

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **14.02.2012**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **13.03.2013**
(Věstník č. 11/2013)

(21) Číslo dokumentu:

2012-100

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C07K 1/28 (2006.01)
C07K 1/26 (2006.01)

(71) Přihlašovatel:

Ústav analytické chemie AV ČR, v.v.i., Brno, CZ

(72) Původce:

Šlais Karel Doc. RNDr. DrSc., Brno, CZ

(74) Zástupce:

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

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob separace a zkoncentrování amfolytů
isoelektrickou fokusací a zařízení pro
provádění tohoto způsobu**

(57) Anotace:

Způsob separace a zkoncentrování amfolytů diskontinuální isoelektrickou fokusací zahrnující nanášení roztoku amfolytů, které mají být separovány, s přidávkou látek zvyšujících viskozitu roztoku, na proužek netkané textilie, a následné vložení stejnosměrného napětí na proužek prostřednictvím elektrod umístěných na obou koncích proužku, přičemž se rozpouštědlo ponechá během isoelektrické fokusace odpařovat. Zařízení pro provádění nového způsobu, které obsahuje alespoň jedno shora otevřené korytko opatřené na každém konci elektrodou, přičemž do korytka je vložen proužek netkané textilie, a dále obsahuje Cockcroft-Waltonův napěťový násobič o maximální výkonu 3 až 5 mW pro 1 cm délky proužku a maximální napětí 100 až 500 V pro 1 cm délky proužku, který je připojený k elektrodám.

CZ 2012 - 100 A3

Způsob separace a zkoncentrování amfolytů isoelektrickou fokusací a zařízení pro provádění tohoto způsobu

Oblast techniky

Vynález se týká zlepšení elektromigrační metody isoelektrické fokusace (IEF), vhodné zejména pro separaci a zkoncentrování proteinů či dalších amfolytů. Zde se zabýváme IEF v neprotékaném separačním prostoru tvaru proužku o rozměrech typicky 0,5 x 3 x 100 mm.

Dosavadní stav techniky

Isoelektrická fokusace (dále jen IEF) je elektroforetická metoda pro separaci a fokusaci amfolytů. Využívá vlastnosti amfolytů, které v prostředí pH rovném jejich isoelektrickému bodu mají nulovou efektivní rychlost migrace. Proto se amfolyty analyzované směsi fokusují v místě systému, kde je pH rovnající se jejich isoelektrickému bodu. Součástí systému pro IEF je vytvoření pH gradientu podél elektrického pole. V současnosti jsou analyzovanými amfolyty převážně proteiny. Pro stále rostoucí význam jejich analýzy byly vyvinuty jak mikroanalytické varianty IEF – gelová, kapilární, v mikrokanálu, tak preparativní metody diskontinuální i kontinuální. Pro zlepšení separace proteinů se používají v elektroforetických metodách k regulaci rozmývání a elektroforetické migrace gely na bázi polysacharidů a polyakrylamidu. Pro regulaci viskozity se používají látky jako etylenglykol, glycerin, sacharóza a deriváty celulózy jako metylcelulóza, hydroxyetylcelulóza, hydroxypropyl-metylcelulóza a další či jejich kombinace. U dosavadních metod diskontinuální isoelektrické fokusace je minimalizováno odpařování vody ze separačního média například jeho pokrytím nepropustnou fólií nebo vrstvou parafinového oleje. U IEF je charakteristickým jevem postupné snižování elektrické vodivosti separačního prostoru během separace až o několik řádů. Proto se pro diskontinuální IEF používají programované zdroje stejnosměrného napětí. Typická doba analýzy je závislá na délce proužku a pohybuje se od cca 4 hodin pro délku kolem 50 mm a 1 až 2 dny pro proužky o délce kolem 200 mm. Pro zamezení nežádoucích rozkladů během separace se udržuje teplota separačního proužku v blízkosti nad 0 °C účinným chlazením.

