

PŘÍHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2008-335

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

G01N 27/447

(2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **30.05.2008**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **09.12.2009**
(Věstník č. 49/2009)

(71) Přihlašovatel:

Masarykova univerzita, Brno, CZ

(72) Původce:

Dvořák Jan Ing., Brno, CZ

(74) Zástupce:

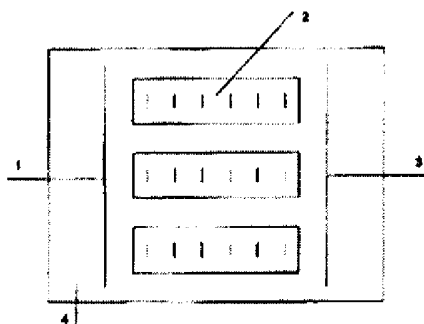
Inventia s.r.o., RNDr. Kateřina Hartvichová, Na Bělidle
3, Praha 5, 15000

(54) Název přihlášky vynálezu:

Způsob a zařízení k provádění elektroforézy

(57) Anotace:

Předmětem předloženého vynálezu je způsob provádění elektroforézy na gelu, vyznačený tím, že na gel se vloží elektrické pole mající charakter pseudonáhodné sekvence s časově stabilní dopřednou výslednicí elektrického pole. Toho lze dosáhnout vložением pseudonáhodného elektrického pole na úplnou nebo neúplnou dvojrozměrnou nebo trojrozměrnou matici elektrod, generováním elektrického pole za pomoci náhodného či pseudonáhodného magnetického pole, mechanickým pohybem gelu vůči elektrickému nebo magnetickému poli, nebo jakoukoli v kombinaci uvedených metod. Zařízení k provádění tohoto způsobu zahrnuje dvě elektrody (1, 3) vložené na gelu (4). Molekuly gelu (4) se působením pole na elektrody (1, 3) pohybují různou rychlostí a vytvářejí tak proužky (2).



CZ 2008 - 335 A3

Způsob a zařízení k provádění elektroforézy

Oblast techniky

Vynález se týká zlepšeného způsobu provádění elektroforézy a zařízení k provádění tohoto způsobu.

Dosavadní stav techniky

Elektroforéza je metoda využívající zákonitostí pohybu elektricky nabitých částic pod vlivem elektrického pole. Elektroforéza se uplatňuje například v biochemii a molekulární biologii, kdy se biomolekuly, např. proteiny, DNA nebo RNA, nanesou do jednoho místa gelu a poté se gel vystaví působení elektrického pole. Molekuly nanesené na gel se pod vlivem tohoto elektrického pole pohybují gelem, v závislosti na velikosti molekul nebo na velikosti náboje se však nepohybují stejnou rychlostí. Pohybem v gelu se molekuly od sebe vzájemně oddělí, a to v závislosti na svých elektroforetických vlastnostech.

Nejstarší elektroforetickou metodou je stejnosměrná elektroforéza. Na gel (gelovou membránu) se do jednoho místa nanese zkoumaný vzorek a vloží se elektrické pole ve směru podélné osy gelu (gelové membrány) - viz obr. 1. Různé molekuly obsažené ve vzorku se působením tohoto pole pohybují různou rychlostí.

Při stejnosměrné elektroforéze existuje závažný problém. Dostatečně malé molekuly bez velké afinity k materiálu gelu bez problému putují ve směru elektrického pole a dochází k postupnému oddělování molekul vzorku od sebe. Větší molekuly nebo molekuly s velkou afinitou vůči okolí se ale naváží („zapletou“) do molekulární struktury gelu a dál již nepostupují. Tento problém vzniká již u poměrně malých molekul.

