PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2014-631

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/50	(2006.01)
H01J 49/00	(2006.01)
C07K 1/22	(2006.01)

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **16.09.2014**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **30.03.2016**

(Věstník č. 13/2016)

(71) Přihlašovatel:
RNDr. Petr Novák, Ph.D., Dolní Břežany, CZ
Michael Volný, Ph.D., Praha 4, CZ
RNDr. Petr Pompach, Ph.D., Mratín, CZ
MUDr. Viktor Růžička, Rýmařov, CZ

(72) Původce:
RNDr. Petr Novák, Ph.D., Dolní Břežany, CZ
Michael Volný, Ph.D., Praha 4, CZ
RNDr. Petr Pompach, Ph.D., Mratín, CZ
MUDr. Viktor Růžička, Rýmařov, CZ

(74) Zástupce:
KANIA, SEDLÁK, SMOLA
Patentová a známková kancelář, Mgr. Martina Dvořáková, Mendlovo nám. 1a, 603 00 Brno

(54) Název přihlášky vynálezu:

Způsob modifikace povrchů bílkovinami pro prekoncentraci analytu pro desorpčně-ionizační techniky hmotnostní spektrometrie a imunochemické eseje

(57) Anotace:
Podstatou technického řešení je způsob provedení modifikace pevných substrátů bílkovinami pro účinnou povrchovou prekoncentraci analytu z vícesložkových vzorků před detekcí založenou na desorpčně-ionizační hmotnostní spektrometrii a imunochemických esejí. Předmětem ochrany je způsob modifikace povrchů používaných jako substráty pro desorpčně-ionizační hmotnostní spektrometrii a imunochemické eseje. Způsob je založen na elektronebulizaci (elektrosprejování) roztoku bílkovin, v závislosti na zamýšlené aplikaci enzymů, lektinů nebo protilátek. Vzniklý nabitý elektrosprej je vysušen v reálném čase průchodem odpařovacím prostorem a utvořený svazek desolvatovaných iontů dopadá na povrch, na který je pevně naváže. Takto modifikovaný povrch potom může být použit pro selektivní interakci s afinitním partnerem deponované bílkoviny, jeho prekoncentrací nebo enzymatickou modifikací s následnou analýzou desorpčně-ionizační hmotnostní spektrometrií nebo pomocí imunochemických esejí.

CZ 2014 - 631 A3

Způsob modifikace povrchů bílkovinami pro prekoncentraci analytu pro desorpčně-ionizační techniky hmotnostní spektrometrie a imunochemické eseje

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu modifikace povrchů substrátů bílkovinami pro účinnou povrchovou selektivní prekoncentraci analytu ze složitých směsí před detekcí založenou na desorpčně-ionizační hmotnostní spektrometrii a imunoesejích.

Dosavadní stav techniky

Moderní biochemické testy, používané ve zdravotnictví, veterinární praxi, výzkumu i v průmyslu, jsou velmi často založeny na interakci bílkoviny s jejím biologickým partnerem. V případě, že je bílkovinou protilátka a stanovovaným analytem příslušný antigen, hovoří se většinou o imunotestech respektive imunoesejích. V běžném provedení je bílkovina ukotvena na pevný povrch (například na destičku nebo kuličku), což umožňuje manipulaci poté, co došlo k navázání analytu na bílkovinu. Je možné kuličky s komplexem bílkovina-analyt vyjmout z roztoku směsného vzorku nebo zbytek vzorku z destičky před detekcí omýt, zatímco analyt zůstává ukotven na povrchu díky interakci s bílkovinou. Zásadní výhodou této kategorie testů je velká specificita a obohacení sledovaného analytu, jenž významným způsobem napomáhá zlepšení limitu detekce a limitu stanovitelnosti.

Pro stanovení analytu specificky obohaceného pomocí interakce s bílkovinou může být použita celá řada metod a technik. Jednou z klíčových podmínek je kompatibilita s použitým povrchem, který slouží jako substrát pro analýzu. Významnou alternativou ke stávajícím metodám detekce jakými jsou například chemiluminiscence, fluorescence nebo radiace je použití desorpčně-ionizační hmotnostní spektrometrie. Při této technice je analyt z povrchu desorbován za současné ionizace, zaveden do hmotnostního analyzátoru a následně detekován. Energetickým impulsem pro desorpční ionizaci je nejčastěji laserový paprsek, ale může být použit například i svazek nabitých či neutrálních částic, plazma či elektrický výboj, elektrické pole, proud horkých par rozpouštědla nebo svazek nabitých kapiček rozpouštědla. Výhodou desorpčně-ionizační hmotnostní spektrometrie v porovnání s převládající fluorescenční či radiační detekcí je její vysoká specificita a možnost získat větší množství informací o detekovaném iontu, vzniklém ionizací molekuly analytu, v porovnání s klasickými detekčními technikami.

První technologie modifikovaných povrchů pro desorpčně-ionizační hmotnostní spektrometrii byla pojmenována SELDI (Surface-enhanced laser desorption/ionization) (Hutchens TW and Yip TT. "New desorption strategies for the mass spectrometric analysis of macromolecules." Rapid Commun Mass Spectrom 7: 576-580 (1993). Méně specifické SELDI povrchy, které vážou celé skupiny analytů, byly vyvinuty s různými organickými materiály na povrchu ((a) Tang N, Tornatore P, Weinberger SR (2004). "Current developments in SELDI affinity technology". *Mass spectrometry reviews* 23 (1): 34–44; (b) Law K.P, Larkin J.R.: Anal Bioanal Chem (2011) 399:2597–2622), s celou řadou komerčních označení (například CM10 – slabý iontoměnič, Q10- silný iontoměnič, H50 – hydrofobní reverzní chromatografický povrch, IMAC30 - fosfopeptidy vázající povrch). Více specifické SELDI povrchy s navázanými bílkovinami, včetně protilátek, jsou potom založené na použití zlaté vrstvy, která je díky reaktivitě zlata schopna navázat celou řadu biologických molekul (US6579719; US6844165; US 6881586). Nevýhodou tohoto řešení je nespecifická vazba všech bílkovin ve vzorku na původní zlatý povrch, což vede ke snížení specifické detekce příslušného analytu, protože na povrch se naváže nejen příslušný partner ukotvené bílkoviny, ale také řada dalších molekul schopných reakce se zlatým povrchem. Alternativním způsobem navázání molekuly na povrch je například derivatizace povrchu N-Hydroxysukcinimidem, který je schopen vazby s biologickou molekulou skrze libovolnou nechráněnou aminoskupinu (US20070059769 A1, WO2005088310A2,WO2005088310A3, WO2005088310A9). Další chemickou modifikací povrchu, která umožňuje navázání bílkovin, je modifikace substrátu kyselinou fenylboritou, karboxyarylboritou nebo aminofenylboritou. Takto modifikované povrchy jsou použitelné jako substráty i pro imunoeseje. (Liu and Scouten, J Mol Recognit. 1996 September-December; 9(5-6):462-7; Lee et al, J Am Soc Mass Spectrom. 2005 September; 16(9):1456-60, Farah et al, Biochim Biophys Acta. 2005 Oct. 10; 1725(3):269-82). Povrchy modifikované kyselinou fenylboritou nebo karboxyarylboritou byly použity pro navázání glykosilovaných bílkovin ze vzorku s následnou detekcí pomocí desopčně-ionizační hmotnostní spektrometrie, konkrétně MALDI-MS (Gontarev et al. Rapid Communications in Mass Spectrometry 2007, 21(1): 1-6 and Shmanai Journal of Mass Spectrometry 2007 November, 42 (11): 1504-1513 a US 20080116367 A1). Pro použití v kombinaci s desorpčně-ionizační hmotnostní spektrometrií je ale z důvodů lepšího přenosu náboje a tím i účinnější ionizace výhodné používat postupy, které umožňují navázání bílkoviny přímo na kovový povrch (který představuje substrát pro měření hmotnostní spektrometrií) bez nutnosti použít chemickou mezivrstvu. Většinu kovů (například nerezovou ocel nebo hliník) ale není možné modifikovat bílkovinami přímo, protože za běžných podmínek v roztoku nedochází

k žádné povrchové reakci. Pro modifikaci povrchů z nerezové oceli bílkovinami použil Volny (Volny M. et al. Anal Chem 2005 Aug;77(15):4890-6) metodu takzvaného *reactive landing*. Tento postup úpravy povrchu se odehrává ve vakuu a povrch je bombardován desolvatovanými ionty, které byly získány měkkou elektrosprejovou ionizací příslušných bílkovin z roztoku. Nabité ionty bílkoviny, které v metodě *reactive landing* podle Volny et al. (Volny M. et al. Anal Chem 2005 Aug;77(15):4890-6) narážejí do povrchu a modifikují jej, se pohybují ve vakuu v prostředí s dostatečně dlouhou střední volnou dráhou na to, aby mohly být externím elektrostatickým polem urychleny na výrazně hypertermální energii až napětím 20V, což by při dopadu odpovídalo více než tisícinásobku průměrné translační kinetické energie při laboratorní teplotě (dle aproximace založené na kinetické teorii plynů). K modifikaci povrchu tak dojde v důsledku energie iontu při dopadu na povrch – jedná se tedy o kinetickou energií indukovanou reakci. Metoda poskytuje kvalitní a mechanicky stálou modifikaci povrchu. Nevýhodou tohoto postupu je nepřiměřená délka celého procesu přípravy povrchu – až několik hodin a malá účinnost převodu do vakua, která vede k velké spotřebě roztoku bílkoviny. K provedení je navíc zapotřebí zkonstruovat speciální přístroj, do kterého se vloží povrch určený k modifikaci. Přístroj se potom vypumpuje tak, aby v něm bylo vakuum, které se musí udržovat po celou dobu modifikace. Po dosažení vakua se na povrch kolizně přistávají ionty o hypertermální energii po dobu přibližně tří hodin. V přístroji tak lze připravit jen několik vzorků denně a tomu odpovídá i potenciální cena jedné modifikace.

Zde předkládaný způsob modifikace povrchu pro desorpčně-ionizační hmotnostní spektrometrii bílkovinami podle vynálezu je také založen na elektrosprejové depozici suchých iontů, ale nevyžaduje vakuovou aparaturu a desolvatace elektrosprejovaných iontů je dosaženo nikoliv převodem do vakua, ale při atmosférickém tlaku tepleným vysušením elektrosprejového aerosolu ve speciálně vyhřívaném odpařovacím prostoru. Od postupu použitém v metodě dle Volny M. et al. výše se tedy tato nová technika liší jak v mechanismu modifikace povrchu, tak i v technickém provedení.

V PCT/CZ2011/000118 (WO2012/079549); a Krasny et al. J Mass Spectrom 2012 Oct;47(10):1294-302, je popsána metoda modifikace povrchu substrátů pro stanovení fosfopeptidů pomocí desorpčně-ionizační hmotnostní spektrometrie, přičemž se povrch substrátu modifikuje roztokem organokovových sloučenin prvků skupiny 4B, a to Ti, Zr a Ha, pomocí elektrosprejování.

