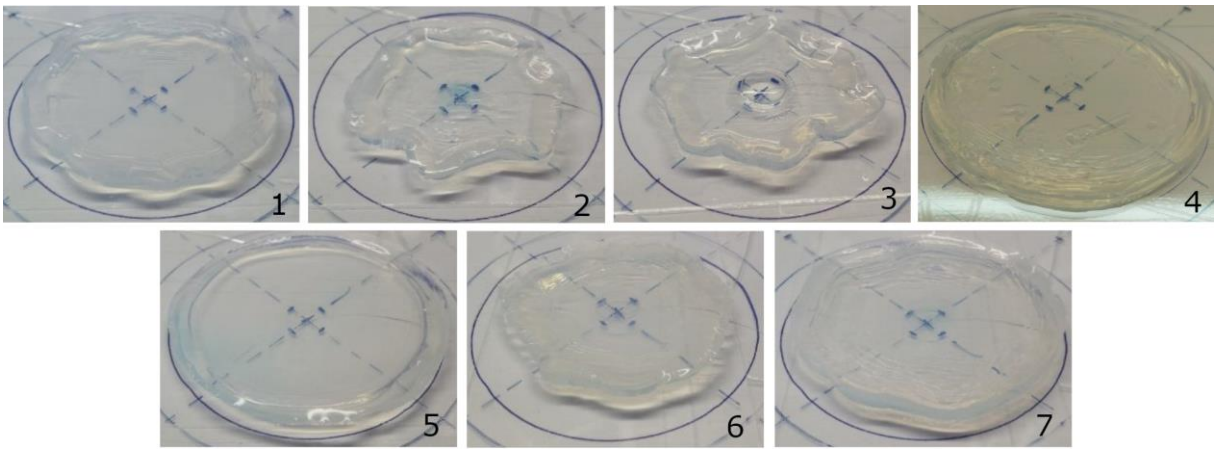


Obrázek 26:
1 - P = 6 W, U = 131 – 265 V, I = 46 – 23 mA, t = 23 min, c(Ba^{2+} v gelu a LE) = 0 mM;
2 - P = 6 W, U = 137 – 270 V, I = 44 – 22 mA, t = 27 min, c(Ba^{2+} v gelu a LE) = 0 mM;
3 - P = 2 W, U = 72 – 167 V, I =28 – 12 mA, t = 48 min, c(Ba^{2+} v gelu a LE) = 0 mM;
4 - P = 2 W, U = 72 – 138 V, I = 28 – 14 mA, t = 47 min, c(Ba^{2+} v gelu a LE) = 2 mM;
5 - P = 6 W, U = 133 – 209 V, I = 46 – 29 mA, t = 28 min, c(Ba^{2+} v gelu a LE) = 1 mM;
6 - P = 2 W, U = 82 – 133 V, I = 25 – 14 mA, t = 48 min, c(Ba^{2+} v gelu a LE) = 1 mM;

Gel 1 a 2 zobrazuje porovnání srážení gelu za stejných podmínek, přičemž gel 1 je nižší než gel 2. Na přípravu obou gelů byl použitý stejný objem ale jiný průměr formy. Gel 1 se sice srazil méně, je však kvůli nižší výšce náchylnější na protavení středu gelu.
Z porovnání gelu 2 a 3 bychom mohli uvažovat o tom, že vyšší výkon způsobuje větší srážení gelu, avšak porovnáním gelu 5 a 6 je toto tvrzení vyvráceno. Všechny gely jsou výrazně sraženy a deformovány bez závislosti na vloženém výkonu, proto můžeme tvrdit, že výkon nemá vliv na srážení gelu. Vyšší výkon a větší objem vedoucího elektrolytu urychlují separaci, je však nutné dbát na teplotu separace, aby nedošlo k protavení gelu ve středu, viz kapitoly 5.3 a 5.5.

5.7 Agaróza pro pulzní elektrické pole (PFGE - Pulsed-Field Gel Electrophoresis)

Předchozí experimenty vyloučily vysokou teplotu ve středu zařízení jako příčinu srážení gelu. Proto byla hledána další média stabilizující rozhraní LE a TE. Byly testovány agarózové gely s nízkou hodnotou EOF jako je agaróza pro gelovou elektroforézu v pulsním poli. Zároveň byl zkoušen i vliv Ba^{2+} na srážení gelu. Byl sledován vliv změny agarózy na separaci a především na srážení gelu. Výsledky experimentu jsou zobrazeny na Obrázku 27.

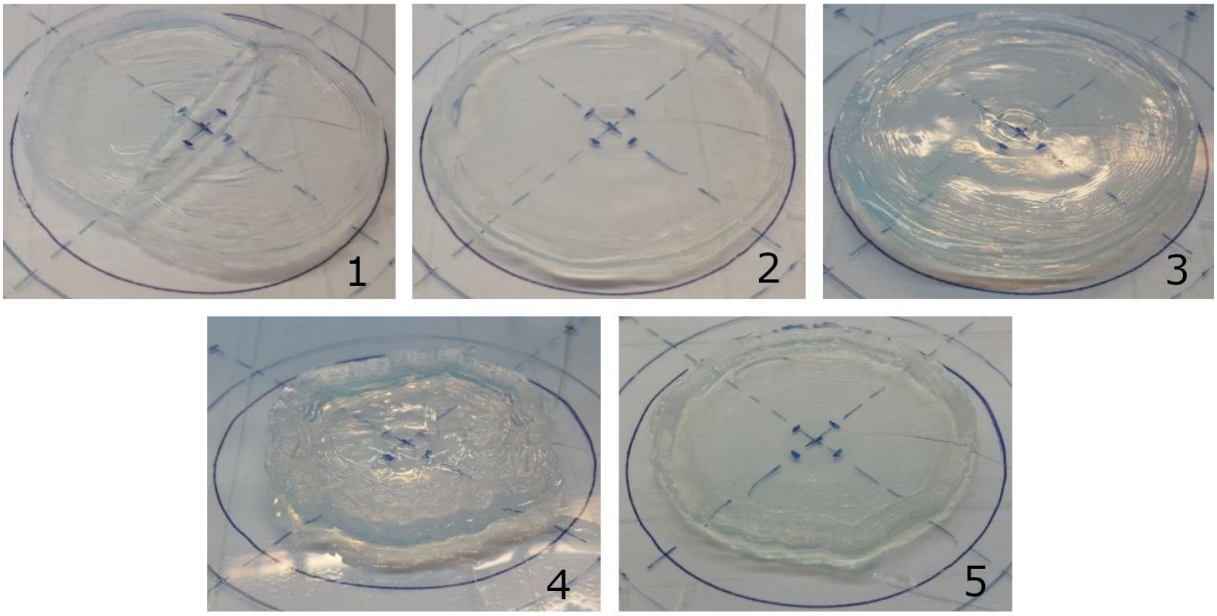


Obrázek 27:
1 – 1%, c(Ba^{2+} v gelu a LE) = 0 mM, P = 2 W, t = 63 min;
2 – 1%, c(Ba^{2+} v gelu a LE) = 0,5 mM, P = 2 W, t = 35 min;
3 – 1%, c(Ba^{2+} v gelu a LE) = 0,5 mM, P = 6 W, t = 20 min;
4 – 1,3%, c(Ba^{2+} v gelu a LE) = 0 mM, U = 100 V, t = 50 min;
5 – 1,3%, c(Ba^{2+} v gelu) = 0,5 mM, P = 2 W, t = 40 min;
6 – 2%, c(Ba^{2+} v gelu) = 0 mM, P = 2 W, t = 54 min;
7 – 2%, c(Ba^{2+} v gelu) = 0,5 mM, P = 2 W, t = 45 min;

Jak je vidět na Obrázku 27 došlo ke sražení 1% gelu bez přídavku, i s přídavkem barnatých kationtů. Přídavek barnatých kationtů v tomto případě působil negativně, jelikož je srážení ještě výraznější než v případě gelu, kdy barnaté ionty přidány nebyly. Jak je vidět na gelu 3 v kombinaci s vyšším výkonem došlo dokonce k protavení středu gelu.
Během měření byla udělaná chyba v navážce a místo 1% gel vznikl 1,3% gel, který se během analýzy nesrazil, nebo srazil velmi málo. Ke sražení 1,3% gelu nedošlo ani v případě přídavku barnatých iontů ani bez něj (Obrázek 27 – 4 a 5). Vzhledem na pozitivní výsledek hustějšího gelu byl dále testován 2% gel, který se v případe přidaní barnatých iontů srazil minimálně, bez přidání barnatých iontů bylo sražení výrazné (Obrázek 27 – 6 a 7).
Předpokládané chování agarózy PFGE bylo udržení tvaru gelu během analýzy, čili jeho nesražení. Tento předpoklad nebyl potvrzen, a protože se jedná o nákladnější agarózu než je NEEO, tak v následujících experimentech jsem se vrátila k NEEO agaróze.

5.8 Vliv hustoty gelu na srážení

Byla prováděna separace barviv na agarózovém gelu různé hustoty a sledován vliv hustoty gelu na jeho srážení. Výsledky pozorování jsou uvedeny na Obrázku 28. Experimenty byly prováděny na novém zdroji napětí, který nenabízí možnost konstantního výkonu, proto bylo používáno konstantní napětí.

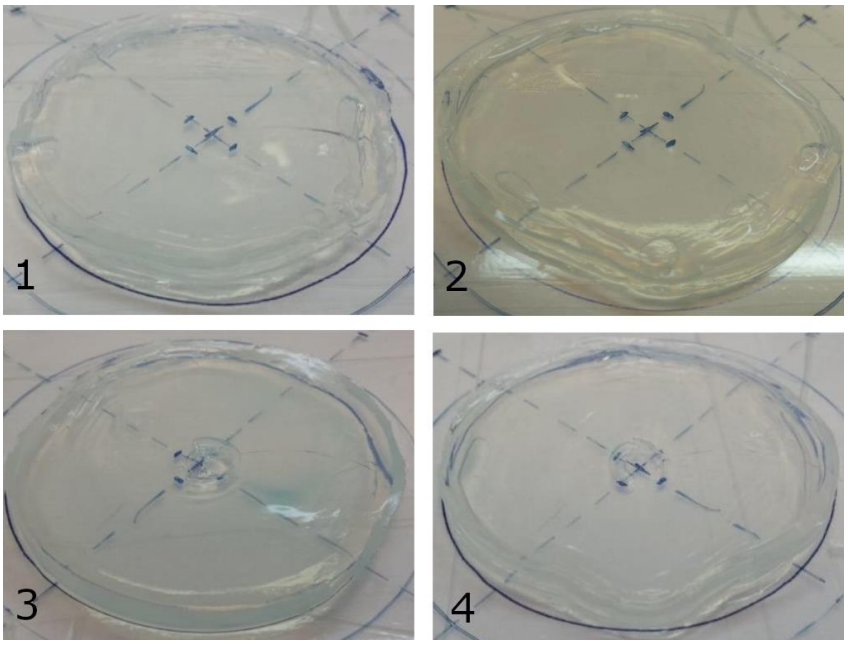


Obrázek 28:
1 - c(Ba^{2+} v gelu) = 0,5 mM, U = 200 V, t = 13 min, 1,3% gel;
2 - c(Ba^{2+} v gelu) = x mM, U = 200 V, t = 15 min, 1,3% gel;
3 - c(Ba^{2+} v gelu) = 0,5 mM, U = 200 V, t = 13 min, 2% gel;
4 - c(Ba^{2+} v gelu) = x mM, U = 200 V, t = 16 min, 2% gel;
5 - c(Ba^{2+} v gelu) = x mM, U = 200 V, t = 21 min, 1,5% gel;

Z pozorování vyplývá, že 1,3% gel bez přídavku barnatých kationtů je nevhodnější pro analýzu, protože nedochází k téměř žádnému srážení (Obrázek 28 – 2). Přídavek barnatých iontů v případě 1,3% gelu způsobil protržení gelu, avšak v případě 2% gelu působí pozitivně a gel se sráží minimálně. 2% gel bez přídavku barnatých iontů se však výrazně sráží (Obrázek 28 – 3 a 4). Taktéž 1,5% gel je výrazněji sražen.

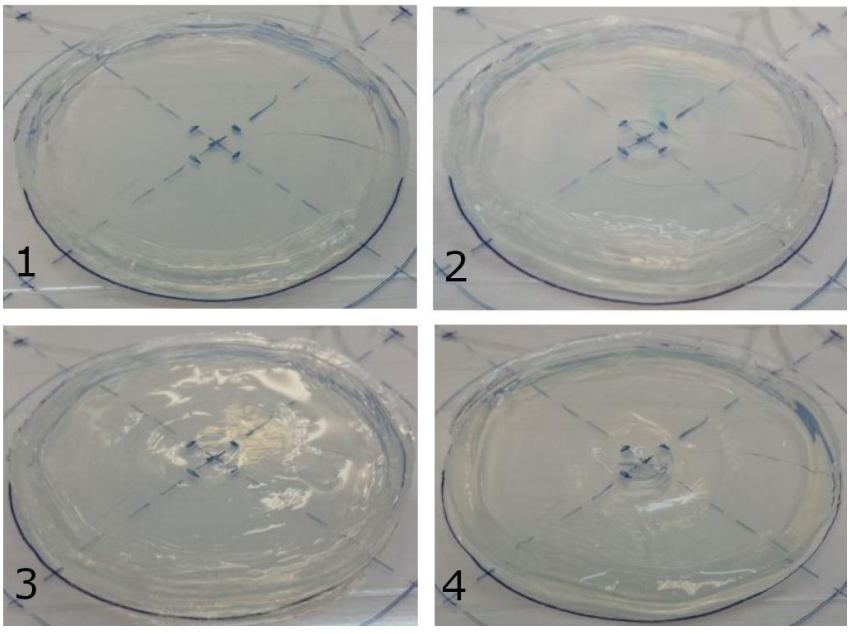
5.9 Vliv soli na srážení gelu

Soli jsou přirozenou částí biologických vzorků, proto je důležité poznat jejich vliv na separaci. Z tohoto důvodu byl testován vliv přídavku 0,9 % NaCl na separaci barviv a na srážení gelu. Na základě předchozích zkušeností o vlivu koncentrace gelu na jeho srážení, byly zkoušeny kombinace koncentrace agarózového gelu a různých přídavků roztoku 0,9 % NaCl. Výsledky pozorování jsou přehledně uspořádány na Obrázku 29 až Obrázku 32.



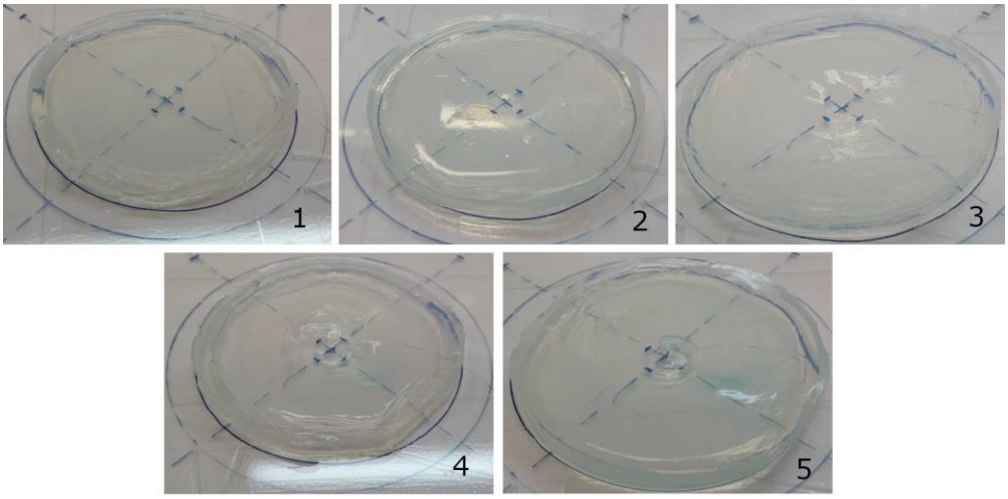
Obrázek 29:
1 – 1,3% gel, V(NaCl) = 1 ml, U = 100 V, t = 33 min;
2 – 1,3% gel, V(NaCl) = 2 ml, U = 100 V, t = 35 min
3 – 1,5% gel, V(NaCl) = 2 ml, U = 100 V, t = 34 min
4 – 1,5% gel, V(NaCl) = 3 ml, U = 100 V, t = 37 min

1,3 % gel, který byl používán doteď jako nejstabilnější médium, není příliš vhodný pro biologické vzorky, které obsahují soli. K výraznému sražení gelu sice nedošlo, pozorujeme však výraznější deformaci okrajů gelu.
U 1,5% gelu taktéž pozorujeme výraznější deformaci okrajů gelu a výrazné ztenčení prostředku gelu co může vést až k jeho protavení.



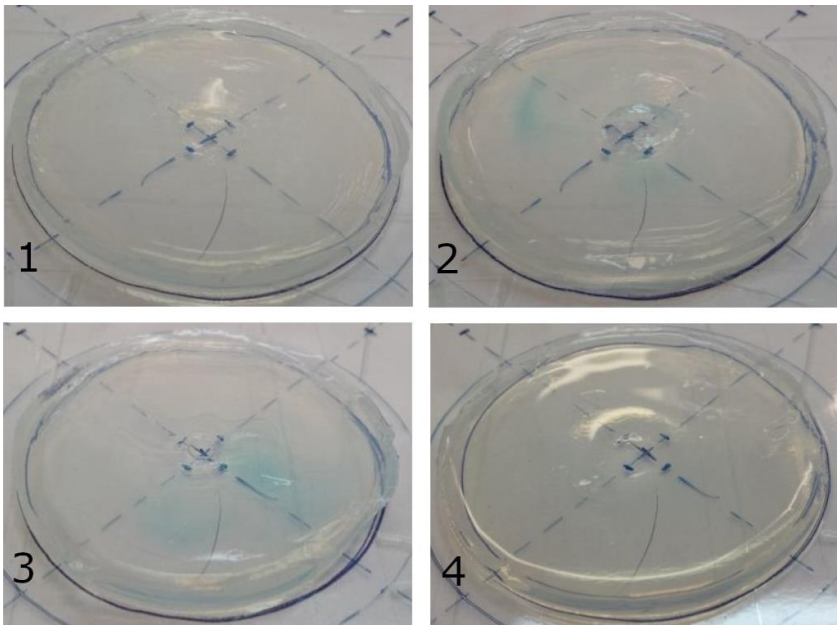
Obrázek 30:
1 – 2% gel, V(NaCl) = 1 ml, U = 100 V, t = 31 min
2 – 2% gel, V(NaCl) = 2 ml, U = 100 V, t = 39 min
3 – 2% gel, V(NaCl) = 3 ml, U = 100 V, t = 39 min
4 – 2% gel, V(NaCl) = 4 ml, U = 80 (100) V, t = 48 min

2% gel s přídavkem 1, 2, a 3 ml vykazuje pouze mírnou deformaci okrajů gelu. Přídavek 4 ml už způsobuje přehřívání středu v průběhu separace a tím jeho ztenčení. Předpokládá se, že s přídavkem 5 ml už by mohlo dojít k jeho protavení.