Tento problém do značné míry řeší tzv. pulzní elektroforéza. Při ní se ve vhodných časových intervalech přepóluje elektrody, a tím se obrátí směr působícího elektrického pole. Molekula vzorku, která narazila na strukturu gelu a zastavila se, se tudíž dá do pohybu opačným směrem, ze struktury gelu se vymaní („vyplete“) a v dalším dopředném pulzu se může znovu pohybovat. Protože vektor pohybu jedné konkrétní molekuly je do značné míry náhodná veličina, je velmi pravděpodobné, že se molekula bude pohybovat poněkud odlišným směrem

a strukturu gelu, na kterou v předchozím pulzu narazila, v tomto dalším pulzu obejde. Tímto způsobem je zajištěno, že je pulzní elektroforéza použitelná i pro poměrně velké molekuly a husté gely. U pulzní elektroforézy se často používá elektrodový systém znázorněný na obr. 2. Tím je dále zvýšena pravděpodobnost, že se „zapletená molekula“ uvolní a v další sérii pulzů překážku obejde pozměněnou trasou.

Pro ještě větší molekuly se používá bodová elektroforéza, která je vhodná pro rozdělování směsi molekul, které jsou natolik velké (anebo „nevhodně tvarované“), že k jejich rozdělení nelze použít pulzní elektroforézu. I při pulzní elektroforéze se tyto molekuly zaplétají do struktury gelu a nepostupují dostatečně kupředu.

Při bodové elektroforéze se používá elektrodový systém, kde se místo dvou lineárních elektrod u okrajů gelu použije několik bodových elektrod umístěných na různá místa gelu. Tyto elektrody se cyklicky budí elektrickým napětím. Existuje tak velká pravděpodobnost, že molekula vzorku zachycená molekulou gelu tuto molekulu gelu v podstatě „obkrouží“, tím se ze zachycení v gelu uvolní a molekula vzorku bude dále postupovat. Velkou nevýhodou této metody je, že trajektorie molekul nejsou rovné, ale deformované, a rozdělování směsi molekul vzorku neprobíhá konstantní rychlostí.

Výše uvedené metody - stejnosměrná, pulsní, s hexagonálním elektrodovým systémem a bodová elektroforéza - jsou v současnosti nejčastěji používané metody. V minulosti bylo vyvinuto mnoho dalších metod, a jednotliví uživatelé si tyto metody dále často sami modifikují. Názvy, označení a mnohdy i drobné technické detaily reálného provedení nejsou ustáleny, nejčastěji je využívána tato klasifikace:

- Stejnosměrná elektroforéza: Elektrody jsou umístěny na protilehlých stranách gelu a na elektrody je přivedeno stejnosměrné napětí neproměnné velikosti, viz obr. 1.
- Jednoduchá pulzní elektroforéza, FIGE (Field Inversion Gel Electrophoresis): Ta využívá rovněž elektrodový systém uvedený na obr. 1, ale na elektrody není přivedeno stejnosměrné napětí stabilní velikosti, ale napětíové nebo proudové pulzy.
- CHEF (Contour Clamped Homogenous Electric Field): Jedná se o nejčastější variantu elektroforézy s šestiúhelníkovým elektrodovým systémem. Plocha, na níž elektroforéza probíhá, je zcela ohraničená šesti elektrodami, jež jsou uspořádány do pravidelného šestiúhelníku. Na jednotlivé elektrody je přivedeno přednastavené napětí. Často se používají i

varianty této metody. Jednotlivé elektrody lze budít elektrickými pulsy podobně jako u jednoduché pulsní elektroforézy se dvěma elektrodami. Dále elektrody nemusí tvořit pravidelný šestiúhelník, ale mohou být uspořádány poněkud nepravidelně, nejčastěji tak jak je zobrazeno na obr. 2.

- PFGE (Pulsed Field Gradient Gel Electrophoresis): Tato metoda využívá elektrodový systém zobrazený na obr. 4, kdy je aplikována kombinace homogenního a nehomogenního elektrického pole.

- OFAGE (Orthogonal Field Alternation Gel Electrophoresis): Elektrodový systém je zobrazen na obr. 3, působí zde kombinace dvou nehomogenních elektrických polí.

- TAFE (Transverse Alternating Field Electrophoresis): použitý gel je umístěn vůči elektrodám vertikálně, působící elektrická pole jsou homogenní, viz obr. 5.

- CROSS FIELD (Crossed Field Gel Electrophoresis): Elektroforetický gel je uložen na pohyblivé podložce, která se periodicky otáčí, popřípadě posouvá, uvnitř elektrického pole. Tento systém se často označuje jako RGE (Rotating Gel Electrophoresis).