Předkládaný vynález používá pro modifikaci povrchu podobný postup jako je uveden v (PCT/CZ2011/000118 (WO2012/079549); a Krasny et al. J Mass Spectrom 2012 Oct;47(10):1294-3021), avšak místo elektrosprejování organokovových sloučenin prvků 4B

skupiny se používají molekuly bílkovin jakými jsou enzymy, lektíny a protilátky, které i po navázání na povrch zůstávání stabilní a vykazují biologickou aktivitu. Tím je dosaženo úplně jiného použití předmětného vynálezu. V (PCT/CZ2011/000118 (WO 2012/079549); a Krasny et al. J Mass Spectrom 2012 Oct;47(10):1294-3021) je použito anorganického povrchu k detekci analytu – fosfopetidů, tedy stavebních kamenů fosforylovaných bílkovin. Naopak v předkládaném vynálezu je povrch modifikován bílkovinami a analytem je vždy příslušný afinitní partner dané bílkoviny. Ke změnám došlo také v podmínkách elektrosprejování (napětí, průtok kapaliny s bílkovinou, teplota vyhřívání, zvýšená teplota nosného plynu v důsledku jeho případného předehřívání, čas depozice). Hlavní konstrukční změnou je kapilární uspořádání a použití mikroelektrospreje s průměrem mikrosprejovací jehly v rozmezí 1 až 100 µm.

Technika použitá v tomto vynálezu se odlišuje od elektrosprejových kapičkových depozic, které byly uvedeny například v přehledových článcích (Jaworek et al. J Mater Sci (2007) 42:266–297 a Morozov Adv. Biochem Eng. Biotechnol. 2010, 119: 115-1620), protože v předkládaném vynálezu na povrch dopadají vysušené ionty. Nebližšími technikami k předkládanému vynálezu jsou tak vakuové metody reaktivního přistávání iontů na povrchu (*reactive landing*), termín použitý ve Volny et al *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 4846-4853 a uvedený například v přehledném textu Cyriac et al. Chem Rev 2012 Chem. Rev. 112, 5356-5411. Zatímco při elektrosprejových depozicích na povrch dopadají nabité kapičky nebo mikrokapičky, při reaktivním přistávání dopadají na povrch suché ionty, v daném případě mnohonásobně nabité bílkoviny zbavené solvatačního obalu. Na rozdíl od reaktivního přistávání se však celý proces podle vynálezu odehrává při atmosferickém tlaku a zbavení rozpouštědla (desolvatace) je dosaženo rychlým ohřevem kapiček v odpařovacím prostoru.

Elektrosprejová depozice bílkovin z nabitých kapiček (znovu Jaworek et al. J Mater Sci (2007) 42:266–297) nevytváří sama o sobě dostatečné stabilní vrstvu bílkoviny na povrchu a tato potom vyžaduje další úpravy, například fixaci 70% roztokem glutaraldehydu (Lee et al. Biomaterials 24 (2003) 2045–2051). K uchování aktivity bílkovin při kapičkové elektrosprejové depozici se pak často používá přídání podpůrných činidel, například disacharidů (Morozov *Anal. Chem.*, **1999**, *71* (7), pp 1415–1420).

Podstata vynálezu

Cílem stávajícího vynálezu je poskytnout způsob modifikace povrchu používaného jako substrát pro prekoncentraci analytu pro desorpčně-ionizační techniky hmotnostní spektrometrie a imunochemické eseje, který je založen na přímém navázání bílkoviny na

povrch substrátu. Podstatou způsobu podle vynálezu je, že do uzavřeného prostoru, který je pod napětím [± (200až8000) V] je pod tlakem 0,05 až 0,5 MPa přiváděn nosný plyn a zásobní roztok sprejované bílkoviny, přičemž vzniklý nabitý aerosol vycházející z elektrospreje je zaváděn do odpařovacího prostoru 10 s teplotou v rozmezí 30 až 80°C a vycházející vysušený aerosol je zaváděn na povrch 12 pro modifikaci, který je umístěn za odpařovacího prostorem 10.

Podle výhodného provedení vynálezu je povrch 12 pro modifikaci vodivý s měrným odporem suchého materiálu menším než 10^{20} Ω•m a je pod napětím [± (200až5000) V] opačné polarity vůči napětí na elektrospreji.

Podle ještě dalšího výhodného provedení vynálezu je mezi odpařovacím prostorem 10 a povrchem 12 pro modifikaci ~~je~~ ve vzdálenosti do 3 mm od povrchu 12 pro modifikaci umístěna maska 13, která je pod napětím [± (200až5000) V] opačné polarity vůči napětí na elektrospreji.

Podle ještě dalšího výhodného provedení vynálezu se před vstupem do uzavřeného prostoru nosný plyn předehřívá na teplotu 30 až 80°C, s výhodou 30 až 40 °C. Nevýhody dosavadního stavu techniky, kdy přímé modifikace povrchu substrátu bylo možné dosáhnout pouze ve vakuu nebo pomocí mezivrstvy, překonává předkládaný způsob modifikace povrchu substrátu, kdy k přímé vazbě mezi bílkovinou a povrchem dochází za atmosferického tlaku. Modifikovaný povrch substrátu neobsahuje žádnou mezivrstvu, na které by mohlo docházet k nespecifické vazbě mezi povrchem a dalšími látkami ve vzorku. Pouze analyt, který disponuje specificitou vůči partnerské bílkovině na povrchu, může utvořit vazbu a být selektivně prekoncentrován na povrchu. Další výhodou způsobu modifikace podle vynálezu je univerzálnost. Jak je ukázáno v příkladech, strukturně a chemicky velmi různé bílkoviny mohou být elektrosprejovány a po přistání následně navázány na povrch. Díky tomu je možné připravit celou řadu povrchů se specificitou k široké škále analytů za dobu několika minut.

Předmětem tohoto vynálezu je způsob modifikace povrchů, používaných jednak jako substráty vzorku v desorpčně-ionizačních metodách hmotnostní spektrometrie, tak i jako substráty pro detekci látek pomocí imunoesejí. Modifikace je dosaženo depozicí bílkovin, čímž vznikne biochemicky aktivní povrch, který následně slouží buď k účinné separaci analytu z dávkovaného směsného vzorku a to na principu afinitní interakce mezi bílkovinou na povrchu a jejím ligandem ve stanovovaném vzorku nebo, je-li deponovaná bílkovina enzym, k iniciaci enzymaticky katalyzované reakce, která způsobí modifikaci analytu (například proteolýzu). Modifikace povrchu substrátu vzorku je dosaženo elektrosprejováním roztoků bílkovin při atmosférickém tlaku v přítomnosti nosného plynu, kterým může být

kterýkoliv inertní plyn s výhodou je vybrán ze skupiny obsahující oxid dusný, dusík, helium, neon, argon, krypton, xenon, oxid uhličitý. Sprejem je vytvářen aerosol, který je tímto nosným plynem nebulizován, a při průchodu odpařovacím prostorem vysušen za vniku desolvatovaných iontů bílkovin, které jsou dále vlivem vysokého napětí přiváděny na povrch určený k modifikaci. Překvapivě k této modifikaci dochází navázáním vzniklého desolvatovaného iontu bílkoviny na povrch v důsledku skutečnosti, že desolvatovaný ion zbavený solvatačního obalu rozpouštědla za určité teploty je schopen reagovat i s povrchem, se kterým by reakce za jinak běžných podmínek v roztoku nebyla možná. Elektrické pole vhodné polarity a intenzity slouží k nasměrování a urychlení iontu na povrch. Po vybití náboje zůstává bílkovina v nativním nedenaturovaném stavu a vykazuje stále biologickou aktivitu.

Modifikován může být kterýkoliv pevný povrch alespoň s minimální vodivostí až do měrného elektrického odporu (rezistivity) přibližně 10^{20} Ω•m. Použitými povrchy pro modifikaci mohou být veškeré tepelně stálé kovy, s výhodou jsou vybrány ze skupiny obsahující nerezovou ocel, zlato, hliník, dále je použitelné sklo, tepelně a mechanicky stabilní syntetický polymer, vrstva křemíkových nanostruktur. S výhodou jsou dále použity křemíkové povrchy používané v metodách DIOS (Desorption/Ionization On Silicon) a NIMS (Nanostructure-Initiator Mass Spectrometry). Dále povrchy z uhlíkových nanotrubiček, grafenu, atp. Mikrostruktura nanesené bílkoviny je monitorována pomocí elektronové mikroskopie (obr. 3).

Nesporné výhody řešení jsou v tom, že modifikace je prováděna za atmosferického tlaku, povrch pro modifikaci i elektrosprejovaný roztok jsou při laboratorní teplotě a elektrosprejované kapičky jsou zahřívány při průchodu odpařovacím prostorem, případně i předehřívaným proudem nosného plynu. Zahřátím dojde k odpaření rozpouštědla a vzniku desolvatovaných nabitých iontů. S výhodou se odpařovací prostor zahřeje na teplotu od 30°C do 80°C, výhodněji od 50°C do 80°C. Efektivnějšího fokusování iontů k povrchu je možné dosáhnout vlivem vysokého elektrického potenciálu z externího zdroje opačné polarity než jsou vzniklé ionty, na kterém je držen povrch pro modifikaci nebo maska umístěná v maximální vzdálenosti 3 mm před povrchem. Získá se mechanicky stabilní vrstva bílkovin navázaných na povrch, která je vhodná pro použití za účelem selektivní analýzy pomocí afinitní interakce, a která je stabilní i po omytí vodnými pufry.

Pro modifikaci povrchu bylo použito zařízení (Obr. 1), které se skládá z elektrosprejovací části, odpařovacího prostoru a koncové části obsahující povrch pro modifikaci. Elektrosprejovací část obsahuje rozdělovník ve tvaru T, který je napojen na stříkačkovou pumpu. Stříkačková pumpa vyvíjí tlak na píst v ní umístěné stříkačky, která je naplněná

zásobním roztokem sprejované bílkoviny o koncentraci v rozmezí 0,01 až 100 μmol/l. Termínem „zásobní roztok" je míněn vodný roztok, vodná směs alespoň jednoho organického rozpouštědla nebo organických rozpouštědel, které nezpůsobují srážení, agregaci, deagregaci či denaturaci sprejovaných bílkovin, které jsou v zásobním roztoku rozpuštěny v koncentračním rozsahu 0,01 až 100 μmol/l. S výhodou se použije jako organické rozpouštědlo methanol nebo acetonitril nebo jejich směs. Obsah organického rozpouštědla nebo směsi rozpouštědel ve vodné směsi je až 80 objemových procent (%obj.), s výhodou v rozmezí 1 až 50 objemových procent (%obj). Vhodný vodný roztok nebo organicko-vodná směs může obsahovat pufr jako konjugovaný pár kyseliny (nebo zásady) o koncentraci od 1μM do 1M, kde anion je s výhodou vybrán ze skupiny obsahující CO_3^{2-}, CH_3COO^-, $HCOO^-$, Cl^- a kation s výhodou vybrán ze skupiny obsahující H^+, Na^+, K^+, NH_4^+, triethanolamin, trimethylamin, triethylamin nebo pyridin. Termínem „sprejovaná bílkovina" je míněn vysokomolekulární biopolymer s relativní molekulovou hmotností 10^3 až 10^6 složený z aminokyselin nebo komplex bílkovin rozpustný ve výše zmíněném zásobním roztoku. Vhodnou bílkovinou pro povrchovou modifikaci je protilátka, enzym, lektin a rozpustné bílkoviny.

Termín „protilátka" znamená bílkovina neboli imunoglobulin, který je schopen specificky vázat antigen. Protilátka podle vynálezu je vybrána ze skupiny obsahující imunoglobuliny tříd IgA, IgG, IgD, IgE, nebo IgM, s výhodou antileptin protilátku nebo FGF 21 protilátku (Fibroblast growth factor 21 protilátku).