Obrázek 31:
1 – 2,5% gel, V(NaCl) = 1 ml, U = 100 V, t = 34 min
2 – 2,5% gel, V(NaCl) = 2 ml, U = 100 V, t = 58 min
3 – 2,5% gel, V(NaCl) = 3 ml, U = 100 V, t = 56 min
4 – 2,5% gel, V(NaCl) = 4 ml, U = 100 V, t = 58 min
5 – 2,5% gel, V(NaCl) = 5 ml, U = 80 (100) V, t = 58 min

2,5% gel drží svůj tvar, pozorujeme pouze mírnou deformaci okrajů gelu. Při přídavku 1 až 3 ml 0,9% roztoku NaCl nepozorujeme téměř žádnou deformaci. Přídavek 4 ml soli začíná výrazněji ovlivňovat proces separace a dochází k zvýšení teploty ve středu gelu. Tento jev je ještě výrazněji možné pozorovat při přídavku 5 ml NaCl kdy je gel ve středu výrazně nataven.



Obrázek 32:
1 – 3% gel, V(NaCl) = 1 ml, U = 100 V, t = 32 min
2 – 3% gel, V(NaCl) = 2 ml, U = 100 V, t = 61 min
3 – 3% gel, V(NaCl) = 3 ml, U = 100 V, t = 47 min
4 – 5% gel, V(NaCl) = 2 ml, U = 100 V, t = 34 min

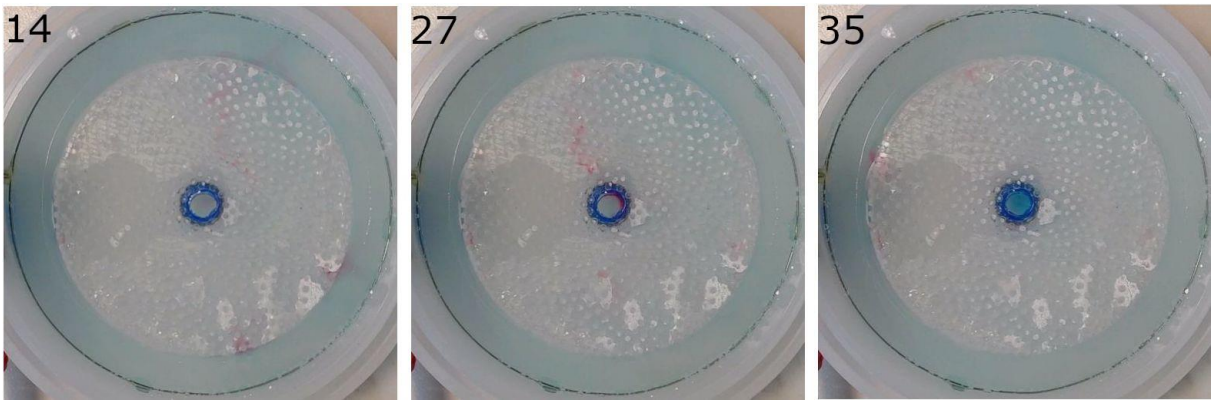
U 3% gelu nedochází k úplnému fokusování, část barviva se fokusuje a dochází k separaci v zdeformovaném tvaru, druhá část zůstává v koncovém elektrolytu a začíná se separovat jako kdyby v „druhé vlně“, nedojde však do středu, protože zbývající množství je malé a není schopné se fokusovat. 5 % gel drží svůj tvar a v malém množství pozorujeme děj, který se děl u 3%, nepozorujeme však deformaci separace. S 5% gelem je náročnější manipulace, kvůli vysoké hustotě vzniká množství bublin, které není možno odstranit a/i kvůli tomu není možné pořádně přilnout krycí fólii. Usuzujeme, že 3% a 5% gel už jsou příliš husté, proto separace probíhá jenom omezeně, tudíž nejsou vhodné.
Jako nejvhodnější se tedy jeví 2% gel, v případě kterého byla pozorována deformace pouze okrajů gelu a vydržel až 4 ml NaCl. Mírné přehřívání středu by bylo možné vyřešit časovým programem, který bude upravovat napětí.

5.10 Alternativní materiály místo agarózového gelu

Vzhledem k přetrvávajícím problémům se srážením gelu, i když v přijatelném měřítku, jsme se rozhodli otestovat alternativní materiály, které by bylo možné použít místo gelu. Jedná se o zejména o polymery s různou velkostí pórů a silikonové sloupky.

5.10.1 PDMS sloupky

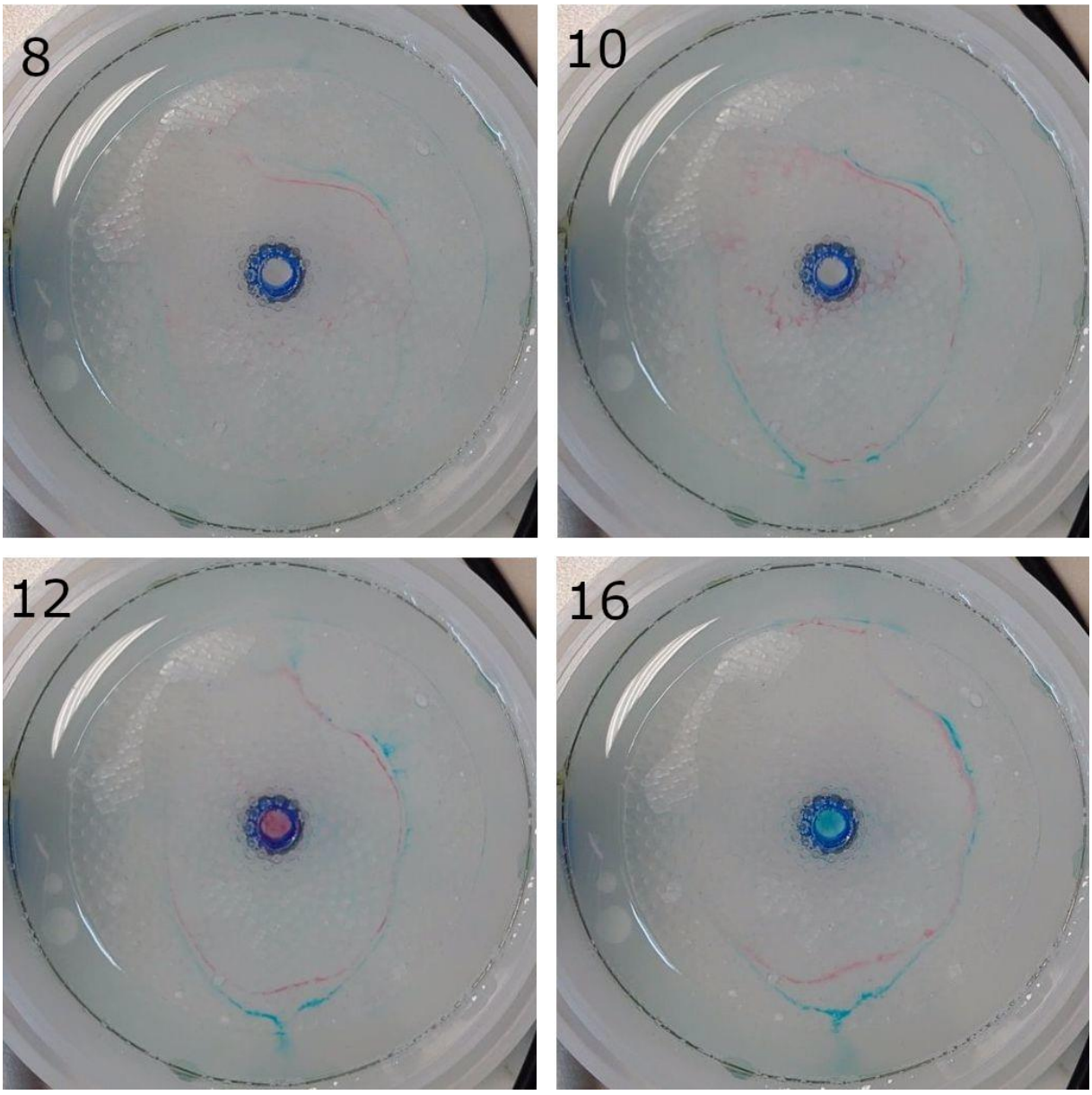
Jako první alternativa na stabilizaci rozhraní vedoucího a koncového elektrolytu ke gelu byly testovány sloupky z PDMS. Ty nabízejí velmi otevřenou strukturu, kde by nemělo docházet k zachycování analytu z důvodu špatné prostupnosti póry gelu. K tomuto by mohlo docházet u velmi velkých analytů, jako jsou nanočástice, proteiny, viry nebo bakterie.
Separace byla prováděna s vedoucím elektrolytem o koncentraci 20 mM a koncovým elektrolytem o koncentraci 10 mM. Separováno bylo 150 µl barviva Patent Blue a SPADNS. Nebylo pozorováno fokusovaní barviva do prstencu tak jako u gelů, bylo však pozorováno zabarvení středu zařízení po cca 30 min.
V dalším experimentu byl proto zvýšen objem barviva na 500 µl, aby bylo možno pozorovat separaci. Průběh separace je zobrazen na Obrázku 33.



Obrázek 33: Separace na PDMS sloupcích, snímky pořízeny v časech 14, 27 a 35 minut, celkový čas separace 41 minut, barviva PB a SPADNS o objemu 500 µl, U = 100 V;

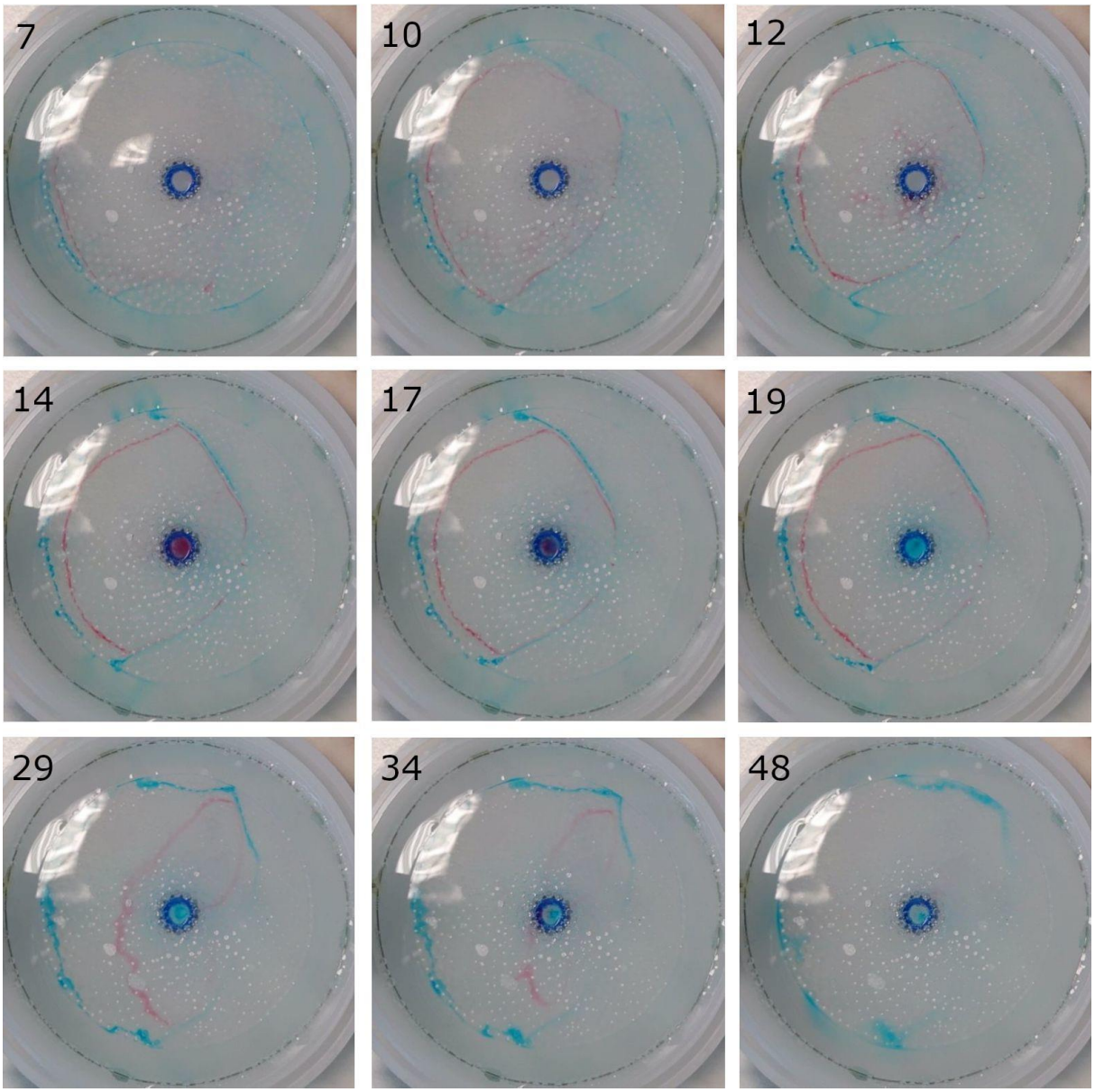
5.10.1.1 Modifikace PDMS sloupků plasmou

Hydrofobita PDMS sloupků způsobuje těžkosti při plnění struktury vedoucím elektrolytem. Proto bylo rozhodnuto sloupky opracovat plasmou po dobu 10 minut. Byl nadávkován větší objem barviv (á 250 µl), aby bylo možno pozorovat separaci. Separace je zobrazena na Obrázku 34.



Obrázek 34: Separace na PDMS sloupcích opracovaných plazmou po dobu 10 minut, snímky byly pořízeny v časech 8, 10, 12 a 16 minut, celkový čas separace 29 minut, barviva PB a SPADNS o objemu 250 µl, U = 150 V;

Dále bylo otestováno opracování O_2 plasmou po dobu jedné hodiny. Separace 500 µl SPADNS a Patent Blue na opracovaných sloupcích je zobrazeno na Obrázku 35.



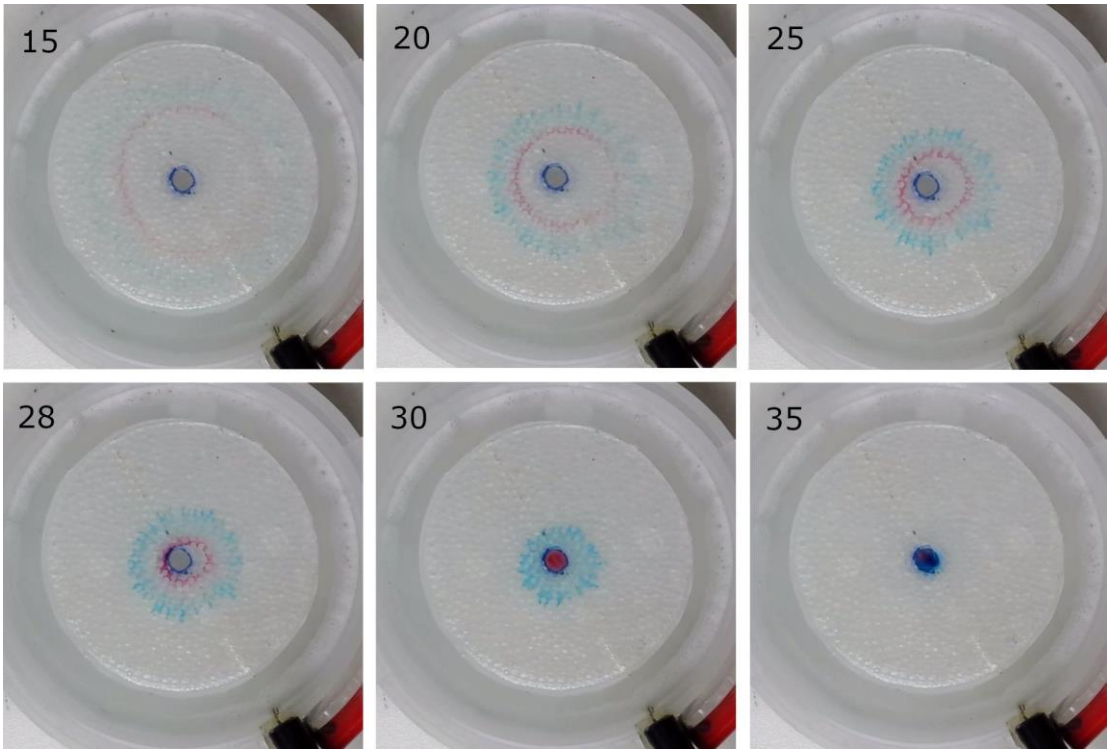
Obrázek 35: Separace na PDMS sloupcích opracovaných plazmou po dobu 1 hodiny, snímky byly pořízeny v časech 7, 10, 12, 14, 17, 19, 29, 34 a 48 minut, celkový čas separace 56 minut, barviva PB a SPADNS o objemu 500 µl, U = 150 V;

Pokud použijeme pouze 150 µl barviva je možné pozorovat jenom zabarvení středu zařízení po ukončení separace.
Délka opracování plazmou nemá vliv na separaci. Opracování po dobu 1 hodinu umožňuje jednodušší plnění v porovnání s opracováním 10 minut.

