

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Separace molekulárních sond pomocí kapilární elektroforézy

diplomová práce



Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

Konzultant diplomové práce: Mgr. Ondřej Horáček

Hradec Králové 2023

Maxim Hof

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne

.....

Moje poděkování patří **doc. PharmDr. Radimovi Kučerovi, Ph.D.** za odborné vedení, trpělivost a cenné rady při zpracování této diplomové práce, konzultantovi **Mgr. Onřejí Horáčkovi** za konzultaci, za pomoc při práci v laboratoři a rady při zpracování získaných dat a **doc. PharmDr. Miroslavu Miletínovi, Ph.D.** za zprostředkování vzorků oligonukleotidových sond. Tato práce vznikla za podpory projektu SVV 260 66.

Obsah

Obsah	7
Abstrakt.....	9
Abstract.....	10
Seznam použitých zkratk.....	11
1. Úvod.....	13
2. Teoretická část: Kapilární elektroforéza	14
2.1. Historie.....	14
2.2. Princip elektroforézy	15
2.3. Elektroosmotický tok	16
2.3.1. Využití EOF	17
2.3.2. Modifikace EOF.....	18
2.4. Instrumentální nastavení	19
2.4.1. Dávkování	20
2.4.2. Příprava kapiláry	20
2.4.3. Příprava kapiláry na analýzu.....	21
2.4.4. Termostatování.....	21
2.4.5. Detekce.....	21
2.5. Módy kapilárních elektromigračních metod	24
2.6. Kapilární zónová elektroforéza (CZE).....	24
2.6.1. Výběr pufru.....	25
2.6.2. pH pufru	26
2.6.3. Aditiva: surfaktanty.....	26
2.6.3.1. Taurodeoxycholová kyselina	28
2.6.4. Aditiva: chirální selektory.....	28
2.6.5. Aditiva: organická rozpouštědla.....	29
2.6.6. Přehled nejčastěji používaných aditiv	30
2.6.7. Modifikace kapilární stěny.....	31
2.6.7.1. Permanentní modifikace kapilární stěny	31
2.6.7.2. Dynamická deaktivace	32
2.7. Modifikované oligonukleotidy.....	33
2.7.1. Fluorescenční barviva	34
2.7.2. Syntéza oligonukleotidových sond.....	34

2.7.3.	Separace oligonukleotidových sond pomocí CZE.....	36
3.	Cíle práce.....	38
4.	Experimentální část.....	39
5.	Diskuze a výsledky.....	44
5.1.	Výběr základního elektrolytu.....	45
5.2.	Separace vzorku BHQ mix.....	47
5.2.1.	Koncentrace pufru.....	47
5.2.2.	Vliv pH.....	48
5.2.3.	Vliv napětí.....	48
5.2.4.	Vliv organické složky.....	49
5.2.5.	Aditiva-SDS.....	50
5.2.6.	Medronová kyselina.....	52
5.2.7.	Porovnání nejlepších výsledků.....	54
5.3.	Separace vzorku PCQ mix.....	55
5.3.1.	Organická složka.....	55
5.3.2.	Vliv pH.....	57
5.3.3.	Koncentrace pufru.....	58
5.3.3.1.	Množství elektrolytu- Změna vzorku.....	59
5.3.4.	Přídavek SDS.....	60
5.3.5.	Zvýšení iontové síly.....	61
5.3.6.	Vliv cyklodextrinu.....	62
5.3.7.	Vliv taurodeoxycholátu.....	64
5.3.8.	Medronová kyselina.....	65
5.3.9.	Porovnání nejlepších výsledků.....	66
5.4.	Porovnání výsledků elektroforetických separací s HPLC.....	70
6.	Závěr.....	72
	Seznam citované literatury.....	73

Abstrakt

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova

Kandidát: Maxim Hof

Školitel: doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Ondřej Horáček

Název práce: Separace molekulárních sond pomocí kapilární elektroforézy

Oligonukleotidy jsou organické molekuly, které nacházejí uplatnění v oblastech jako je biotechnologie, molekulární biologie, diagnostika a terapie. Pro použití oligonukleotidů jako molekulárních sond je nutné oligonukleotidy kovalentně modifikovat např. fluorescenčním barvivem a zhášečem. Produkty těchto značících reakcí jsou dvojitě značená oligonukleotidová sonda, ale také vedlejší produkty, jako je neznačený oligonukleotid a oligonukleotidy značené buď fluorescenčním barvivem nebo zhášečem. Produkty této reakce je nutné separovat, což je těžištěm této diplomové práce.

Separace takto dvojitě značených oligonukleotidových sond byla dosud prováděna pouze v chromatografických podmínkách. Cílem této práce je prozkoumat využití kapilární elektroforézy pro tuto separaci. Konkrétně bylo zkoumáno použití kapilární elektroforézy pro separaci oligonukleotidových sond jednoduše značených BHQ zhášečem od dvojitě značených BHQ zhášečem s fluorescenčním barvivem 6-FAM (BHQ-FAM) a jednoduše značených oligonukleotidových sond azaftalocyaninovým zhášečem (PCQ) od dvojitě značených azaftalocyaninovým zhášečem a fluorescenčním barvivem 6-FAM (PCQ-FAM) nebo Cy5 (PCQ-Cy5). Pozoruhodné je, že planární a hydrofobní struktura azaftalocyaninového zhášeče se liší od dosud používaných zhášečů, a proto lze separaci molekul značených azaftalocyaninem považovat za novou výzvu.

Experimentální podmínky pro elektroforetickou separaci jednoduše značených sond BHQ od dvojitě značených sond BHQ-FAM a také jednoduše značených PCQ od dvojitě značených sond PCQ-Cy5 byly kompletně optimalizovány. Oddělení PCQ od PCQ-FAM sond však vyžadovalo 40 minut. Použité elektroforetické podmínky pro separaci BHQ od BHQ-FAM a PCQ z PCQ-Cy5 jsou vhodnější než u HPLC. Nicméně separace pomocí HPLC za izokratických podmínek a s acetonitrilem jako organickým rozpouštědlem se zdá být vhodnější pro separaci PCQ a PCQ-FAM.

Abstract

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University

Candidate: Maxim Hof

Supervisor: doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

Consultant: Mgr. Ondřej Horáček

Title of Thesis: Separation of molecular probes by capillary electrophoresis

Oligonucleotides are organic molecules which find their application in fields such as biotechnology, molecular biology, diagnosis and therapy. For the use of oligonucleotides (ON's) as molecular probes, it is necessary to covalently modify the ON's for example with a fluorescent dye and a quenching moiety. The products of this labelling reactions are the required double labelled ON probe, but also side products like the unlabeled ON and the ON's labeled either with the fluorescent dye or the quencher. Consequently, the products of this reaction must be separated, which represents the focus of this diploma thesis.

The separation of these double labeled ON probes has been so far only performed by chromatographic approaches. The aim of this thesis is to explore the use of capillary electrophoresis for that separation. Specifically, the use of capillary electrophoresis was investigated for the separation of a) single-labeled ON probe with BHQ quencher from a double-labeled ON probe with a BHQ quencher and a fluorescent dye 6-FAM (BHQ-FAM) and b) single-labeled ON probe with an azaphthalocyanine quencher (PCQ) from a double-labeled probe with azaphthalocyanine quencher and fluorescent dye 6-FAM (PCQ-FAM) or Cy5 (PCQ-Cy5). Noteworthy, the planar and hydrophobic structure of the azaphthalocyanine quencher is different from the types of quenchers used so far and thus the separation of azaphthalocyanine labelled molecules can be considered as a new challenge.

The experimental conditions for the electrophoretic separation of the single-labeled BHQ from double-labeled BHQ-FAM probes as well as of the single-labeled PCQ from double-labeled PCQ-Cy5 probes were completely optimized. However, the separation of the PCQ from PCQ-FAM probes required 40 minutes. The used electrophoretic conditions for the separation of BHQ from BHQ-FAM and PCQ from PCQ-Cy5 are more suitable than when HPLC is used. However, separation by HPLC under isocratic conditions and with acetonitrile as an organic solvent appears to be more suitable for the separation of PCQ and PCQ-FAM.

Seznam použitých zkratk

AzaPC	azaftalocyaninový zhášec
BHQ-1	black hole quencher
BHQ	jednoduše značená oligonukleotidová sonda BHQ-1 zhášecem
BHQ-FAM	dvojitě značená oligonukleotidová sonda BHQ-1 zhášecem a 6-FAM
CD	cyklodextrin
CEC	kapilární elektrochromatografie
CGE	kapilární gelová elektroforéza
CIEF	kapilární isoelektrická fokusace
CITP	kapilární izotachoforéza
CMC	kritická micelární koncentrace
CTAB	cetyltrimethylamonium bromid
Cy5	tetramethylindo(di)-karbokyanid
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DAD	diode array detector
EOF	elektroosmotický tok
F_E	elektrická síla
F_F	třecí síla
MEEKC	mikroemulzní elektrokinetická chromatografie
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MES	2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina
OLIGO	neznačená oligonukleotidová sonda
PCR	polymerázová řetězová reakce
PCQ	jednoduše značená oligonukleotidová sonda azaftalocyaninovým zhášecem
PCQ-FAM	dvojitě značená oligonukleotidová sonda azaftalocyaninovým zhášecem a 6-FAM
PCQ-Cy5	dvojitě značená oligonukleotidová sonda azaftalocyaninovým zhášecem a Cy5
PEG	polyethylene glykol
pI	isoelektrický bod
PVA	polyvinylalkohol
SDS	dodecylsírán sodný

THF	tetrahydrofuran
Tris	tris(hydroxymethyl)aminoethan
6-FAM	6-karboxyflurescein

1. Úvod

Používání oligonukleotidových sond v biologii, biochemii, analytické chemii a genetice se stává čím dál tím populárnější. Nemodifikované oligonukleotidy se nejčastěji využívají jako primery v polymerázové řetězové reakci (PCR) [1][2]. Avšak nejčastěji je potřeba oligonukleotidy modifikovat. Nejčastěji se jedná o modifikaci na 5-konci oligonukleotidového řetězce fluorescenčním barvivem a z 3-konce zhasěčem, který je zodpovědní za zhasení fluorescence vyvolané fluorescenčním barvivem. Využití těchto oligonukleotidových sond se nadále rozšiřuje po zavedení technologie DNA čipů, která je založená na sérii oligonukleotidů chemicky vázaných na vhodný plochý povrch. [2] Kromě toho lze oligonukleotidové sondy považovat za aptamery, které mohou být po vazbě na buněčné receptory translokovány do vnitra buňky, což z nich činí užitečné cílené doručovací nosiče pro malé interferující RNA, mikro RNA a konvenční léky. [3]

Centrem zájmu mé práce je zkoumání elektroforetického chování jednotlivých oligonukleotidových sond. Detailně je posána jejich elektroforetická separace ve vodném prostředí. Nadále diskutuji vliv přídavku organických rozpouštědel, surfaktantů a cyklodextrinů do základního elektrolytu na elektroforetickou separaci oligonukleotidových sond. Elektroforéza dosud nebyla použita na analýzu elektroforetické pohyblivosti těchto dvojitě značených oligonukleotidových sond. Z toho důvodu je část práce věnována porovnáním výsledků dosažených na elektroforéze s výsledky dosažených HPLC metodou.

2. Teoretická část: Kapilární elektroforéza

Jedná se o analytickou metodu, která na základě vloženého napětí separuje ionty podle jejich elektroforetické pohyblivosti. Elektroforetická pohyblivost, nebo-li elektroforetická mobilita, je závislá na těchto faktorech: viskozita a pH prostředí, vložené napětí, poloměr a náboj daného iontu. Rychlost migrace analytů je mimo jiné závislá na elektrickém proudu v systému. Jinými slovy, čím je větší elektrický proud procházející kapilárou, tím kratší bude migrační čas. V tomto systému jsme schopni separovat kationty, anionty i neutrální molekuly. Pokud jsou dvě molekuly stejně veliké, liší se jejich migrační čas podle počtu nábojů přítomných na dané molekule. Ta molekula, která má větší počet nábojů se bude pohybovat v systému rychleji. Naopak pokud máme dvě molekuly se stejným počtem nábojů, rozlišují se podle velikosti. Jak z logiky věci vyplývá, čím menší bude molekula, tím menší bude odpor prostředí a tím se bude pohybovat rychleji. I drobné odlišnosti ve struktuře molekul mohou vést k jejich úspěšné separaci. Pokud budeme hovořit o separaci neutrálních molekul, tak ta lze realizovat pomocí přídavku aditiv například ve formě surfaktantů tvořící micely. Elektroforéza má široké využití, přičemž nejčastěji lze na elektroforézu narazit při analýze DNA, fragmentů DNA a proteinů. [4]

2.1. Historie

Snahy o první využití kapilární elektroforézy začaly již v roce 1892, kdy byla popsána migrace anorganických částic v elektrickém poli. Roku 1930 se Arne Tiselius zapsal do historie jako vědec, který poprvé zkonstruoval elektroforézu jako takovou. Podařilo se mu předvést pokus, kde dokázal migraci a separaci proteinů krevního séra ve vodné fázi (roku 1948 mu za tento poznatek byla udělena Nobelova cena). Na Tiseliovu práci navázali vědci J.W. Jorgenson a K.D. Lukacsová, kteří poprvé demonstrovali účinnost separace v kapiláře, která díky velkému poměru povrchu k objemu eliminovala možnost přehřátí systému. Díky velké účinnosti separace se kapilární elektroforéza stala oblíbenou technikou v analýze iontů. Dokazuje to využití kapilární elektroforézy v řadě oborů: analytická chemie, toxikologie atd. [4][5]

2.2. Princip elektroforézy

Elektroforetická separace je dána rozdílem v rychlosti migrace dělených látek. Rychlost iontu, neboli ‘ion velocity’, je definována:

Rovnice č. 1:

$$v = \mu_e E$$

přičemž v = rychlost iontu

μ_e = elektroforetická mobilita

E = intenzita elektrického pole [V/cm]

Elektrické pole lze definovat jako podíl napětí a délky kapiláry. Z této funkce vyplývají jednotky V/cm. Elektroforetická mobilita (μ_e) je charakteristickou konstantou pro určitý iont a může být odvozena z rovnice č. 2. Na iont působí dvě síly: elektrická síla (F_E), neboli elektrická síla, která působí na danou molekulu v systému a frictional force (F_F), neboli třecí síla, která má opačný vektor než elektrická síla.