Termín „enzym" znamená jednoduchou nebo složenou bílkovinu s katalytickou aktivitou. Enzym podle vynálezu je vybrán ze skupiny obsahující oxidoreduktázy, transferázy, hydrolázy, lyázy, izomerázy nebo ligázy, s výhodou proteázy, jako například trypsin nebo pepsin

Termín „lektin" znamená bílkovinu neimunitního původu, která dokáže s vysokou mírou specifity rozpoznávat a vázat sacharidové jednotky, ať už volné nebo vázané na glykobílkovinách nebo glykolipidech. Lektin podle vynálezu je vybrán ze skupiny obsahující konkanavalin A, lektiny z obilných klíčků nebo arašídů, ricin nebo čočkový lektin.

Tlakem na píst stříkačky dochází k pumpování roztoku do kapiláry směrem do rozdělovníku (obvyklá průtoková rychlost 0,05 až 5 μl/min). Rozdělovník je zakončen mikrosprejovací jehlou (průměr v rozmezí 1 až 100 μm). Dále je k rozdělovníku připojen přívod nosného plynu, přičemž tlak jeho ventilu je v rozmezí 0,05 až 0,5 MPa. Nosný plyn může být přiváděn za laboratorní teploty nebo může být předehřát až na 80 °C. S výhodou je předehříván na teplotu v rozmezí 30 až 40 °C. Součástí elektrosprejové části je zdroj

vysokého napětí [± (500 až 8000) V], který je připojený v libovolném vodivém místě na elektrosprejovací část. Odpařovací prostor může být externě vyhřívaný až na teplotu 80 °C v závislosti na termostabilitě bílkoviny, tak aby nedošlo k její denaturaci nebo k ztrátě její aktivity. Koncová část obsahuje povrch pro modifikaci, před kterým může být umístěna maska uzemněná nebo připojená na druhý zdroj vysokého napětí (od 0 do ±8000 V). V případě, že maska není použita, může být napětí připojeno rovnou na povrch pro modifikaci. Vzdálenost masky od výstupu z odpařovacího prostoru je méně než 20 mm a více než 1 mm od povrchu pro modifikaci. V případě, že maska není použita, tak vzdálenost povrchu od výstupu z odpařovacího prostoru je méně než 50 mm.

Proces modifikace probíhá následujícím způsobem: zdroj vysokého napětí je připojen na elektrosprejovací část. Roztok bílkoviny (A) je průtokem v rozmezí 0,01 až 50 µl/min zaváděn do proudu stlačeného (0,05 až 0,5 MPa) nosného plynu, kterým je inertní plyn, s výhodou dusík, argon, helium nebo neon. V důsledku vysokého napětí (+/- 200 až 4000 V) a proudu stlačeného nosného plynu je roztok bílkoviny (A) elektronebulizován ze sprejovací jehly za vzniku nabitého aerosolu (B). Ten je následně zaveden do odpařovacího prostoru, kde dojde k vysušení aerosolu.

Takto vybuzený aerosol se mění v suchý aerosol a následně v iontový svazek (C). Suché nabité částice - ionty, (C) mohou být navíc fokusovány pomocí vysokého napětí (+/- 200 až 4000 V) opačné polarity než je napětí na elektrospreji přivedeného na masku nebo přímo na samotný povrch a díky energii získané rapidním ohřevem jsou navázány na modifikovaný povrch, kde vytvoří makroskopicky homogenní otisk, jehož tvar a velikost je definován tvarem a velikostí otvorů na masce. Pokud není maska použita, pak je velikost a tvar otisku definován průřezem odpařovacího prostoru. Takto modifikovaný povrch může být použit přímo pro selektivní analýzu pomocí imunochemické eseje nebo po nanesení ionizační matrice mohou být vzorky analyzovány desorpčně-ionizační hmotnostní spektrometrií, například pomocí MALDI MS (z anglického Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry).

Tento způsob modifikace povrchu bílkovinami poskytuje kvalitní povrch prostý prasklin a jiných makroskopických nehomogenit přičemž bílkovina je navázána přímo na substrát bez použití jakékoliv mezivrstvy (Obr. 3).

Modifikovaný povrch byl použit pro zjednodušení analýzy biologických vzorků, jak je demonstrováno v příkladech 1 až 3.

Objasnění

Přehled obrázků na výkresech

Obrázek 1: Aparatura pro modifikaci povrchů pro desorpčně-ionizační hmotnostní spektrometrii obsahuje T-rozdělovník 1, stříkačkovou pumpu 2 působící na píst 3 stříkačky 4 se zásobním roztokem A, hadičku 5, mikrosprejovací jehlu 6 na rozdělovníku 1, přívod nosného plynu 7 s možností předehřívání, zdroj vysokého napětí 8 pro elektrosprej připojený na vodivou část 9 stříkačky 4, odpařovací prostor 10, povrch 12 pro modifikaci a masku 13, zdroj vysokého napětí 11 připojený na masku 13 a povrch 12 pro modifikaci. Při průchodu zásobního roztoku sprejerem vzniká nabitý aerosol (B), který se při průchodu případně vyhřívanou trubičkou mění na vysušený aerosol/ iontový svazek (C).

Obrázek 2: Aparatura pro modifikaci povrchů pro desorpčně-ionizační hmotnostní spektrometrii obsahuje T-rozdělovník 1, stříkačkovou pumpu 2 působící na píst 3 stříkačky 4 se zásobním roztokem A, hadičku 5, mikrosprejovací jehlu 6 na rozdělovníku 1, přívod nosného plynu 7 s možností předehřívání, zdroj vysokého napětí 8 pro elektrosprej připojený na vodivou část 9 stříkačky 4, odpařovací prostor 10, povrch 12 pro modifikaci, zdroj vysokého napětí 11 připojený na povrch 12 pro modifikaci. Při průchodu zásobního roztoku sprejerem vzniká nabitý aerosol B, který se při průchodu případně vyhřívanou trubičkou mění na vysušený aerosol/iontový svazek C.

Obrázek 3: Obrázky modifikovaných povrchů získané pomocí elektronové mikroskopie. Horní panel snímků ukazuje mikroskopické porovnání na nerezové oceli deponované bílkoviny před (A) a po omytí (B). Záběr z elektronového mikroskopu dokumentuje odstranění vrstvy bílkoviny, která nebyla navázána na povrch. Prostřední panel snímků ukazuje porovnání povrchů s nanesenou bílkovinou na nerezové oceli po omytí (C) a povrchem z nerezové oceli bez deponované bílkoviny (D). Snímky E a F ukazují mikroskopické porovnání na skleněném povrchu deponované bílkoviny před a po omytí. Spodní panel snímků ukazuje mikroskopické porovnání na skle deponované bílkoviny navázané na povrch po omytí (G) a intaktního skleněného povrchu bez depozice bílkoviny (H).

Obrázek 4: A) Hmotnostní spektrum peptidů lidského haptoglobinu inkubovaného po dobu 2 hodin na povrchu s naneseným trypsinem při 37°C. Nalezené peptidy jsou vyznačeny černě-podtrženou kurzívou a celkově pokrývají 46% sekvence. B) Hmotnostní spektrum peptidů

myoglobinu inkubovaného po dobu 20 minut na povrchu s naneseným pepsinem při 37°C. Nalezené peptidy jsou černě-podtrženou kurzívou a celkově pokrývají 78% sekvence. Identifikace byla provedena pomocí vyhledávacího programu MASCOT (Matrix Science) proti databázi SwissProt.

Obrázek 5: Hmotnostní spektrum tryptických peptidů ß N-acetylhexosaminidázy po nabohacení (černé spektrum) na povrchu s naneseným lektinem konkanavalinem A a před nabohacením (šedé spektrum). Konkanavalin A selektivně interaguje s O-glykosidicky vázanými glykány obsahující manózy (A) a s N-glykosidicky vázanými glykány tzv. vysoce manózového typu (B). Hmotnostní spektrum A ukazuje nabohacení glykopeptidu WVPAATEAPISSFEPFPTPTAGAS (pep) a jeho zkrácené formy WVPAATEAPISSFEPFPTPTAGA (pep*) nesoucí až 6 manóz. Hmotnostní spektrum B představuje nabohacení glykopeptidu ELSDIFPDHWFHVGGDEIQPNCF***NFS***THVTK nesoucího vysoce manózové glykány (šedý čtverec představuje N-acetylglukózamin, šedé kolečko představuje manózu).

Obrázek 6: Hmotnostní spektrum tryptických peptidů směsi imunoglobulínů IgG1 a IgG2 po nabohacení (černé spektrum) na povrchu s naneseným lektinem z pšeničných klíčků (wheat germ agglutinin) a před nabohacením (šedé spektrum). Lektin z pšeničných klíčků selektivně nabohacuje glykopeptidy nesoucí konečný sacharid N-acetyl glukózamin. Ve spektru jsou nabohacené dva glykopeptidy označené jako pep.1 (TKPREEQFNSTFR – IgG2) a pep.2 (TKPREEQYNSTYR – IgG1) nesoucí různé glykánové struktury (šedý čtverec představuje N-acetylglukózamin, šedé kolečko představuje manózu, šedý trojúhelník představuje fukózu a černé kolečko představuje galaktózu).

Obrázek 7: A) Hmotnostní spektrum standartní bílkoviny FGF-21 (Fibroblast growth factor 21) po inkubaci s polyklonální protilátkou proti lidskému FGF-21, která byla nanesena na povrch (černé spektrum). Z intezity signálu bílkoviny je patrné, že i po důkladném promytí povrchu zůstává FGF-21 bílkovina navázaná na protilátku. Šedé spektrum představuje samotný standartní bílkovinu FGF-21 o stejném množství (1pmol). B) UV/VIS spektrum imunoenzymatické reakce měřené po inkubaci FGF-21 antigenu v arteficiálním séru s polyklonální protilátkou proti lidskému FGF-21 nanesenou na povrch. Při vlnové délce 450 nm dochází k výraznému nárustu absorbance na povrchu s navázaným antigenem (černé spektrum) oproti povrchu bez FGF-21 antigenu (šedé spektrum). Vložený obrázek představuje

zachycené fotony CCD (Charge-coupled device) kamerou po imunoenzymatické reakci využívající chemiluminiscenci, která proběhla přímo na povrchu modifikovaném protilátkou proti lidskému FGF-21 (Fibroblast growth factor 21).
C) Hmotnostní spektrum standartní bílkoviny leptinu po inkubaci s polyklonální protilátkou proti lidskému leptinu, která byla nanesena na povrch (černé spektrum). Po odmytí zůstává leptin navázaný na protiláktu. Šedé spektrum představuje samotnou standartní bílkovinu leptin nanesenou ve stejném množství (1 pmol). D) Hmotnostní spektrum leptinu naneseného v přítomnosti arteficiálního séra na povrch modifikovaný polyklonální protilátkou proti lidskému leptinu (černé spektrum). Po promytí povrchu dochází k nabohacení leptinu, který je možno ve spektru identifikovat. Šedé spektrum představuje leptin v arteficiálním séru nanesený na povrch, který nebyl modifikovaný protilátkou.

Obrázek 8: Hmotnostní spektra tryptických peptidů molekuly haptoglobinu po štěpení na povrchu připraveném deponováním trypsinu o koncentracích: A) 0,01 µmol/l, B) 1 µmol/l a C) 100 µmol/l.

Obrázek 9: Hmotnostní spektra tryptických peptidů molekuly haptoglobinu po štěpení na povrchu připraveném deponováním trypsinu v pufru (hydrogen uhličitan amonný) o různé koncentraci: A) 1 µmol/l, B) 1 mmol/l a C) 1 mol/l.