Uživatelé elektroforézy často metody elektroforézy kombinují dohromady a upravují si je. Příkladem těchto kombinací a úprav je např. metoda ST/RIDE (Simultaneous Tangential/Rectangular Inversion).

Nevýhody v současné době známých typů elektroforéz řeší způsob a zařízení podle předloženého vynálezu.

Podstata vynálezu

Předmětem předloženého vynálezu je způsob provádění elektroforézy na gelu, jehož podstata spočívá v tom, že na gel se vloží elektrické pole mající charakter pseudonáhodné sekvence s časově stabilní dopřednou výslednicí elektrického pole. Elektrické pole může být vloženo přímo nebo může být generováno indukcí z pole magnetického, může být pulzní nebo spojitě.

Elektroforetickou separaci molekul omezuje zejména „zaplétání“ separovaných molekul do struktury gelu. Účelem všech dosud známých elektroforetických metod je co nejvíce randomizovat pohyb molekul vzorku gelem, a tím snížit pravděpodobnost nevratného „zapletení“ molekuly vzorku do struktury gelu. Úspěšnost všech nyní používaných elektroforetických metod je limitována právě tím, jak jsou schopny omezit vliv tohoto jevu. Tento jev se uplatní nejméně v případě, že pohyb elektroforeticky separovaných molekul

gelem bude co možná nejnáhodnější, ovšem při zachování dopředné výslednice tohoto pohybu tak, aby na gelu vznikl „elektroforetický běh“. Toho je technicky dosaženo tak, že na gelu působící elektrické pole je v uživateli zvolených mezích pseudonáhodné s uživatelem zvolenými statistickými parametry tak, aby existovala časově stabilní dopředná výslednice elektrického pole. Způsob podle vynálezu se provádí například vložení pseudonáhodného elektrického pole na úplnou nebo neúplnou dvojrozměrnou nebo trojrozměrnou matici elektrod, generováním elektrického pole za pomoci náhodného či pseudonáhodného magnetického pole, mechanickým pohybem gelu vůči elektrickému nebo magnetickému poli, nebo jakoukoliv kombinací uvedených metod.

Konkrétní trajektorie konkrétních molekul prostupujících gelem je náhodná veličina a spektrum trasy se blíží k bílému šumu. Pokud odhlédneme od nelineárních jevů vznikajících při nárazech molekul a při polarizaci molekul, od čistě náhodného bílého šumu se liší jen výsledným dopředným pohybem, který je způsoben tím, že převažující směr elektrického pole je směr kupředu. „Zaplétání se“ molekul vzorků mezi molekuly gelu je rovněž náhodný jev se spektrem blízkým bílému šumu.

Způsob provádění elektroforézy podle předloženého vynálezu lze aplikovat do všech nyní existujících elektroforetických metod jako jejich modifikaci.

Předmětem předloženého vynálezu je dále zařízení k provádění způsobu podle předloženého vynálezu, obsahující nádobu na elektroforetický gel, elektrody a zdroj elektrického pole, jehož podstata spočívá v tom, že obsahuje matici elektrod. Matice elektrod může být dvojrozměrná nebo trojrozměrná. Pro různou požadovanou kvalitu elektroforetického procesu lze použít různé počty a velikosti elektrodových plošek v matici. Elektrody mohou být uspořádány pravidelně a pravoúhle nebo jakýmkoliv jiným nepravidelným způsobem. Matice může, ale nemusí být realizována jako úplná, vyplněná, pro menší nároky lze část elektrod tvořících matici vynechat, tedy matice může být neúplná. Jednotlivé elektrodové plošky v matici mohou být využívány jako elektrody budící, měřicí nebo obojí. V praxi budou často zachovány pouze obvodové elektrody. Ve výhodném provedení vynálezu je pak v prostoru nádoby, kde probíhá elektroforéza, vložena alespoň jedna měřicí elektroda. Tato elektroda (elektrody) slouží pro linearizaci běhu.