Rovnice č. 2:

$$\mu_e = \frac{\text{Elektrická síla } (F_E)}{\text{Frictional force } (F_F)}$$

Elektrickou sílu (F_E) lze vyjádřit jako:

Rovnice č. 3:

$$F_E = qE$$

Třecí síla (F_F) je vyjádřena rovnicí č. 4:

Rovnice č. 4:

$$F_F = -6\pi\eta r v$$

kde q = náboj iontu

η = viskozita roztoku

r = iontový poloměr

v = rychlost iontu

Pokud jsou obě síly (elektrická a třecí) v rovnováze tak nastává takzvaný ustálený stav. Tento jev lze vyjádřit rovnicí č. 5:

Rovnice č. 5:

$$qE = 6\pi\eta r v$$

Vliv fyzikálních parametrů na elektroforetickou mobilitu, je odvozen dosazením rovnice č. 5 do rovnice č. 1. Z této rovnice je patrné, že malé molekuly nesoucí velký náboj mají

vysokou mobilitu. Naopak větší molekuly s malým nábojem se budou pohybovat pomaleji:

Rovnice č. 6:

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

Musíme si uvědomit, že mobilita, kterou můžeme dohledat v tabulkách ve formě konstanty, je určena za ideálních podmínek. V tomto případě je konstanta uváděna v podmínkách plného iontového náboje a za nekonečného ředění. U experimentu se setkáme s pojmem efektivní mobilita, která je silně závislá na pH (pK_a analytu) a složení daného pufru. [6]

2.3. Elektroosmotický tok

Elektroosmotický tok (EOF – electroosmotic flow) je objemový tok elektrolytu v kapiláře, který vzniká důsledkem negativního náboje vznikajícího na vnitřní stěně křemenné kapiláry díky deprotonizaci -SiOH skupin. Vzniká v případě aplikace napětí na kapiláru naplněnou elektrolytem. Opačně nabyté ionty (protiionty), v tomto případě kationty, začnou vytvářet vrstvu přiléhající na negativně nabitý povrch křemenné kapiláry. Tato dvojrivrstva se bez přidaného napětí ustálí a vytváří potenciál zvaný ‘zeta potenciál’. Kationty, které jsou v blízkém kontaktu se stěnou kapiláry, jsou fixované a tvoří tzv. Sternovu vrstvu. Naopak vzdálenější kationty tvoří pohyblivou část dvojrivrstvy, nebo-li difuzní vrstvu. S přidaným napětím se kationty difuzní vrstvy začnou pohybovat směrem ke katodě. Protože se jedná o solvatované ionty, unášejí celý vnitřní obsah kapiláry. Tomuto jevu říkáme elektroosmotický tok. [6][7] EOF ovládá dobu, za kterou elektrolyt projde kapilárou. Pomocí akcelerace nebo suprese EOF lze velmi efektivním způsobem ovlivnit rychlost analýzy a separaci analytů. [6] Velikost EOF lze popsat jednoduchou rovnicí vyjadřující elektroosmotickou mobilitu. [6][7]

Rovnice č. 7:

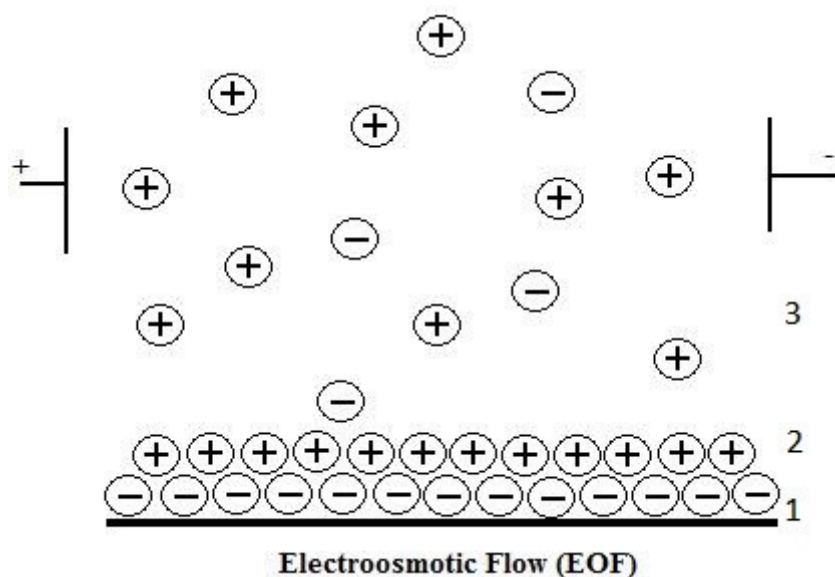
$$\mu_{EOF} = \frac{\epsilon}{4\pi\eta} E \zeta$$

kde ϵ = dielektrická konstanta
 η = viskozita
 E = síla elektrického pole
 ζ = zeta potenciál

V případě elektroforézy patří křemenná kapilára k nejpoužívanějším. Tato kapilára má vnitřní stranu pokrytou -SiOH skupinami. Při ionizaci (deprotonizace) tohoto povrchu

vzniká negativní náboj $-\text{SiO}^-$. Patrný elektroosmotický tok vzniká kolem pH 4. [6]

Vznikající EOF na základě aplikovaného napětí je znázorněn na obr. 1.

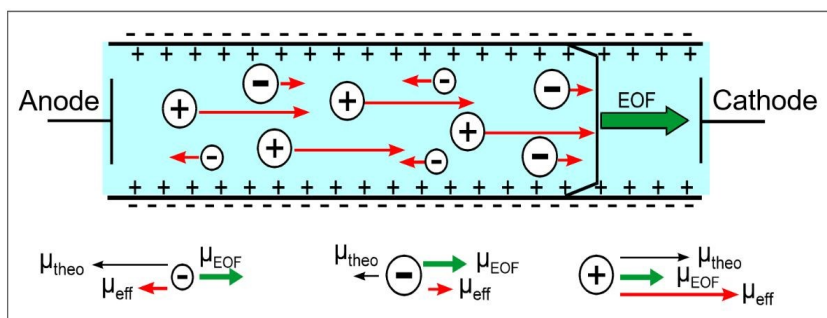


Obr. 1 EOF vznikající na základě aplikovaného napětí [převzato a upraveno z reference 8] : Negativně nabytý povrch kapiláry (1) je obklopený opačně nabytými ionty. Silně vázané přiléhající ionty tvoří Sternovu vrstvu (2). Na Sternovu vrstvu přiléhá difuzní vrstva (3), kde ionty nejsou plně fixované. [9]

Zeta potenciál je závislý na velikosti náboje na povrchu kapiláry. Tento náboj je silně ovlivnitelný pH uvnitř kapiláry. Pokud bude hodnota $\text{pH} > 9$ dochází k úplné deprotonizaci silanolových skupin, což vede i ke zvýšení zeta potenciálu. [4] Mezi další faktory, které mohou ovlivnit zeta potenciál, patří iontová síla pufru. V případě vysoké iontové síly pufru dochází ke kompresi dvojvrstvy, zčehož vyplývá snížení zeta potenciálu a ve finále i sníženého elektroosmotického toku. [6]

2.3.1. Využití EOF

Díky tomuto jevu lze v jednom vzorku analyzovat jak anionty tak i kationty společně s neutrálními molekulami. [6] Za normálních podmínek zobrazených na obr. 2 (což je, negativně nabytá stěna kapiláry), se budou anionty pohybovat nejpomaleji. Tento jev se dá jednoduše vysvětlit jejich opačnou elektroforetickou mobilitou (směrem k anodě), jejíž vektor má opačný směr než vektor elektroosmotického toku. Výsledný vektorový součet bude nižší než pro neutrální molekuly a kationty (viz obr. 2). Naopak kationty budou mít nejrychlejší migrační čas, protože jejich elektroforetická mobilita působá aditivně na EOF. [6][7]



Obr. 2 Vliv elektroosmotického toku na pohyblivost jednotlivých iontů [převzato z reference 10]

2.3.2. Modifikace EOF

Základní kámen kontroly elektroosmotického toku je alterace náboje kapilární stěny nebo změna viskozity pufru. Nejjednodušší způsob jak zpomalit EOF je snížení elektrického pole v systému. V momentě sníženého elektrického pole dochází nejen ke změnám v rychlosti analýzy ale i účinnosti separace. Tato změna je obzvláště patrná u analytů migrujících proti EOF, kde příliš silný EOF nedovolí jejich separaci. Z praktického hlediska se největší změny v EOF docílí zvýšením nebo snížením pH pufru. Hlavní nevýhoda změny pH je, že může ovlivnit stabilitu a rozpustnost analytů. [6][7]

Dále lze také sílu EOF ovlivnit změnou koncentrací nebo iontové síly pufru. Radikálnější, ale často využívaný princip modifikace EOF, je modifikace kapilární stěny. Kapiláru lze potáhnout různými polymery, který velmi výrazně zpomalí či zrychlí EOF. Příklady polymerů používaných při potahování kapiláry jsou: polyvinylalkohol, polyakrylamid atd. (více viz kapitola č. 2.6.7.1.). Nevýhoda tohoto kroku je ta, že potaženou kapiláru nelze vrátit do zcela původního stavu. [6][7]

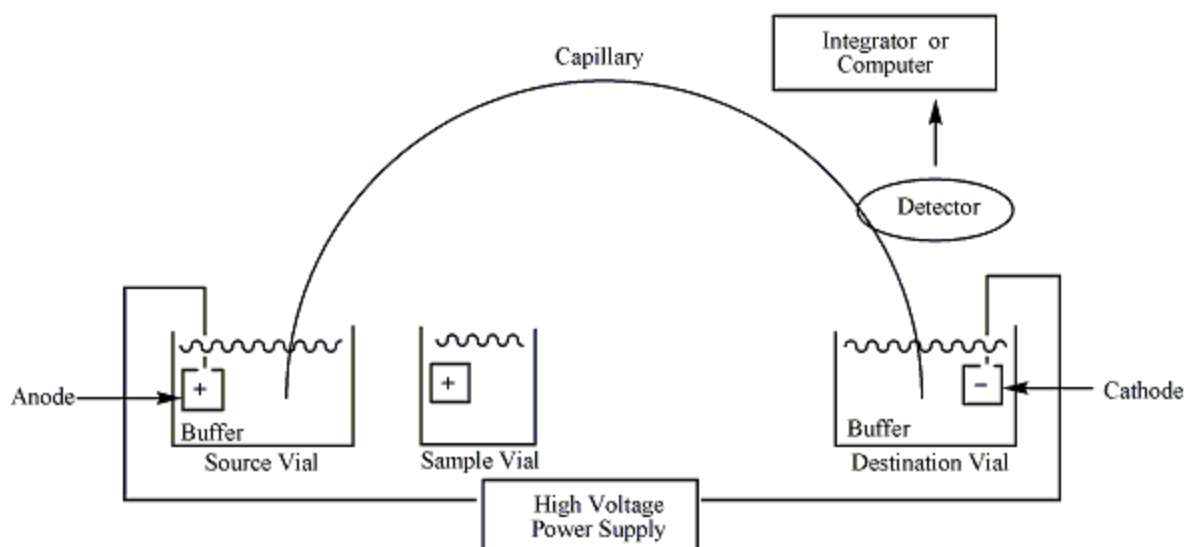
Ve většině případů je EOF pozitivní a chtěný. Někdy se ale stává, například u analýzy za vyšších hodnot pH, že je EOF moc silný. Tento jev vede k předčasné eluci analytu bez možnosti separace. Naopak při snižování hodnoty pH může dojít k adsorpci na negativně nabitou stěnu kapiláry columickými silami. Tento jev je velmi problematický u separace bazických proteinů. Módy jako isotachoforéza, isoelektrická fokusace a kapilární gelová elektroforéza profitují z redukce EOF. [6] Přehled jak lze modifikovat EOF je znázorněno v tab. 1.