Obrázek 10: Hmotnostní spektra tryptických peptidů molekuly haptoglobinu po štěpení na povrchu připraveném deponováním trypsinu v přítomnosti organického rozpouštědla (acetonitril) o různé koncentraci: A) 0 %obj., B) 40 %obj. a C) 80 %obj.

Obrázek 11: Hmotnostní spektra tryptických peptidů molekuly haptoglobinu po štěpení na povrchu připraveném deponováním trypsinu za různé teploty odpařovacího prostoru: A) 30 °C, B) 50 °C a C) 80 °C.

Příklady ~~provedení~~ uskutečnění vynálezu

Příklad 1 (enzym: Trypsin, Pepsin)

Modifikovaný povrch byl připraven provedením elektrosprejové depozice a přistáváním suchých iontů na povrchu po dobu 60 minut podle následujícího postupu:

Hodnoty na aparatuře z obr. 1 byly nastaveny následujícím způsobem:

Průtoková rychlost pumpy 2: 2µl/min

Napětí ze zdroje 8 přivedené na vodivou část 9 stříkačky 4 : 1500V

Teplota odpařovacího prostoru ve tvaru trubičky 10: 80 °C

Napětí ze zdroje 11 na masce 13: -1500V

Tlak na přívodu nosného plynu 7: 0,25 MPa

Typ nosného plynu: dusík

Teplota nosného plynu: laboratorní teplota (21°C)

Tvar otvoru na masce: kruh o průměru 2 mm

Stříkačková pumpa 2 byla naplněna roztokem trypsinu (pepsinu) o koncentraci 2 µmol/l v 5 mmol/l octan amonný, 30%obj. acetonitril (Roztok A). Zdroj vysokého napětí 8 byl připojen na vodivou část 9 stříkačky 4 se zásobním roztokem, která byla kapilárou 5 spojena s rozdělovníkem 1. Roztok trypsinu (pepsinu) (A) byl stříkačkovou pumpou 2 zaváděn do rozdělovníku, kde byl v důsledku vysokého napětí a proudu stlačeného nosného plynu z přívodu elektronebulizován ze sprejovací jehly za vzniku nabitého aerosolu (B). Vzniklý aerosol byl přiváděn do prostoru 10 ve tvaru trubice o průměru 5 mm, kde došlo k vysušení aerosolu a dále procházel maskou 13 až na povrch z hliníku 12. Po ukončení bylo vypnuto vysoké napětí ze zdroje 8 i zdroje 11, povrch byl vyjmut a opláchnut vodou. Tímto postupem bylo pro modifikaci povrchu použito 240 pmol trypsinu (pepsinu) a vytvořená vrstva měla tvar kruhu s průměrem daným maskou (2 mm). Tato vrstva byla stabilní jak pro přípravu vzorku, tak pro jeho analýzu.

Na povrch s trypsinem byl dávkován roztok 50 mM hydrogenuhličitanu amonného, pH 7,9 s rozpuštěným haptoglobinem o objemu 1µl a koncentraci 1 pmol/µl. Na povrch s pepsinem byl dávkován roztok myoglobinu v 50mM glycínovém pufru, pH 2,3. Povrchy s naneseným haptoglobinem a myoglobinem byly umístěny do Petriho misky a inkubován po dobu 2 hodin (haptoglobin) a 20 minut (myoglobin) při 37 °C. V důsledku enzymové aktivity obou modifikovaných povrchů došlo k roštěpení molekuly haptoglobinu a myoglobinu na jednotlivé peptidy. Ty byly ze stejného povrchu, bez nutnosti manipulace se vzorkem, ihned analyzovány pomocí desorpčně-ionizační hmotnostní spektrometrie, konkrétně metodou MALDI. Obr. 4 ukazuje získaná hmotnostní spektra peptidů. Ze spekter zjištěné údaje o přesných hmotách jednotlivých peptidů vedly k nalezení aminokyselinové sekvence haptoglobinu a myoglobinu, jak je rovněž vyznačeno na obr. 4.

Celkové pokrytí zjištěných sekvencí bylo pro haptoglobin 46% a pro myoglobin 78%, což postačuje k identifikaci haptoglobinu v databázi bílkovin jakou je například Swissprot nebo NCBI.

Dle postupu uvedeném výše byly modifikovány povrchy trypsinem, přičemž postupy se lišily pouze v jednom parametru:

1) Koncentrace trypsinu: A) 0,01 µmol/l, B) 1 µmol/l a C) 100 µmol/l. Hmotnostní spektra tryptických peptidů molekuly haptoglobinu po štěpení na modifikovaném povrchu jsou uvedeny na Obrázku 8.

2) Koncentrace pufru (hydrogen uhličitan amonný) o různé koncentraci: A) 1 µmol/l, B) 1 mmol/l a C) 1 mol/l. Hmotnostní spektra tryptických peptidů molekuly haptoglobinu po štěpení na modifikovaném povrchu jsou uvedeny na Obrázku 9.

3) Ve vodném roztoku a v přítomnosti organického rozpouštědla: A) 0 %obj., B) 40 %obj. a C) 80 %obj. Hmotnostní spektra tryptických peptidů molekuly haptoglobinu po štěpení na modifikovaném povrchu jsou uvedeny na Obrázku 10.

4) Teplota odpařovacího prostoru při deponování trypsinu: A) 30 °C, B) 50 °C a C) 80 °C. Hmotnostní spektra tryptických peptidů molekuly haptoglobinu po štěpení na modifikovaném povrchu jsou uvedeny na Obrázku 11.

Příklad 2 (lektin: konkanavalin A a lektin z pšeničných klíčků)

Modifikovaný povrch byl připraven provedením elektrosprejové depozice a přistáváním suchých iontů na povrchu po dobu 12 minut podle následujícího postupu:

Hodnoty na aparatuře z obr. 1 byly nastaveny následujícím způsobem:

Průtoková rychlost stříkačkové pumpy 2: 2 µl/min

Napětí ze zdroje 8 přivedené na sprejovací jehlu 6: +1000 V

Teplota odpařovacího prostoru ve tvaru trubičky 10: 55 °C

Napětí ze zdroje 11 přivedené na masku 13: -1000 V

Tlak na přívodu nosného plynu 7: 0,25 MPa

Typ nosného plynu: dusík

Teplota nosného plynu: 35 °C

Tvar otvoru na masce: kruh o průměru 2 mm

Stříkačková pumpa 2 byla naplněna roztokem konkanavalinu A (lektin z pšeničných klíčků) o koncentraci 10 µmol/l v 5 mM octan amonný, 30 %obj. acetonitril (alternativně v 50%obj.

metanolu) (Roztok A) a propojena kapilárou 5 s rozdělovníkem. Zdroj vysokého napětí 8 byl připojen na sprejovací jehlu 6. Roztok konkanavalinu A nebo lektinu z pšeničných klíčků (A) byl stříkačkovou pumpou 2 zaváděn do rozdělovníku, kde byl v důsledku vysokého napětí a proudu stlačeného nosného plynu z přívodu elektronebulizován ze sprejovací jehly za vzniku nabitého aerosolu (B). Vzniklý aerosol byl přiváděn do odpařovacího prostoru 10 ve tvaru trubice o průměru 5 mm, kde došlo k vysušení aerosolu a dále procházel maskou 13 až na povrch 12 pro modifikaci, který byl z nerezové oceli. Po ukončení bylo vypnuto vysoké napětí ze zdroje 8 i zdroje 11, povrch byl vyjmut a opláchnut vodou. Tímto postupem bylo pro modifikaci povrchu použito120 pmol konkanavalinu A nebo lektinu z pšeničných klíčků a vytvořená vrstva měla tvar kruhu s průměrem daným maskou (2 mm). Tato vrstva byla stabilní jak pro přípravu vzorku, tak pro samotnou analýzu.

Na takto připravený povrch byl dávkován roztok tryptických peptidů hexosaminidasy nebo směsi IgG1 a IgG2 (původem z organismu *Aspergillus Oryzae* a člověk) o objemu 1 µl a koncentraci 10 pmol/µl. V důsledku afinitní interakce mezi konkanavalimen A nebo lektinem z pšeničných klíčků na povrchu a glykopeptidy dojde k jejich specifickému navázání. Po odmytí povrchu roztokem PBS (phosphate buffered saline) nebo TBS (Tris-buffered saline) jsou ostatní složky vzorku odstraněny. Navíc je možné na modifikovaný povrch nanášet vzorek opakovaně, protože v důsledku omytí ostatních složek vzorku je možné dávkovat větší množství samotného analytu. Tyto efekty jsou znázorněny na obr. 5 a 6, které ukazují porovnání analýzy pomocí MALDI hmotnostní spektrometrie z běžného komerčně dostupného MALDI povrchu a z MALDI povrchu s navázaným konkanavalinem A nebo lektinem z pšeničných klíčků. Při analýze na konkanavalinovém povrchu došlo k detekci tří forem N-glykosidicky vázaných vysoce manózových glykánů a dále potom k nalezení několika forem O-glykosidicky vázaných glykánů. Při analýze na běžném povrchu byly detekovány pouze dva N-glykosidicky vázané glykány a pouze několik variant O-glykopeptidu. V případě deponovaného lektinu z pšeničných klíčků se nabohatily dva N-glykosilované peptidy (jeden z IgG1 a druhý z IgG2) s komplexními sacharidy.

Příklad 3 (protilátka: Anti FGF-21, anti Leptin)

Modifikovaný povrch byl připraven provedením elektrosprejové depozice a přistáváním suchých iontů na povrchu po dobu 60 minut podle následujícího postupu

Hodnoty na aparatuře z obr. 2 byly nastaveny následujícím způsobem:

Průtoková rychlost stříkačkové pumpy 2: 2 µl/min

Napětí ze zdroje 8 přivedené na vodivou část stříkačky (9): +1000V

Teplota odpařovacího prostoru ve tvaru trubičky 10: 45 °C

Napětí ze zdroje 11 přivedené na povrch 12: -1000V

Tlak na přívodu nosného plynu 7: 0,25 MPa

Teplota nosného plynu: 30 °C

Typ nosného plynu: dusík

Stříkačka byla naplněna roztokem polyklonální protilátky specifické proti leptinu (antileptin protilátka) o koncentraci 2 µmol/l v 5mM octan amonný, 30%obj. acetonitril (Roztok A). Stříkačka s roztokem A byla vložena do stříkačkové pumpy 2. Zdroj vysokého napětí 8 byl připojen na vodivou část 9 stříkačky 4 se zásobním roztokem, která byla kapilárou 5 spojena s rozdělovníkem 1. Roztok antileptin protilátky (A) byl stříkačkovou pumpou 2 zaváděn do rozdělovníku, kde byl v důsledku vysokého napětí a proudu stlačeného nosného plynu z přívodu elektronebulizován ze sprejovací jehly za vzniku nabitého aerosolu (B). Vzniklý aerosol byl přiváděn do odpařovacího prostoru 10 ve tvaru trubice o průměru 5 mm, kde došlo k vysušení aerosolu a dále procházel až na povrch 12 pro modifikaci, který by z hliníku. Po ukončení bylo vypnuto vysoké napětí ze zdroje 8 i zdroje 11, povrch byl vyjmut a opláchnut vodou. Tímto postupem byla vytvořená vrstva protilátky, která měla tvar kruhu s průměrem daným průměrem odpařovacího prostoru (2 mm). Tato vrstva byla stabilní jak pro přípravu vzorku, tak pro samotnou analýzu peptidů. Stejný postup přípravy byl použit i v případě modifikace povrchu polyklonální protilátkou proti lidskému FGF-21.