Nádobou na elektroforetický gel může být kterákoliv nádoba používaná v dosud známých elektroforetických metodách, jako je např. podložka pod gel, vanička atd.

Budící elektrody jsou buzeny matematicky konstruovaným signálem tak, aby v elektroforetickém prostoru vznikalo budící elektrické pole s pseudonáhodnou sekvencí s časově stabilní dopřednou výslednicí elektrického pole. Časová stabilita této výslednice je nutná, protože polarizace molekul vzorku není lineární děj. Tato časová stabilita je nutná i z praktických důvodů - aby uživatel mohl elektroforézu přerušit předčasně a měl k dispozici hodnotitelný výsledek.

Generování pseudonáhodného časového průběhu budícího elektrického pole je možné provádět například následujícími způsoby:

- Pseudonáhodná budící sekvence může být do přístroje vložena uživatelem, například jako výsledek jeho empirie.
- Pseudonáhodná budící sekvence může být generována přístrojem jako součet náhodné sekvence uživatelem zadaných statistických parametrů s nulovou střední hodnotou a konstantního elektrického pole uživatelem zadané hodnoty.
- Pseudonáhodná budící sekvence může být generována v reálném čase během běhu elektroforézy na základě měření skutečného elektrického pole v prostoru elektroforézy tak, aby toto skutečné elektrické pole v prostoru elektroforézy splňovalo uživatelem zadaný rozsah povolených statistických hodnot. Toto je realizováno tak, že se kontinuálně měří prostorové parametry generovaného elektrického pole, tyto se statisticky vyhodnocují a následný úsek pseudonáhodné sekvence budícího pole se vygeneruje jako náhodná sekvence s parametry náhodnosti takovými, aby se statistické parametry výsledného pole trvale udržely v požadovaných mezích.
- Pseudonáhodným pohybem gelu vůči elektrodovému systému s elektrickým polem s dopřednou výslednicí nebo vůči magnetickému poli. Elektrické pole může být v tomto případě časově stabilní nebo proměnné, např. určené pseudonáhodnou sekvencí. Pohyb gelu může být realizován i jako změna úhlu v trojrozměrném prostoru. Pro tento způsob provedení vynálezu je vhodné zařízení, obsahující nádobu na elektroforetický gel, elektrody a zdroj elektrického pole, v němž je nádoba na elektroforetický gel uspořádána pohyblivě vůči elektrodám nebo vůči magnetickému poli.

Zařízení podle vynálezu umožňují aplikovat způsob provádění elektroforézy podle předloženého vynálezu jako zdokonalení nyní existujících elektroforetických metod. A to buď jako externí technické zařízení, které se aplikuje společně se zařízením pro provádění elektroforézy na nyní známých principech, nebo jako interní subsystém, který je vnitřní součástí zdokonalující nově vyrobená zařízení vycházející z nyní známých principů provádění elektroforézy. Výše uvedený způsob provádění elektroforézy lze realizovat i jako zcela novou technickou konstrukci elektroforetického generátoru, elektroforetického elektrodového systému a elektroforetické komory.

Přehled obrázků

Obr. 1 ukazuje schematicky základní dvuelektrodový systém vhodný pro stejnosměrnou nebo pulzní elektroforézu. Na gel 4 jsou umístěny elektrody 1 a 3. Různé molekuly vzorku se působením tohoto pole pohybují různou rychlostí a vytvářejí tak proužky 2.

Obr. 2 ukazuje schematicky systém obsahující více než dvě elektrody, vhodný např. pro pulzní elektroforézu. Na gelu 5 je umístěn systém šesti elektrod 6.

Obr. 3 ukazuje schematicky systém pro provedení metody OFAGE, kde jsou na gel 9 umístěny dvě dvojice elektrod, přičemž je na elektrody 8 a 8' vloženo jedno napětí, na elektrody 7 a 7' je vloženo jiné napětí a působí zde kombinace dvou nehomogenních elektrických polí.

Obr. 4 ukazuje schematicky systém pro provedení metody PFGE, kde jsou na gel 12 umístěny dvě dvojice elektrod, přičemž je na elektrody 10 a 10' vloženo jedno napětí, na elektrody 11 a 11' je vloženo jiné napětí. Je při ní aplikována kombinace homogenního a nehomogenního elektrického pole.