Tab. 1 přehled možností jak ovlivnit EOF [převzato a upraveno z referencie 11]

Proměnná	Výsledek	Poznámka
Elektrické pole	Úměrná změna EOF	Opatrně s Joulovým teplem
Změna pH	EOF se zeslabuje při nižších hodnotách a zesiluje při vyšších	Nejlepší metoda kontroly EOF, ale může ovlivnit náboj analytů
Iontová síla	Zvýšení koncentrace elektrolytu vede ke snížení zeta potenciálu a EOF	Vysoká iontová síla vede ke zvýšení elektrického pole a Joulova tepla
Přídavek organické složky	Snižuje zeta potenciál a EOF	Komplexní efekt
Surfaktanty	Adsorbuje se na kapilární stěnu pomocí hydrofóbních nebo iontových interakcí	Anionické surfaktanty zvyšují EOF; Kationické surfaktanty snižují nebo úplně otáčejí EOF
Neutrální hydrofilní polymery	Adsorbce na kapilární stěnu pomocí hydrofóbních interakcí	Snižuje EOF pomocí stínění náboje na kapilárním povrchu a zvyšuje viskozitu
Kovalentní potažení kapilární stěny	Chemicky navázané na kapilární stěnu	Mnoho možností modifikace EOF
Teplota	Změna viskozity	Jednoduchá kontrola

2.4. Instrumentální nastavení

Nejčastěji se instrument kapilární elektroforézy skládá ze zdroje vysokého napětí, autosampleru, kapiláry, detektoru, termostatu a počítače. Zdroje vysokého napětí je napojen na elektrody (viz obr. 3). Kapilára je nejčastěji křemenná a zvnějšku potažená polyimidem. Z každé strany je kapilára s elektrodou ponořena do vialky obsahující elektrolyt. [4]



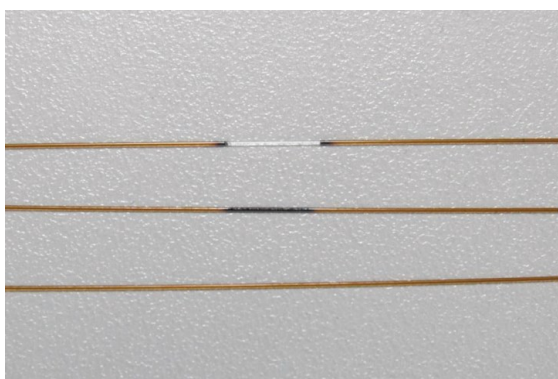
Obr. 3 schéma kapilární elektroforézy [převzato a upraveno z reference 12]

2.4.1. Dávkování

Dávkování je prováděno v řádech nanolitřů. Mezi nejčastější princip dávkování vzorku do kapiláry patří hydrodynamické dávkování. Princip spočívá v aplikaci přiměřeného množství tlaku po dobu několika málo sekund. Nástřik je nejčastěji prováděn silou 100 mbar po dobu 5 s. [13]

2.4.2. Příprava kapiláry

Prvním krokem přípravy je naměření potřebné délky kapiláry a označení detekčního okénka. Řez provádíme keramickým nožem. Nutné je také opálit polyimid v místě detekčního okénka (viz obr. 4) a na obou koncích, které budou ponořeny do elektrolytu. Řádně očistíme kapiláru po opálení. Nadále je nutné kapiláru umístit do kazety (viz obr. 5), která se vkládá do přístroje. [13]



Obr. 4 vypálené detekční okno [13]



Obr. 5 kazeta na umístění kapiláry [13]

2.4.3. Příprava kapiláry na analýzu

Mezi nejdůležitější kroky patří takzvaná kondicionizace. Tento krok je zásadní pro opakovatelnost analýzy. Udržovat stejné prostředí v kapiláře se řadí mezi největší problémy kapilární elektroforézy. Ideální podmínky jsou takové, kde se pro analýzu používá základní elektrolyt, který se skládá pouze z pufru. Ve většině případů ale pouze pufr bez aditiv nestačí. Hlavní problém vedoucí ke změně reprodukovatelnosti je adsorpce analytu či jiných součástí na stěny kapiláry. Základní kondicionizace kapiláry spočívá ve vymytí látek adsorbovaných na vnitřní povrch kapiláry. Docílit toho lze deprotonací silanolových skupin. Nejčastěji se používá mód 'flush', kde se na vstupní vialku naplněnou 0,1 M NaOH aplikuje hydraulický tlak, pomocí kterého je obsah vialky odváděn skrz kapiláru do odpadní vialky. Vždy po promytí NaOH následuje promytí vodou, na které navazuje promytí samotným pufrem. Tyto kroky provádíme před každou analýzou. [6][7]

2.4.4. Termostatování

Dalším faktorem udržování opakovatelnosti analýzy je termostatování kapiláry. Hlavní důvod termostatování je možnost vzniku Joulova tepla, který vzniká na podkladě procházejícího elektrického proudu vodičem. Teplotní zvýšení závisí na generované síle (produkt napětí a elektrického proudu) a je určeno kapilárním rozměrem, vodivostí elektrolytu a aplikovaným napětím. Tyto faktory mohou vést k velkým teplotním rozdílům v rozsahu 10 °C až 70 °C. Teplota významně ovlivňuje viskozitu elektrolytu, která má dopad na migrační čas analytů. Výkyvy teplot vedou ke špatné opakovatelnosti analýzy a mohou vést i k menší stabilitě analytů. Většina analýz se udržuje při teplotě 25 °C. [6]

2.4.5. Detekce

Formu detektoru u kapilární elektroforéze lze vybírat ze čtyř možností: Spektrofotometrický v UV a viditelné oblasti, fluorescenční, vodivostní, hmotnostní spektrometr. Nejčastěji používaný je **spektrofotometrický**. Používání křemenné kapiláry a vodného pufru dovoluje detekci v oblasti 190-780 nm. Podobným typem spektrofotometrické detekce je DAD (Diode array detector), který byl použit u našeho experimentu. Hlavní výhodou oproti detektoru UV-VIS, pomocí kterého lze detekovat pouze jednu konkrétní vlnovou délku, je možnost detekce celého UV spektra v jednom bodě elektroforeogramu. Vzhledem k tomu, že drtivá většina analyzovaných látek má

absorbanci v UV-VIS oblasti, je tento princip detekce nejpoužívanější. Elektroforeogram je sestaven na základě závislosti absorbance při dané vlnové délce a čase. Platí tu Lambertův-Beerův zákon:

$$A = \epsilon cl$$

Kde ϵ je molární absorpční koeficient (tato hodnota je konstanta pro danou látku za daných podmínek a určité vlnové délce), l tloušťka absorbující vrstvy, c látková koncentrace daného analytu. [6][14][15]

Fluorescenční detektory se vyznačují ještě větší citlivostí než DAD. Analyty ale musí buď sami o sobě být schopny fluorescence, nebo musí proběhnout derivatizace analytů fluorescenčním barvivem. Záleží na aplikaci a analytu, ale vzhledem k nepříliš velkému množství analytů schopného fluorescence a vyšší ceně detektoru se u elektroforézy častěji setkáme s detekcí UV-VIS nebo DAD. [6][14][15]

Nepříliš vysoká citlivost a nutnost modifikace kapiláry vodivostních detektorů vedla k nahrazení za UV-VIS detektory. **Bezkontaktní vodivostní detektor** dnes patří mezi jediný užívaný typ vodivostního detektoru. Detektor se skládá ze dvou elektrod, které jsou umístěny cylindricky kolem vnější polyimidové vrstvy kapiláry. Elektrody vytvářejí válcový kondenzátor (detekční cela), kde se v meziprostoru měří elektrická konduktivita. Na jednu elektrodu (excitační) je aplikován střídavý elektrický proud. Elektrický proud poté protéká detekční celou ke druhé elektrodě, kde je snímán. Poté je tento proud zesílen a změřen. Tím, jak detekční celou prochází proud, tak jen malá změna v elektrolytu vede ke změně její vodivosti, což se projeví na měřeném proudu. Nejčastější využití této detekce je v případě, když analyt obsahuje málo absorbující chromofor. Nabízí možnost detekovat molekuly bez potřeby derivatizace. Hojně využití nalezneme také u detekce anorganických iontů. [14][15][16]

Hmotnostní spektrometr patří mezi nejcitlivější a nejselektivnější detektor. Hlavní výhodou je získání informace o struktuře analytů. Nevýhoda je nemožnost detekovat analyt přímo v kapiláře. Vzhledem k problematickému propojení hmotnostního detektoru s elektroforézou je tento typ detekce využíván pouze ve specifických případech. [6][14] Základní přehled výhod a nevýhod všech typů detekcí užívaných v kapilární elektroforéze jsou znázorněny v tab. 2.

Tab. 2 výhody a nevýhody typů detekcí využívaných v elektroforéze [17]

Metoda	Maximální + minimální množství analytu (mol)	Maximální + minimální koncentrace analytu (M)	Výhody/ nevýhody
UV-VIS spektrometr	10^{-13} - 10^{-16}	10^{-5} - 10^{-8}	- univerzální metoda
Fluorescenční spektrometr	10^{-15} - 10^{-17}	10^{-7} - 10^{-9}	- Citlivá metoda - Často vyžaduje úpravu vzorku
Laser-induced fluorescence	10^{-18} - 10^{-20}	10^{-14} - 10^{-16}	- Velmi citlivá metoda - Často vyžaduje úpravu vzorku - Vysoká cena
Vodivostní	10^{-15} - 10^{-17}	10^{-7} - 10^{-8}	- Univerzální, ale zastaralá - Vyžaduje modifikaci kapiláry a speciální elektroniku
Hmotnostní spektrometr	10^{-16} - 10^{-17}	10^{-8} - 10^{-9}	- Citlivá metoda která poskytuje informace o struktuře - Složité spojit s kapilární elektroforézou

2.5. Módy kapilárních elektromigračních metod

Klíčem univerzálnosti elektromigračních metod je velké množství různých módů. Každý z těchto módů nabízí jiný princip separace. Základní metody spadající pod kapilární elektromigrační metody jsou: kapilární zónová elektroforéza (vzhledem k tématu DP bude tato kapitola podrobně popsána v kapitole 2.6.), micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC), kapilární gelová elektroforéza (CGE), kapilární izotachoforéza (CITP), kapilární isoelektrická fokusace (CIEF), mikroemulzní elektrokinetická chromatografie (MEEKC) a kapilární elektrochromatografie (základní rozdíly jsou vysvětleny v tab. 3). [6][7][18]

Tab. 3 Přehled vybraných módů elektromigračních metod [6][7][18]

Módy	Základ separace
Kapilární zónová elektroforéza (CZE)	Volný pohyb elektrolytu a analytů
Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC)	Hydrofobní/iontové interakce s micelou [19]
Kapilární gelová elektroforéza (CGE)	Velikost a náboj analytů
Kapilární isoelektrická fokusace (CIEF)	Rozdíly v isoelektrických bodech analytů [20]
Kapilární izotachoforéza (CITP)	Rozdílné hranice pohyblivostí
Mikroemulzní elektrokinetická chromatografie	Rozdílná rozpustnost a rozdělování (obdoba MEKC)
Kapilární elektrochromatografie (CEC)	Kapiláry naplněné stacionární fází- záchyt analytů na podkladu rozdílné afinitě k stacionární fázi [21]

2.6. Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

Tento mód elektroforetické separace patří mezi nejpoužívanější. Mezi hlavní přednosti patří jednoduchost operace a univerzálnost. Kapilára je naplněna pufrům a separace analytů probíhá na základě rozdílné elektroforetické migrace. Pomocí EOF lze dělit anionty, kationty a ve speciálních případech i neutrální látky. Selektivita je úzce spojená s charakterem základních elektrolytů. I malá obměna základního elektrolytu může vést k významným rozdílům v analýze. Selektivitu a citlivost metody lze ovlivňovat

přídavkem aditiv, úpravou pH pufrů, přidáním surfaktantů, přidáním chirálních selektrů, změnou teploty nebo modifikací kapilární stěny. [6]

2.6.1. Výběr pufru

Správná selekce pufru patří mezi nejdůležitější součást úspěšné elektroforetické analýzy. Hlavním úkolem pufru je poskytnout dostatečné množství iontů nutných pro úspěšné proudění elektrického proudu. Druhým zásadním úkolem pufru je udržet pH prostředí, aby došlo k optimální ionizaci analyzovaných látek. Pufr také může ovlivňovat stabilitu analytů. Vysoká citlivost na změnu pH si vyžaduje pufr, který jsou schopné udržet stabilní hodnotu pH. Základními vlastnostmi ideálního pufru pro CZE jsou:

- Pokud je detekce pomocí UV/DAD je potřeba nízká absorbance v detekované vlnové délce
- Nízká mobilita, aby se nevygeneroval moc velký proud, která může vést k elektrolýze
- Dobrá pufrovací kapacita s minimálními výkyvy pH

[6] [22]

Přehled nejčastěji používaných pufrů je znázorněn v tab. 4.