5.10.1.2 Modifikace silikonových skupin činidly

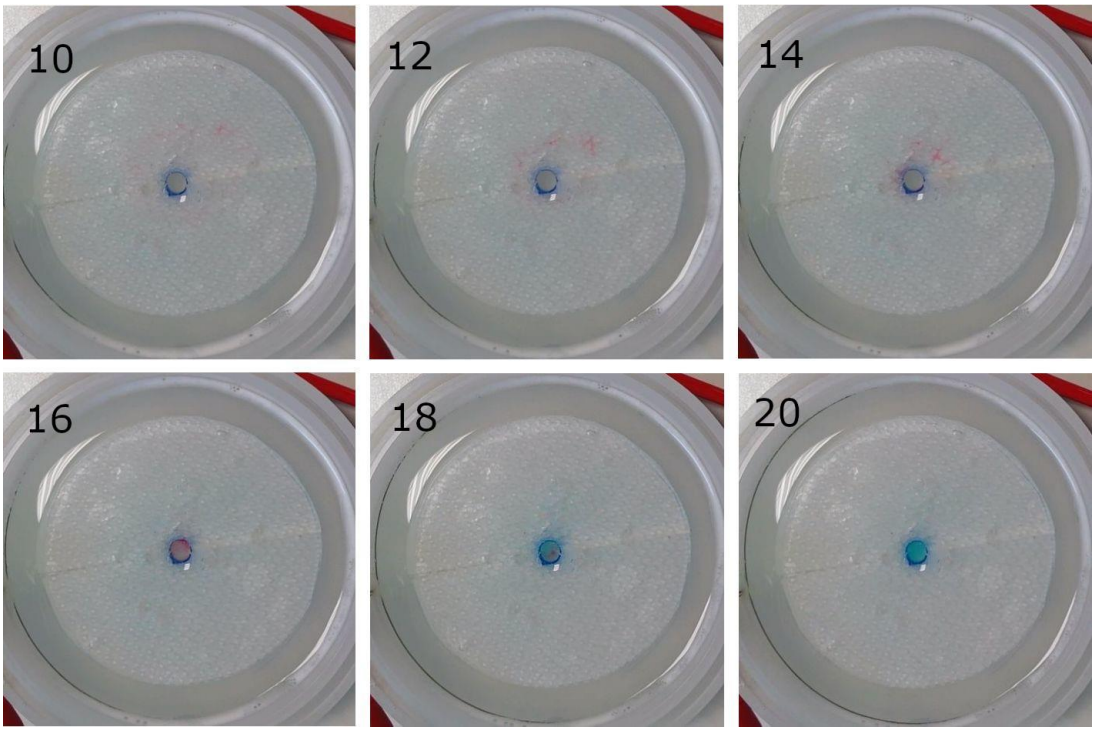
Další možností jak usnadnit plnění PDMS struktury vedoucím elektrolytem a zabránit absorbci analytu na sloupky je přídavek detergentů. Proto byla k vedoucímu elektrolytu přidána různá činidla a sledován jejich vliv na separaci a jednoduchost plnění sloupků.

1. 0,1% MHEC – umožňuje jednodušší plnění vedoucího elektrolytu do sloupků bez nutnosti opracování plazmou. Zlepšuje separaci. Dochází k separaci většího množství barviva, nezůstává v koncovém elektrolytu (Obrázek 36).



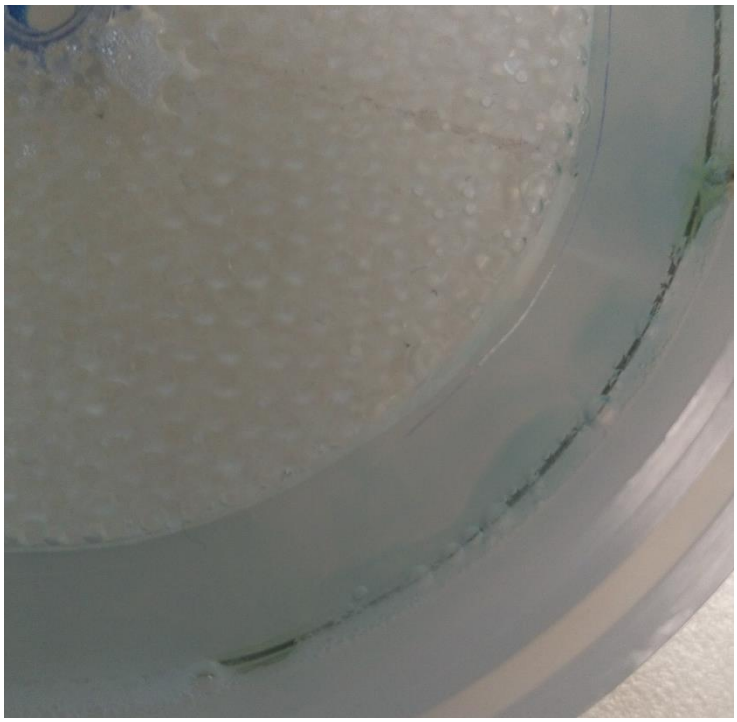
Obrázek 36: Separace na PDMS sloupcích modifikovaných MHECem, snímky byly pořízeny v časech 15, 20, 25, 28, 30 a 35 minut, celkový čas separace 40 minut, barviva PB a SPADNS o objemu 150 µl, U = 100 V;

2. 1% TRITON – taktéž zjednodušuje plnění vedoucího elektrolytu do sloupků a zlepšuje separaci. Možné pozorovat separaci barviva o objemu 150 µl ke konci separace, zobrazeno na Obrázku 37.



Obrázek 37: Separace na s PDMS sloupcích modifikovaných TRITONem, snímky byly pořízeny v časech 10, 12, 14, 16, 18 a 20 minut, celkový čas separace 29 minut, barviva PB a SPADNS o objemu 150 µl, U = 150 V;

3. 1% Poly(diallyldimethylamonium chlorid) – výrazně neulehčuje plnění elektrolytu. Separace neproběhla, protože došlo k odpuzení barviva od disku s elektrolytem, jak je zobrazeno na Obrázku 38.



Obrázek 38: Odpuzování barviva 1% poly(diallyldimethylamonium chloridem)

4. 1% Hexadimetrin bromid – usnadňuje plnění elektrolytu do sloupků, avšak separace neproběhla.

5.10.1.3 Změna koncentrace vedoucího a koncového elektrolytu

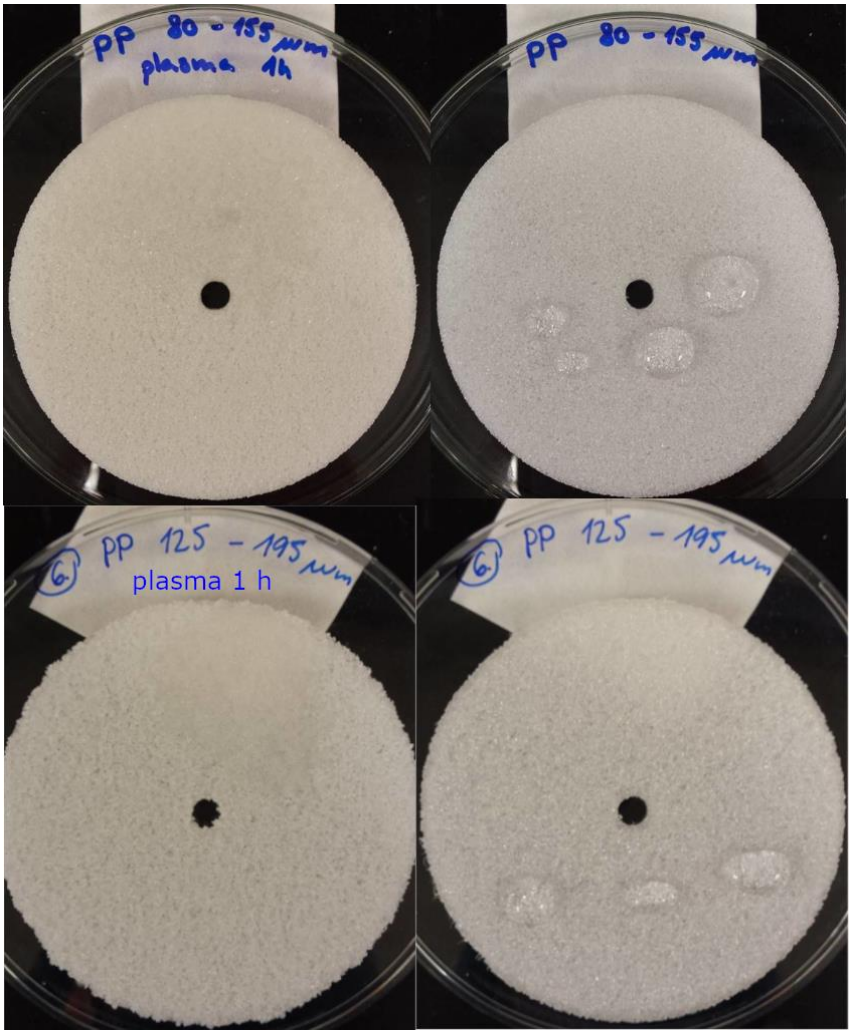
V neposlední řadě byla vyzkoušena změna koncentrace vedoucího a koncového elektrolytu. Cílem bylo získat pozorovatelnou separaci při objemu vzorku 150 µl a jeho fokusování do prstenců.

Nejprve byla zvolena koncentrace vedoucího elektrolytu 50 mM a koncového také 50 mM. Nebyla pozorována žádná separace v průběhu experimentu, ani zbarvení středu ke konci experimentu. Tudíž jsme došli k závěru, že separace neproběhla.

Dále byla zvolena koncentrace vedoucího elektrolytu 50 mM a koncového 20 mM. V tomto případě byla pozorována separace, která byla velmi rychlá avšak, nedošlo k žádanému fokusování barviv do prstence.

5.10.2 Polypropylén (PP)

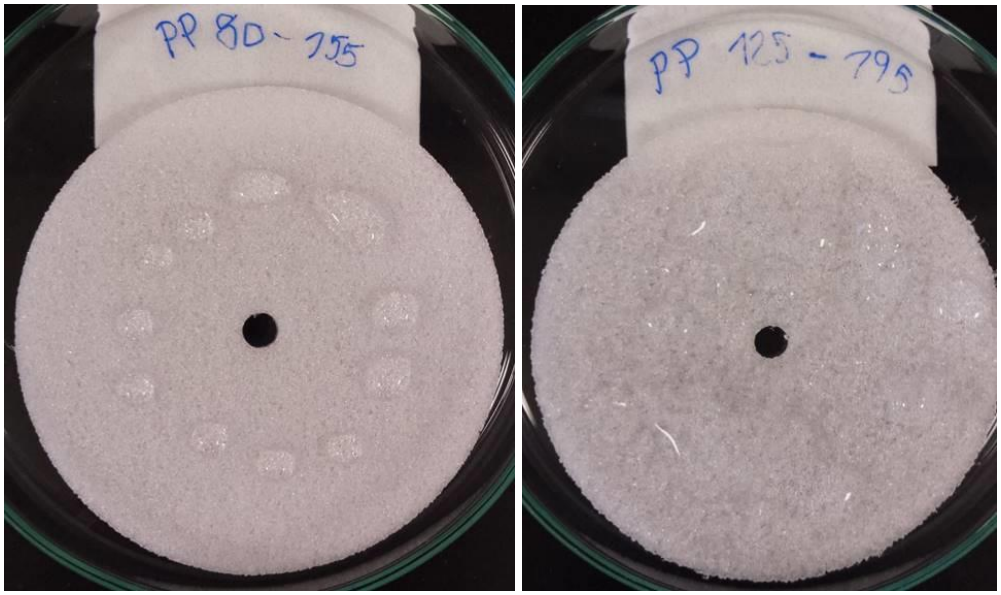
Další alternativou pro stabilizaci rozhraní vedoucího a koncového elektrolytu byly porézní plastové disky z různých materiálů a o různé porozitě. K dispozici byly disky z PP o velikosti pórů 80 – 155 µm a 125 – 195 µm. Nejdříve byla otestována nasákavost materiálu vodou. Po zkušenosti se silikónovými sloupky byla komplikace s hydrofilitou/hydrofobitou materiálu očekávána. Proto byly následně disky opracovány O_2 plazmou po dobu 1 hodiny. Na Obrázku 39 je vidět porovnání disků před a po aplikaci plazmy. Disk ošetřený plasmou získal hydrofilní vlastnosti na rozdíl od neošetřeného disku. Pro následnou separaci je tedy nutné použít disky opracované plazmou.



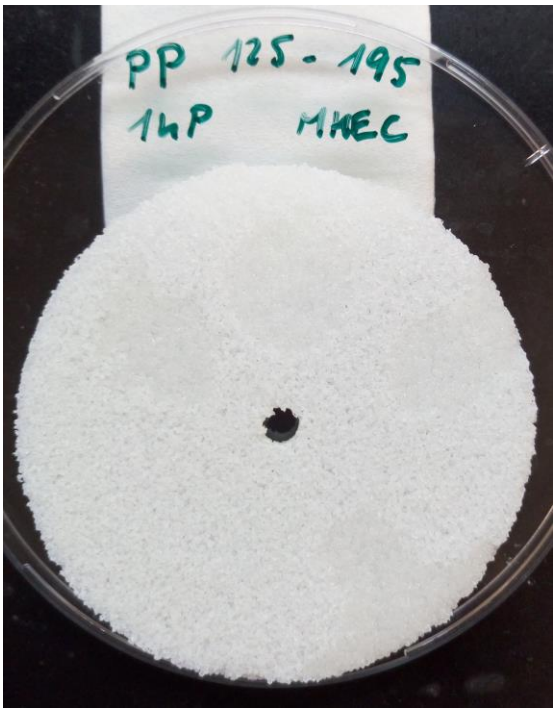
Obrázek 39: Nasákavost disků z PP vodou

Separaci na disku s velikosti pórů 80 – 155 µm nebylo možné pozorovat. Ukončení separace nám značilo pouze modré zbarvení středu zařízení a pokles proudu. Bledé zbarvení ve středu značí, že jen malé množství vzorku se dostalo do středu. U separace na disku s velikosti pórů 125 – 195 µm bylo pozorováno zadržování barviva diskem, přičemž do středu se dostalo jen malé množství vzorku barviva. V obou případech se jednalo o množství cca 10%.

Dále byl využit MHEC. Na Obrázku 40 a Obrázku 41 je zobrazena nasákavost PP MHECem. Ani v jednom případě PP nenasává MHEC. Je nutné ho nejdříve opracovat plasmou.



Obrázek 40: Nasákavost disků z PP MHECem



Obrázek 41: Nasákavost disku z PP MHECem po opracování plasmou

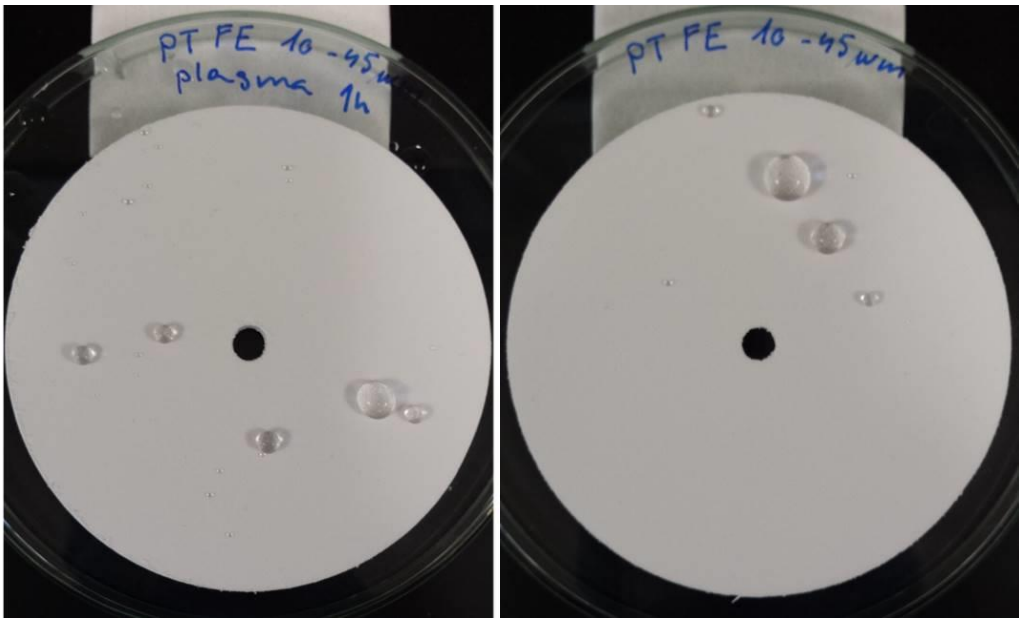
Separace v obou případech vypadala jako bez přítomnosti MHECu. U disku s velikostí pórů 80 – 155 µm nebyla pozorována separace a u disku s velikosti pórů 125 – 195 µm bylo pozorované zadržování barviva.

Nízký výtěžek v případě disku s velikostí pórů 80 – 155 µm mohl být způsoben neschopností materiálu přilnout k zařízení. To mohlo způsobit podtékání elektrolytů. Proto na spodní část disku byla přidána tenká vrstva PDMS, která umožnila lepší přilnutí disku k zařízení. Jak je možno vidět na Obrázku 42 potom docházelo k značnému zadržování vzorku barviva a pouze velmi malé množství dosáhlo středu zařízení. Z tohoto důvodu byly disky z polypropylenu označeny jako nevhodné pro stabilizaci rozhraní vedoucího a koncového elektrolytu a dále již nebyly používány.

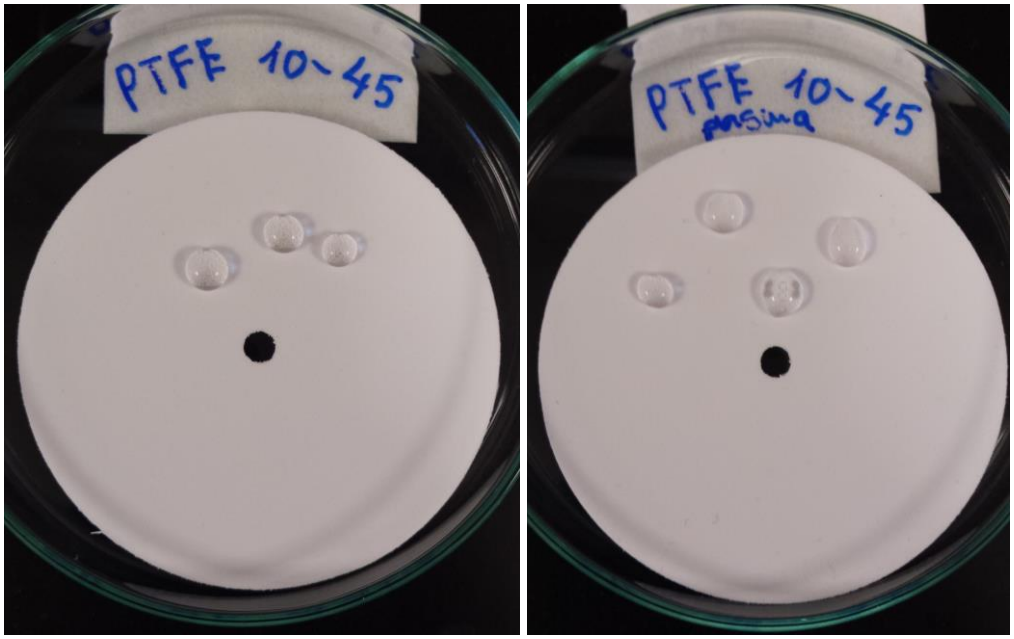
Obrázek 42:Separace na PP disku opatřeném silikonovým spodkem, snímky byly pořízeny v čase 10 (vlevo) a 24 minut (vpravo), celkový čas separace 56 minut, barviva PB a SPADNS o objemu 150 µl, U = 150 V;

5.10.3 Polytetrafluorethylén (PTFE) – teflon

Dalším testovaným polymerním materiálem jako náhrada agarózového gelu byl vybrán teflonový disk o velikosti pórů 10 – 45 nm. Stejně jako v předchozím případě i zde byla nejdříve testována nasákavost materiálu. Byla testována nejdříve nasákavost vodou před a po opracování disku O_2 plazmou po dobu 1 hodiny a pak nasákavost MHECem. Výsledky testu nasákavosti jsou na Obrázcích 43 a 44.