Na připravené povrchy byly naneseny jednak standardní bílkoviny leptin a FGF-21, tak i leptin a FGF-21 rozpuštěné v areteficiálním séru. Po aplikaci roztoků obsahujících jednotlivé antigeny, byly povrchy uzavřeny v Petriho miskách, aby nedocházelo k příliš rychlému odparu, a inkubovány po dobu 1 hodiny. Po promytí povrchů roztokem PBS následovala hmotnostně spektrometrická analýza bílkovin (peptidů, v případě kdy se na modifikovaný povrch nanášel naštěpený antigen) nebo imunoenzymatická esej. Obrázek 7 ukazuje porovnání hmotnostních spekter bílkovin leptinu a FGF-21 na modifikovaném a standardním povrchu. Ze spekter je patrné, že i po důkladném promytí povrchů zůstávají antigeny navázány na příslušné protilátky. Imunoenzymatická esej potvrzuje zachovanou aktivitu protilátky po nanesení na povrch a umožňuje tak stanovit antigen i v přítomnosti komplexní matrice.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob modifikace povrchu bílkovinami pro prekoncentraci analytu pro desorpčně-ionizační techniky hmotnostní spektrometrie a imunochemické eseje, vyznačující se tím, že do uzavřeného prostoru, který je pod napětím [± (200 až 8000) V], je pod tlakem 0,05 až 0,5 MPa přiváděn nosný plyn a zásobní roztok sprejované bílkoviny, přičemž vzniklý nabitý aerosol vycházející z elektrospreje je zaváděn do odpařovacího prostoru (10) s teplotou v rozmezí 30 až 80 °C a vycházející vysušený aerosol je zaváděn na povrch (12) pro modifikaci, který je umístěn za odpařovacího prostorem (10).

2. Způsob modifikace povrchu pro prekoncentraci analytu pro desorpčně-ionizační techniky hmotnostní spektrometrie a imunochemické eseje podle nároku 1, vyznačující se tím, že povrch (12) pro modifikaci je vodivý s měrným odporem suchého materiálu menším než 10^{20} Ω•m a je pod napětím [± (200 až 5000) V] opačné polarity vůči napětí na elektrospreji.

3. Způsob modifikace povrchu podle nároku 1 nebo nároku 2, vyznačující se tím, že mezi odpařovacím prostorem (10) a povrchem (12) pro modifikaci je ve vzdálenosti do 3 mm od povrchu (12) pro modifikaci umístěna maska (13), která je pod napětím [± (200 až 5000) V] opačné polarity vůči napětí na elektrospreji.

4. Způsob modifikace povrchu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, vyznačující se tím, že nosný plyn má teplotu v rozmezí 30 až 80 °C.

5. Způsob modifikace povrchu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, vyznačující se tím, že sprejovaná bílkovina je vybrána ze skupiny obsahující enzym, lektin nebo protilátku.

6. Způsob modifikace povrchu podle nároku 5, vyznačující se tím, že enzym je vybrán ze skupiny obsahující oxidoreduktázu, transferázu, hydrolázu, lyázu, izomerázu, ligázu nebo proteázu, s výhodou trypsin, pepsin; lektin je vybrán ze skupiny obsahující konkanavalin A, lektin z pšeničných klíčků nebo arašídů, ricin nebo čočkový lektin;

protilátka je vybrána ze skupiny obsahující imunoglobuliny tříd IgA, IgG, IgD, IgE, nebo IgM, s výhodou antileptin protilátku nebo anti FGF 21 protilátku.

7. Způsob modifikace povrchu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6, vyznačující se tím, že koncentrace sprejované bílkoviny v zásobním roztoku je v rozsahu 0,01 až 100 μmol/l.

8. Způsob modifikace povrchu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 7, vyznačující se tím, že zásobní roztok je vodný roztok nebo směs vody a alespoň jednoho organického rozpouštědla, s výhodou methanolu nebo acetonitrilu.

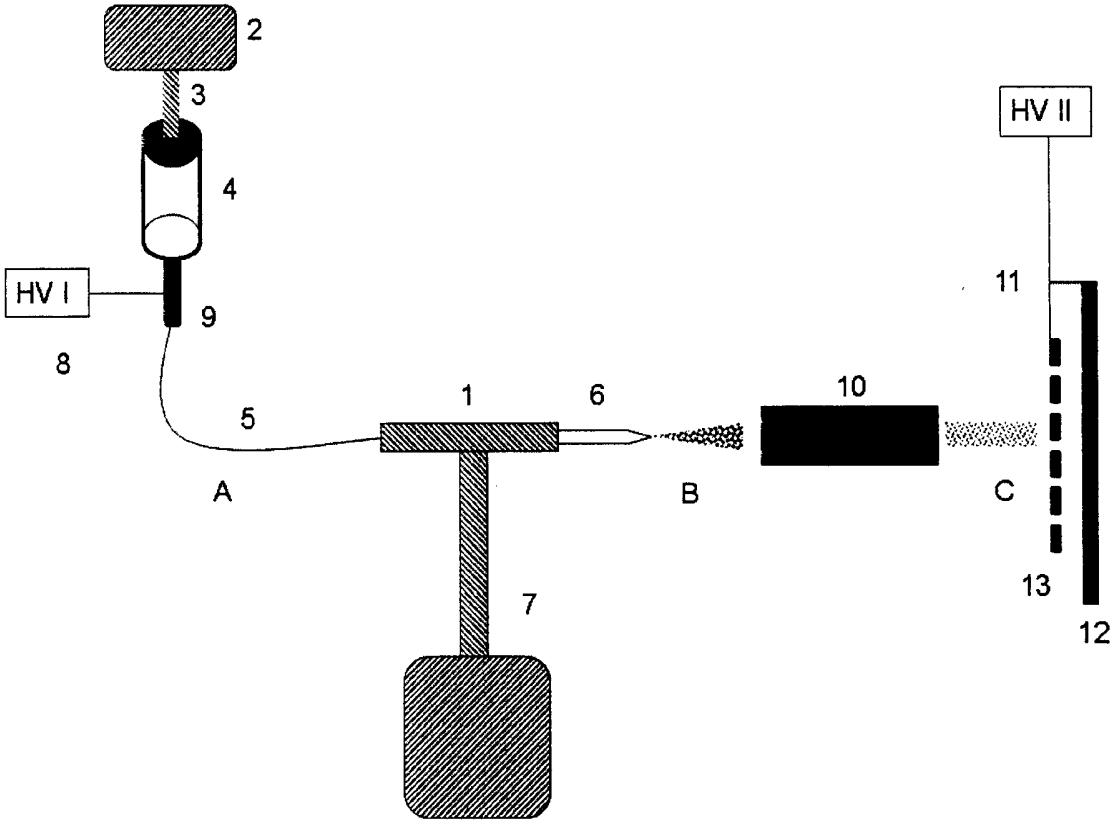
9. Způsob modifikace povrchu podle nároku 8, vyznačující se tím, že zásobní roztok dále obsahuje pufr o koncentraci v rozmezí 1 μmol/l až 1 mol/l.

10. Způsob modifikace povrchu podle nároku 8 nebo nároku 9, vyznačující se tím, že obsah organického rozpouštědla ve směsi je až 80 %obj.

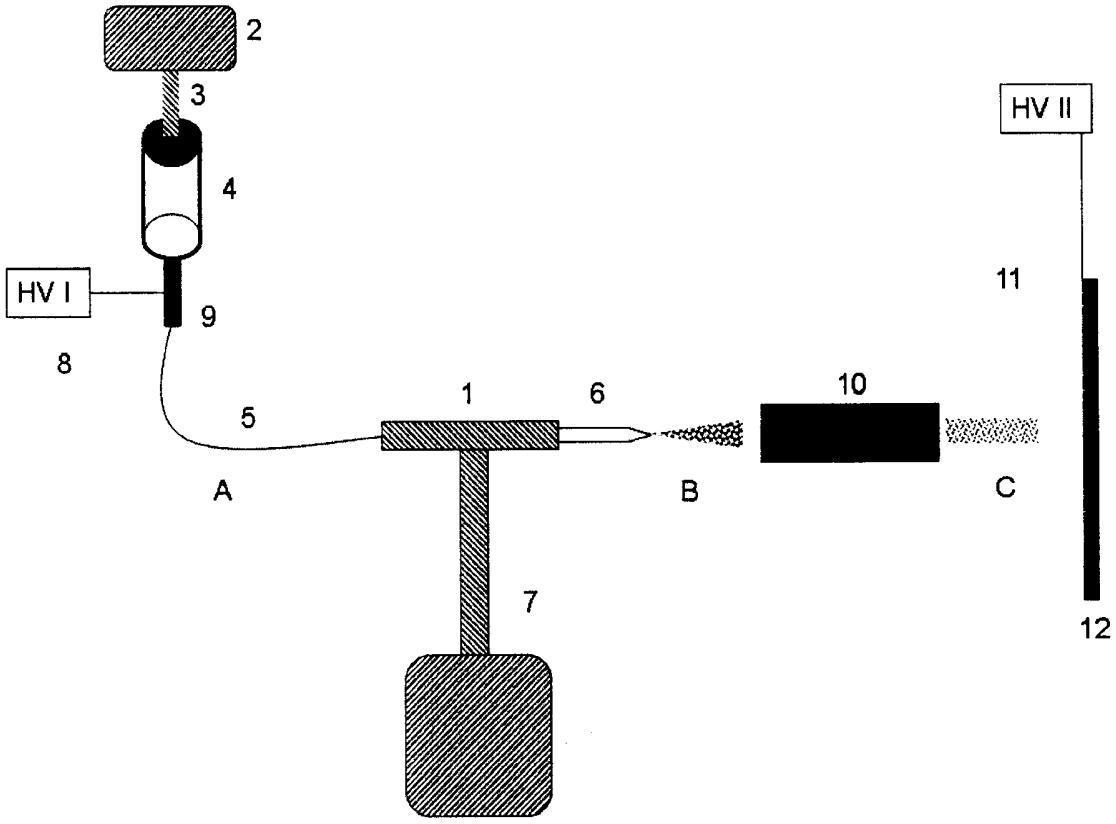
11. Způsob modifikace povrchu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 10, vyznačující se tím, že nosný plyn je vybrán ze skupiny obsahující oxid dusný, dusík, oxid uhličitý, helium, neon, argon, krypton, xenon nebo kyslík.

12. Způsob modifikace povrchu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 11, vyznačující se tím, že povrch (12) pro modifikaci je vybrán ze skupiny obsahující tepelně stabilní kov, sklo, křemíkové nanostruktury, uhlíkové nanotrubičky, grafen, tepelně a mechanicky stabilní syntetický polymer.