Tab. 4 nejčastěji používané pufrы při CZE [převzato a upraveno z reference 22]

Pufr	pK _a
Fosforečnanový pufr	2.15
Malonanový pufr	2.85
Mravenčanový pufr	3.75
6-aminokaprovový pufr	4.37
Octanový pufr	4.76
Pufr odvozen od MES (2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina)	6.21
Triethanolaminový pufr	7.76
Pufr odvozen od TRIS [Tris(hydroxymethyl)aminomethan]	8.06
Tricinový pufr	8.26
Borátový pufr	9.23

2.6.2. pH pufru

Modifikace pH patří mezi jednu z nejjednodušších a nejpoužívanějších možností ovlivnění analýzy. Jako příklad lze uvést chování peptidů a proteinů. U peptidů a proteinů, které mají známou hodnotu isoelektrického bodu (pI), lze ovlivnit zda eluce nastane před nebo po EOF. Záleží na tom, zda bude pH pufru nad či pod hodnotou isoelektrického bodu. Pokud bychom se pohybovali nad hodnotou pI, získáme negativně nabitý iont, který bude putovat směrem k anodě. Protože EOF působí směrem ke katodě, bude docházet k detekci aniontů až po EOF. V momentě, kdy bude hodnota pH pod pI hodnotou, bude nastávat opačný jev. [7][22]

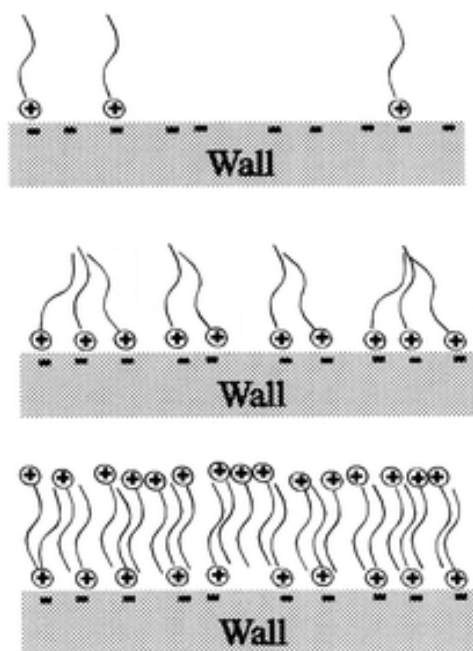
Mimo jiné má pH pufru vliv i na elektroosmotický tok. Jako praktický příklad lze uvést analyty se kterými jsme pracovali. Oligonukleotidové sondy (viz. kapitola 2.7.) jsou negativně nabitě a budou migrovat proti EOF. Se zvýšením pH dochází k zesílení elektroosmotického toku. Při příliš vysoké síle EOF může docházet k eluci analytů bez separace. V tomto případě by bylo vhodné zvážit snížení pH pufru. Naopak pokud by analýza potřebovala zrychlit, lze zvýšit pH pufru a tím i zesílit EOF. To by vedlo ke mnohem kratší době potřebné k separaci analytů. [7][22]

2.6.3. Aditiva: surfaktanty

Surfaktanty patří mezi nejpoužívanější aditiva. Nejčastěji používané surfaktanty lze rozdělit do čtyřech skupin: anionické, kationické, zwitteriontové a neionické. Každý surfaktant má svou hodnotu CMC (kritická micelární koncentrace), která specifikuje potřebnou koncentraci na vytvoření micely. Pokud se pohybujeme pod hodnotou CMC chovají se surfaktanty jako pomocná rozpouštědla (kosolventy) pro hydrofobní látky, jako látky ovlivňující povrch kapilární stěny nebo jako párový protiion. Mechanismus interakce mezi monomerním surfaktantem a analytem je dán dvěma směry. První možnost mechanismu je iontová interakce nabitou částí monomeru. Druhá možnost je nepolární interakce mezi alkylovými řetězci monomeru a hydrofobní částí analytu. Tyto interakce často probíhají za doprovodných jevů, které vznikají na podkladě interakce surfaktantu s kapilární stěnou. [6][7]

V případě interakce surfaktantu s kapilární stěnou může dojít k modifikaci elektroosmotického toku. Modifikace elektroosmotického toku surfaktantem závisí na iontovém charakteru surfaktantu. Dle jejich charakteru mohou elektroosmotický tok zrychlit, zpomalit či obrátit. Kationické surfaktanty (např. CTAB - cetyltrimetylamonium

bromid) mohou vést k reverznímu elektroosmotickému toku. Mechanismus spočívá v adsorpci monomerů kationického surfaktantu na kapilární stěnu díky iontovým interakcím. CTAB vytvoří dvojvrstvu prostřednictvím hydrofobních interakcí mezi již adsorbovanými monomery a volnými monomery v pufru (viz obr. 6). Důsledek tohoto děje je pozitivně nabitá modifikovaná vnitřní stěna kapiláry, což vede k reverznímu elektroosmotickému toku. Navíc adsorbované monomery na vnitřní stěnu kapiláry zamezí interakce analytu s povrchem kapiláry. [6][7]



Obr. 6 Schématické znázornění adsorbce CTAB surfaktantu na nabitý povrch křemenné kapiláry [převzato a upraveno z reference 23]

Pokud budou koncentrace nad CMC budeme hovořit o micelární elektrokinetické chromatografii. V tomto případě bude k separaci docházet za pomoci surfaktantů tvořící micely. Na povrchu micely jsou nabyté polární skupiny, které jsou v kontaktu s pufrém. Micely ve většině případů nesou náboj, pomocí jehož jsou schopny elektroforetické migrace. Aniontové surfaktanty, jako je např. dodecylsírán sodný, migrují směrem k anodě proti elektroosmotickému toku. Vzhledem k velikosti micely je většinou EOF silnější než jejich elektroforetická mobilita (v případě neutrálního či bazického pH). Důsledek je takový, že separace různých micel bude probíhat buď podle velikosti nebo podle náboje na povrchu. U neturálních analytů (nebo se slabým kladným nábojem) bude odlišný eluční čas závislý na tom, zda je analyt v micle (tah proti EOF) či nikoli. [6][7]

2.6.3.1. Taurodeoxycholová kyselina

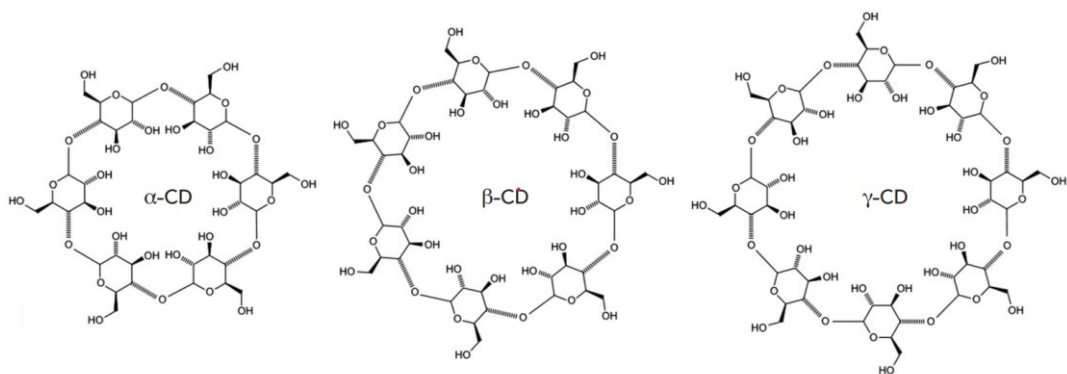
Taurodeoxycholová kyselina patří mezi žlučové kyseliny. Díky její struktuře se často využívá v micelární elektrokinetické chromatografii. V našem experimentu je využita jako surfaktant, který už při velmi malé koncentraci začne tvořit micely. Její kritická micelární koncentrace se pohybuje v rozmezí 1-4 mM. [24] V nedávno publikovaném článku velmi detailně popisují autoři Raymond B. Yu a Joselito P. Quirino charakteristiky a využití cholových kyselin u micelární elektrokinetické chromatografie. Velkou část článku věnují vlivu cholových kyselin na chirální separaci. Nicméně také komentují výhody a nevýhody užití těchto surfaktantů v nechirální separaci. [25]

Marcelo Blanco a Ismael Valverde již v roce 2001 publikovali článek ve kterém popisují elektroforetickou analýzu alkylxantinů. Jejich nejlepší analýza byla provedena za přítomnosti taurodeoxycholové kyseliny v nadkritické micelární koncentraci. Jejich experiment byl prováděn v podmínkách zásaditého pufru a tím i za přítomnosti elektroosmotického toku. [26]

2.6.4. Aditiva: chirální selektory

U CZE lze využít přidavek chirálních selektorů do pufru. Mezi nejužívanější chirální selektory patří: cyklodextriny, makrocyclické antibiotika, žlučové soli, crown ethery a řada komplexů pro ligandovou výměnu (např. měd-aspartátové komplexy). Selektivitu ovlivňuje koncentrace a typ selektoru. Přidavkem alkoholu, surfaktantu, urey nebo kovových iontů také lze modifikovat chirální separaci. Navíc se cyklodextriny (CD) používají u separaci nechirálních molekul, kde fungují na principu nosiče. Analyty, který se vejdou do kavity, budou migrovat s CD. Naopak analyty neinteragující s CD se budou pohybovat na základě jejich elektroforetické pohyblivosti. [6][7]

CD, tvořeny cyklickým oligosacharidem (obsahující šest, sedm nebo osm glukózových jednotek), se nazývají alfa, beta a gama (viz obr. 7). CD mají uprostřed hydrofobní kavitu, do které může analyt vstupovat. Obvod dutiny obsahuje chirální primární i sekundární hydroxylové skupiny, díky kterým dochází ke specifické interakci chirálních látek a jejich vstupu do kavity. Derivatizací hydroxylových skupin (např. carboxyalkyl, sukcinylalkyl atd.) lze vylepšit selektivitu. [6][7]



Obr. 7 základní struktura α , β a γ cyklodextrinů [převzato a upraveno z reference 27]

2.6.5. Aditiva: organická rozpouštědla

Hlavní rozpouštědlem v CE je bezkonkurenčně voda, ale v některých případech je nutno použít i organickou složku. Organická složka může být buď hlavním rozpouštědlem, nebo se dá přidat jako aditivum do vodného pufru. Hlavní přednosti organických rozpouštědel je zvýšení rozpustnosti analytů. Dále se přidavkem organického rozpouštědla mohou ovlivňovat faktory jako jsou viskozita, bod varu elektrolytu a toxicita elektrolytu, dále chemická stabilita všech komponentů elektrolytu včetně rozpuštěného analytu. Mezi nejčastěji používané organická aditiva patří methanol, ethanol, propanol, acetonitril a tetrahydrofuran. Tato rozpouštědla mají relativně nízkou toxicitu a dobrou chemickou stabilitu. [28]

Přidavkem organického rozpouštědla do elektrolytu lze ovlivnit velké množství separačních parametrů. Nelze však vždy s jistotou předpovědět, jak se dané organické rozpouštědlo bude v elektroforetických podmínkách chovat. Hlavní výhody jsou: vyšší separační účinnost, kratší/delší čas analýzy, lepší rozpustnost analytů a lepší rozlišení. [28]

Ernst Kenndler [28] věnoval celý článek organickým rozpouštědlům v kapilární elektroforéze. Velice přesně popisuje vliv organického rozpouštědla na separaci. Pozitivní vliv na účinnost separace vysvětluje heterokonjugací, která nemůže vzniknout pouze ve vodném prostředí. Vzniká v prostředí rozpouštědla s určitým poměrem vodné složky a organického rozpouštědla. [28] Na druhou stranu také zmiňuje, že v případě užití organických rozpouštědel nedojde vždy k zlepšení separačních podmínek. Popisuje vliv organických rozpouštědel na pH a na hodnotu pKa. Tato problematika zahrnuje objasnění ovlivnění pH přidavkem organiky. Slabé báze se v prostředí organického rozpouštědla snadněji ionizují a dochází k úspěšnější separaci než pouze ve vodném prostředí. Nadále

se zabývá vlivem organických rozpouštědel na elektroforetickou pohyblivost analyzovaných látek. Relevantní je také ovlivnění elektroosmotického toku, který organická rozpouštědla ovlivňují změnou viskozity a relativní permitivity. [28][29]

2.6.6. Přehled nejčastěji používaných aditiv

Nejčastěji používaná aditiva a jejich využití jsou zobrazeny v tab. 5.

Tab. 5 aditiva a jejich využití [6][30]

Aditiva	Příklad	Použití
Surfaktanty (anionické, kationické, neutrální)	SDS, CTAB, polyethylen glykol monodecyl ether (BRIJ), polyoxyethylen sorbitan monolaurát (TWEEN)	<ul style="list-style-type: none"> - EOF modifikace - Solubilizace hydrofobních analytů - Iontové párování - Tvorba micel
Zwitteriontové substance	2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina (MES), tris(hydroxymethyl)aminoethan (Tris), 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonát (CHAPS)	<ul style="list-style-type: none"> - Zvýšit iontovou sílu bez snížení konduktivity - Separace proteinů
Organické látky	methanol, acetonitril, trifluoroctová kyselina (TFA), tetrahydrofuran (THF)	<ul style="list-style-type: none"> - Snížení EOF - Změna selektivity u micelární elektroforézy - Změna selektivity u analýzy s přídavkem surfaktantu pod CMC - Modifikace chirální separace
Lineární hydrofilní polymery	methylcelulóza, polyakrylamid, poly 1-acetyloxyethylen (PVA), polyethylen glykol (PEG)	<ul style="list-style-type: none"> - Snížení EOF - Snížení adsorbce analytu na kapilární stěnu
Chirální selektory	cyklodextriny, crown ether, žlučové soli	<ul style="list-style-type: none"> - Chirální separace - Solubilizace hydrofobních substancí - Zlepšení separace
Ionty kovové nebo polokovové	K^+ , Na^+ , Cu^{2+} , Li^+	<ul style="list-style-type: none"> - Ovlivnění selektivity u chirální separace a u CGE
Látky vázající vodík/solubilizující látky	urea	<ul style="list-style-type: none"> - Solubilizace proteinů - Ovlivnění chirální separace - Rozvolnění terciální struktury DNA

2.6.7. Modifikace kapilární stěny

Modifikaci kapilární stěny lze provádět dvěma směry: a) permanentní modifikací (kovalentně navázané nebo fyzikálními vazby navázané substance); nebo b) dynamickou deaktivací. Pokud je jedna z těchto modifikací správně provedena, může dojít k silnému poklesu až vymizení interakce mezi kapilární stěnou a analytem. Jak vychází z předchozích kapitol, modifikace kapilární stěny ovlivňuje elektroosmotický tok. [6]

2.6.7.1. Permanentní modifikace kapilární stěny

Mezi nejčastější formu modifikace patří silylace s deaktivovanou funkční skupinou. Si-O-Si-R skupina je stabilní pouze v rozmezí pH 4-7. Pokud se nepohybujeme v tomto rozmezí dochází k hydrolyze těchto vazeb. Vzhledem k tomu, že kovalentně (permanentně) navázané skupiny by měli být odolné jak vůči výplachu (flush) tak i pufru jako takovém, je tato pH limitace značným problémem. Nicméně pokud zvolíme správné podmínky může takto modifikovaná kapilára pozitivně ovlivnit separaci analytů. Záleží na typu modifikace (viz tab. 6), který faktor bude nejvíce ovlivněn. [6][7]