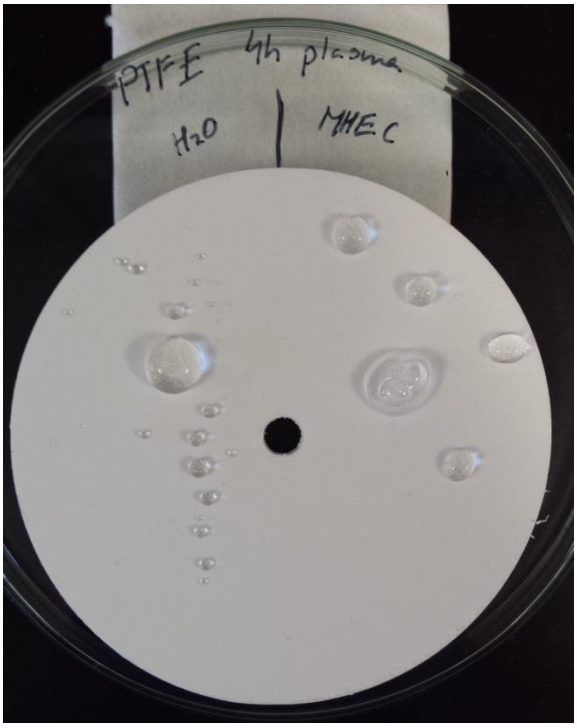


Obrázek 43: Nasákavost disků z PTFE vodou



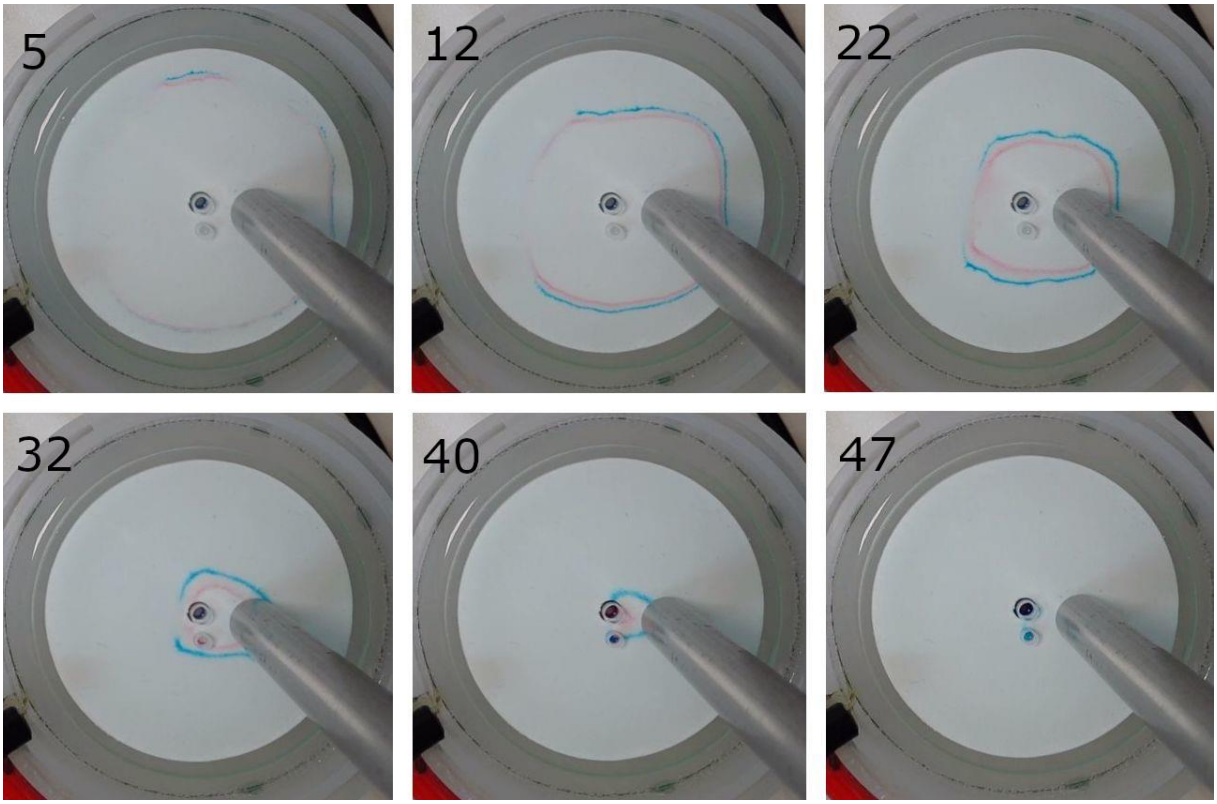
Obrázek 44: Nasákavost disků z PTFE MHECem

PTFE disky nenasávají vodné roztoky ani po přídavku MHECu ani po opracování plazmou. Důvodem bude pravděpodobně malá velikost pórů 10 – 45 μm.
Bylo vyzkoušeno i opracování disku plasmou po dobu 4h. Tato možnost byla zvolena za předpokladu, že delší doba opracování umožní hlubší průnik plasmatu materiálem. Jak zobrazuje Obrázek 45, výsledek byl stejný jako v předchozích případech.



Obrázek 45: Nasákavost disku z PTFE po opracování plasmou po dobu 4 hodin

Aby bylo možno separaci vyzkoušet, musel být vedoucí elektrolyt nasát do disku za pomoci podtlaku. Navzdory komplikacím s plněním disku byla následná separace úspěšná, je zobrazena na Obrázku 46. Jak možno vidět jedná se o úspěšnou separaci, proto byl tento materiál vyhodnocen jako možná alternativa k agarózovému gelu.

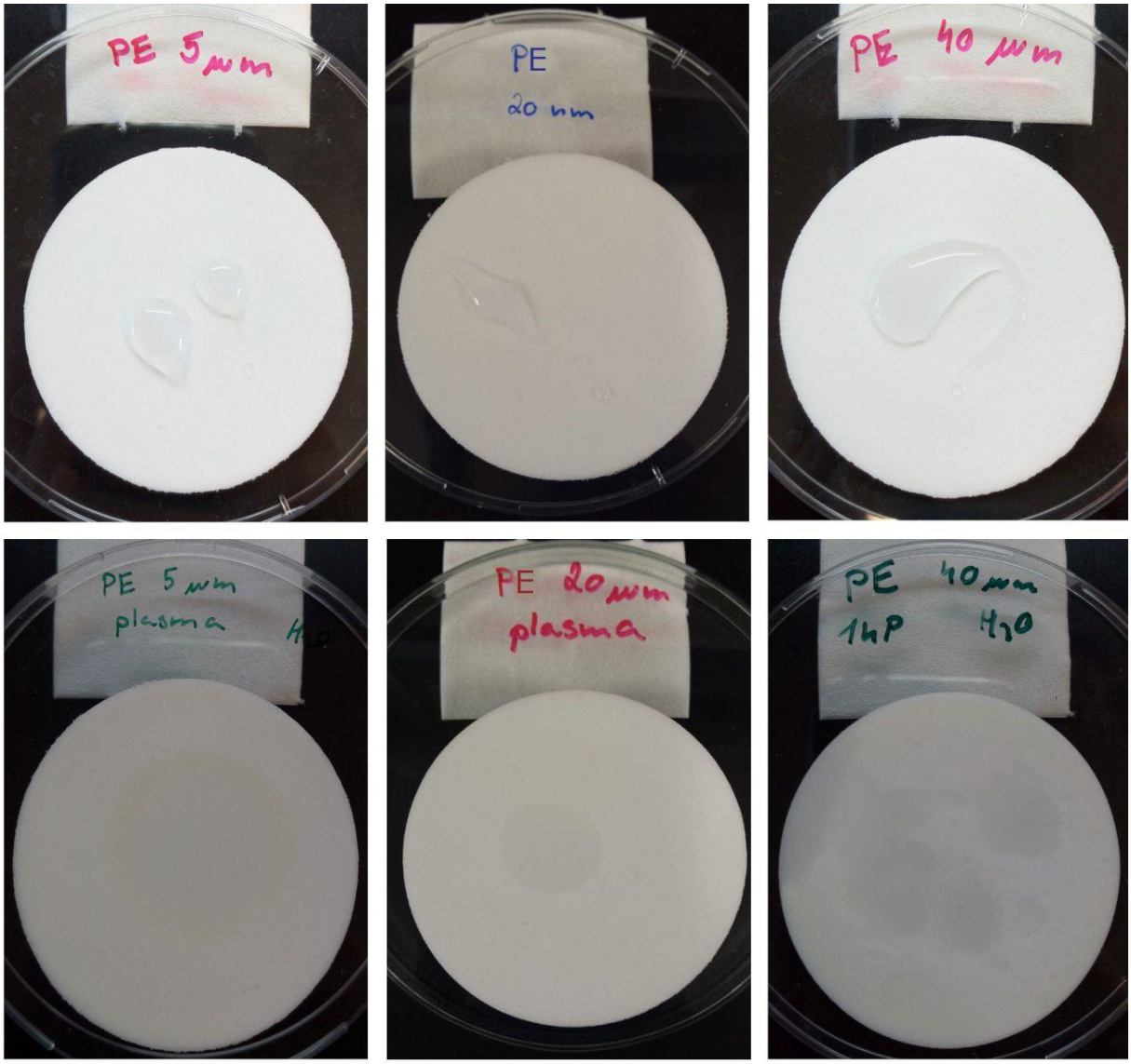


Obrázek 46:Separace na PTFE disku s MHECem, snímky byly pořízeny v čase 5, 12, 22, 32, 40 a 47 minutách, celkový čas separace 47 minut, barviva PB a SPADNS o objemu 150 µl, U = 150 V;

5.10.4 Polyethylén (PE)

Dalším testovaným polymerním materiálem jako náhrada agarózového gelu byl testován polyethylén. K dispozici byly disky s velikostí pórů 5, 20 a 40 µm.

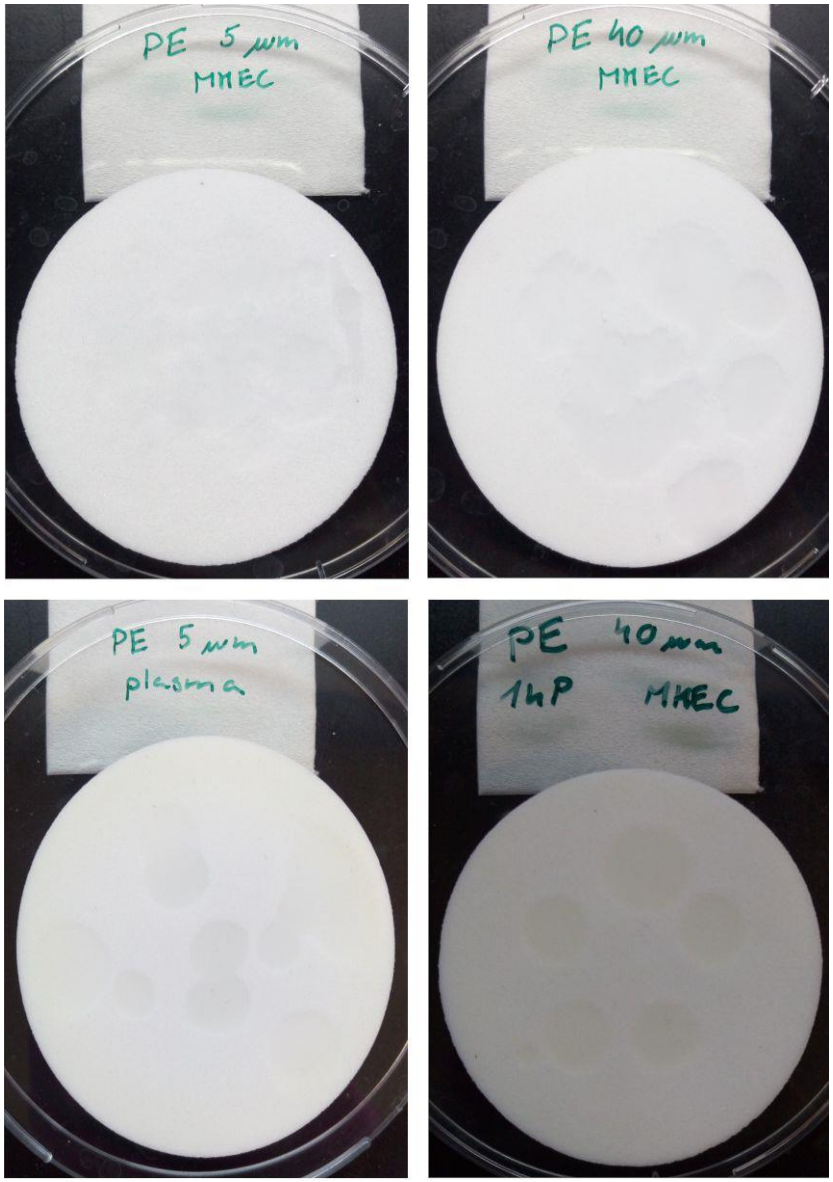
Stejně jako v předchozím případě, byla nejdříve testována nasákavost materiálu vodou, kvůli očekávanému problému s hydrofobitou. Disky byly nejdříve otestovány bez použití plazmy a pak po opracování plazmou (Obrázek 47).



Obrázek 47: Nasákavost disků z PE vodou před a po použití plazmy

Jak je patrné na Obrázku 47, opracování plazmou je nevyhnutelný krok pro naplnění disku vedoucím elektrolytem.
Pro separaci byl vybrán disk o velikosti pórů 20 µm opracovaný plasmou a spuštěna separace se 200 µl barviva SPADNS a Patent Blue. Byla pozorována separace Patent Blue, nikoli však jako prstence, ale spíš jako šmouhy. Došlo k fokusaci SPADNS na okrajích disku avšak k samotné separaci nedošlo.

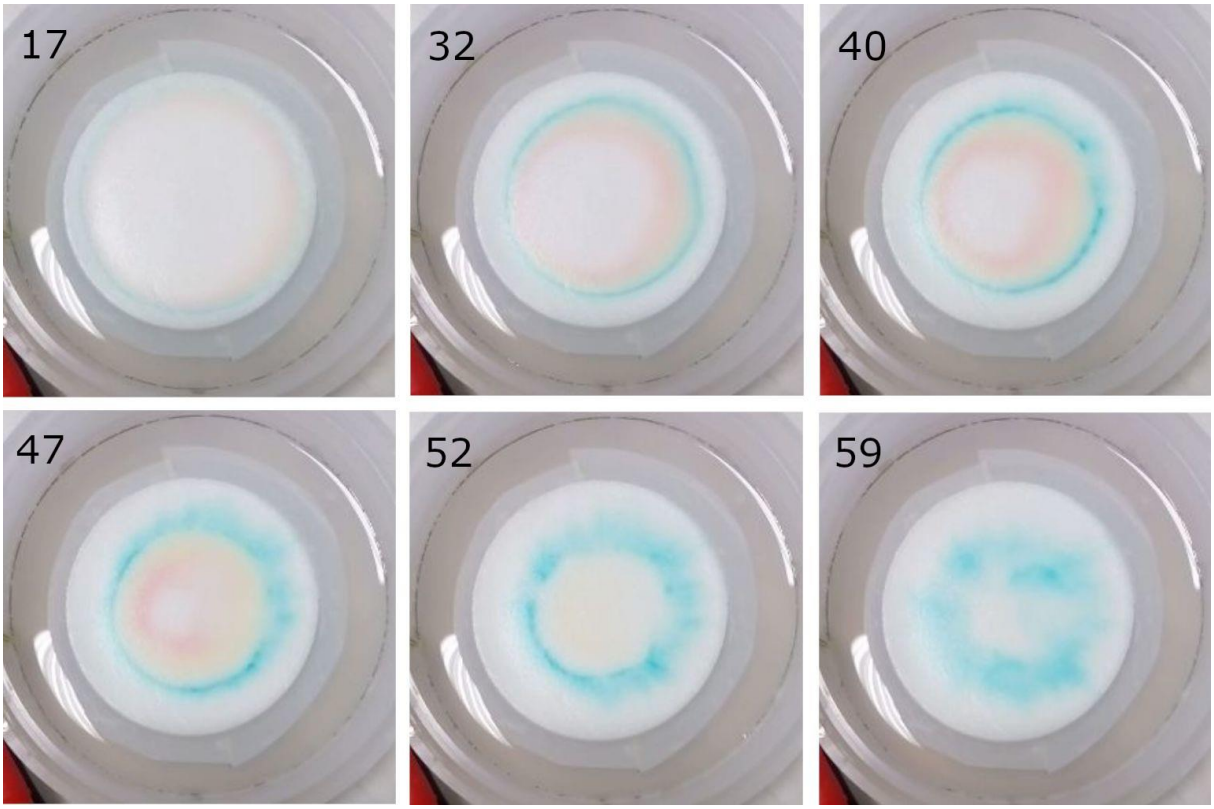
Následně byla otestována nasákavost MHEC, který jak jsme zjistili už dříve, také napomáhá separaci. Výsledky jsou zobrazeny na Obrázku 48.