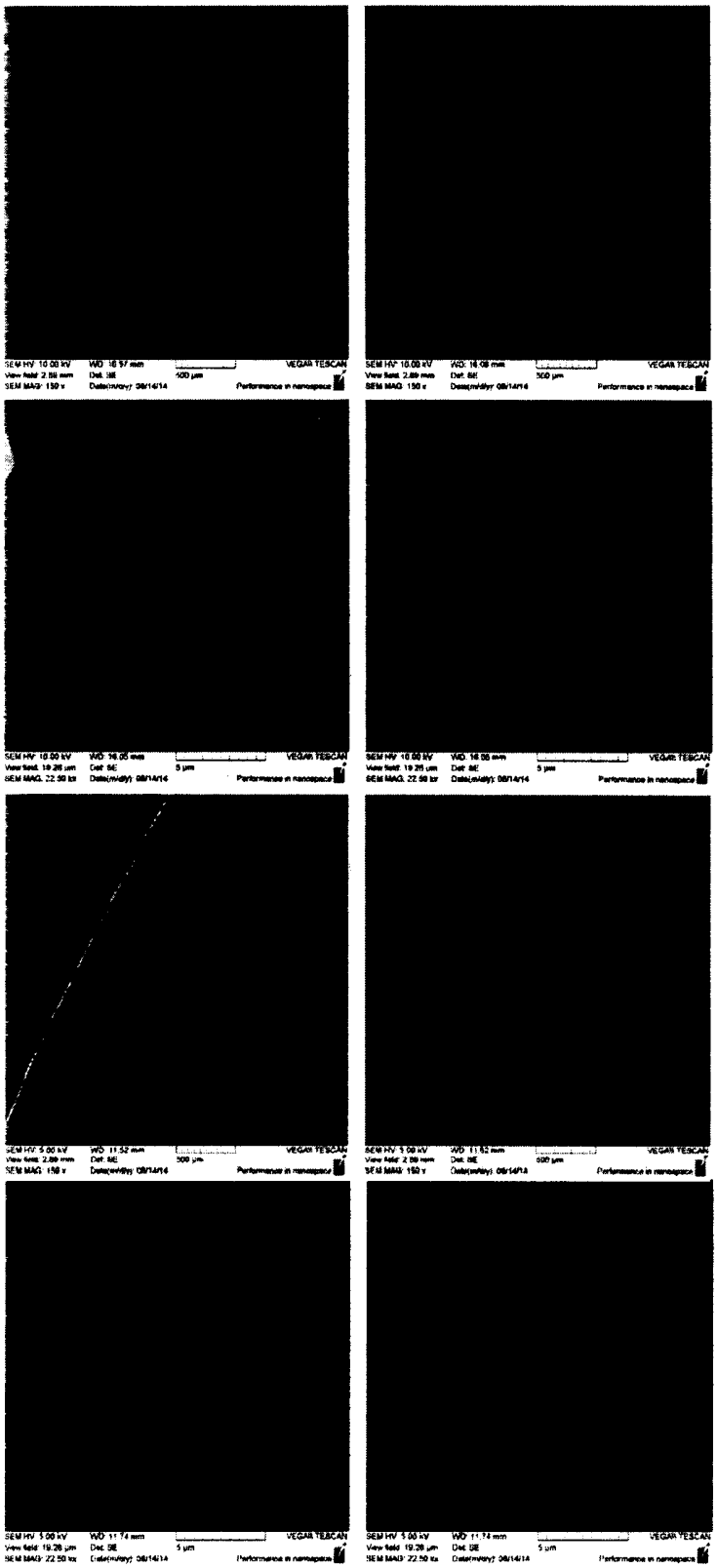
hsk 16.09.14
PV 2014-801 6M



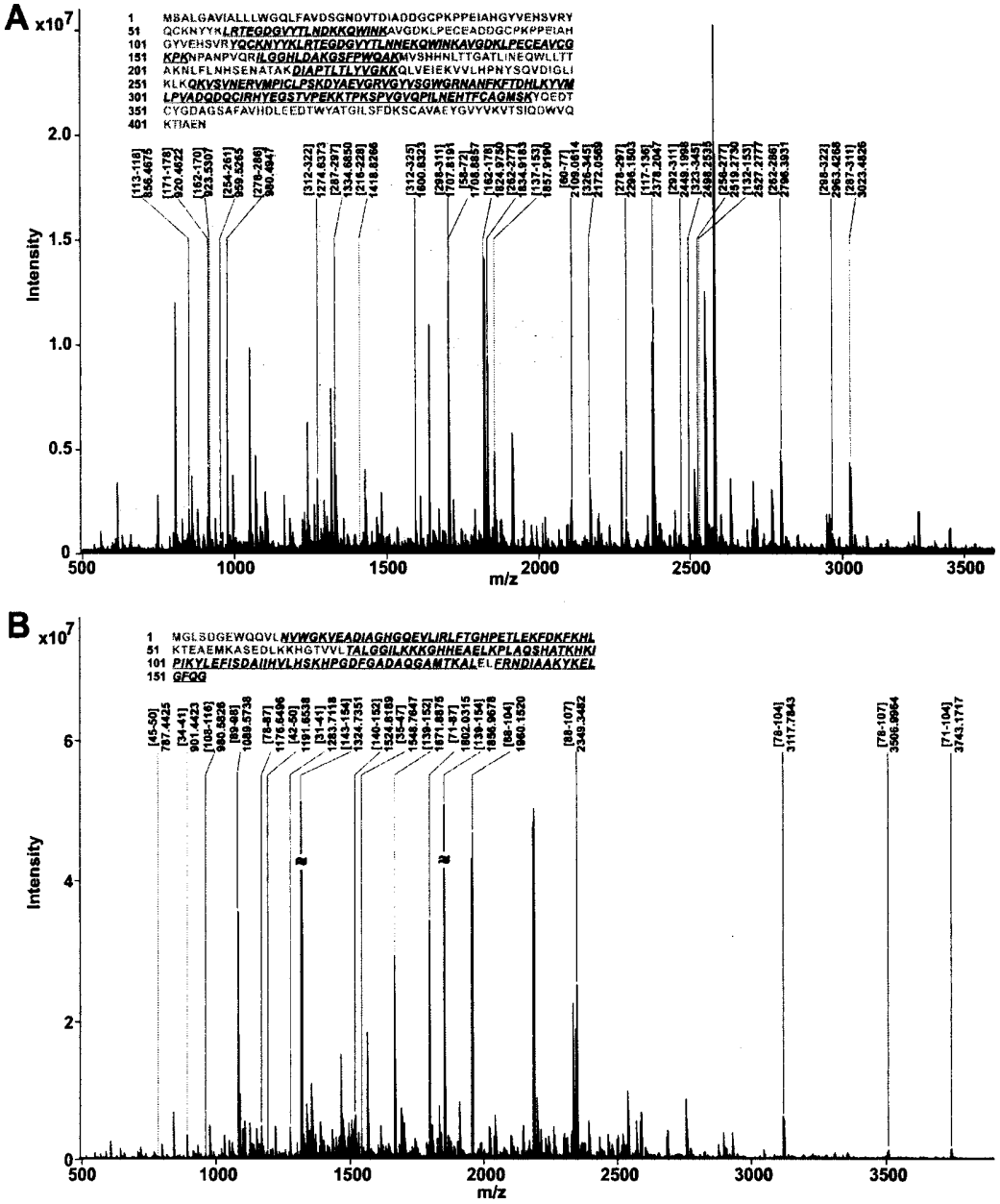
Obr. 1



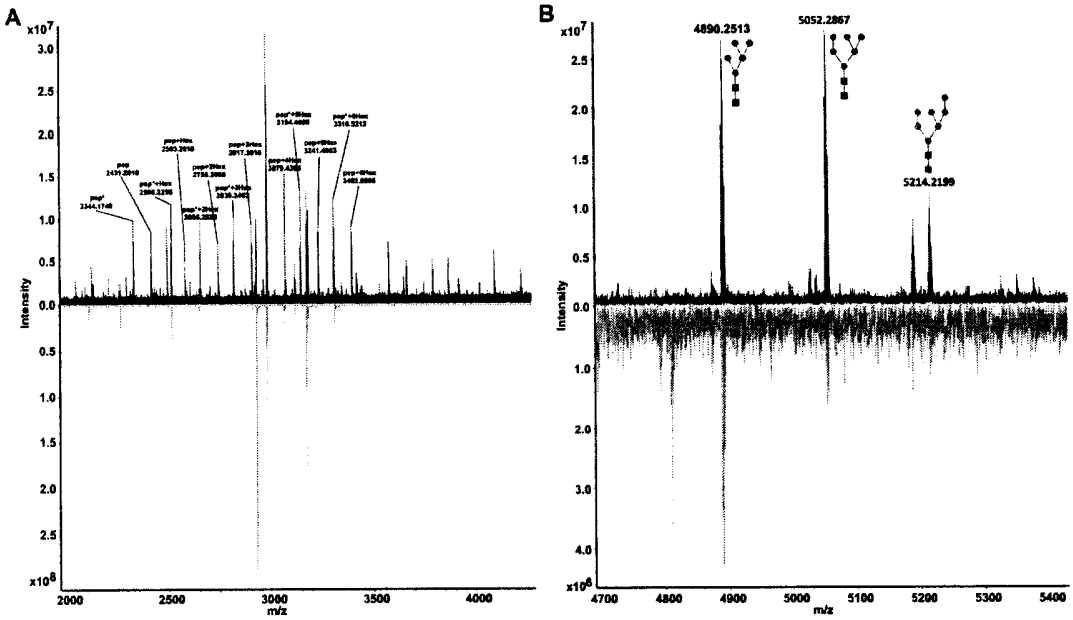
Obr. 2



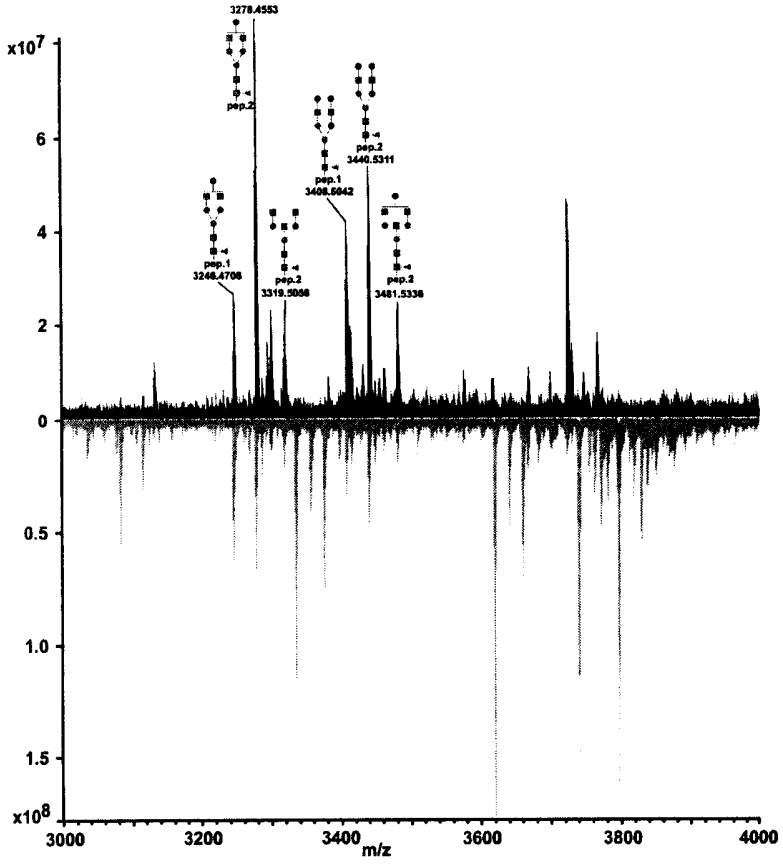
Obr. 3



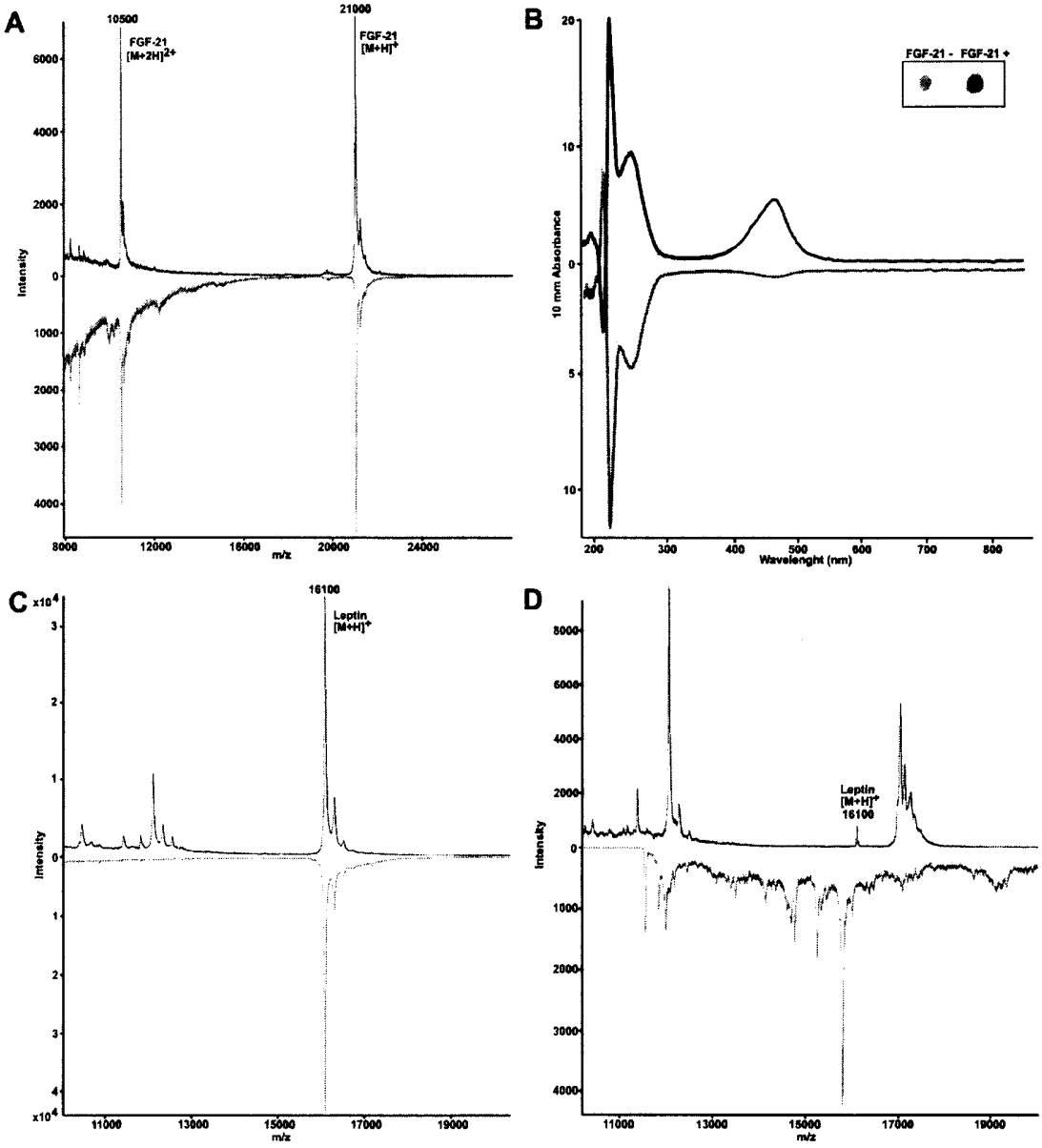
Obr. 4



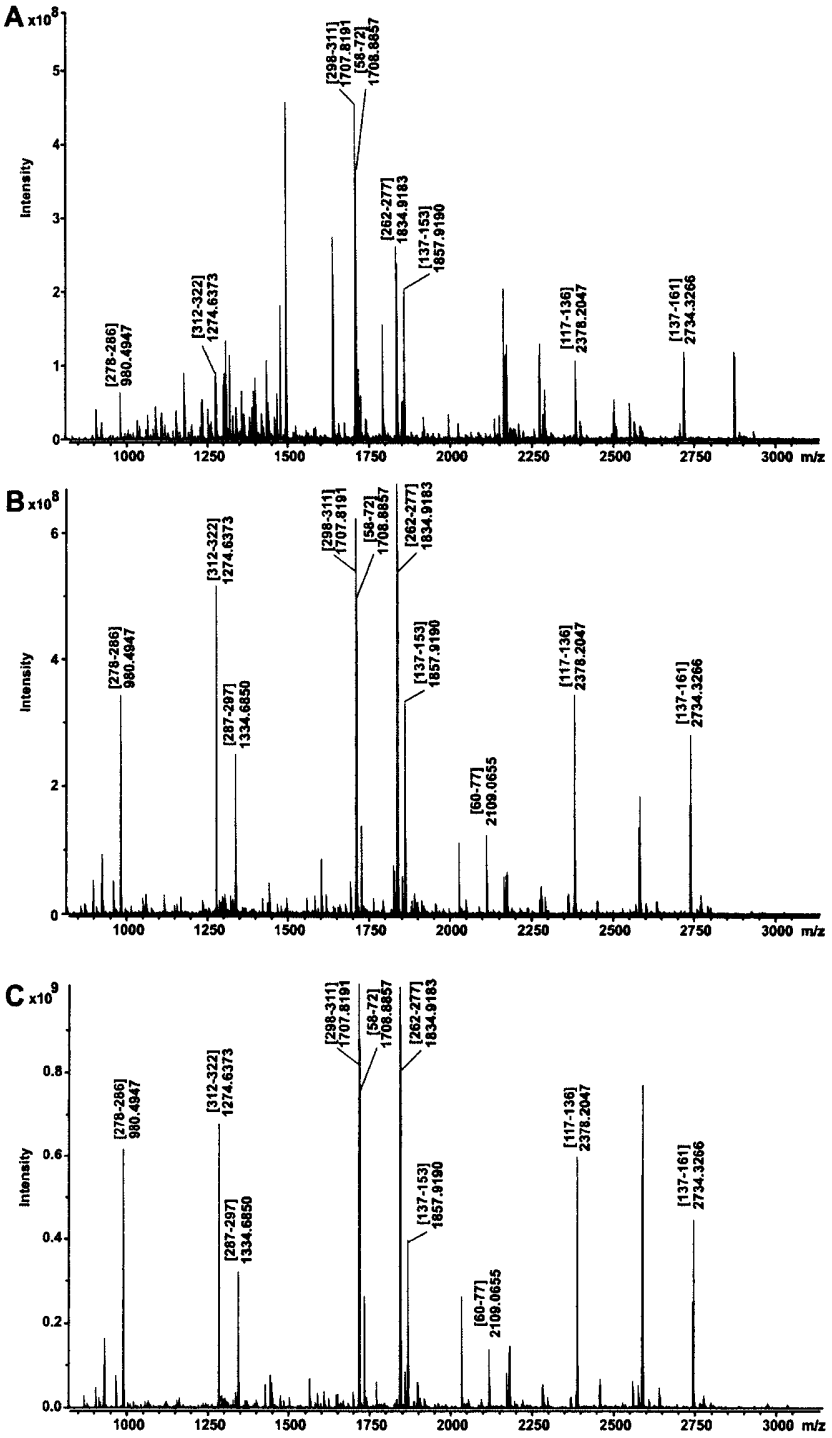
Obr. 5


3278.4553
x10^7
6
4
2
0
0.5
1.0
1.5