Deaktivaci lze dosáhnout různými skupinami jako jsou polyakrylamidy, polysacharidy nebo aryl-pentafuryl skupiny. Eliminaci EOF dosáhneme pomocí neutrálních deaktivátorů s polyakrylamidem nebo polyethylen glykolem. Mechanismus spočívá v několikanásobném zvýšení viskozity prostředí a snížení efektivního náboje kapilární stěny. Reverzní tok docílíme modifikací kationickými skupinami. Pokud použijeme amfoterní skupiny, záleží na jejich pI a na pH pufru zda proběhne úplná reverse EOF nebo jen zpomalení. [6][7]

Tab. 6 typy permanentní modifikace kapilární stěny

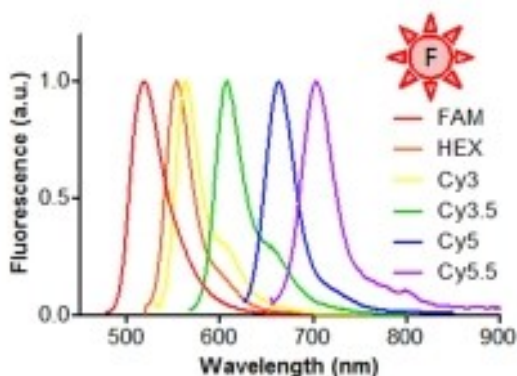
Typ modifikace	Komentář
Silace + coupling (Si-O-Si-R) R= Polyakrylamid, aryl-pentafluor, aminokyselina, sulfonová kyselina, maltosa, PEG, polyvinyl pyrrolidin	<ul style="list-style-type: none"> - Jednoduchá příprava - Stabilní v pH 4-7 - Limitovaná stabilita - Mnoho různých modifikací
Přímo Si-C coupling (polyakrylamid, gringardova reakce)	<ul style="list-style-type: none"> - Eliminace silylace - pH 2-10 - obtížné na přípravu
Adsorbované polymery (PVA, PEG, celulosa)	<ul style="list-style-type: none"> - Slabá stabilita - Hydrofobní - pH 2-4
Adsorbované/crosslinked polymery (polyethylenimin)	<ul style="list-style-type: none"> - reverzní EOF - analýza basických proteinů - stabilní ve fyziologickém pH

2.6.7.2. Dynamická deaktivace

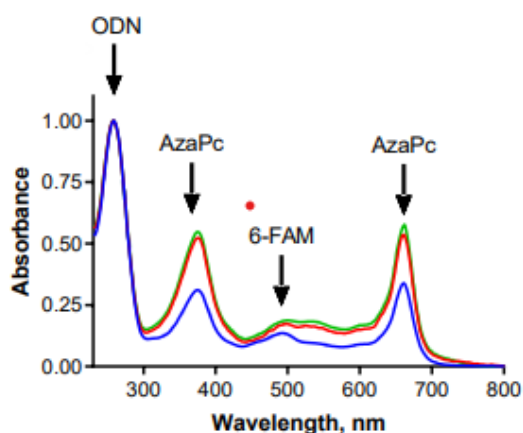
Přídavek aditiva do pufru patří mezi oblíbenější a častější metody modifikace kapilární stěny. Díky stále čerstvému základnímu elektrolytu se pokaždé obnovuje a regeneruje vnitřní stěna kapiláry. Hlavní přednosti tohoto typu modifikace jsou: snadná příprava a provedení, finanční nenáročnost, veliká škála využití. Příprava spočívá v jednoduchém rozpuštění aditiva do základního elektrolytu. Nejčastěji používané aditiva jsou surfaktanty (viz kap. 2.6.3.), které se dokážou adsorbovat na kapilární stěnu a tím ji dočasně modifikovat. Široká škála surfaktantů umožňuje mnoho různých možností změny EOF jako je jeho zrychlení, zpomalení a otočení. Komplikace může působit, že tato aditiva neovlivňují pouze kapilární stěnu ale také ostatní složky v základního elektrolytu. V nějakých případech jev chtěný, např. zvýšená solubilita analytů nebo snížení interakce mezi analyty, se může stát nechtěným. Komplikace především nastávají s opakovatelností analýzy. Kontinuální nanášení pufru se surfaktanty nikdy nevytvoří neměnnou modifikaci kapilární stěny. [7]

2.7. Modifikované oligonukleotidy

Nemodifikované oligonukleotidy jsou nejčastěji používány buď jako primery v PCR nebo jako látky generující základ pro cílené zavádění léčiv. [1][2] Jejich modifikací lze ovlivnit jejich vlastnosti a stabilitu. Různě modifikované oligonukleotidy se využívají v biologii, biochemii, analytické chemii a genetice. [31] Tyto sondy se skládají z nemodifikovaného oligonukleotidu, zhášedce a fluorescenčního barviva (ukázka emisních spekter používaných fluoroforů je zobrazena na obr. 8). Sondy jsou jednoduše nebo dvojitě značené. Jednoduše označené sondy obsahují samotný zhášedce nebo samotné fluorescenční barvivo. Dvojitě označené sondy jsou z jedné strany označeny fluorescenční značkou a z druhé strany zhášedcem (modelové absorpční spektrum neznačeného oligonukleotidu, fluorescenčního barviva a zhášedce je znázorněno na obr. 9). Zhášedce je zodpovědný za zhášení fluorescence, která je vyvolána statickým nebo dynamickým procesem. BHQ-1 (black hole quencher) je ukázka staršího dark quencheru. Nejčastěji je používán k zhášení zelených nebo žlutých barviv jako jsou 6-karboxyfluorescein (6-FAM) nebo tetrachlorfluorescein (TET). Jeho absorpční rozsah se pohybuje mezi 480-580 nm s vrcholem absorpce v 534 nm. [32] Mezi takzvané moderní dark quencherů patří molekuly z rodiny azaftalocyaninů (AzaPC). Mezi jejich výhody patří široké absorpční spektrum a díky ultrarychlému intramolekulárnímu přenosu je jejich excitovaný stav bez fluorescence. [33] Díky jejich unikátní schopnosti zhášení se řadí mezi výborné příklady moderních quencherů. [1][32][33]



Obr. 8 ukázka emisních spekter používaných fluoroforů [33]



Obr. 9 modelové absorpční spektrum neznačeného oligonukleotidu (ODN), azaftalocyaninového zřášeče (AzaPC) a fluorescenčního barviva (6-FAM) [převzato a upraveno z reference 34]

2.7.1. Fluorescenční barviva

6- FAM (6-karboxyfluorescein) je fluorescenční barvivo s absorpčním píkem v 493nm a excitačním píkem u 517 nm. [35] Nejčastěji je používán ve značení proteinů a nukleotidů. Jeho schopnost procházet membránami v buňkách patří mezi velké výhody. Díky dobré rozpustnosti ve vodě a dobré fotostabilitě patří mezi nejpoužívanější fluorescenční barviva. [36][37] Při užití 6-FAM se také mohou vyskytnout komplikace. Hlavní nevýhody jsou vysoká citlivost na změnu pH a nepříliš vysoká stabilita při vyšších teplotách. [38]

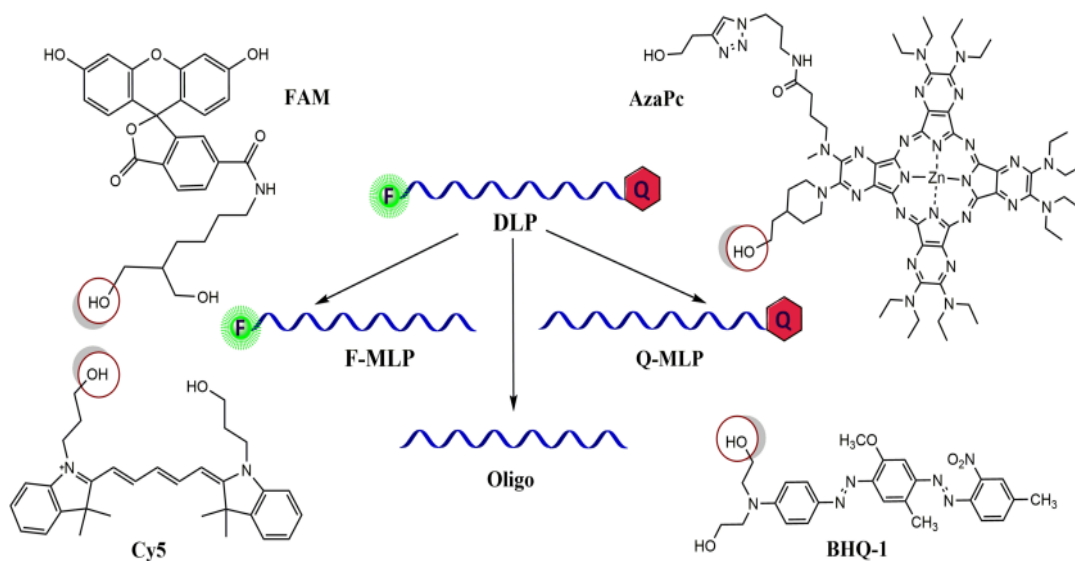
Cy5 (tetrametylindo(di)-karboxyanid) patří mezi široce používaná červená fluorescenční barviva. Nejčastější užití najdeme v oblasti cytometrie, genetiky, zobrazování proteinů a nukleotidů. Také je součástí lipofilního neuronálního značení. Vyznačuje se absorpcí v rozmezí 633-647 nm. Největší výhodou je malá pravděpodobnost autofluorescence biologického materiálu v tomto rozsahu vlnových délek. [39][40] Hlavní nevýhodou užití Cy5 je malý Stokesův posun, což může vést k problematickému oddělení excitačního a emisního spektra. Pokud máme přítomno více Cy5 molekul na jednom nosiči, může nastat samozhášení fluorescence. [41]

2.7.2. Syntéza oligonukleotidových sond

Oligodeoxynukleotidy se získávají komerčně známou syntézou zvanou fosforamiditová metoda. [42] Syntéza probíhá naopak jako biosyntéza nukleotidů. Postupuje se od 3' → 5' ve čtyřech krocích. První krok detrytilace chránicí skupiny, která zamezuje

polymeryzaci nukleosidů, spočívá v odstranění 5'-DMT (4,4-dimethoxytrityl) pomocí trichloroctové kyseliny. Plynule navazuje coupling (párování). Po odstranění DMT z 5' konce vzniká volná 5' hydroxylová skupina, která reaguje s dalším nukleosidem ve formě fosfoamidového monomeru. Vzniklý fosfit-triester je velmi nestabilní a musí být oxidován na stabilnější fosfát. Tato oxidace je prováděna za přítomnosti jódu, vody a pyridinu. Produkt této oxidace je fosfát-triester. 100% úspěšnost couplingu není možná a tím pádem vznikají i nukleosidy s nezreagovanou 5' hydroxylovou skupinou. Tyto volné hydroxylové skupiny mohou v dalším cyklu samovolně reagovat a vést k chybějícím bazím. Akumulace těchto bazí vede ke tvorbě nečistot, které jsou velmi obtížné odstranit. Z toho důvodu je finálním krokem capping (zavíčkování), kde v prostředí THF acetanhydrid spolu s N-methylimidazolem vytvářejí intermediát, který je schopný navázat na koncovou 5-OH skupinu acetyl, který znemožní hydroxylové skupině samovolně reagovat. [42][43]

Mechanismus navázání značky spočívá v modifikaci pevné fáze jedním ze zhášečů. Na tento krok navazuje syntéza oligonukleotidového řetězce. Posledním krokem je navázání fluoroforu pomocí fosforamiditové metody. Odštípnutí od pevné fáze je prováděno 32% roztokem amonia. Přesto, že je tato metoda velmi rychlá a efektivní, nevznikají pouze oboustranně modifikované oligonukleotidy. Jednoduše značené molekuly tvoří téměř 2/3 výtěžku. [31][42][43] Na obrázku č. 10 jsou znázorněny struktury značených i neznačených oligonukleotidů používaných v této diplomové práci.



Obr. 10 znázorněné struktury používaných fluoroforů (Cy5, FAM), zhášeců (AzaPc a BHQ-1), nemodifikovaného oligonukleotidu (Oligo), DLP- dvojitě značené oligonukleotidové sondy zhášecem (Q) a fluoroforem (F), F-MLP- jednoduše značená oligonukleotidová sonda fluoroforem a Q-MLP- jednoduše značená oligonukleotidová sonda zhášecem [31]

2.7.3. Separace oligonukleotidových sond pomocí CZE

V roce 1997 G. De Bellis a G. Salani [44] publikovali článek, ve kterém prezentují metodu stanovení čistoty oligonukleotidů pomocí kapilární elektroforézy ve volném roztoku při nízkém pH. Konstatují fakt, že princip separace nemodifikovaných oligonukleotidů spočívá v diferenciální protonizaci nukleobází. Z toho usuzují, že složení fragmentu DNA koreluje s migračním časem. [44] Pier Giorgio Pietta et al. [45] později publikovali článek, ve kterém testují aplikaci kapilární elektroforézy při nízkém pH na kontrolu kvality oligonukleotidů. V tomto článku zmiňují, že CZE může být alternativou ke klasickým analytickým metodám, které používají bazické pufrы a vyžadují přítomnost síťovacího média k oddělení oligonukleotidů v závislosti na jejich délce. Konstatují, že při nízkém pH ($\text{pH} < 5$) jsou čtyři nukleobáze (adenin, cytosin, guanin a thymin) převážně kladně nabitě. Z toho důvodu je při nízkém pH elektroforetická migrace závislá na rozdílném náboji, který nese oligonukleotid různého složení. [45] Kromě toho, byla CZE použita pro analýzu modifikovaných oligonukleotidů. V roce 1998 byla CZE použita pro kvantifikaci rezistence fosforthoátem modifikovaného oligonukleotidu vůči 3'-exonukléaze, [46] zatímco v nedávné práci byly lipid-oligonukleotidové kojugáty

analyzovány pomocí cyklodextrínem modifikované kapilární zónové elektroforézy. Je zajímavé, že v posledně uvedené práci byly odděleny jednořetězcové lipidové kjugáty a nelipidický oligonukleotid. [47]

3. Cíle práce

Hlavním cílem diplomové práce je otestovat možnost využití kapilární elektroforézy pro separaci nečistot vznikajících při syntéze reálných dvojitě značených oligonukleotidových sond. Modelové vzorky obsahovaly směs:

a) neznačeného oligonukleotidu, jednoduše značeného oligonukleotidu pomocí BHQ a dvojitě značený oligonukleotid pomocí BHQ a 6-FAM

b) neznačeného oligonukleotidu, jednoduše značeného oligonukleotidu pomocí AzaPC a dvojitě značeného oligonukleotidu pomocí AzaPC a FAM nebo AzaPC a Cy5.