Mezi nevýhody dosavadní metody gelové IEF patří zejména problémy při zpracování gelu se separovanými proteiny, které se získávají z gelu komplikovaně a neúplně, protože polymerní charakter gelu brání difuzi proteinů mimo gel. Typickým řešením bývá vybarvení a

enzymatické štěpení proteinů přímo v gelu a následná extrakce fragmentů proteinů. Dále, při postupu separace a před zpracováním proužku není známa hodnota pH v tom kterém místě proužku, proteiny v proužku je třeba vybarvovat a porovnávat se separací standardů za stejných podmínek. Tento problém částečně řeší proužky s imobilizovaným pH gradientem (immobilized pH gradient, IPG). Protože se však do separačního média přidává řada látek ovlivňujících polohu a rychlost ustavení pH gradientu, je třeba vždy srovnávací separace. Tím se pracnost a doba analýzy dále zvyšuje až o jeden den. I dávkování analyzovaného roztoku trvá mnoho hodin až jeden den neboť se typicky realizuje vsakováním vzorku do komerčně dodávaného vysušeného proužku gelu naneseného na plastovou fólii. Problémem je i nutnost použít optimalizovaný program napětí vloženého na proužek. Při změně složení pracovního média, například při aplikaci jiného analyzovaného roztoku, často dojde ke zcela nevyhovujícímu průběhu separace, přičemž se chyba pozná až po několikadenním procesu zahrnujícím dávkování vzorku, separaci a vybarvování. Často je požadována separace více vzorků paralelně, použití jednoho programovaného zdroje napětí pro více proužků současně je problematické. Protože většina biologických tekutin obsahuje značné množství solí, je třeba před separací buďto provést zvlášť odsolení, nebo odsolovat na počátku IEF separace, což může trvat až 1 den.

Pro odstranění těchto a dalších nevýhod jsou stále vyvíjeny metody IEF které nepotřebují gelovou matici a které jsou souhrnně zvané elektroforéza ve volném roztoku (free flow electrophoresis, FFE), které však dosud zdaleka nedosáhly vlastností schopných rutinně konkurovat gelové IEF.

Dále je známo použití netkané textilie v kontinuální elektroforéze (PV 2008-279, Šlais K., Electrophoresis 2008, 29, 2451⁴²2457). Textilie formuje geometrii toku, umožňuje velmi tenké vrstvy toku, dále nastavení tloušťky vrstvy kapaliny, a je levná ve srovnání se zařízeními založenými např. na paralelních deskách atd. V těchto publikacích netkaná textilie nezpomaluje tok ani nebrání toku a nepřidává se žádná látka zvyšující viskozitu. V kontinuální IEF je doba pobytu kapaliny v zařízení typicky řádu deset až dvacet minut, tj. více než 30x menší čas než při diskontinuální IEF a protékané objemy kolem 10 ml za hodinu a více (při diskontinuální kolem jednoho ml), takže se vliv odpařování se zanedbává a nebo je považován za nežádoucí. Podstatnější úbytek objemu by způsobil problémy s tokem.

Podstata vynálezu

Předmětem předkládaného vynálezu je zlepšení způsobu separace a zkoncentrování amfolytů diskontinuální isoelektrickou fokusací a zařízení k provádění tohoto zlepšeného způsobu, které odstraňují nevýhody dosavadního stavu techniky.

Způsob separace a zkoncentrování amfolytů isoelektrickou fokusací podle předkládaného vynálezu zahrnuje nanesení roztoku amfolytů, které mají být separovány, s přídavkem látek zvyšujících viskozitu roztoku, na proužek netkané textilie, a následné vložení stejnosměrného napětí na proužek prostřednictvím elektrod umístěných na obou koncích proužku, přičemž se rozpouštědlo ponechá během isoelektrické fokusace odpařovat.