Obr. 5 ukazuje schematicky systém pro provedení metody TAFE, kdy je gel 13 umístěn vůči dvojicím elektrod 14, 14' a 15, 15' vertikálně, působící elektrická pole vložena na dvojice elektrod jsou homogenní.

Obr. 6 ukazuje schematicky systém podle příkladu 2.

Obr. 7 ukazuje schematicky systém podle příkladu 3.

Obr. 8 ukazuje schematicky systém podle příkladu 4.

Obr. 9 ukazuje schematicky systém podle příkladu 5.

Obr. 10 znázorňuje schematicky uspořádání elektrod do úplné matice.

Příklady

Příklad 1

Způsob podle vynálezu lze aplikovat v jakémkoliv v současné době známém elektroforetickém systému tak, že se zajistí pseudonáhodný mechanický pohyb gelu vůči elektrodám. Lze to ukázat na známém uspořádání dvouelektrodivého systému podle obr. 1, kdy uživatel rukou náhodně pohybuje gelem či elektrodou.

Příklad 2

Zařízení podle příkladu 2 je znázorněno na obr. 6, kde je v prostoru mezi elektrodami 17 a 18, na něž je vloženo stejnosměrné nebo pulzní pole, umístěna otočně podložka 19, na níž je položen gel 20. Podložkou 19 se otáčí pomocí pohonné jednotky, např. elektromotorku, o náhodně generované úhly v rozmezí 0 – 90°. Úhly otočení mohou být generovány jakýmkoliv generátorem náhodných čísel.

Příklad 3

Zařízení podle příkladu 3 je znázorněno na obr. 7, kde je nádoba 21 s elektroforetickým gelem vložena do těla solenoidu 24, v rovině kolmé na podélnou osu nádoby 21 jsou umístěny dvojice elektrod 22, 22' a 23, 23', na něž je vloženo homogenní elektrické pole. Na solenoid 24 je přiváděn proud z generátoru šumu, čímž se generuje náhodné magnetické pole, stabilní dopřednou výslednici zajišťuje homogenní elektrické pole vkládané na dvojice elektrod 22, 22' a 23, 23'. Jedná se o metodu TAFE s aplikací způsobu podle vynálezu.

Příklad 4

Zařízení podle příkladu 4 je schematicky znázorněno na obr. 8. Na gelu 25 je neúplná matice elektrod: jsou ponechány obvodové elektrody 26 a některé vnitřní elektrody 27 matice, které lze použít k měření pole v daných místech gelu 25. Na všechny obvodové elektrody 26 je přivedeno napětí z generátorů šumu, ponechané vnitřní elektrody 27 měří skutečnou hodnotu výslednice proudového pole vznikajícího na gelu 25, tato informace je využita ke zpětnovazební modulaci amplitudy generátorů šumu budících obvodové elektrody 26. Zpětnovazební mechanismus udržuje požadovanou dopřednou výslednici vznikajícího proudového pole.