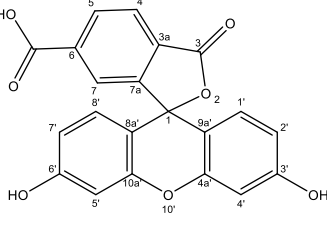
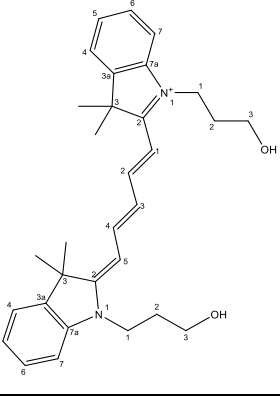
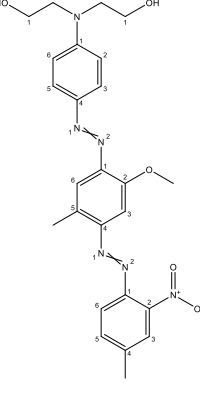
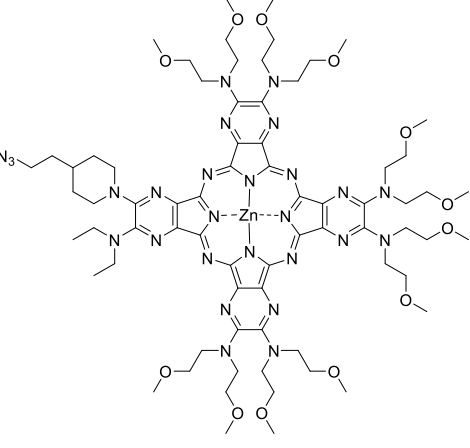
Separace těchto dvojitě značených oligonukleotidových sond dosud nebyla provedena na elektroforéze. Výsledné elektroforetické separace jsou porovnány s výsledky dosaženými Kučerou et al. v HPLC. [31]

4. Experimentální část

Chemikálie:

Jako organická rozpouštědla byla použita acetonitril HPLC grade (VWR chemicals, Česká republika), methanol HPLC grade (VWR chemicals, Česká republika), ethanol absolute reagent grade (Scharlau, Německo), tetrahydrofuran (Merck, Česká republika), pyridin (Merck, Česká republika), kyselina mravenčí 85 % p.a. (Merck, Česká republika) a kyselina octová >99% (Merck, Česká republika). Pro tvorbu základních elektrolytů byly použity tris(hydroxymethyl)aminoethan >99,8% (Tris) (Merck, Česká republika), dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát (Merck, Česká republika), dihydrogenfosforečnan draselný (Merck, Česká republika), chlorid sodný (Merck, Česká republika), kyselina methyldifosfonová (medronová) pro syntézu (Merck, Česká republika), fosforečná kyselina 85% (Lachner, Česká republika) nebo hydroxid sodný (Lachner, Česká republika). Aditiva které byly použity na tvorbu finálních elektrolytů jsou dodecylsíran sodný (SDS) (Merck, Česká republika), taurodeoxycholát sodný (Merck, Česká republika), methyl- β -cyklodextrin (CYCLOLAB, Maďarsko), 6-(ω -sulfanyl-alkylene-sulfanyl)- β -cyklodextrin (CYCLOLAB, Maďarsko), random methyl- γ -cyklodextrin (CYCLOLAB, Maďarsko), γ -cyklodextrin (CYCLOLAB, Maďarsko), 2-hydroxypropyl- β -cyklodextrin (CYCLOLAB, Maďarsko) a 2-hydroxypropyl- γ -cyklodextrin (CYCLOLAB, Maďarsko). Vzorčky, poskytnuté docentem Miletínem, nemodifikovaný oligonukleotid obsahující 17 nukleotidů (OLIGO), 3'BHQ (oligonukleotid značený BHQ-1), 3'FAM-5'BHQ (oligonukleotid značený 6-FAM a BHQ-1), 3'PCQ (oligonukleotid značený AzaPC), 5'Cy5-3'PCQ (oligonukleotid značený Cy5 a AzaPC) a 5'FAM-3'PCQ (oligonukleotid s nasyntetizovaným 6-FAM a AzaPC) pocházely od firmy Generi biotech. Struktury používaných zhášečů a fluorescenčních barviv jsou znázorněny v tab. 7.

Tab. 7 Přehled struktur fluorescenčních barviv a quencherů

Název/označení	Strukturní vzorec
<p>6-FAM</p> <p>3',6'-dihydroxy-1-oxospiro[2-benzofuran-3,9'-xanten]-5-karboxylová kyselina</p>	
<p>Cy5</p> <p>1-(3-hydroxypropyl)-2-((1E,3E)-5-((E)-1-(3-hydroxypropyl)-3,3-dimethylindolin-2-yliden)penta-1,3-dien-1-yl)-3,3-dimethyl-3H-indol-1-ium</p>	
<p>BHQ-1</p> <p>2-[N-(2-hydroxyethyl)-4-[[2-methoxy-5-methyl-4-[(4-methyl-2-nitrofenyl)diazenyl]fenyl]diazenyl]anilino]ethanol</p>	
<p>AzaPC</p> <p>Azaftalocyaninový zhášec</p>	

Kapilární elektroforéza:

Měření probíhalo na přístroji kapilární elektroforéza CE 7100 od firmy Agilent. Byla použita Sarstedt kazeta na kapiláru, kde minimální nutná délka kapiláry byla 31 cm. Autosampler byl temperovaný 50ti místný karusel s oboustranným automatizovatelným dávkovačem s možností dávkování na oba konce kapiláry. Detekce byla zajištěna real time UV/VIS detektorem s diodovým polem (190nm-600nm) s přesností 1nm a odezvou v rozmezí 0,063-16s.

Měření probíhalo v křemenné kapiláře potažené polyimidovou vrstvou s délkou 60 cm a průměrem 75 μm . U příliš dlouhých analýz byla tato kapilára zkrácena na 47 cm. Kapilára byla u všech experimentů temperována na 25 °C. Před každou analýzou byla kapilára promyta nejdříve vodou po dobu tří minut a v zápětí tři minuty elektrolytem připraveným na navazující analýzu. Po analýze následovalo tři minutové promytí vodou. Poté probíhalo minutové promytí hydroxydem sodným s navazujícím tří minutovým promytí vodou.

Příprava kapiláry probíhala v následujících krocích:

- 1) Naměření patřičné délky kapiláry
- 2) Označení detekčního okna
- 3) Řezání kapiláry keramickým nožem
- 4) Pomocí plamene odstranit polyimid v místě detekčního okénka a na obou koncích kapiláry (cca. 0,5 cm opálit)
- 5) Očištění opálených míst pomocí buňičiny namočené v ethanolu
- 6) Inerce kapiláry do kasety
- 7) Kondicionizace kapiláry (10 minut proplach vodou → 10 minut proplach NaOH → 10 minut proplach vodou → 10 minut proplach elektrolytem)

Další přístroje:

K navážení chemikálií byly použity analytické váhy (Sartorius CPA225D-0CE, Německo). Kontola a úprava pH byla prováděna pomocí acidimetru (Druopta Praha, Československo). Rozpouštění chemikálií bylo urychleno v ultrazvukové lázni (Ecoson, Slovensko). Homogenizace byla docílena na automatické třepače (Velp, Italy).

Spotřební materiál:

K dispozici byly tři druhy vialek se zabudovaným 100 μL propylenovým insertem s uzavíratelným víčkem, se zabudovaným 1 mL s propylenovým insertem s uzavíratelným víčkem a se zabudovaným 2 mL propylenovým insertem s uzavíratelným víčkem. [48]

Práce v laboratoři byla prováděna pomocí laboratorního skla (odměrné válce, pipety, kádinky, baňky atd.), mikropipet (Eppendorf, Německo), vialek a nylonových filtrů 0,45 μm (Altium, Česká republika).

Příprava vzorků:

Byly připraveny 6 individuální a 3 směsné vzorky. Individuální vzorky byly ředěny vodou, která byla vždy před použitím zfiltrována, na koncentraci 0,1 mol/l. V případě směsných vzorků bylo pipetováno 30 μL od vybraných individuálních vzorků, výsledná koncentrace jednotlivých složek vzorku byla 0,03 mol/l. Homogenizace vzorků byla provedena na automatické třepačce po dobu 60 sekund.

Vzorky před naředěním byly uchovávány v mrazáku. Po naředění byly vzorky uchovávány nejprve v ledničce, ale po několika experimentech bylo zjištěno, že po určité době dochází buď k oligomerizaci nebo degradaci vzorku. Ve všech experimentech zmíněných v diplomové práci byly uchovány i naředěné vzorky při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Individuální vzorky:

Všechny vzorky oligonukleotidů (č. 1-6) byly ředěny na základě změřené absorpance a to tak, aby vznikl 0,1 mM roztok.

Vzorek č. 1 (OLIGO): Neznačenou oligonukleotidovou sondu OLIGO bylo nutno naředit 1784 μl vody.

Vzorek č. 2 (BHQ): Jednoduše značenou oligonukleotidovou sondu 3'BHQ bylo nutno naředit 1610 μl vody.

Vzorek č. 3 (BHQ-FAM): Ke dvojitě značenému oligonukleotidu 3'FAM-5'BHQ bylo přidáno 1930 μl vody.

Vzorek č. 4 (PCQ-Cy5): Oboustraně značená 5'Cy5-3'PCQ oligonukleotidová sonda byla ředěna pomocí 1177 μl vody.

Vzorek č. 5 (PCQ-FAM): Oligonukleotidová sonda 5'FAM-3'PCQ byla naředěna 1807 μl vody.

Vzorek č. 6 (PCQ): K výtěžku vzorku 3'PCQ bylo nutné přidat 2186 μl vody.

Směsné vzorky:

BHQ mix: Vzorek složen z 30 μL OLIGO, 30 μL BHQ a 30 μL BHQ-FAM.

PCQ mix 1: Vzorek složen z 30 μL OLIGO, 30 μL PCQ, 30 μL PCQ-FAM a 30 μL PCQ-Cy5.

PCQ mix 2: Vzorek složen z 30 μL OLIGO, 30 μL PCQ a 30 μL PCQ-Cy5.

Příprava základních elektrolytů:

Prvním krokem bylo přesné navážení chemikálií tvořící základní elektrolyt: NaH_2PO_4 (nejčastější), Tris, H_3PO_4 nebo HCOOH . Navážku dané chemikálie bylo nutné rozpustit určitým množstvím vody. Tento krok byl nejčastěji realizován v ultrazvukové lázni. Po rozpuštění se pomocí kyselin (H_3PO_4 , CH_3COOH , medronová kyselina) nebo zásad (NaOH) upravilo pH na požadovanou hodnotu. Pokud byl nutný přídavek aditiva (surfaktant, organické rozpouštědlo, chirální selektory atd.), tak se po přesném navážení přidal do elektrolytu upraveného na určitou hodnotu pH. Následně jsme doplňovali vodu do patřičného objemu, aby vznikla požadovaná koncentrace. Poslední krok přípravy bylo rozdělení již kompletního elektrolytu do vialek.

5. Diskuze a výsledky

V literatuře je zmíněná separace nemodifikovaných oligonukleotidů v nízkém pH. [44] [45] Konkrétně se jedná o separaci v elektrolytu fosforečné kyseliny upravenou hydroxidem sodným na pH 2,5. Při takto nízkém pH získávají jednotlivé nukleobáze proměnný zlomek kladného náboje v důsledku jejich různého pKa. Rozdíly v pořadí a počtu nukleobází umožňují separaci na základě rozdílné kompozice a celkového náboje oligonukleotidu. Separace v těchto podmínkách byla úspěšná. [44][45] Modifikované oligonukleotidy (v tomto případě lipid-oligonukleotidové kojugáty) byly doposud separovány pomocí cyklodextrínem modifikované kapilární elektroforézy v bazickém elektrolytu. [47] Takto upravené podmínky zamezily samo-agregaci modifikovaných oligonukleotidů a interakci modifikovaných oligonukleotidů s kapilární stěnou. [47] I když se jedná pouze o podobné molekuly těm našim, lze z těchto poznatků vycházet.