Netkaná textilie je s výhodou zhotovená z polymerního materiálu, výhodněji vybraného ze skupiny zahrnující polypropylen, polyester, polyamid, polyetylen, celulóza, polyakrylonitril, viskosa, hydrofilizovaný polypropylen, hydrofilizovaný polyethylen a jejich směsi. Proužek netkané textilie má s výhodou tloušťku 0,1 až 2 mm, šířku 1 až 5 mm a délku 50 až 300 mm.

Látky zvyšující viskozitu roztoku jsou s výhodou vybrány ze skupiny zahrnující ethylenglykol, glycerin, sacharidy (mono- a oligo-) a deriváty celulózy, výhodněji ethylenglykol a glycerin.

Předkládaný způsob tedy umožňuje zkoncentrování a separaci amfolytů, zejména proteinů, odpařovací diskontinuální isoelektrickou fokusací v proužku netkané textilie (non woven fabric) v korýtku. Navržená metoda využívá principu separační metody isoelektrické fokusace amfolytů, která probíhá vlivem vloženého stejnosměrného napětí mezi dvěma elektrodami umístěnými na konci proužku. Zároveň využívá odpařování rozpouštědla, zejména vody, ze separovaného roztoku k zkoncentrování separovaných amfolytů, a záměrně přidaných látek sloužících ke zvýšení viskozity.

Jako zdroj stejnosměrného napětí se s výhodou použije Cockroft-Waltonův napěťový násobič, který je vhodné optimalizovat k tomu, aby zdroj dával určitý maximální výkon vyplývající z rozměrů proužku a maximální napětí vyplývající z délky proužku. Obvyklé napětí je řádu

nad sto voltů na 1 cm délky separační dráhy. Optimální maximální výkon je 3 až 5 mW pro 1 cm délky proužku (5 až 20 mW na 1 cm² plochy proužku) a maximální napětí 100 až 500 V pro 1cm délky proužku. Optimalizací lze dosáhnout toho, že zdroj je použitelný pro jakoukoliv vodivost roztoku použitého k fokusaci bez nutnosti dohledu a programování. Princip napěťového násobiče dovoluje jednoduchou konstrukci zdrojů o maximálním napětí až desítek kV, ve speciálních případech až stovek kV. Jsou popsány i zdroje nezávislé na síťovém napětí, což zvyšuje mobilitu zařízení.

Separovaný roztok v korytce s proužkem netkané textilie je s výhodou umístěn v prostoru chlazeném na 0 až +5 °C, např. v chladničce. Konce proužku jsou v kontaktu s elektrodami (např. grafitové, platinové) přivádějícími napětí ze stejnosměrného zdroje. Zde je jako zdroj s výhodou použit Cockcroft-Waltonův (CW) napěťový násobič tvořený kombinací diod a kondenzátorů. Do roztoku určeného k separaci obsažených amfolytů jsou již před zahájením separace rozpuštěny látky zvyšující viskozitu. V separovaném roztoku nasáklém do proužku netkané textilie dochází vlivem proudu procházejícího mezi elektrodami k fokusaci přítomných amfolytů a k postupnému vytváření pH gradientu. Dále dochází k fokusaci analyzovaných amfolytů, např. proteinů, do míst, kde lokální pH odpovídá jejich isoelektrickému bodu. Separovaný roztok se kontinuálně a stále pomaleji odpařuje v závislosti na teplotě a obsahu a druhu látky regulující viskozitu, až je dosaženo objemu roztoku, který je všechen vsáknutý do proužku v korytce. Poměry jsou voleny tak, aby se značnou časovou rezervou během této doby došlo k dokončení separace. Z výhodných látek zvyšujících viskozitu etylenglykol je blízko optima pro teplotu fokusace 0 až 10 °C, glycerin je vhodný pro teplotu kolem 25 °C. Obě jsou běžně akceptované jako kompatibilní s proteiny a následnými analytickými postupy. Pokud se glycerin použije pro teploty kolem 10 °C, probíhá fokusace pomalu, po dva až tři dny. Další látky jsou méně výhodné, např. pevné cukry (rovněž kompatibilní a jinde používané) lze použít, ale odpaří se do pevného stavu a proužek se přilepí k podložce. Deriváty celulozy (např. hydroxypropylcelulosa) přinášejí problémy pro následné analytické postupy. Další běžné látky jsou málo viskozní, nebo příliš těkavé a nebo drahé. Rychlost odpařování souvisí s řadou parametrů, jejich vztahy jsou pro etylenglykol a glycerin podrobně tabelované v literatuře a na webu. Jde o závislosti např. tenze par, relativní vlhkosti, rosného bodu, na teplotě a složení směsi voda – glykol, voda - glycerin. Zde např. je při teplotě kolem 5 až 10 °C vhodná relativní vlhkost 50 až 60 %, což jsou poměry v běžné chladničce. Při odpařování je pak konečná koncentrace glykolu kolem 70 % a relativní