Příklad 5

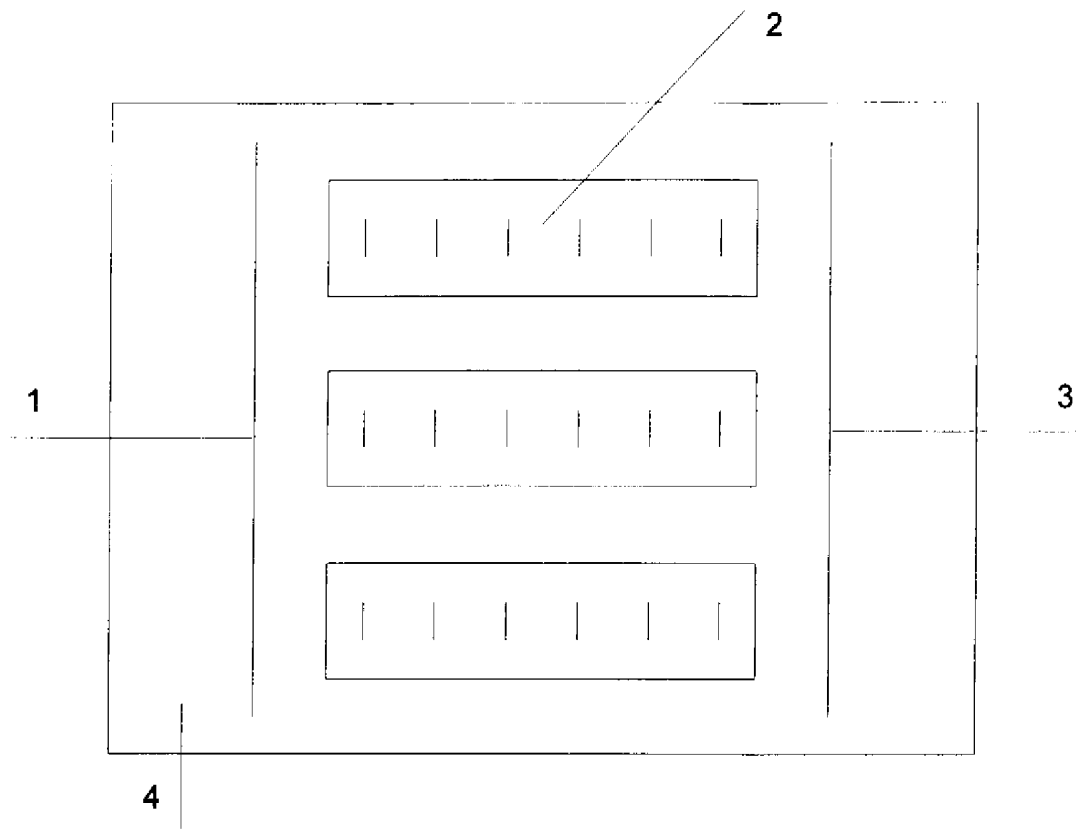
Zařízení podle příkladu 5 je schematicky znázorněno na obr. 9. Na gelu 28 je neúplná matice elektrod: jsou ponechány pouze obvodové elektrody 29. Buzení probíhá stejně jako v příkladu 4, pouze regulační informace pro zpětnou vazbu je získávána nikoliv z měření skutečného pole na gelu vnitřními elektrodami, ale z matematického modelování pole vznikajícího na gelu 28.

Průmyslová využitelnost

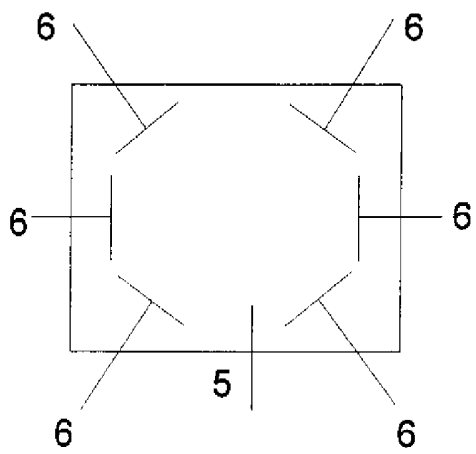
Způsob a zařízení podle předloženého vynálezu jsou využitelné i pro větší molekuly než umožňuje bodová elektroforéza. Pro menší molekuly elektroforéza způsobem podle předloženého vynálezu probíhá rychleji a v gelu vznikají ostřejší pruhy než je tomu u elektroforézy pulzní. Elektroforetický systém využívající tento způsob lze vždy navrhnout tak, aby vznikaly pouze rovné běhy se stejnou rychlostí postupu ve všech oblastech gelu, pokud je gel homogenní.