K dispozici máme dvě oligonukleotidové sondy jednoduše značené BHQ-1 zhášečem (BHQ) nebo AzaPC zhášečem (PCQ), tři dvojitě značené sondy ve formě oligonukleotidu s navázaným zhášečem a fluorescenčním barvivem (PCQ-FAM, PCQ-Cy5, BHQ-FAM) a nedotčený oligonukleotid (OLIGO). Ze struktur zhášečů a fluorescenčních barviv je patrné, že pokud dojde k ionizaci sond, každá bude mít jiný celkový náboj. Oligonukleotidy jako takové jsou negativně nabitě. Jejich elektroforetická mobilita bude protichůdná EOF. V případě příliš silného EOF by nedošlo k dostatečné separaci. Na kontrolu EOF bude potřeba nižší pH. Oligonukleotid se skládá v našem případě z 17 nukleotidů nesoucí negativní náboj. Molekuly zhášečů jsou naopak spíše bazické, z čehož vyplývá, že kladný náboj zhášečů ovlivní celkový náboj negativně nabytého oligonukleotidu. Z toho důvodu, který lze podložit úspěšnou separací nemodifikovaných oligonukleotidů při pH 2,5, [44][45] je možno předpokládat, že bude na separaci potřeba kyselé prostředí. Nápomocný faktor separace by v tomto případě mohla být i velikost a tvar molekuly jako takové. [31]

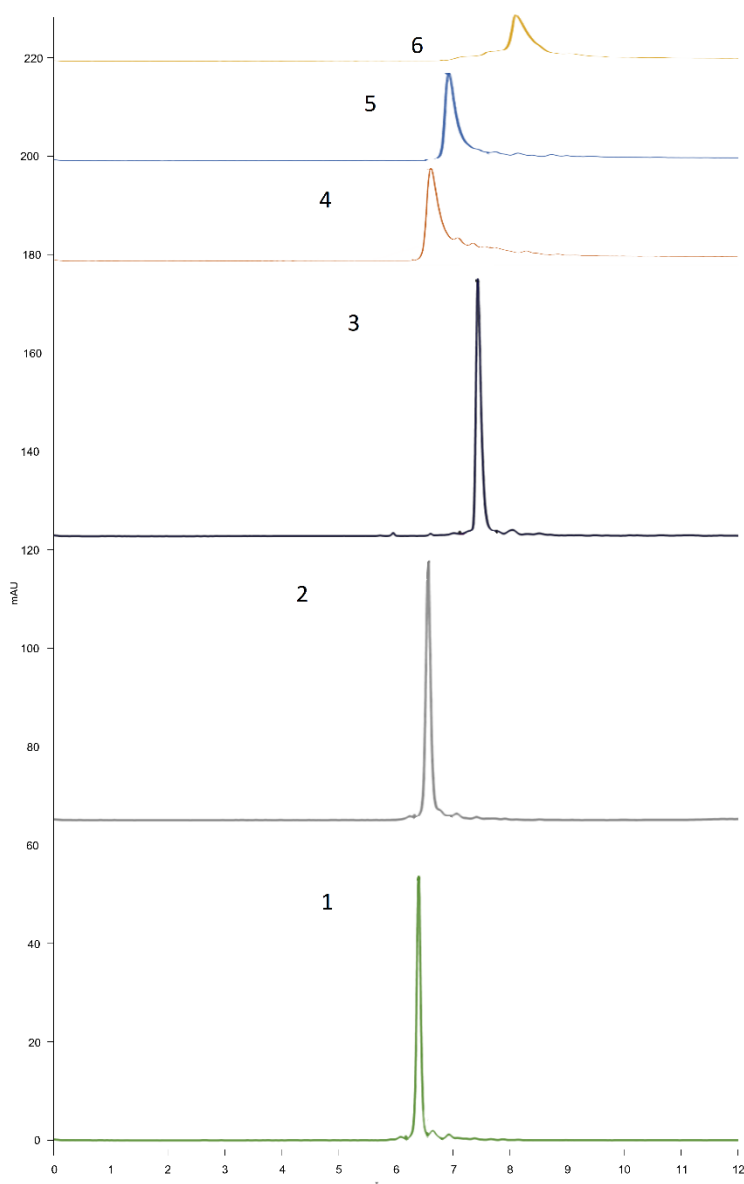
Na základě prostudované literatury a struktur analytů lze předpokládat interakce s kapilární stěnou. Přídavek dodecylsíranu sodného (SDS) v koncentraci nižší než CMC 8,5 mmol/l by mohla pomoci tuto interakci omezit. Přídavek organického rozpouštědla do základního elektrolytu by také mohl ovlivnit interakci s kapilární stěnou. Navíc přídavek organické složky patří mezi nejjednodušší a nejlevnější formu aditiv.[6][7]

Problematika separace nemusí být nutně pouze interakce s kapilární stěnou. Nedostatečné rozdíly analytů v elektroforetických mobilitách v daném prostředí mohou vést k nedostatečné separaci. Tento problém lze vyřešit přidavkem CD. Modifikující skupiny jsou poměrně velké molekuly, z čehož vyplývá že bude potřeba CD s větší kavitou. Smysl dává zkoušet nativní i modifikované beta- a gama-cyklodextriny. Selektivitu separace v elektroforéze lze změnit i tvorbou micely, v našem případě se jedná o přidavek SDS v koncentraci vyšší než CMC. Z teoretického hlediska veliký přidavek SDS bude také navyšovat proud. Rapidní navýšení proudu může vést ke snížení stability základního elektrolytu a až k jeho elektrolyze. [6]

Z hlediska opakovatelnosti separací je nejjednodušší mít podmínky co nejjednodušší. Pohybovat se v systému 3-4 různých aditiv není pro separace s vysokou opakovatelností zcela vhodný.

5.1. Výběr základního elektrolytu

Prvním krokem byl výběr základního elektrolytu. Na základě prostudované literatury [44] [45] byl jako první volba vybrán kyselý základní elektrolyt. Zásaditý základní elektrolyt byl také vyzkoušen pro ověření, zda modifikace neumožní práci i v bazické oblasti. Jednotlivé vzorky č. 1 až 6 byly analyzovány ve dvou základních elektrolytech s různými hodnotami pH, konkrétně Tris (100 mM, pH 8 upraveno HCl) a NaH₂PO₄ (10mM, pH 3 upraveno H₃PO₄). Pro bazický pufr bylo zvoleno kladné napětí +25 kV a pro kyselý pufr bylo zvoleno záporné napětí -25 kV. Kapilára byla během těchto experimentů temperována na 25 °C. Za podmínek bazického pufru byla analýza neúspěšná, protože se nepodařilo detekovat žádné analyty. V kyselém prostředí byly vzorky č. 1 až 6 (viz obr. 11) detekovány.



Obr. 11 Elektroforeogramy vzorků BHQ (1), BHQ-FAM (2), OLIGO (3), PCQ-FAM (4), PCQ (5) a PCQ-Cy5 (6); základní elektrolyt NaH_2PO_4 (10 mM, pH 3 upraveno zředěnou H_3PO_4); délka kapiláry 60 cm; teplota 25 °C; napětí -25 kV; detekce DAD

Z prvotního experimentu plyne, že v kyselém pufru 10 mM NaH_2PO_4 lze každý vzorek úspěšně detekovat. Nejprve byla vyzkoušena analýza směšného vzorku obsahující všech šest komponentů. Tato analýza se nevydařila. Byl viděn pouze jeden pík. Analyty se navzájem překryly a nedošlo k separaci.

V návaznosti na tento poznatek byly tyto podmínky vyzkoušeny i se směšným vzorkem BHQ mix. Analýza vzorku BHQ mix byla vydařená (viz. Kapitola 5.2.1.). Následně byl připraven směšný vzorek PCQ mix 1, který byl analyzován za stejných podmínek. Tato analýza vzorku PCQ mix 1 nebyla dobrá. Analyty se navzájem překrývaly a nedocházelo

k dostatečné separaci. Z tohoto poznatku vyplývá, že BHQ značené sondy potřebují jednodušší podmínky pro separaci než PCQ značené sondy. Na základě těchto výsledků jsme nadále experimenty od sebe oddělovali a analyzovali sondy značené BHQ a PCQ zvlášť.

5.2. Separace vzorku BHQ mix

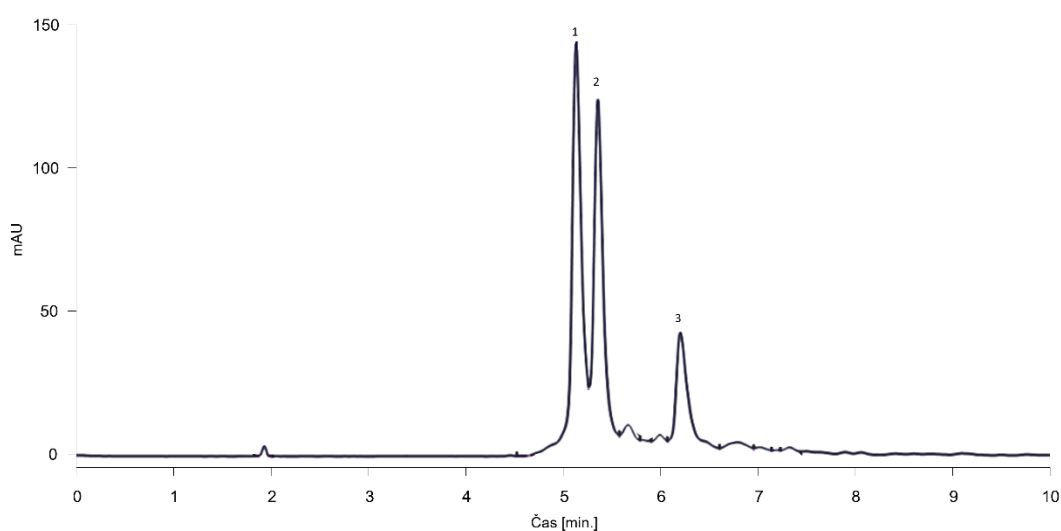
Z důvodu příliš dlouhého času analýzy byla kapilára zkrácena z 60 cm na 47 cm.

5.2.1. Koncentrace pufru

Vliv koncentrace pufru na separaci jednotlivých analytů ve vzorku BHQ mix byl studován. Postupně bylo připraveno pět různých koncentrací pufrů:

- 1) 5mM NaH₂PO₄ pH 3 (upraveno zředěnou H₃PO₄)
- 2) 10mM NaH₂PO₄ pH 3 (upraveno zředěnou H₃PO₄)
- 3) 25mM NaH₂PO₄ pH 3 (upraveno zředěnou H₃PO₄)
- 4) 50mM NaH₂PO₄ pH 3 (upraveno zředěnou H₃PO₄)
- 5) 100mM NaH₂PO₄ pH 3 (upraveno zředěnou H₃PO₄)

U koncentrací 25 mM, 50 mM a 100 mM pufru nedocházelo k dostatečné separaci BHQ od BHQ-FAM. Neznačený oligonukleotid byl viditelný ve všech koncentracích kromě pufru č. 1. Analýza za podmínek č. 2 měla nejlepší rozlišení a tvar píků (viz obr. č 12). Z toho důvodu byl vybrán pufr o koncentraci 10 mM, který byl dále použit v dalších experimentech.



Obr. 12 analýza vzorku BHQ mix v základním elektrolytu NaH₂PO₄ (10 mM, pH 3 upraveno zředěnou H₃PO₄) kde pík č. 1 odpovídá analytu BHQ-FAM, pík č. 2 odpovídá

analytu BHQ a pík č. 3 odpovídá analytu OLIGO; délka kapiláry 47 cm; teplota 25 °C; napětí -25 kV; detekce DAD

5.2.2. Vliv pH

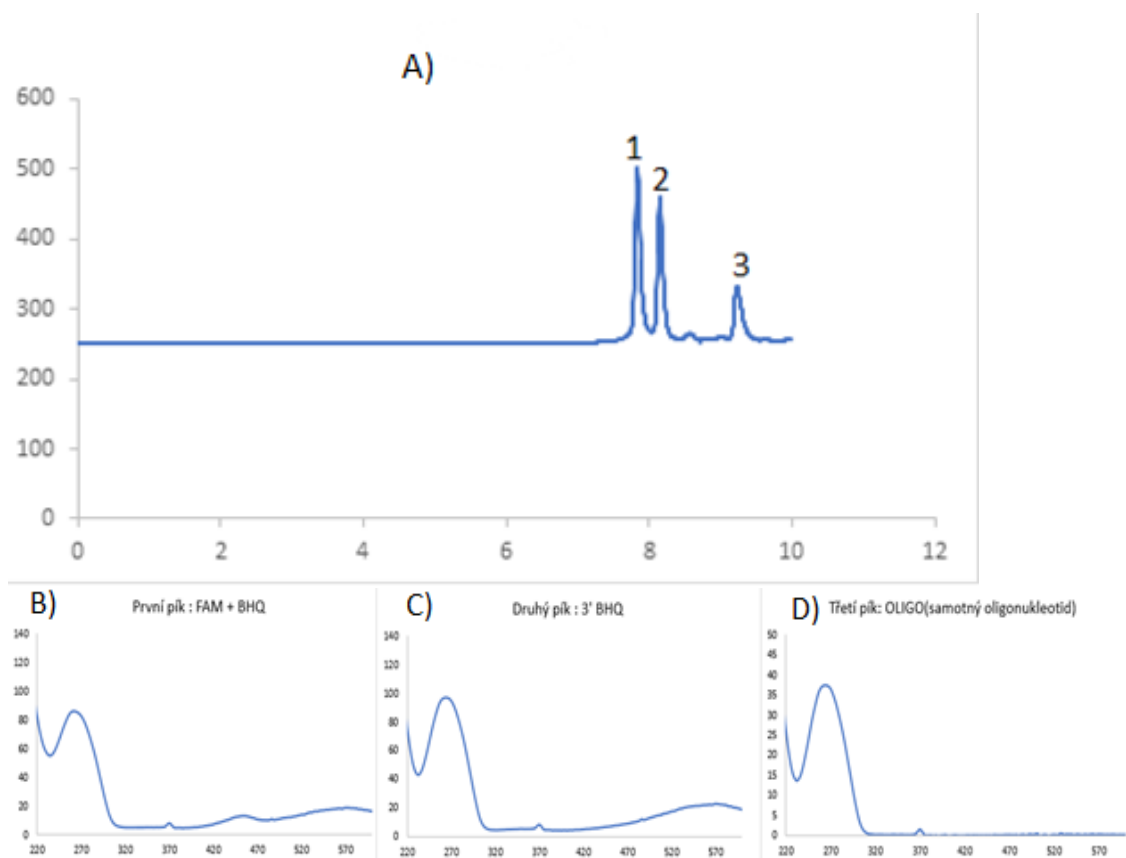
Elektroosmotický tok vzniká cca od hodnoty pH 3 a výrazný začíná být kolem hodnoty pH 4. [6] Naše analyty se pohybují proti EOF. Mírné zvýšení pH by mohlo pozitivně ovlivnit rozlišení mezi prvním a druhým píkem, protože mezi hodnotami pH 3-4 vzniká pouze slabý EOF. Byl zkoušen pufr 10 mM NaH₂PO₄ v hodnotách pH 2.7, 2.9, 3.0, 3.25 a 3.5 (viz tab. 8) upravený kyselinou fosforečnou. Z tabulky je patrné, že pomocí pH můžeme ovlivnit rychlost analýzy a selektivitu. Bylo zjištěno, že snížení hodnoty pH zkracuje čas analýzy a naopak zvýšení pH prodlužuje čas analýzy. Rozlišení píků se jak při snížení tak při zvýšení pH zhoršilo. Tyto poznatky jsme aplikovali v dalších experimentech.