zvýšení viskozity cca 25 $\times$. Podobné úvahy lze provést i pro teplotu 25 °C, přičemž běžná relativní vlhkost 30 až 40 % je nízká, vede k velmi viskoznímu roztoku a pomalé fokusaci, což lze řešit např. částečným zakrytím proužku v korýtku, což vede k vyššímu obsahu vody v roztoku a vhodně viskozním roztokům. Díky zkoncentrování látek zvyšujících viskozitu roztoku se viskozita roztoku postupně zvyšuje až k dosažení konzistence, která účinně brání pohybu tekutiny v pórech netkané textilie. Tím je účinně zabráněno nežádoucímu míchání separovaných zón vlivem vždy přítomné elektroosmózy. V kontaktu s proužkem v korýtku jsou na jeho koncích pevné elektrody, kterými se vkládá stejnosměrné napětí ze zdroje. Pevné elektrody jsou zhotoveny například z grafitu nebo platiny. Rychlost odpařování vody z korýtky lze zvýšit např. proudem vzduchu z větráku. Odpařování lze zpomalit přiklopem či štítem. Zejména lze odpařování regulovat teplotou a volbou přidané kapaliny, přičemž tyto kapaliny jsou výhodné i pro zlepšení stability proteinů v roztoku.

Pro vizuální orientaci při průběhu separace, odhadu pH gradientu a způsobu dělení proužku pro zpracování proteinů je výhodné do separovaného roztoku přidat před separací barevné amfolyty, což mohou být barevné nebo obarvené proteiny nebo syntetické barevné pl indikátory.

Po ukončení separace lze proužek pohodlně vyjmout z korýtky a skladovat nebo ihned přistoupit ke zpracování separovaných proteinů, zpravidla pro další analýzy. S výhodou lze proužek rozstříhat na úseky, tyto vložit například do zkumavek a proteiny extrahovat vodou nebo vodnými roztoky reagensů ovlivňujících stabilitu a rozpustnost proteinů. Takové reagenty jsou odborníkovi v oboru dobře známy. Extrakce proběhne kvantitativně do 10 minut.

Dále je předmětem předkládaného vynálezu zařízení vhodné pro provádění nového postupu. Toto zařízení obsahuje alespoň jedno korýtko, s výhodou plastové, které je na každém konci opatřeno elektrodou. Korýtko je shora otevřené, tj. například o průřezu tvaru V, U, hranatého U, dole zkoseného V apod. Takto je umožněno volné odpařování rozpouštědla z fokusovaného roztoku. Do korýtky je vložený proužek netkané textilie. Dále zařízení obsahuje jako zdroj napětí CW napěťový násobič o maximálním výkonu 3 až 5 mW pro 1 cm délky proužku a maximálním napětí 100 až 500 V pro 1 cm délky proužku, který je

s výhodou uložen v plastovém obalu, který je zároveň podstavcem pro korýtko, a zdroj napětí je připojený k elektrodám.