PATENTOVÉ NÁROKY

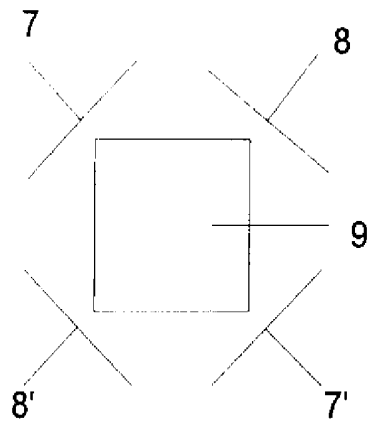
1. Způsob provádění elektroforézy na gelu, vyznačený tím, že na gel se vloží elektrické pole mající charakter pseudonáhodné sekvence s časově stabilní dopřednou výslednicí elektrického pole.
2. Způsob podle nároku 1, kde elektrické pole je generováno indukcí z pole magnetického.
3. Způsob podle nároku 1, kde elektrické pole je pulzní
4. Způsob podle nároku 1, kde elektrické pole je spojitě.
5. Způsob podle nároku 1, kde působení elektrického pole majícího charakter pseudonáhodné sekvence s časově stabilní dopřednou výslednicí elektrického pole se dosáhne pseudonáhodným pohybem gelu vůči elektrodovému systému s elektrickým polem s dopřednou výslednicí nebo vůči magnetickému poli.
6. Zařízení k provádění způsobu podle nároku 1, obsahující nádobu na elektroforetický gel, elektrody a zdroj elektrického pole, vyznačené tím, že obsahuje dvojrozměrnou nebo trojrozměrnou úplnou nebo neúplnou matici elektrod.
7. Zařízení k provádění způsobu podle nároku 5, obsahující nádobu na elektroforetický gel, elektrody a zdroj elektrického pole, vyznačené tím, že nádoba na elektroforetický gel je uspořádána pohyblivě vůči elektrodám nebo vůči magnetickému poli.