Obrázek 48: Nasákavost disku z PE MHECem před a po opracování plasmou

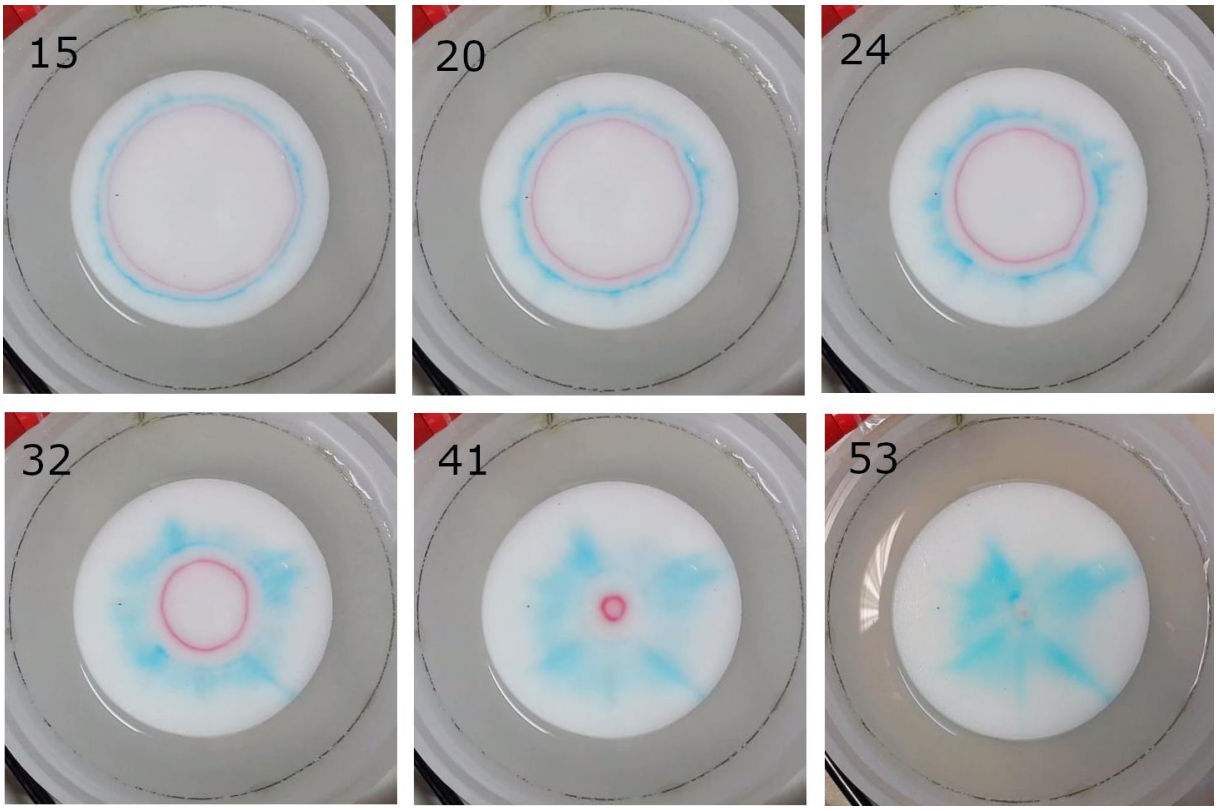
Disky o velikosti pórů 5 a 20 µm byly schopné nasát vedoucí elektrolyt s MHECem po krátké době (do 5 minut) i bez opracování plazmou. Po opracování plazmou bylo nasátí okamžité. V případě disku o velikosti pórů 40 µm nebyl pozorován patrný rozdíl před a po opracování plazmou. V obou případech bylo nasání okamžité.

Disk o velikosti pórů 5 µm byl opracován plazmou a použit na separaci barviv Patent Blue a SPADNS. K vedoucímu elektrolytu byl přidán 0,1% MHEC, pro zlepšení analýzy. Separace probíhala za konstantního napětí 100 V, její průběh je zobrazen na Obrázku 49.



Obrázek 49:Separace barviv na PE disku s velikostí pórů 5 µm, snímky byly pořízeny v časech 17, 32, 40, 47, 52 a 59 minut, celkový čas separace 60 minut, barviva PB a SPADNS o objemu 150 µl, U = 150 V;

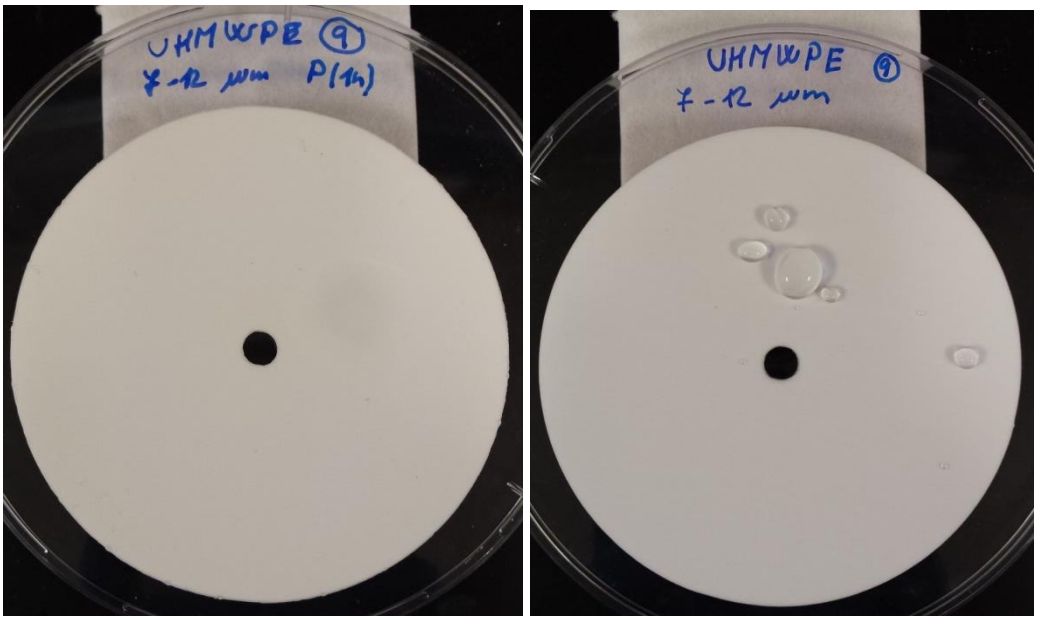
Separace byla po 59 minutách ukončena i navzdory tomu, že separace nedoběhla. Po celou dobu analýzy byl v systému velmi nízký proud. Z počátečních 13 mA rychle klest na 4 mA. I po zvýšení napětí na 150 V, a následně na 300 V, se proud pohyboval jen kolem 5 mA. Kvůli nízkému proudu by pak dokončení analýzy trvalo ještě značnou dobu. Protože prodlužováním délky analýzy dochází k přehřívání celého systému a poškození vzorku tento materiál nepřestavuje vhodnou volbu pro separaci.
Byl předpoklad, že k zadržování barviva Patent Blue mohlo docházet v důsledku malé velikosti pórů disku (5 µm), proto byl experiment zopakován s diskem s velikosti pórů 40 µm. Výsledek však byl obdobný a to, že došlo k úspěšné separaci SPADNS barviva a sorbci barviva Patent Blue na disk. Průběh separace je zobrazen na Obrázku 50.



Obrázek 50: Separace barviv na PE disku s velikostí pórů 40 µm, snímky byly pořízeny v časech 15, 20, 24, 32, 41 a 53 minut, celkový čas separace 63 minut, barviva PB a SPADNS o objemu 150 µl, U = 100 V;

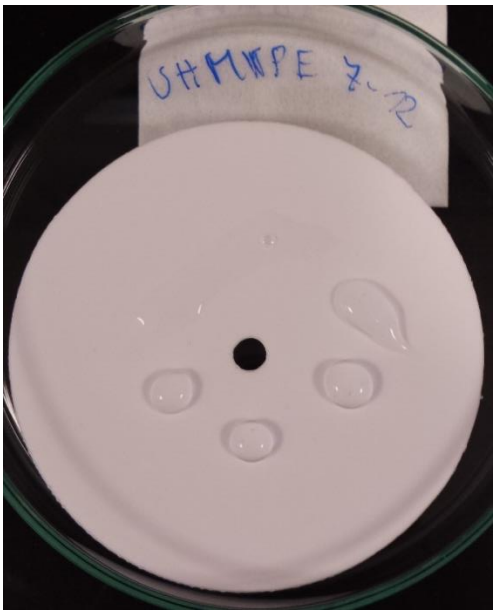
5.10.5 Ultra-high-molecular-weight polyethylene (UHMWPE) - Dyneema

Posledním polymerním materiálem testovaným jako náhrada agarózového gelu byla Dyneema. Disk z Dyneemy měl velikosti pórů 7 – 12 µm. Na Obrázku 51 je zobrazena nasákavost materiálu vodou, z kterého vyplývá, že jako ve všech předchozích případech ani zde není možné vynechat krok opracování disku O_2 plazmou.

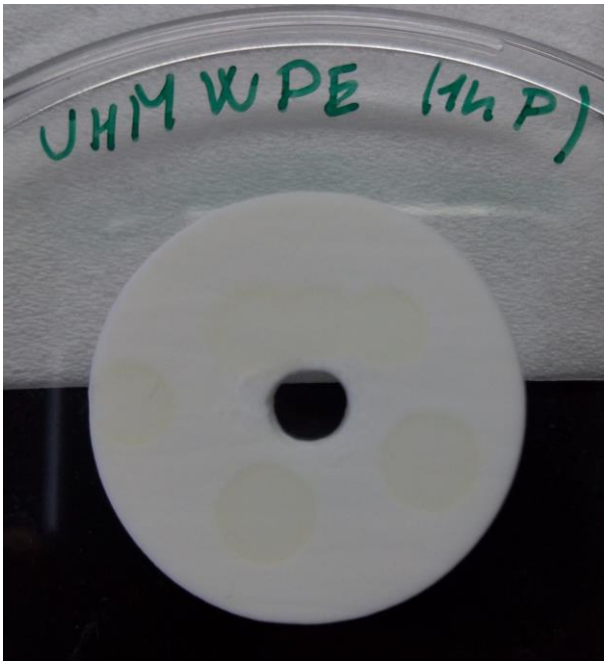


Obrázek 51: Nasákavost disků Dyneema vodou.

Dále byl aplikován vedoucí elektrolyt s MHECem. Test nasákavosti můžeme pozorovat na Obrázku 52. Pravděpodobně kvůli malé velikosti pórů není Dyneema schopná nasát MHEC bez opracování plazmou. Po opracování plasmou je nasákavost vedoucím elektrolytem s přídavkem MHEC velmi dobrá, jak je vidět na Obrázku 53.

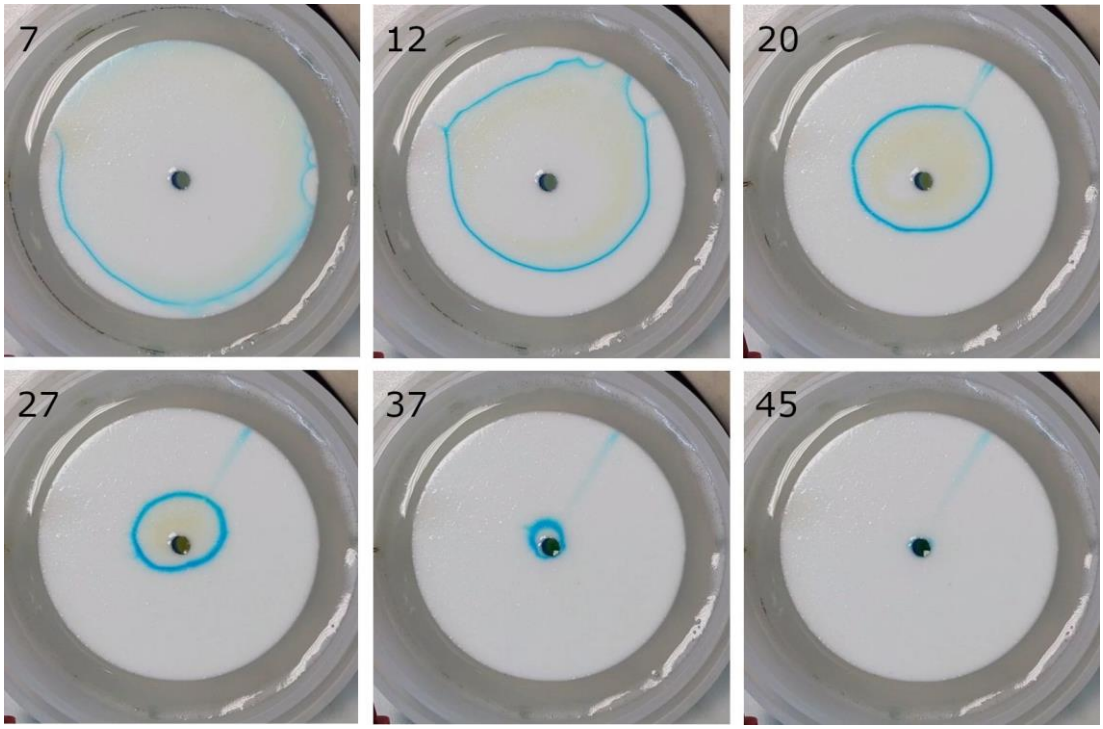


Obrázek 52: Nasákavost disků Dyneemy MHECem



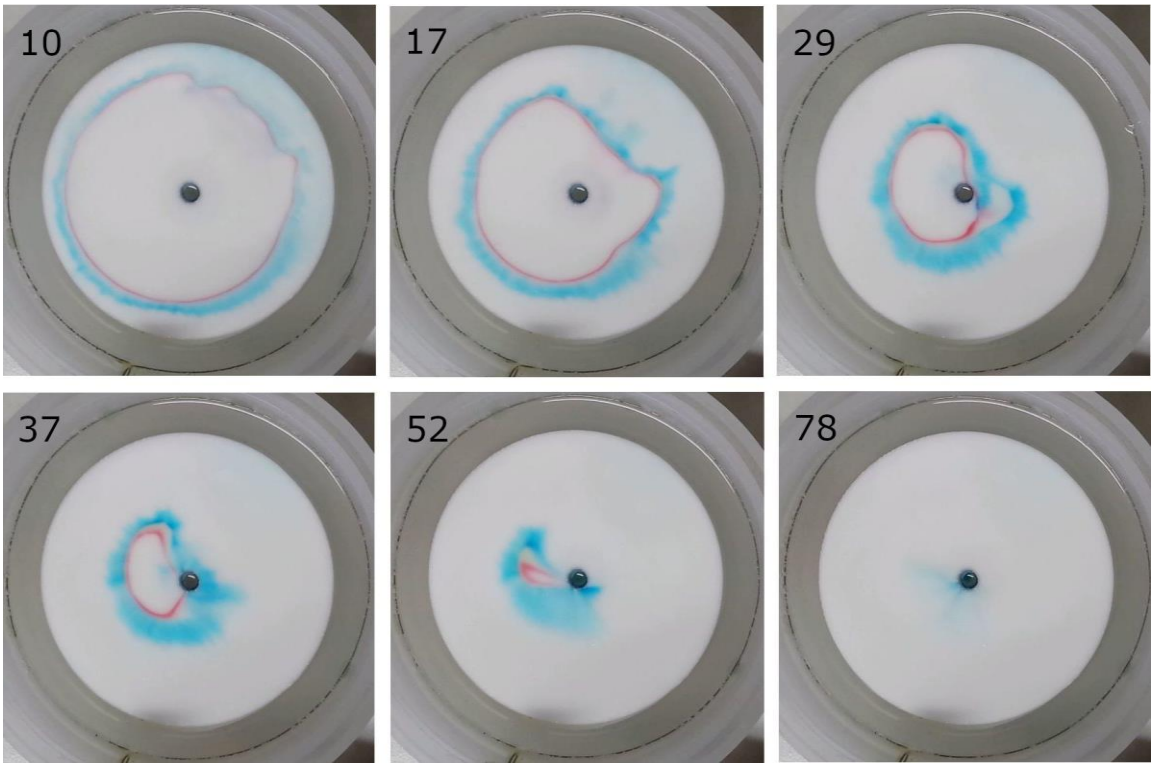
Obrázek 53: Nasákavost disku Dyneema MHECem po opracování plazmou

Separace barviva Patent Blue za pomoci 0,1% MHECu je zobrazena na Obrázku 54. Došlo k úspěšné fokusaci barviva, avšak taktéž mírné reakci některé ze složek s diskem a tak vzniku žlutě zbarveného prstence.



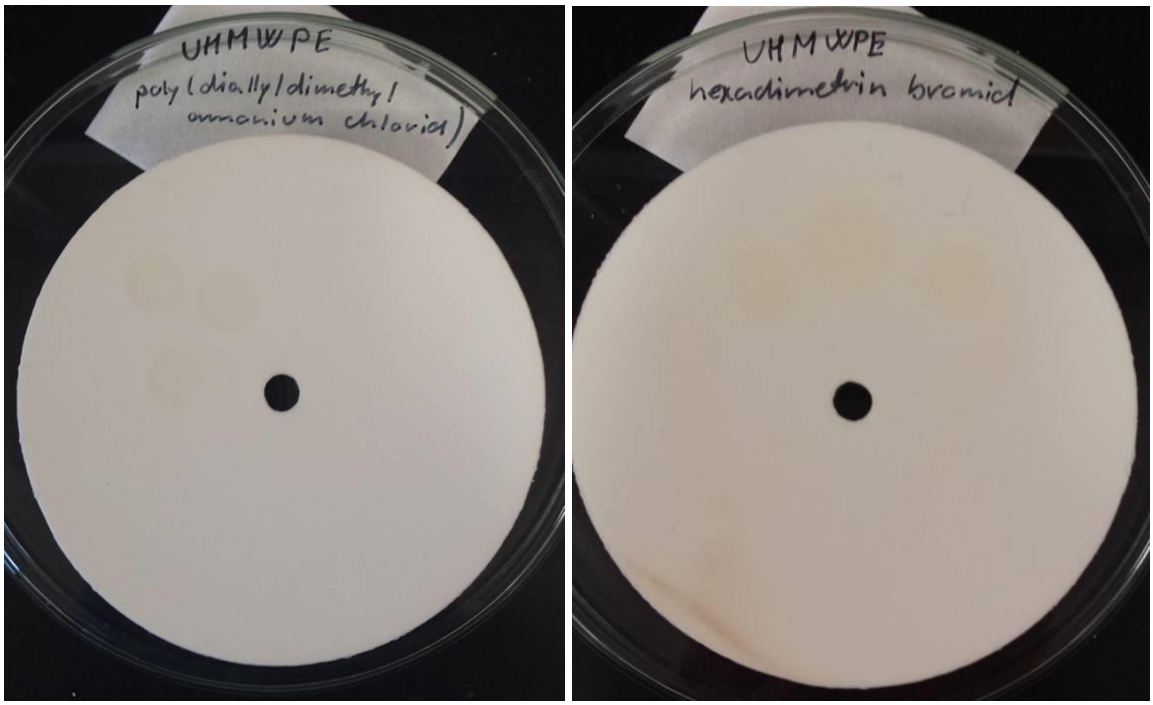
Obrázek 54: Separace barviva na Dyneema disku, snímky byly pořízeny v čase 7, 12, 20, 27, 37 a 45 minut, celkový čas separace 47 minut, barviva PB o objemu 150 µl, U = 150 V;

Separace byla zopakována za využití dvou barviv, SPADNS a Patent Blue. Je zobrazena na Obrázku 55. V tomto případě došlo k horší fokusaci druhého barviva.