V závislosti na velikosti proužku lze separovat desetiny mililitru až mililitry kapaliny, přičemž celkový objem kapaliny v proužku na konci separace je zde kolem 0,1 ml při použití proužku o rozměrech typicky 0,5 x 3 x 180 mm.

Proužek i korýtko jsou jednoduché a levné, takže je lze použít jednorázově, čímž odpadá nutnost čištění systému mezi jednotlivými analýzami.

Zdroj napětí na základě CW násobiče je jednoduchý, levný a konstrukčně malý, takže lze snadno realizovat a použít pro každý proužek nezávislý zdroj. Tím lze provádět separaci na větším počtu proužků nezávisle v různém čase a s různými vzorky.

Způsob a zařízení pro fokusaci podle vynálezu mají oproti dosavadnímu stavu řadu výhod.

Při použití separačního média obsahujícího látku pro regulaci viskozity a umístěného v prostředí netkané textilie dochází zejména v závěru separace ke zmírnění až odstranění nežádoucích konvektivních toků jinak vedoucích k podstatnému zhoršování fokusace. Tím je dosaženo vysoké separační účinnosti srovnatelné s gelovou IEF. Přitom odpadá časově náročná a drahá příprava gelu před separací. Odpadá dlouhodobé dávkování vzorku a rehydratace gelového proužku, dávkování je okamžité.

Originalita řešení spočívá zejména ve využití odpařování během separace. Dosavadní postupy odpařování brání. Zabránění elektroosmotického toku se dosud dosahuje nikoliv prostřednictvím látek zvyšujících viskozitu, ale gelovou maticí, např. polyakrylamidem nebo agarozou. To ale přináší problém se zpětným získáním proteinů po separaci, to až do desítek procent měřeno počtem identifikovatelných proteinů. V tomto směru je nově efekt eliminace elektroosmotického toku dosažen kombinací velmi viskozní kapaliny a netkané textilie. Velké viskozity se nově dosáhne až v průběhu separace a odpařování vody. Látky zvyšující viskozitu navrhované v tomto vynálezu jsou někdy používány pro zvýšení stability proteinů. Dále je nové použití CW násobiče jako malého, levného jednoduchého zdroje napětí o průběhu vhodném pro IEF.

Příklad ^y provedení ^{vynálezu} zařízení podle vynálezu

Příklad 1: Zařízení

Zařízení je tvořeno plastovou krabičkou, ve které jsou umístěny dva nezávislé zdroje napětí založené na 4 stupňovém CW napětěovém násobiči a dávající naprázdno přibližně 2 400 V stejnosměrných, zatím co do zkratu přibližně 0,5 mA a maximální výkon do zátěže 50 mW. Horní stěnou krabičky procházejí vývody výstupního napětí zakončené elektrodami. Na bocích krabičky je přívod síťového napětí a vypínač.

Proužek netkané textilie Vliseline, tloušťka 0,5 mm, šířka 3 mm, délka 175 mm je vložený do korýtko zhotoveného z bílé PVC fólie tloušťky 0,2 mm, délka 180 mm, šířka stran 5 mm. V příkladu jsou použity 2 proužky v korýtkách, která jsou položena na krabičku a připojena k elektrodám. Zařízení tak umožňuje provádět jednu až dvě nezávislé separace současně.

Maximální výstupní výkon 50 mW zde použitého 4 stupňového CW napětěového násobiče napájeného síťovým napětím 220 V je optimalizovaný pro použité rozměry proužku a dodává velký proud na počátku separace, při odsolování až kolem 0,5 mA, zatímco na konci separace až 2,4 kV, přičemž není nebezpečí přehřátí a zároveň fokusace probíhá blízko maximální možné rychlosti.

Příklad 2: Způsob provedení isoelektrické fokusace (separace a fokusace barevných pI markerů)

Roztok určený k separaci: V celkem 0,5 ml vodného separovaného roztoku je 0,1 ml roztoku směsi pI markerů, 0,2 ml roztoku nosných amfolytů, 0,1 ml etylenglykolu, 0,1 ml 0,1 mol/l K_2SO_4 .