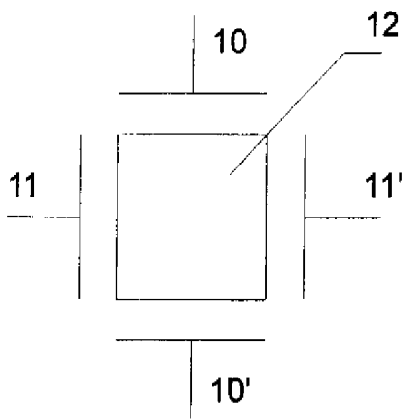
Obr. 1



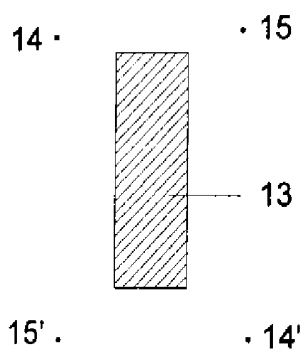
Obr. 2



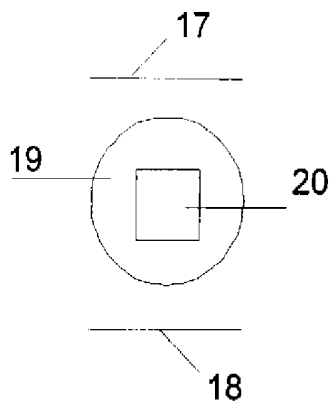
Obr. 3



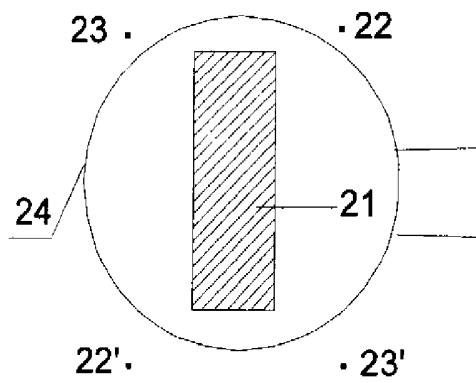
Obr. 4



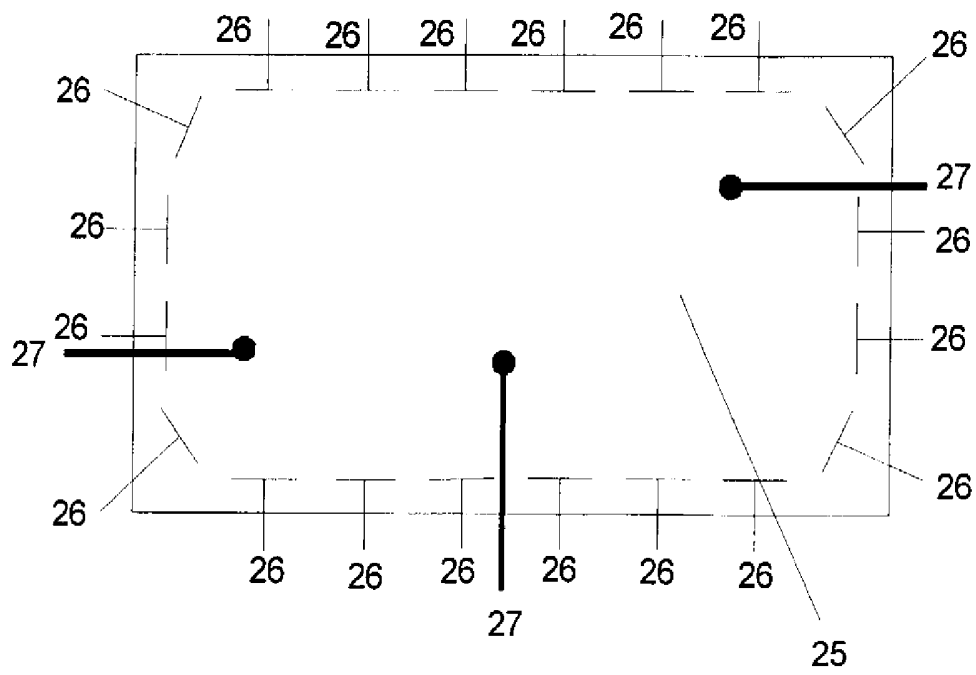
Obr. 5



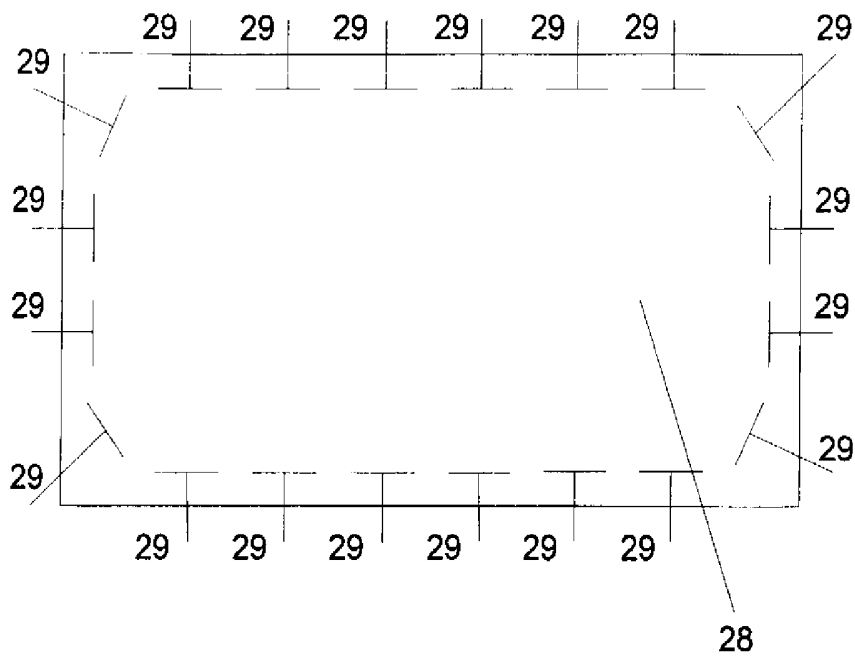
Obr. 6



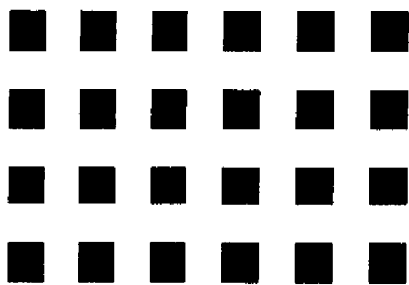
Obr. 7



Obr. 8



Obr. 9



Obr. 10