Obrázek 55: Separace dvou barviv na Dyneema disku, snímky byly pořízeny v časech 10, 17, 29, 37, 52 a 78 minut, celkový čas separace 91 minut, barviva PB a SPADNS o objemu 150 µl, U = 150 V;

Na discích byly následně testovány i další modifikační činidla jako v případě silikových sloupků. Byly testovány činidla poly(diallyldimethylamonium chlorid) a hexadimetrin bromid. Nasákavost disků oběma činidly byla dobrá, Obrázek 56.



Obrázek 56:Nasákavost disků Dyneema modifikačními činidly

V případě činidla poly(diallyldimethylamonium chlorid) došlo k odpuzování barviva a separace neproběhla. Separace s hexadimetrin bromidem neproběhla, nedošlo k viditelné fokusaci barviva a separace byla po 20 minutách ukončena.
Obě modifikace se jeví jako permanentní a neúčinné. I po opracování plazmou, kdy byl předpoklad, že dojde k spálení skupin navázaných na Dyneemu, se nepodařilo vrátit disky do původního stavu, proto nebylo možné tyto disky dále používat.

5.11 Aplikace epitachoforézy pro koncentraci DNA

Testovaná aplikace epitachoforézy byla separace DNA. Před spuštěním analýzy byl do středu zařízení umístěn kalíšek s membránou o velikosti pórů nepropustných pro DNA a propustných pro vedoucí elektrolyt. Nejprve byla prováděna separace s barvivem SybrGold, které se váže na DNA, abychom vyloučili možnost, že se DNA váže na dané stabilizační médium. Separace se SybrGold taktéž určuje čas, který je potřebný na migraci DNA do středu zařízení. Následně bylo k tomuto času přičteno 5 nebo 10 minut a koncentrace byla provedená ve vypočteném čase. Druhá možnost, jak určit čas ukončení separace je přidání barviva Patent Blue do koncového elektrolytu. Barvivo má menší elektroforetickou mobilitu než DNA, řadí se jako zóna za DNA, a proto je možno ho použít jako indikátor konce separace.
Všechny separace, byly prováděny za konstantního napětí 100V. Po ukončení koncentrace DNA byl vzorek odpipetován ze středu zařízení do předem zvážené vialky. Výtěžnost DNA byla následně stanovena pomocí přístroje Qubit 4, detaily viz. kapitola 4.4.
Z testovaných médií stabilizujících rozhraní vedoucího a koncového elektrolytu byly vybrány ty s nejlepší koncentrací barviv a otestována koncentrace DNA. Vybrány byly gely 1,3 % NEEO, NEEO + 0,5 mM Ba^{2+}, 1,3% PTFE, PDMS sloupky a PTFE a Dyneema disky.

5.11.1 Separace DNA na gelu

Z gelů byly vybrány ty, které se nejméně deformují v průběhu separace. Jsou to 1,3% gel z NEEO agarózy s a bez přídavku barnatých kationtů, 2% NEEO agaróza s přídavkem barnatých kationtů o koncentraci 0,5 mM a 1,3% gel z PFEG agarózy. Na těchto médiích pak byla testována separace DNA a následně stanovena její výtěžnost. Separace byla prováděna za standardních podmínek. Čas ukončení separace byl určen využitím SybrGold i Patent Blue. Výtěžnosti jsou uvedeny v Tabulce 1.

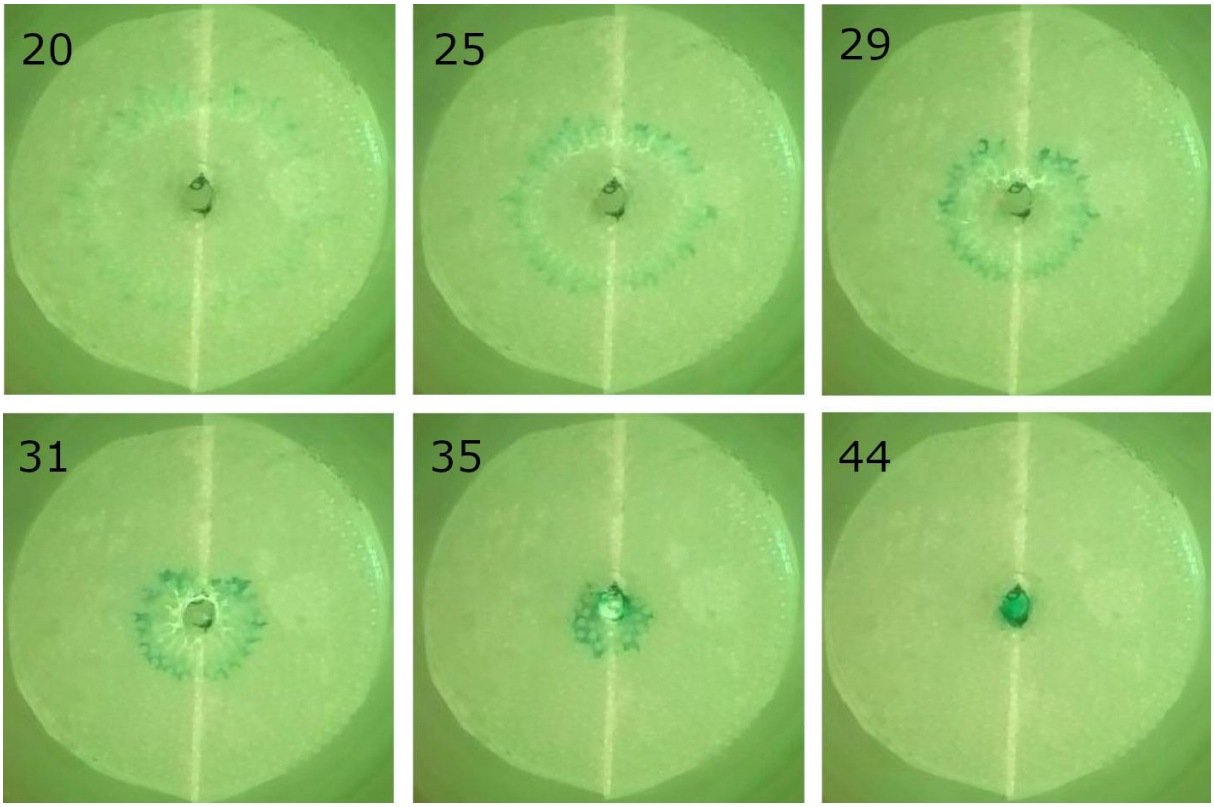
Tabulka 1: Výtěžnosti na gelech

	Médium	Ba^{2+} (mM)	výtěžnost (%)	Ukončení separace	t (min)
1	1,3% NEEO	0	4	SybrGold + 5 min	55
2	1,3% NEEO	0	22	SybrGold + 10 min	60
3	1,3% NEEO	0	20	SybrGold + 5 min	55
4	1,3% NEEO	0	11	SybrGold + 10 min	60
5	1,3% NEEO	0	10	Patent Blue	45
6	1,3% NEEO	0,5	4	SybrGold + 10 min	75
7	1,3% NEEO	0,5	12	Patent Blue	58
8	2% NEEO	0,5	4	Patent Blue	41
9	1,3% PFEG	0	30	SybrGold + 5 min	55
10	1,3% PFEG	0	24	Patent Blue	53

Na žádném z vybraných gelů nedocházelo k viditelné absorbci DNA na stabilizační médium. V případě separací 1, 2 a 3, 4 byly využité jiné membrány pro zachycení DNA. Jednotlivé výtěžnosti jsou relativně nízké, protože odebírání vzorku z kalíšku po ukončení separace vyžaduje určitou zručnost.

5.11.2 Separace DNA na PDMS sloupcích

Pro separaci DNA byly sloupky opracovány plazmou a použit vedoucí elektrolyt s 0,1% MHECem. Separace byla nejdříve provedena se SybrGold a pozorován její průběh (Obrázek 57). Bylo přidáno i barvivo Patent Blue, které umožňuje pozorovat separaci od spuštění analýzy, protože DNA je možné pozorovat až blíže středu zařízení.
Separace byla následně zopakována bez použití barviva SybrGold, aby bylo možné změřit výtěžek DNA. Výtěžnost DNA na silikonových sloupcích byla 19,5%.

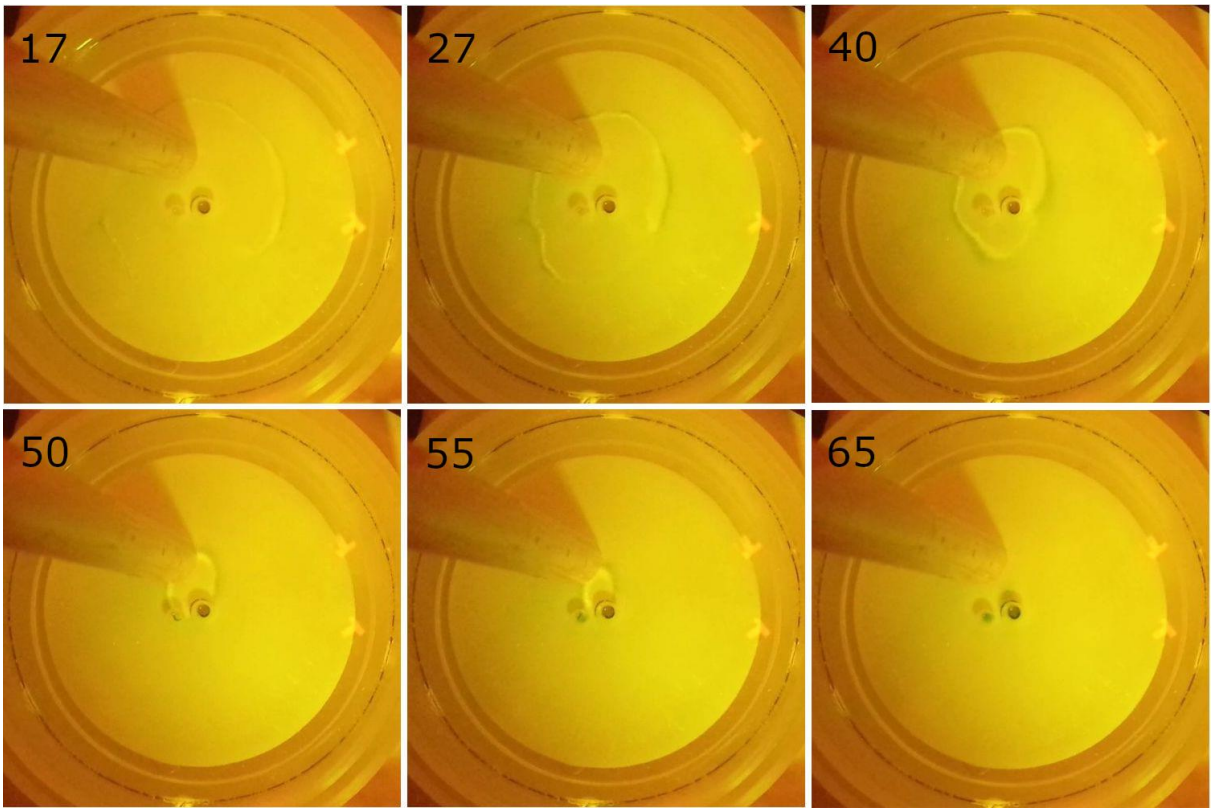


Obrázek 57: Separace DNA na PDMS sloupcích, vizualizována za pomoci SybrGold, snímky byly pořízeny v časech 20, 25, 29, 31, 35 a 44 minut

5.11.3 Separace DNA na PTFE

I přes problémy s plněním disku vedoucím elektrolytem do PTFE disku, byla následná separace barviv vydařená. Proto byla testována i možnost koncentrace DNA.

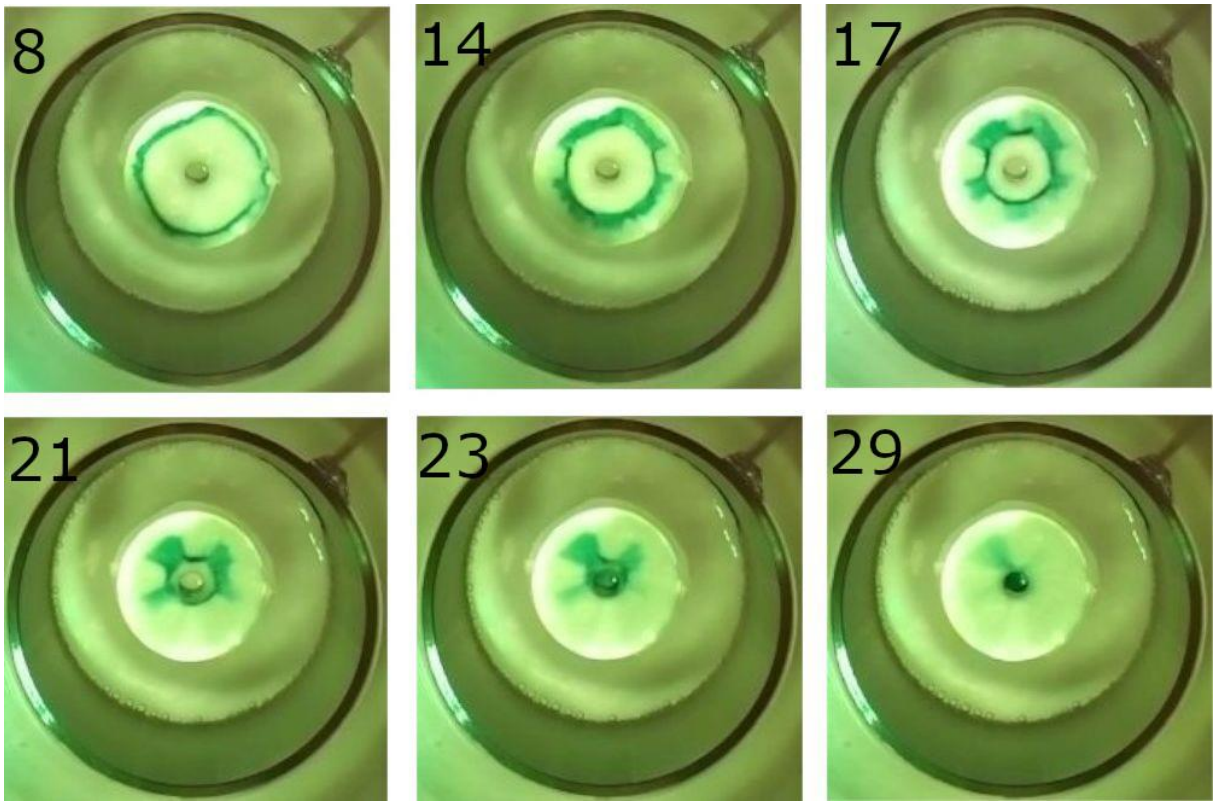
Do disku byl pod tlakem nasát 20 mM vedoucí elektrolyt s 0,1% MHECem. Separována byla nejdříve DNA s navázaným barvivem SybrGold, aby ji bylo možné pozorovat. Bylo přidáno taktéž barvivo Patent Blue, které umožňuje lepší kontrolu průběhu separace. Průběh je zobrazen na Obrázku 58. Experiment byl zopakován i bez použití barviva SybrGold pro získání výtěžku DNA. Po ukončení separace byl z kalíšku ve středu zařízení odebrán koncentrovaný vzorek a změřená výtěžnost DNA. Výtěžnost DNA na PTFE disku byla 7%.



Obrázek 58: Separace DNA na PTFE disku, snímky byly pořízeny v časech 17, 27, 40, 50, 55 a 65 minut

5.11.4 Separace DNA na Dyneema disku

Při separaci barviv na Dyneema disku došlo k úspěšnému fokusování a separaci, proto byla následně otestována i možnost koncentrace DNA. Nejprve byla DNA separována v přítomnosti barviva SybrGold a Patent Blue. Disk byl předem opracován O_2 plazmou po dobu jedné hodiny a naplněn vedoucím elektrolytem s 0,1% MHECem. Bylo použito zařízení z nádob pro vysoké gely, protože k dispozici byl pouze malý disk Dyneema o průměru 3 cm. Velké disky, které byly doposud používány, byly poškozeny experimentem, při kterém byly testovány modifikace činidly, viz kapitola 5.8.1.2. Separace DNA se SybrGold a Patent Blue je zobrazena na Obrázku 59.



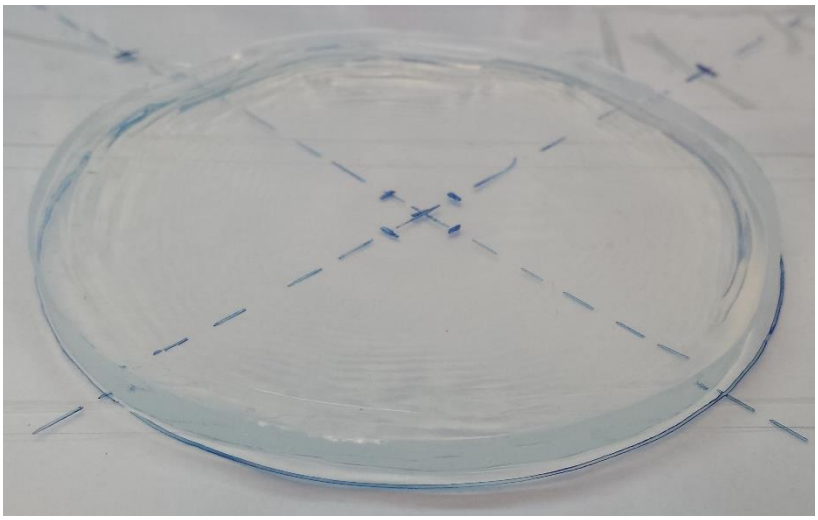
Obrázek 59: Separace DNA se SybrGoldem na Dyneema disku, snímky byly pořízeny v časech 8, 14, 17, 21, 23 a 29 minut

Jak je možno pozorovat na Obrázku 39 z počátku separace probíhá normálně pak, ale začne docházet k zadržování DNA na Dyneema disku a DNA se dále neseparuje. Analýza byla ukončena po odseparování barviva Patent Blue.
Navzdory patrně nevydařené separaci pomocí barviva SybrGold, byla provedena separace DNA bez tohoto barviva a změřen výtěžek. Výtěžnost DNA na Dyneema disku byla 76%.
Zdánlivé zadržování DNA na disku mohlo být způsobeno interakcí barviva SybrGold s diskem nebo dochází pouze k absorbci komplexu DNA-SybrGold a samotná DNA už adsorbována není.