x10^8
pep.2
pep.1
3246.4706
pep.2
3319.5066
pep.1
3408.6042
pep.2
3440.5311
pep.2
3481.5336
3000
3200
3400
m/z
3600
3800
4000

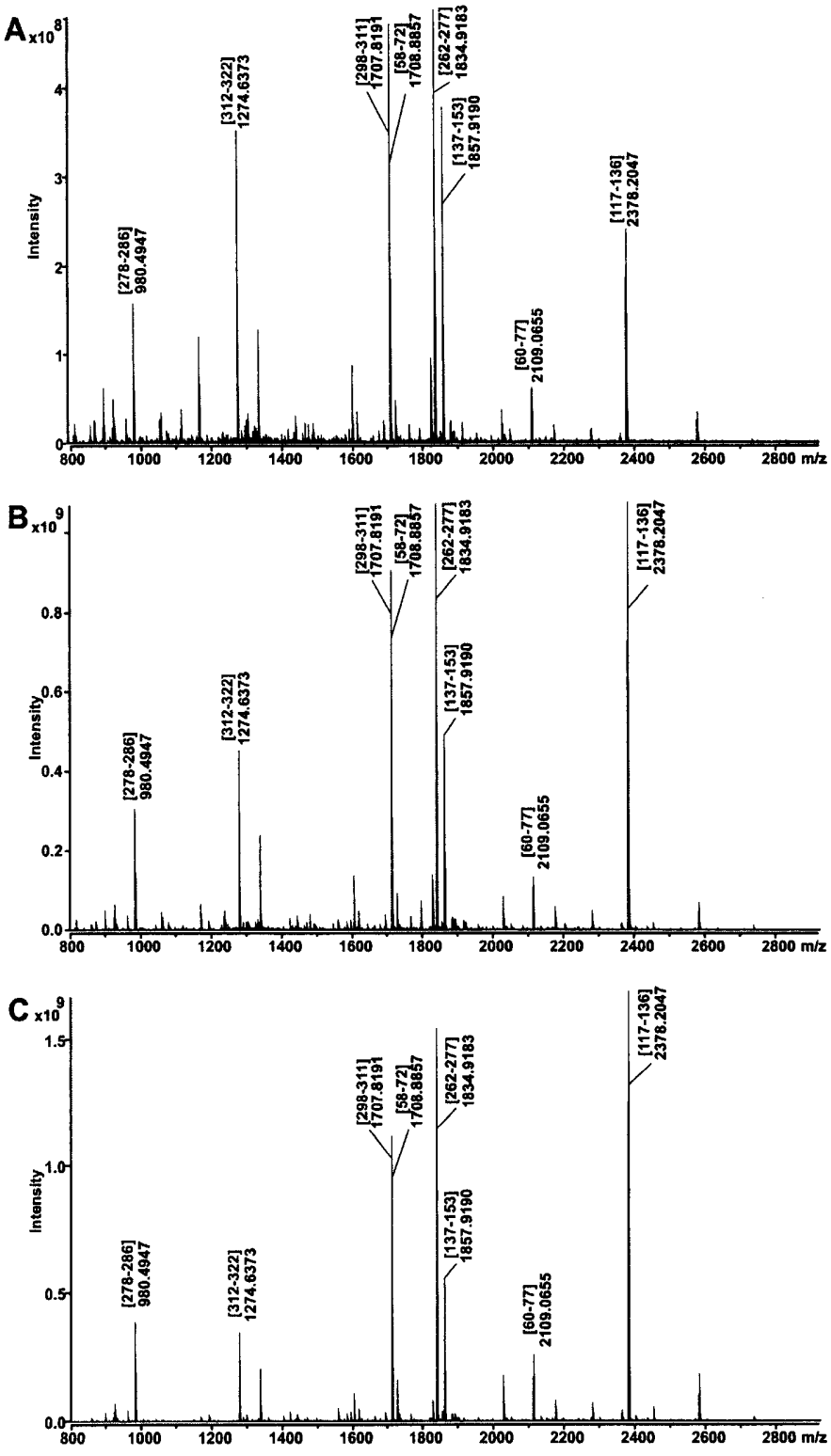
Obr. 6


A
10500
FGF-21
[M+2H]2+
21000
FGF-21
[M+H]+
Intensity
m/z
B
FGF-21 - FGF-21 +
10 mm Absorbance
Wavelenght (nm)
C
x10^4
16100
Leptin
[M+H]+
Intensity
m/z
D
Leptin
[M+H]+
16100
Intensity
m/z