Postup:

Separace a fokusace je prováděna na zařízení popsaném v příkladu 1. Na krabičku se zdroji jsou položena korýtko s proužky tak, aby elektrody směřovaly dovnitř konců korýtek. Roztok určený k separaci je vnesen do korýtko s vloženým proužkem, na každý proužek 0,5 ml roztoku, přičemž kapalina se rozpije podél celého proužku a její část zůstane mimo proužek. K proužkům jsou přiloženy elektrody a zapnuty zdroje napětí, proud přes proužek je 400 mikroampér při 40 V. Celá souprava je vložena do chladničky s teplotou + 3 °C a nucenou

vnitřní cirkulací vzduchu. Po 16 hodinách byl proud přes proužek 8 mikroampér při 2400 V a pI markery byly fokusovány do vzájemně oddělených zón širokých 1 až 5 mm plynule pokrývajících celý pH gradient pH 2 až 10. Ionty silných elektrolytů jsou separovány mimo gradient.

Závěr: Konečný výsledek separace a fokusace na proužku netkané textilie má parametry blízké fokusaci IEF na gelovém proužku.

Průmyslová využitelnost

Způsob a zařízení jsou využitelné pro analýzy v potravinářství, biotechnologiích, farmacii, kde je potřeba izolovat proteiny či jiné amfolyty z biologických materiálů a čistit pro další analýzy.

14.02.12
~~2012-100~~
~~Tisk~~

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob separace a zkoncentrování amfolytů diskontinuální isoelektrickou fokusací, vyznačující se tím, že zahrnuje nanesení roztoku amfolytů, které mají být separovány, s přídavkem látek zvyšujících viskozitu roztoku, na proužek netkané textilie, a následné vložení stejnosměrného napětí na proužek prostřednictvím elektrod umístěných na obou koncích proužku, přičemž se rozpouštědlo ponechá během isoelektrické fokusace odpařovat.
2. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že netkaná textilie je zhotovená z materiálu vybraného ze skupiny zahrnující polypropylen, polyester, polyamid, polyetylen, celulóza, polyakrylonitril, viskosa, hydrofilizovaný polypropylen, hydrofilizovaný polyetylen a jejich směsi.
3. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že proužek netkané textilie má tloušťku 0,1 až 2 mm, šířku 1 až 5 mm a délku 50 až 300 mm,
4. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že látky zvyšující viskozitu roztoku jsou vybrány ze skupiny zahrnující ethylenglykol, glycerin, monosacharidy, oligosacharidy a deriváty celulózy, s výhodou ze skupiny zahrnující ethylenglykol a glycerin.
5. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že roztok amfolytů dále obsahuje barevné amfolyty, s výhodou syntetické barevné pí indikátory nebo barevné či obarvené proteiny.
6. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že jako zdroj napětí se použije napěťový násobič tvořený kombinací diod a kondenzátorů, s výhodou Cockroft-Waltonův napěťový násobič.
7. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že po ukončení isoelektrické fokusace jsou separované a zkoncentrované látky z proužku netkané textilie a nebo jeho částí extrahovány do roztoku vodou a vodnými roztoky reagentů ovlivňujících stabilitu a rozpustnost proteinů.

8. Způsob podle kteréhokoliv předcházejících nároků, vyznačující se tím, že se isoelektrická fokusace provádí při teplotě v rozmezí 0 až 5 °C.

9. Zařízení pro provádění způsobu podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, vyznačující se tím, že obsahuje alespoň jedno shora otevřené korýtko, které je na každém konci opatřeno elektrodou, přičemž do korýtko je vložen proužek netkané textilie, a dále obsahuje Cockroft-Waltonův napěťový násobič o maximálním výkonu 3 až 5 mW pro 1 cm délky proužku a maximálním napětí 100 až 500 V pro 1 cm délky proužku, který je připojený k elektrodám.