6 ZÁVĚR

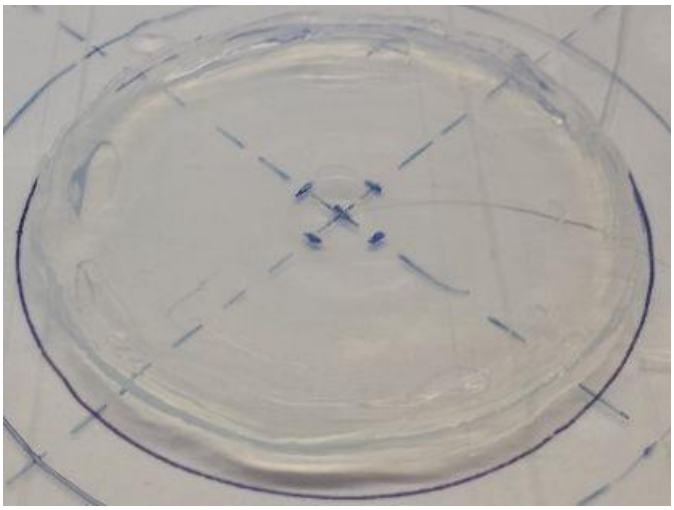
Hlavním problémem, který byl řešen v rámci předložené diplomové práce, bylo srážení agarózového gelu během separace aniontů pomocí epitachoforézy a jeho možná náhrada alternativními materiály. Předpokládáme, že srážení gelu ovlivní průběh separace a její výtěžnost. Bylo vyzkoušeno několik přístupů jak tento problém řešit.

Prvním z nich byl přídavek barnatých kationtů do vedoucího elektrolytu. Předpokládali jsme, že srážení gelu způsobuje elektroosmotický tok. Velikost elektroosmotického toku souvisí se sulfo skupinami přítomnými v agaróze. Barnaté kationty reagují s těmito skupinami a předpokládali jsme, že způsobí vymizení nebo výrazné snížení elektroosmotickému toku, a tím zamezí nebo aspoň výrazně omezí srážení gelu.
Bylo vyzkoušeno několik koncentrací barnatých iontů, které byly přidány pouze do gelu nebo i do vedoucího elektrolytu. Prvotní koncentrace byla 10 mM. Toto množství barnatých iontů sice zabránilo sražení gelu, ale taktéž způsobilo celkovou deformaci gelu. Další koncentrace byly proto zvoleny nižší, konkrétně 2, 1, 0,5 a 0,2 mM. Nejlepších výsledků bylo dosaženo s koncentrací 0,5 mM, jak je vidět na Obrázku 60.



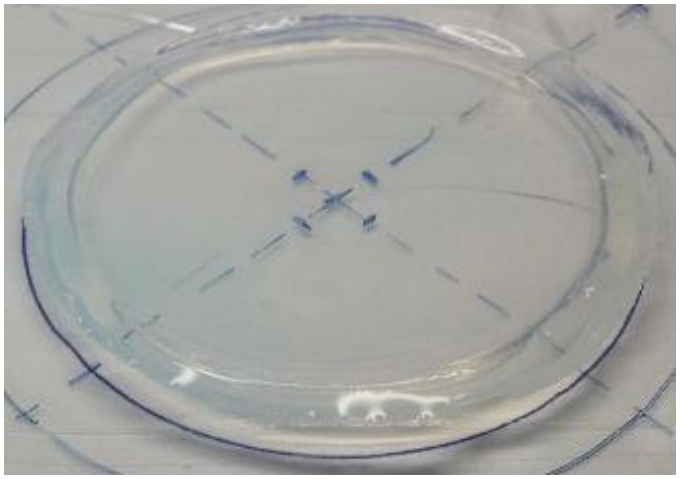
Obrázek 60: Gel po separaci aniontových barviv s barnatými kationty, $c(Ba^{2+}$ v gelu$) = 0{,}5$ mM, $c(Ba^{2+}$ v LE$) = 0{,}5$ mM

Kromě přídavku barnatých iontů byly testovány různé koncentrace gelu. Byly připraveny gely od 1% až po 5%. Jako nejvhodnější byl vyhodnocen 1,3% gel bez přídavku barnatých iontů. Došlo pouze k mírnému sražení gelu. Došlo také k mírnému ztenčení gelu a deformaci okrajů, což mohlo být způsobeno použitím příliš vysokého napětí a ovlivnilo tak separaci. Gel je zobrazen na Obrázku 61.



Obrázek 61: 1,3% gel po separaci aniontových barviv

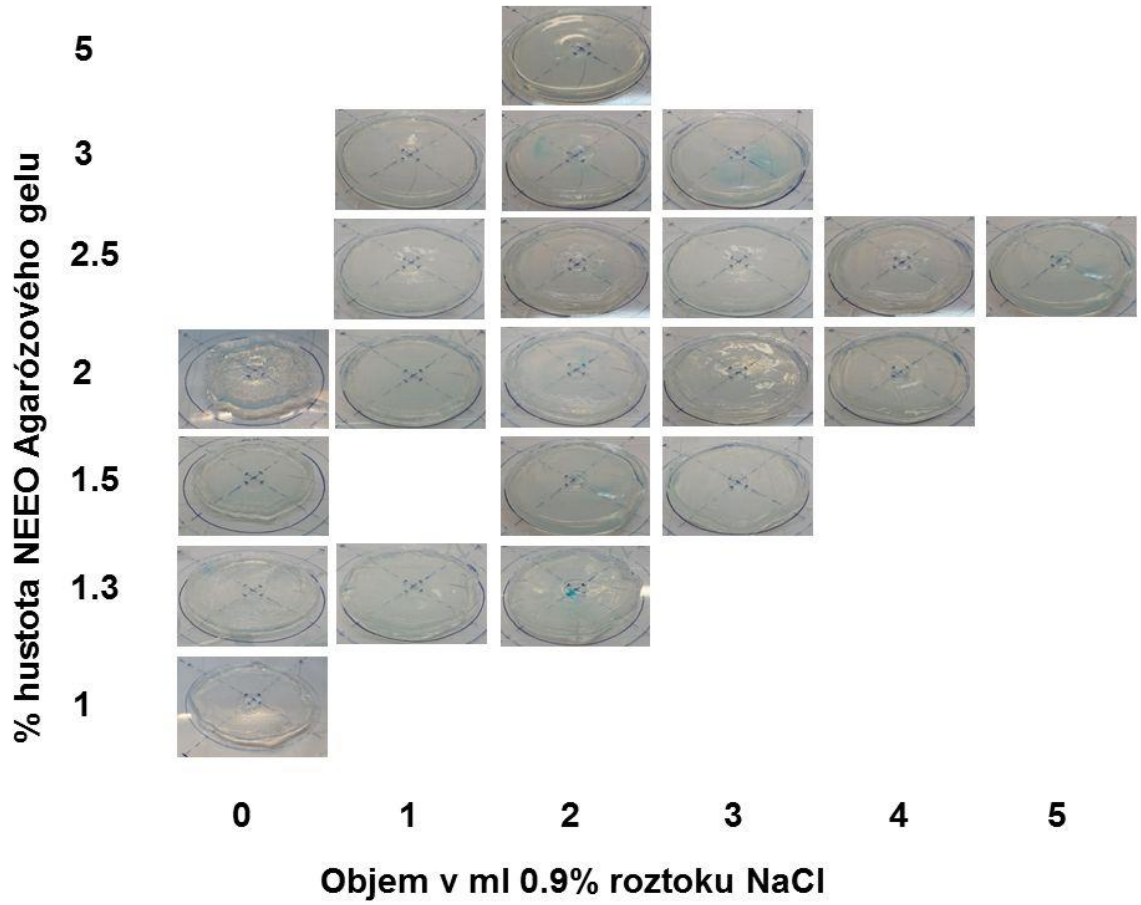
Vzhledem k problémům se srážením gelů připravených z NEEO agarózy, která má nízkou elektroosmózu, dle výrobce je ≤ 0,12. Dalším krokem bylo hledání jiného druhu agarózy s ještě nižším, ideálně žádným, elektroosmotickým tokem. Byla testována PFEG agaróza, agaróza pro pulzní pole, která má hodnotu elektroosmózy ještě nižší než NEEO a to 0,04 – 0,10. Použití samotné PFEG agarózy nepřineslo výrazné zlepšení srážení gelu.
Následně byl zkoušen jak přídavek barnatých kationtů k PFEG agaróze, tak různé koncentrace gelu. Koncentrace přídavku barnatých iontů do gelu byla 0,5 mM. Bylo pracováno s 1%, 1,3% a 2% gelem. Z provedených experimentů vyšel jako nejlepší 1,3% gel s přídavkem barnatých iontů. Gel je zobrazen na Obrázku 62.



Obrázek 62:1,3% gel z PTFE agarózy s přídavkem Ba^{2+} po separaci

PTFE agaróza v porovnaní s NEEO agarózou neposkytla výrazně lepší výsledky, jak bylo očekáváno. Vzhledem k výrazně vyšší ceně PTFE agarózy a minimálnímu rozdílu v srážení gelu oproti NEEO agaróze není výhodné používat danou agarózu.

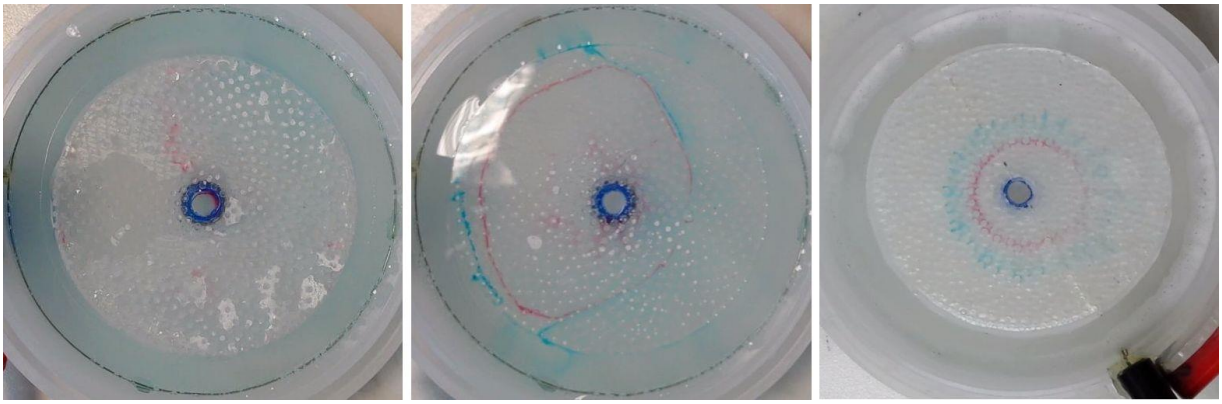
Dále byl testován vliv chloridu sodného na srážení gelu. Tento krok byl testován z důvodu pozorování, jak přítomnost anorganických solí ovlivňuje samotnou separaci, které jsou významnou součástí většiny biologických vzorků.
Byly testovány různé hustoty gelu a různé objemy 0,9% roztoku NaCl. Jak je vidět na Obrázku 63, existuje optimální poměr koncentrací gelu a přídavku NaCl, kdy je srážení a deformace gelu téměř eliminována.



Obrázek 63: Přehledná tabulka různých koncentrací gelu a vlivu roztoku NaCl na ně

Jako nejúčinnější se jeví 2 a 2,5% gel, který vykazuje minimální srážení a deformaci při velkém rozsahu přídavků fyziologického roztoku. Tuto koncentraci gelu bych doporučila pro separaci a koncentraci aniontů z biologických tekutin jako je krevní plasma, krev nebo moč.

Další možností jak řešit srážení gelu byla jeho úplná náhrada jiným materiálem. Jako první byly testovány sloupky z PDMS. Samozřejmě, ke srážení PDMS sloupků v průběhu separace nedocházelo vzhledem k jejich pevné struktuře. Vyskytl se však jiný problém a to v podobě obtížného plnění vodícím elektrolytem z důvodu hydrofobity materiálu. Tento problém byl řešen dvojím způsobem. Prvním byla modifikace sloupků O_2 plazmou. Druhým jejich modifikace činidly, konkrétně MHECem, TRITONem, poly(diallyldimethylamonium chloridem), hexadimetrin bromidem. I když opracování plazmou se zdálo jako dostatečné pro vyřešení tohoto problému, přídavek MHECu do vedoucího elektrolytu nejenom upravil hydrofobitu materiálu a usnadnil tak plnění sloupků, ale také zlepšil samotnou separaci. Na Obrázku 64 je porovnání separace na sloupcích bez opracování plazmou, s opracováním plazmou po dobu 1 hodinu a s přídavkem MHECu.



Obrázek 64:Separace na sloupcích – vlevo jsou sloupky bez opracování plazmou, uprostřed s opracováním plazmou a vpravo s přídavkem MHECu

Navzdory tomu, že v případě přidání MHECu nedochází k vytvoření tenké fokusační zóny, jako se to jeví v případě opracování plazmou, samotný průběh separace je lepší. Dochází k odseparování celého objemu barviva a tvorbě o něco širších, ale stabilních fokusačních zón.

Kromě silikonových sloupků byly dále testovány různé plastové materiály. Přehled použitých plastových materiálu je zobrazen v Tabulce 2.

Tabulka 2: Souhrn použitých platových materiálů

	Materiál	Velikost pórů (µm)	Tloušťka (mm)
1	PP	80 - 155	3,175
2	PP	125 - 195	3,175
3	PTFE	10 - 45	3,175
4	PE	5	6
5	PE	20	6
6	PE	40	6
7	UHMWPE	7 - 12	3,175

Z daných materiálů byly vyřezány kruhové disky a nejdříve vyzkoušena jejich nasákavost, protože byl předpokládaný problém s hydrofobitou jako v případě silikonových sloupků. Výsledky tohoto testu jsou zobrazeny v Tabulce 3.

Tabulka 3: Test nasákavosti; + značí nasává a – značí nenasává

Materiál	Velikost pórů (µm)	H_2O		MHEC	
		x	plasma 1h	x	plasma 1h
PP	80 - 155	-	+	-	+
PP	125 - 195	-	+	-	+
PTFE	10 - 45	-	-	-	-
PE	5	-	+	+	+
PE	20	-	+	+	+
PE	40	-	+	+	+
UHMWPE	7 - 12	-	+	-	+

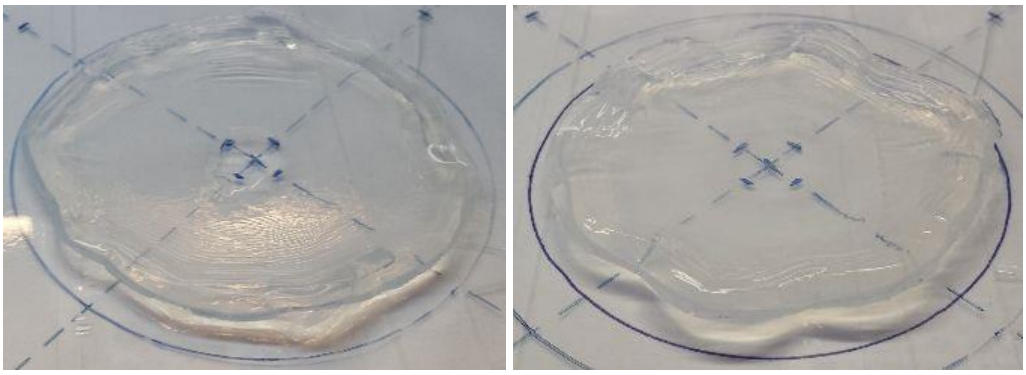
S výjimkou PTFE jsme pro každý materiál našly podmínky kdy je možné nasát vedoucí elektrolyt do disku. V případě PTFE bylo nutné použít podtlak a nasát vedoucí elektrolyt použitím vakua. Pro separaci byla pak zvolena kombinace opracování plazmou a přidání MHECu do vedoucího elektrolytu, jelikož při separaci na silikonových sloupcích byly potvrzeny jeho pozitivní účinky na separaci.

Polypropylén nebyl vhodný materiál pro separaci, protože docházelo k adsopci barviva na disk. Separace na teflonu (PTFE) proběhla úspěšně s tvorbou úzkých zón analytů. Nevýhodou je náročné plnění vodícího elektrolytu do PTFE disku. Separace na polyetylénovém disku neprobíhala optimálně. Jednak docházelo k adsorpci jednoho z barviv na disk, navíc separace trvala příliš dlouho, což je problematické pokud by se jednalo o reálný vzorek. Podobně jako v případě teflonu tak i separace na Dyneemě (UHMWPE) proběhla úspěšně s tvorbou úzkých zón analytů. Zde však odpadají problémy s plněním vedoucího elektrolytu do porézního disku.

Výše byly uvedeny různé varianty jak řešit původně stanovený problém srážení gelu. Byly vyzkoušeny různé možnosti od přídavku aditiv do gelu pro jeho stabilizaci až po jeho úplné nahrazení jiným materiálem. Jako optimální možnosti byly vyhodnoceny:

- 1% NEEO agarózový gel s přídavkem barnatých kationtů do gelu a vedoucího elektrolytu o koncentraci 0,5 mM
- 1,3% NEEO agarózový gel bez přídavku barnatých kationtů
- 2% a 2,5% NEEO agarózový gel v případě biologických vzorků obsahujících soli
- Silikonové sloupky opracované plazmou a přídavkem MHECu
- Dyneema disk opracovaný plazmou s přídavkem MHECu

Dalším cílem diplomové práce byla optimalizace podmínek separace. Tento cíl zahrnuje prvotní výběr koncentrace elektrolytů.
Dále byl sledován vliv výkonu na srážení gelu, průběh separace a její rychlost. V případě zařízení s kanálkem byly separace zdlouhavé kvůli malému množství vedoucího elektrolytu a byl předpoklad, že se zvýšeným výkonem by mohlo dojít k urychlení separace. Obdobně to bylo u přídavku barnatých iontů. Z provedených experimentů vyplynulo, že výkon nemá vliv na srážení gelu ani průběh separace. Dochází k zrychlení separace, avšak v případě vyšších výkonů dochází k zvýšení teploty ve středu zařízení a tím k degradaci stabilizačního média a sledovaného analytu. V extrémním případě může dojít k přehřátí středu zařízení, varu vedoucího elektrolytu, přerušení elektrického obvodu a předčasnému ukončení separace. Důkazem tohoto jevu je ztenčení až proděravění gelu ve středu, v důsledku jeho zahřívání, viz. Obrázek 65, kde jsou porovnány 1 % gely po separaci aniontů při různých výkonech. Zvýšená teplota může poškodit i vzorek. Zejména u biologických vzorků hrozí jejich denaturace.



Obrázek 65:
Vlevo je gel po separaci při výkonu 6 W (U 131 - 265, I 46 – 23) t = 23 min;
Vpravo je gel po separaci při výkonu 2 W (U 72 – 167, I 28 – 12), t = 48 min;

Poslední částí diplomové práce bylo porovnání separace a hlavně výtěžnosti koncentrace DNA pomocí epitachoforézy za použití různých médií stabilizujících rozhraní vedoucího a koncového elektrolytu. Separace DNA byla prováděna na vybraných stabilizačních médiích, které měly nejlepší výsledky separace aniontových barviv. Přehled médií a výtěžností je v Tabulce 4.