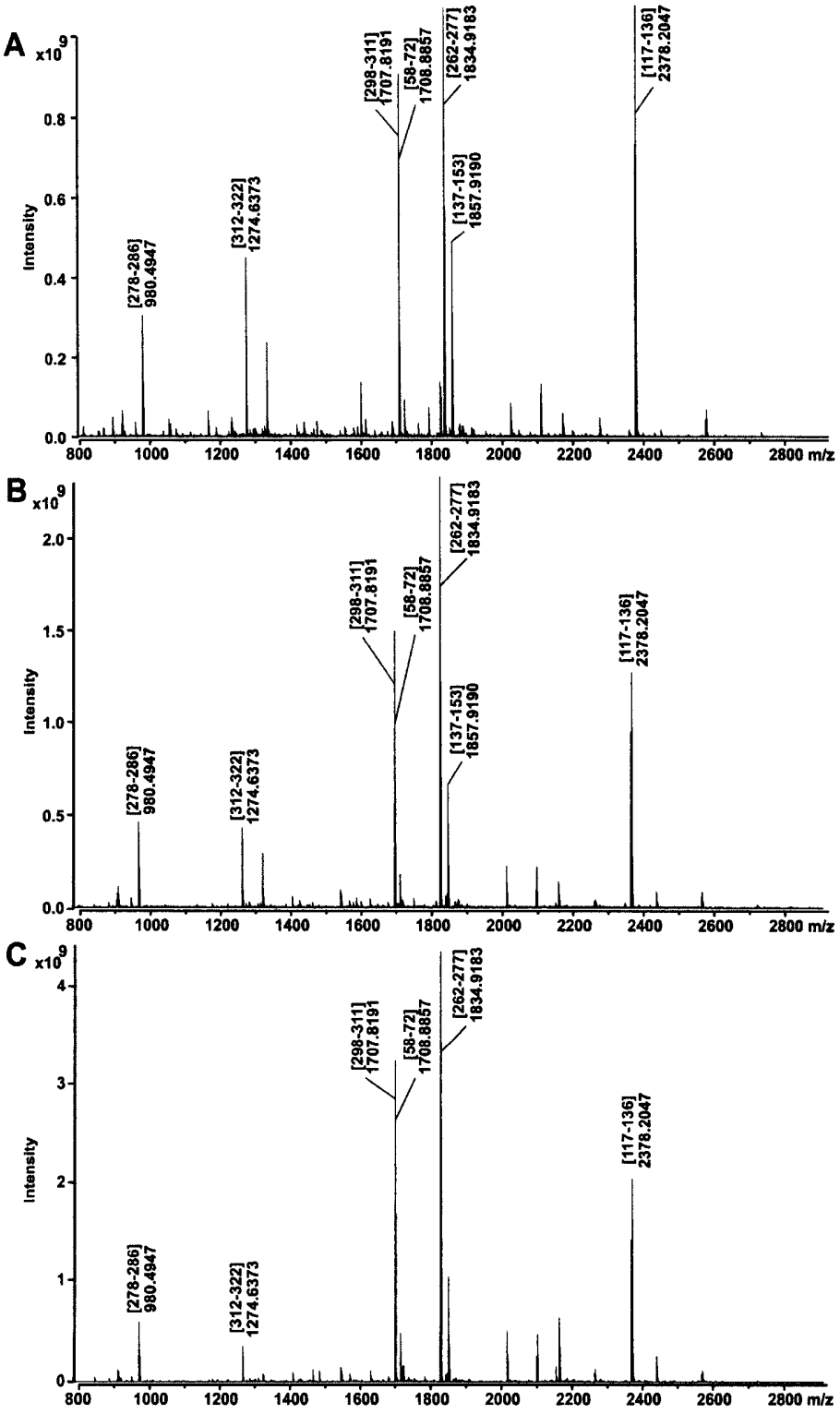
Obr. 7


A x10^8
Intensity
[278-286] 980.4947
[312-322] 1274.6373
[298-311] 1707.8191
[58-72] 1708.8857
[262-277] 1834.9183
[137-153] 1857.9190
[117-136] 2378.2047
[137-161] 2734.3266
m/z
B x10^8
Intensity
[278-286] 980.4947
[312-322] 1274.6373
[287-297] 1334.6850
[298-311] 1707.8191
[58-72] 1708.8857
[262-277] 1834.9183
[137-153] 1857.9190
[60-77] 2109.0655
[117-136] 2378.2047
[137-161] 2734.3266
m/z
C x10^9
Intensity
[278-286] 980.4947
[312-322] 1274.6373
[287-297] 1334.6850
[298-311] 1707.8191
[58-72] 1708.8857
[262-277] 1834.9183
[137-153] 1857.9190
[60-77] 2109.0655
[117-136] 2378.2047
[137-161] 2734.3266
m/z

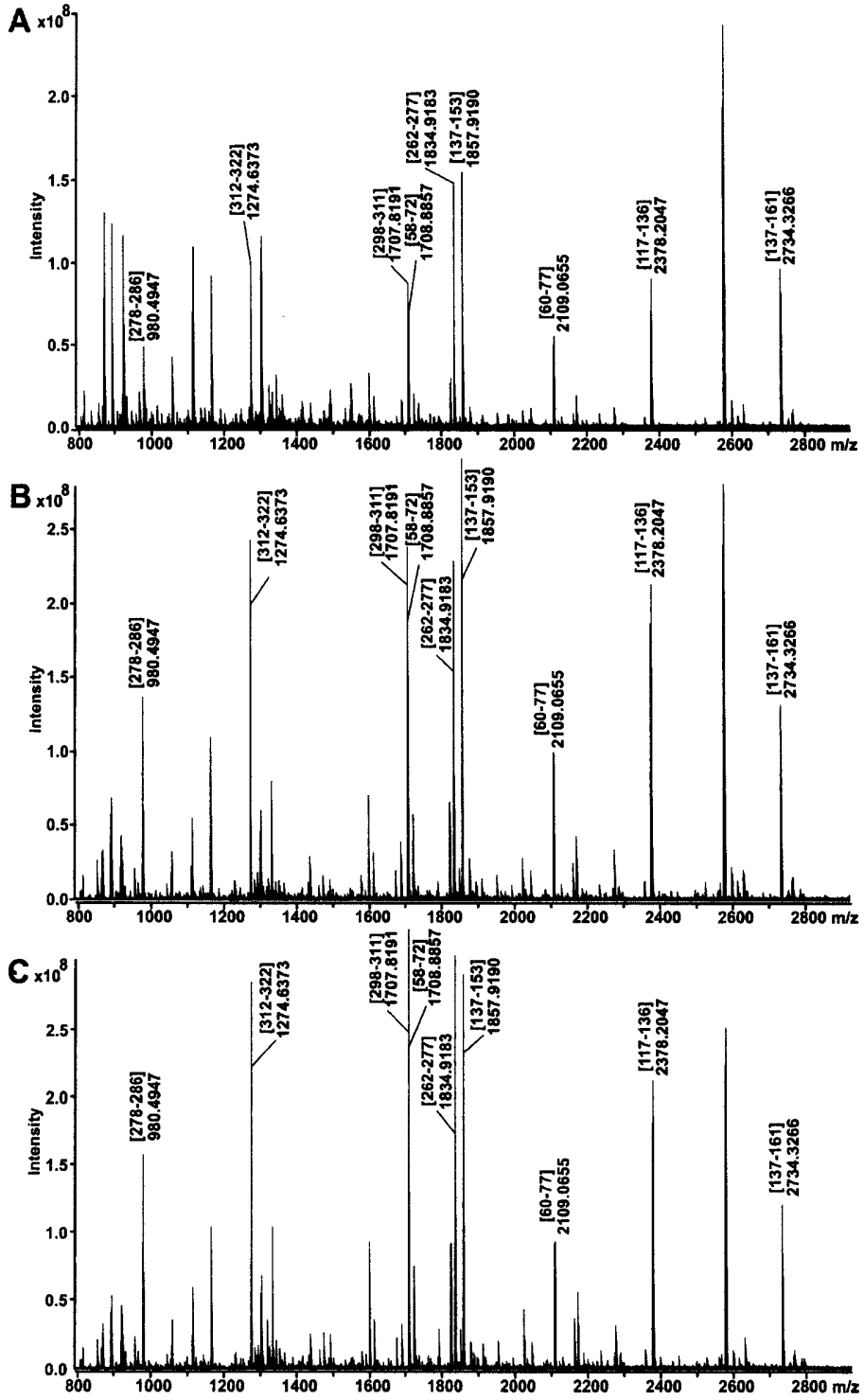
Obr. 8


A x10^8
Intensity
[278-286] 980.4947
[312-322] 1274.6373
[298-311] 1707.8191
[58-72] 1708.8857
[262-277] 1834.9183
[137-153] 1857.9190
[60-77] 2109.0655
[117-136] 2378.2047
800 1000 1200 1400 1600 1800 2000 2200 2400 2600 2800 m/z
B x10^9
Intensity
[278-286] 980.4947
[312-322] 1274.6373
[298-311] 1707.8191
[58-72] 1708.8857
[262-277] 1834.9183
[137-153] 1857.9190
[60-77] 2109.0655
[117-136] 2378.2047
800 1000 1200 1400 1600 1800 2000 2200 2400 2600 2800 m/z
C x10^9
Intensity
[278-286] 980.4947
[312-322] 1274.6373
[298-311] 1707.8191
[58-72] 1708.8857
[262-277] 1834.9183
[137-153] 1857.9190
[60-77] 2109.0655
[117-136] 2378.2047
800 1000 1200 1400 1600 1800 2000 2200 2400 2600 2800 m/z

Obr. 9


A
x10^9
Intensity
[278-286]
980.4947
[312-322]
1274.6373
[298-311]
1707.8191
[58-72]
1708.8857
[262-277]
1834.9183
[137-153]
1857.9190
[117-136]
2378.2047
800 1000 1200 1400 1600 1800 2000 2200 2400 2600 2800 m/z
B
x10^9
Intensity
[278-286]
980.4947
[312-322]
1274.6373
[298-311]
1707.8191
[58-72]
1708.8857
[262-277]
1834.9183
[137-153]
1857.9190
[117-136]
2378.2047
800 1000 1200 1400 1600 1800 2000 2200 2400 2600 2800 m/z
C
x10^9
Intensity
[278-286]
980.4947
[312-322]
1274.6373
[298-311]
1707.8191
[58-72]
1708.8857
[262-277]
1834.9183
[117-136]
2378.2047
800 1000 1200 1400 1600 1800 2000 2200 2400 2600 2800 m/z

Obr. 10


A x10^8
B x10^8
C x10^8
Intensity
m/z
[278-286] 980.4947
[312-322] 1274.6373
[298-311] 1707.8191
[58-72] 1708.8857
[262-277] 1834.9183
[137-153] 1857.9190
[60-77] 2109.0655
[117-136] 2378.2047
[137-161] 2734.3266

Obr. 11