Tabulka 4:Výtěžnosti DNA

Stabilizační médiu	Výtěžnost (%)	t (min)
1,3% NEEO	22	60
1,3% NEEO (Ba^{2+})	12	58
1,3% PFEG	30	55
Silikonové sloupky	20	40
PTFE	7	36
Dyneema	76	42

V případě mých experimentů nebylo dosahováno příliš vysokých výtěžků s výjimkou separace na disku Dyneema. Toto je způsobeno optimalizací procesu odběru vzorku ze středu zařízení a mojí malou praxí s vypipetováváním vzorku. Tato činnost vyžaduje určitou zručnost, kterou je možné nabýt po určitém čase. Z tohoto důvodu v Tabulce 5 uvádím i výtěžnosti, kterých dosáhli moji spolupracovníci po optimalizaci celého procesu, a kteří dosahovali vyšších výtěžností.

Tabulka 5: Výtěžnosti DNA

Stabilizační médiu	Výtěžnost (%)
0,5% NEEO	92
0,5% NEEO (Ba^{2+})	100
0,3% IsoGel	16
0,5% PFEG	103

Chyba při měření výtěžnosti je ± 5%. V případě IsoGelu je výtěžnost malá protože docházelo k zachytávání většiny DNA na okraji gelu a pouze malá část se separovala.

Jednotlivé cíle diplomové práce byly splněny. Byla otestována různá média stabilizující rozhraní mezi vedoucím a koncovým elektrolytem a navrženo několik optimálních řešení. V případě gelu bylo navrženo několik řešení problému jeho srážení a deformace v průběhu separace. Taktéž bylo vyzkoušeno několik možností úplného nahrazení gelu.
Byly optimalizovány podmínky separace, jako je koncentrace vedoucího a koncového elektrolytu a jejich množství a dále výkonu a později napětí tak, aby nedocházelo k výraznému přehřívání středu zařízení. Kromě celkového snižování výkonu by přehřívání středu zařízení v průběhu separace bylo možno řešit vytvořením programu, který by upravoval napětí v průběhu separace tak, aby nedošlo k překročení určité teploty. Tento program by také zkrátil dobu separace.
Posledním cílem byla aplikace epitachoforézy na vzorový biologický analyt, DNA, a stanovení jeho výtěžku. Jednotlivá vybraná stabilizační média byla použita pro koncentraci DNA. Jako optimální stabilizační médium vodícího a koncového elektrolytu pro DNA se jeví NEEO a PFEG agaróza a Dyneema s výtěžky nad 70%.
Epitachoforéza představuje velmi perspektivní metodu přípravy vzorku. V této práci byla optimalizována metoda pro koncentraci DNA. Při použití pro jiný druh vzorku bude potřeba optimalizace zejména vedoucího a koncového elektrolytu, vkládaného napětí a času koncentrace. Provedené experimenty ukazují další možnosti využití, například při separování

a koncentrování mikroorganizmů bude vhodnější zvolit PDMS sloupky a použít časový program, aby nedošlo k jejich usmrcení. Nebo při separaci kationtů a aniontů z moči bude potřeba využít 2 nebo 2,5% gel kvůli vyššímu obsahu solí. Toto významně rozšiřuje možnosti využití a aplikace epitachoforézy na přípravu vzorků z velkých odebraných objemů k následné analýze vysoce citlivými metodami.

7 ZDROJE

[1] PAWLISZYN, Janusz a Heather L. LORD, ed. *Handbook of Sample Preparation*. USA: Wiley-Blackwell, 2010. ISBN 978-0-470-09934-6.

[2] VORÁČOVÁ, Ivona. Epitachoforéza: Nová metoda na extrakci, separaci a koncentraci DNA z velkého objemu vzorků. *Vesmír 99* [online]. 1. 6. 2020n. l., **2020**(6), 355 [cit. 2020-06-19]. Dostupné z: https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2020/cislo-6/epitachoforeza.html

[3] MITRA, Somenath, ed. *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*. 1th ed. USA: Wiley-Interscience, 2003. ISBN 978-0471328452.

[4] WELLS, David. *High Throughput Bioanalytical Sample Preparation: Volume 5*. Elsevier Science, 2003. ISBN 9780444510297.

[5] DZIUBAKIEWICZ, Ewelina a Bogusław BUSZEWSKI. Principles of Electromigration Techniques. BUSZEWSKI, Boguslaw, Ewelina DZIUBAKIEWICZ a Michal SZUMSKI, ed. *Electromigration Techniques* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013, 2013-4-24 [cit. 2020-03-16]. Springer Series in Chemical Physics. DOI: 10.1007/978-3-642-35043-6_2. ISBN 978-3-642-35042-9. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-35043-6_2

[6] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.

[7] SKOOG, Douglas A., Donald M. WEST, F. James HOLLER a Stanley R. CROUCH. *Analytická chemie*. Přeložil Karel NESMĚRÁK, přeložil Václav ČERVENÝ, přeložil Tomáš KŘÍŽEK, přeložil Eliška NOVÁKOVÁ. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2019, 860 - 871. ISBN 9788075920430.

[8] KENKEL, John. *Analytical chemistry for technicians*. 4th ed. Boca Raton: CRC Press, c2014. ISBN 9781439881057.

[9] CHRISTIAN, Gary D., Purnendu K. DASGUPTA a Kevin SCHUG. *Analytical chemistry*. 7th ed. Hoboken: Wiley, c2014. ISBN 978-0-470-88757-8.

[10] WESTERMEIER, Reiner a Sonja GRONAU. *Electrophoresis in Practice*. 5th edition. Weinheim: Wiley, 2004 [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.1002/3527603468. ISBN 9783527311811.

[11] MAGDELDIN, Sameh, ed. *Gel Electrophoresis - Principles and Basics* [online]. InTech, 2012 [cit. 2020-03-18]. DOI: 10.5772/2205. ISBN 978-953-51-0458-2.

[12] ROCCO, A., G. D'ORAZIO, Z. ATURKI a S. FANALI. Capillary Electrochromatography. *Liquid Chromatography* [online]. Elsevier, 2013, 2013, s. 469-492 [cit. 2020-03-11]. DOI: 10.1016/B978-0-12-415807-8.00021-3. ISBN 9780124158078. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124158078000213

[13] GAO, Fan, Xiao-Fei WANG a Bo ZHANG. Research and Application Progress of Micellar Electrokinetic Chromatography in Separation of Proteins. *Chinese Journal of*

Analytical Chemistry [online]. 2019, **47**(6), 805-813 [cit. 2020-03-12]. DOI: 10.1016/S1872-2040(19)61163-1. ISSN 18722040. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1872204019611631

[14] HANCU, Gabriel, Brigitta SIMON, Aura RUSU, Eleonora MIRCIA a Árpád GYÉRESI. Principles of Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography Applied in Pharmaceutical Analysis. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2013, (3 (1). DOI: 10.5681/apb.2013.001.

[15] MOSTOVENKO, Ekaterina, Chopie HASSAN, Janine RATTKE, André M. DEELDER, Peter A. VAN VEELEN a Magnus PALMBLAD. Comparison of peptide and protein fractionation methods in proteomics. *EuPA Open Proteomics* [online]. 2013, **1**, 30-37 [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.1016/j.euprot.2013.09.001. ISSN 22129685. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212968513000068

[16] GARFIN, David a Satinder AHUJA. *Handbook of Isoelectric Focusing and Proteomics*. Netherlands: Academic Press, 2005. ISBN 9780120887521.

[17] Tri, N., Caldwell, K., Beckett, R., Anal. Chem. 72 (2000) 1823.

[18] W.H. Field flow fractionation: Analysis of macromolecules and particles. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. 1988, **13**(6) [cit. 2020-03-12]. DOI: 10.1016/0968-0004(88)90094-1. ISSN 09680004. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0968000488900941

[19] PALKAR, Saurabh A. a Mark R. SCHURE. Mechanistic Study of Electrical Field Flow Fractionation. 1. Nature of the Internal Field. *Analytical Chemistry* [online]. 1997, **69**(16), 3223-3229 [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.1021/ac9700134. ISSN 0003-2700. Dostupné z: https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac9700134

[20] GALE, Bruce K. a Merugu SRINIVAS. Cyclical electrical field flow fractionation. *ELECTROPHORESIS* [online]. 2005, **26**(9), 1623-1632 [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.1002/elps.200410296. ISSN 0173-0835. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1002/elps.200410296

[21] TASCI, Tonguc, William JOHNSON, Diego FERNANDEZ, Eliana MANANGON a Bruce GALE. Particle Based Modeling of Electrical Field Flow Fractionation Systems. *Chromatography* [online]. 2015, **2**(4), 594-610 [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.3390/chromatography2040594. ISSN 2227-9075. Dostupné z: http://www.mdpi.com/2227-9075/2/4/594

[22] EVERAERTS, Frans Matheus, Jo L. BECKERS a Theo P. E. M. VERHEGGEN. *Isotachophoresis: theory, instrumentation, and applications*. 1th ed. New York: Elsevier Scientific Pub. Co., 1976. ISBN 0-444-41430-4.

[23] BOČEK, P., M. DEML, P. GEBAUER a V. DOLNÍK, RADOLA, Bertold J., ed. *Analytical Isotachophoresis*. Weinheim: Verlagsgesellschaft Acta humaniora, 1988. Electrophoresis library. ISBN 3-527-26444-2.

[24] SANTIAGO, Juan a Tarun KHURANA. *Method of detecting directly undetectable analytes using directly detectable spacer molecules*. US. US 7,951.278 B2. Uděleno May 31, 2011.

[25] VOHLÍDAL, Jiří, Karel ŠTULÍK a Alois JULÁK. *Chemické a analytické tabulky*. Praha: Grada, 1999. ISBN 978-80-7169-855-5.

[26] HUNTER, Robert J. *Zeta potential in colloid science: principles and applications*. 1th ed. New York: Academic Press, 1981. Colloid science (London, England: 1976): 1976), 2. ISBN 0-12-361960-2.

[27] FORET, František, Vladimíra DATINSKÁ, Ivona VORÁČOVÁ, Jakub NOVOTNÝ, Pantea GHEIBI, Jan BERKA a Yann ASTIER. Macrofluidic Device for Preparative Concentration Based on Epitachophoresis. *Analytical Chemistry* [online]. 2019, **91**(11), 7047-7053 [cit. 2020-04-09]. DOI: 10.1021/acs.analchem.8b05860. ISSN 0003-2700. Dostupné z: https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.8b05860

[28] NELSON, David L. a Michael M. COX. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4 th edition. Madison: W. H. Freeman, 2004. ISBN 978-0716743392.

[29] MOORE, David a Dennis DOWHAN. Purification and Concentration of DNA from Aqueous Solutions. *Current Protocols in Molecular Biology* [online]. 2002, **59**(1), 2.1.1-2.1.10 [cit. 2020-05-17]. DOI: 10.1002/0471142727.mb0201as59. ISSN 1934-3639. Dostupné z: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/0471142727.mb0201as59

[30] XU, QIAO a TU. Microfluidic Technologies for cfDNA Isolation and Analysis. *Micromachines* [online]. 2019, **10**(10), 1 - 19 [cit. 2020-05-17]. DOI: 10.3390/mi10100672. ISSN 2072-666X. Dostupné z: https://www.mdpi.com/2072-666X/10/10/672

[31] KYE, Hyeon Gi, Christian D. AHRBERG, Byeong Seon PARK, Jong Min LEE a Bong Geun CHUNG. Separation, Purification, and Detection of cfDNA in a Microfluidic Device. *BioChip Journal* [online]. 2020, , 1 - 11 [cit. 2020-05-17]. DOI: 10.1007/s13206-020-4208-1. ISSN 1976-0280. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/s13206-020-4208-1

[32] MORALES, Mercedes C. a Jeffrey D. ZAHN. Droplet enhanced microfluidic-based DNA purification from bacterial lysates via phenol extraction. *Microfluidics and Nanofluidics* [online]. 2010, **9**(6), 1041-1049 [cit. 2020-05-17]. DOI: 10.1007/s10404-010-0623-2. ISSN 1613-4982. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/s10404-010-0623-2

[33] HU, Fei, Juan LI, Niancai PENG, et al. Rapid isolation of cfDNA from large-volume whole blood on a centrifugal microfluidic chip based on immiscible phase filtration. *The Analyst* [online]. 2019, **144**(14), 4162-4174 [cit. 2020-05-18]. DOI: 10.1039/C9AN00493A. ISSN 0003-2654. Dostupné z: http://xlink.rsc.org/?DOI=C9AN00493A

[34] DATINSKÁ, Vladimíra, Ivona VORÁČOVÁ, Ulrich SCHLECHT, Jan BERKA a František FORET. Recent progress in nucleic acids isotachophoresis. *Journal of Separation Science* [online]. 2018, **41**(1), 236-247 [cit. 2020-05-18]. DOI: 10.1002/jssc.201700878. ISSN 16159306. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.201700878

[35] DATINSKÁ, Vladimíra, Ivona VORÁČOVÁ, Jan BERKA a František FORET. Preparative concentration of nucleic acids fragments by capillary isotachophoretic analyzer. *Journal of Chromatography A* [online]. 2018, **1548**, 100-103 [cit. 2020-07-08]. DOI: 10.1016/j.chroma.2018.03.021. ISSN 00219673. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967318303145

[36] ALIX-PANABIÈRES, Catherine, Heidi SCHWARZENBACH a Klaus PANTEL. Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA. *Annual Review of Medicine* [online]. 2012, **63**(1), 199-215 [cit. 2020-04-17]. DOI: 10.1146/annurev-med-062310-094219. ISSN 0066-4219. Dostupné z: http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-med-062310-094219

[37] HABER, D. A. a V. E. VELCULESCU. Blood-Based Analyses of Cancer: Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA. *Cancer Discovery* [online]. 2014, **4**(6), 650-661 [cit. 2020-04-17]. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-13-1014. ISSN 2159-8274. Dostupné z: http://cancerdiscovery.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/2159-8290.CD-13-1014

[38] WONG, David, Sharmili MOTURI, Vach ANGKACHATCHAI, Reinhold MUELLER, Grace DESANTIS, Dirk VAN DEN BOOM a Mathias EHRICH. Optimizing blood collection, transport and storage conditions for cell free DNA increases access to prenatal testing. *Clinical Biochemistry* [online]. 2013, **46**(12), 1099-1104 [cit. 2020-04-28]. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2013.04.023. ISSN 00099120. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000991201300163X

[39] LO, YM, ES LO, N WATSON, L NOAKES, IL SARGENT, B THILAGANATHAN a JS WAINSCOAT. Two-way cell traffic between mother and fetus: biologic and clinical implications. *Blood* [online]. 1996, **88**(11), 4390-4395 [cit. 2020-04-28]. DOI: 10.1182/blood.V88.11.4390.bloodjournal88114390. ISSN 0006-4971. Dostupné z: https://ashpublications.org/blood/article/88/11/4390/50329/Twoway-cell-traffic-between-mother-and-fetus

[40] SINGH, Ripudaman, Lotte HATT, Katarina RAVN, Ida VOGEL, Olav Bjørn PETERSEN, Niels ULDBJERG a Palle SCHELDE. Fetal cells in maternal blood for prenatal diagnosis: a love story rekindled. *Biomarkers in Medicine* [online]. 2017, **11**(9), 705-710 [cit. 2020-04-28]. DOI: 10.2217/bmm-2017-0055. ISSN 1752-0363. Dostupné z: https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/bmm-2017-0055

[41] LO, Y. M. Dennis, Jun ZHANG, Tse N. LEUNG, Tze K. LAU, Allan M.Z. CHANG a N. Magnus HJELM. Rapid Clearance of Fetal DNA from Maternal Plasma. *The American Journal of Human Genetics* [online]. 1999, **64**(1), 218-224 [cit. 2020-04-28]. DOI: 10.1086/302205. ISSN 00029297. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929707616759

[42] STRASINGER, Susan King a Marjorie Schaub DI LORENZO. *Urinalysis and body fluids*. 6th ed. Philadephia: F.A. Davis Company, c2014. ISBN 9780803639201.

[43] M. YOKOTA, N. TATSUMI, I. TSUDA, T. TAKUBO a M. HIYOSHI. DNA extraction from human urinary sediment. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* [online]. 1998, **12**(2),

88 - 91 DOI: 10.1002/(SICI)1098-2825(1998)12:2<88::AID-JCLA3>3.0.CO;2-F. Dostupné z: https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2825(1998)12:2<88::AID-JCLA3>3.0.CO;2-F

[44] BURTIS, C.A. a E.R ASHWOOD. *Tietz Textbook of Clinical Biochemistry.* 2. vydání. Philadelphia : W.B.Saunders Company, 1994. ISBN 0-7216-4472-4.

[45] BOTEZATU, Irina, Ol'ga SERDYUK, Galina POTAPOVA, et al. Genetic Analysis of DNA Excreted in Urine: A New Approach for Detecting Specific Genomic DNA Sequences from Cells Dying in an Organism. *Clinical Chemistry* [online]. 2000, **46**(8), 1078-1084 [cit. 2020-05-12]. DOI: 10.1093/clinchem/46.8.1078. ISSN 0009-9147. Dostupné z: https://academic.oup.com/clinchem/article/46/8/1078/5641471

[46] M. UTTING, W. WERNER, R. DAHSE, J. SCHUBERT a K. JUNKER. Microsatellite Analysis of Free Tumor DNA in Urine, Serum, and Plasma of Patients. *American Association for Cancer Research* [online]. 2002, **8**(1), 35 - 40. Dostupné z: https://clincancerres.aacrjournals.org/content/clincanres/8/1/35.full.pdf

[47] DEMMLER, G. J., G. J. BUFFONE, C. M. SCHIMBOR a R. A. MAY. Detection of Cytomegalovirus in Urine from Newborns by Using Polymerase Chain Reaction DNA Amplification. *Journal of Infectious Diseases* [online]. 1988, **158**(6), 1177-1184 [cit. 2020-05-13]. DOI: 10.1093/infdis/158.6.1177. ISSN 0022-1899. Dostupné z: https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/158.6.1177

[48] LACROIX, Jean-Michel, Keith JARVI, Sukhsatej D. BATRA, Dianne M. HERITZ a Marc W. MITTELMAN. PCR-based technique for the detection of bacteria in semen and urine. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 1996, **26**(1-2), 61-71 [cit. 2020-05-13]. DOI: 10.1016/0167-7012(96)00844-5. ISSN 01677012. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0167701296008445

[49] M. PARISA, S. NAHID a R. M. SHAHLA. ISOLATION AND DETECTION OF YEAST BIOFILMS FROM URINE CATHETERS OF INFECTIOUS PATIENTS. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2012, **6**(4), 533 - 536.