Tab. 8 vliv změny pH na analýzu vzorku BHQ mix

Hodnota pH	Komentář
2.7	Urychlení analýzy (4 min); separace nezlepšená oproti referenčním podmínkám
2.9	Velmi dobrý čas analýzy (4 min); separace úspěšná; rozlišení píků horší než u referenčních podmínek (moc rychlá analýza, analyty BHQ a BHQ-FAM se nestíhají od sebe dělit)
3.0 (referenční podmínky)	Velmi dobrá separace; Čas analýzy 5-7min; Všechny tři komponenty lze od sebe odlišit; Rozlišení mezi BHQ a BHQ-FAM je potřeba trochu zlepšit
3.25	Čas analýzy v rozsahu 5-7 minut; separace horší než u referenčních podmínek, ale lepší než u pH 3.5
3.5	Čas analýzy v rozsahu 6-8 minut; separace není úplná-lze oddělit samotný oligonukleotid od BHQ, ale BHQ a BHQ-FAM migrují ve stejných časech

5.2.3. Vliv napětí

Po úspěšné analýze za podmínek popsaných v předešlé kapitole (viz obr. 12), jsme se pokusili zlepšit rozlišení mezi prvními analyty (BHQ-FAM a BHQ) snížením napětí na -15 kV, které vedlo ke snížení elektrického proudu probíhajícího v systému. Bylo předpokládáno, že se prodlouží doba analýzy a umožní to analytům dosáhnout lepšího rozlišení (viz obr. 13). Výsledkem byla separace všech tří analytů s rozlišením kritických párů píků BHQ-FAM od BHQ 2.30 a rozlišením mezi BHQ a Oligo 6.19 (více viz kapitola 5.2.7.).

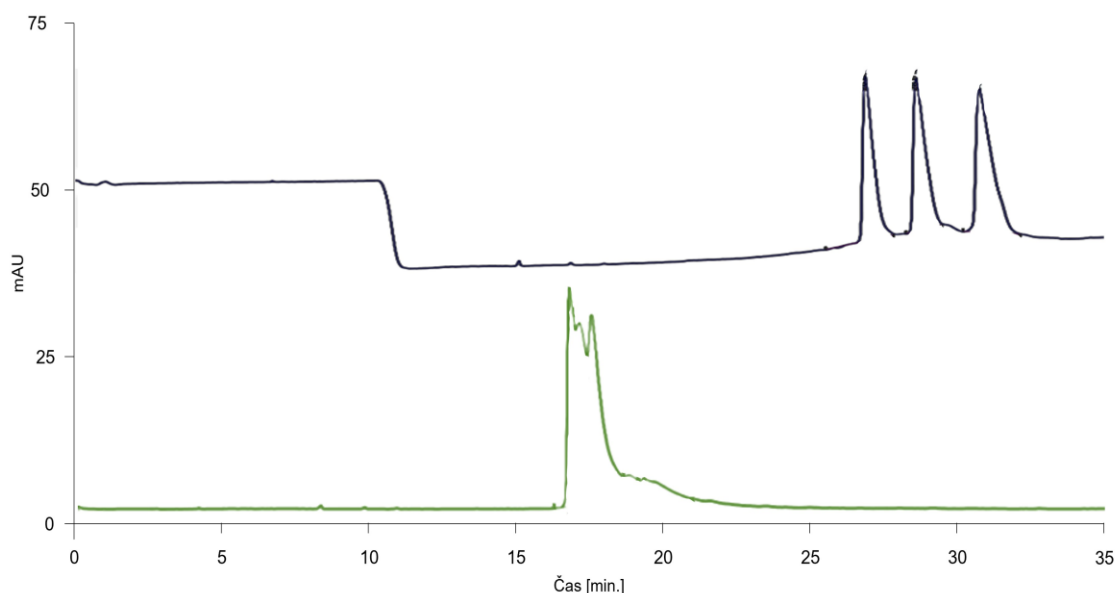


Obr. 13 A) Analýza vzorku BHQ mix v základním elektrolytu NaH_2PO_4 (10 mM, pH 3 upraveno zředěnou H_3PO_4) kde pík č. 1 odpovídá analytu BHQ-FAM, pík č. 2 odpovídá analytu BHQ a pík č. 3 odpovídá analytu OLIGO; délka kapiláry 47 cm; teplota 25 °C; napětí -15 kV; detekce DAD **B)** Detail UV-Vis spektra prvního píku BHQ-FAM; **C)** Detail UV-Vis spektra druhého píku BHQ; **D)** Detail UV-Vis spektra třetího píku OLIGO

5.2.4. Vliv organické složky

Cílem přidavku organického rozpouštědla bylo ovlivnění vodivosti a viskozity prostředí. [28] Tyto parametry by mohli ovlivnit selektivitu separace a tvar píku. Experiment jsme chtěli zachovat ve vodném prostředí, tak byla zvolena organická složka pouze ve formě aditiva. Organické komponenty byly přidávány do základního elektrolytu NaH_2PO_4 (10mM, pH 3 upraveno zředěnou H_3PO_4). Postupně byl vyzkoušen vliv methanolu, tetrahydrofuranu, acetonitrilu a pyridinu. Pyridin byl kvůli vysoké hodnotě UV cut off vyřazen. U každé jiné organické složky byla postupně změněná koncentrace v pufru. U prvního experimentu byl pufr naředěn organickou složkou tak, aby obsah pufru a organiky byl v poměru 1:1. Postupně bylo nejdříve zvyšováno a poté snižováno množství organického aditiva: 1:2 → 1:1 → 2:1 → 4:1 → 9:1.

Ze všech organických rozpouštědel byl tetrahydrofuran v poměru 1:1 z hlediska rozlišení a selektivity separace nejlepší. Při této koncentraci aditiva byl ale výrazně snížen proud a píky migrovaly v rozmezí 27-32 minut. Všechny ostatní organické komponenty zhoršily rozlišení a selektivitu separace (viz obr. 14).



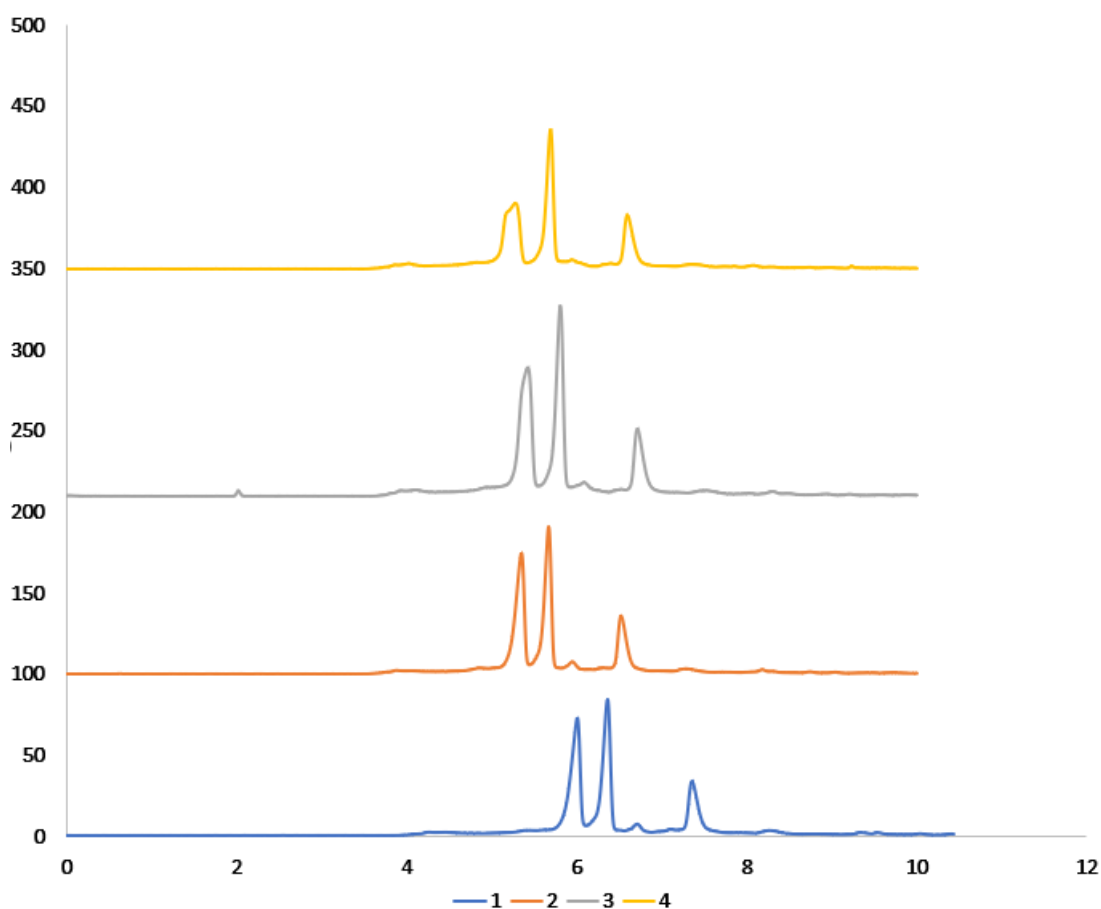
Obr. 14 analýzy vzorku BHQ mix v základním elektrolytu NaH_2PO_4 (10 mM, pH 3 upraveno zředěnou H_3PO_4) přičemž přídavek organické složky byl u **zeleného záznamu** ACN v poměru 1:1 a u **černého záznamu** THF v poměru 1:1 kde první pík odpovídá analytu BHQ-FAM, druhý pík odpovídá analytu BHQ a třetí pík odpovídá analytu OLIGO; délka kapiláry 47 cm; teplota 25 °C; napětí -15 kV; detekce DAD

5.2.5. Aditiva-SDS

V případě vzorku BHQ mix bylo chtěné ovlivnit interakci analytů s kapilární stěnou, ovšem přídavek SDS markantně zvyšuje elektrický proud v systému. Je třeba zvolit takové podmínky, aby nedocházelo k příliš rychlé migraci analytů. V návaznosti na kapitolu 5.2.4. byl jako první připraven pufr NaH_2PO_4 (10 mM, pH 3 upraveno zředěnou kyselinou fosforečnou) + 10mM SDS – THF (1:1). Přídavek SDS do těchto podmínek zrychlil analýzu o 5 minut, avšak oproti podmínkám bez SDS se snížilo rozlišení mezi BHQ a BHQ-FAM. Zkouška SDS v koncentraci nad kritickou micelární koncentrací se u tohoto vzorku nejevilo jako řešení. [49]

Pro snížení elektrického proudu v průběhu analýzy byl připraven pufr NaH_2PO_4 (5 mM, pH 3) + 5 mM SDS. Vůči předešlému experimentu došlo k snížení elektrického proudu

v systému o polovinu a zároveň došlo ke zvýšení rozlišení mezi píky BHQ-FAM a BHQ, pravděpodobně díky zabránění interakce analytů s kapilární stěnou (viz obr. 15). Problém byl s opakovatelností analýz. Při třetí analýze se začalo objevovat výrazné zhoršení tvaru prvního píku (BHQ-FAM). Tento jev lze vysvětlit dvěma možnostmi. Buď dochází k interakci SDS s navázaným fluorescenčním barvivem, nebo se jedná o nestabilní pufr. Navíc lze u takto nízké koncentrace SDS předpokládat částečnou interakci se stěnou kapiláry. Analýza byla provedena čtyřikrát. První dvě analýzy byly provedeny hned po sobě. Třetí analýza byla provedena s odstupem třiceti minut od prvotního nástřiku. Analýza číslo 4 (viz. obr. 15) byla provedena se stejným pufrům s odstupem 2 hodin od ostatních tří analýz. Tento experiment potvrdil, že stáří pufru má na analýzu výrazný vliv.

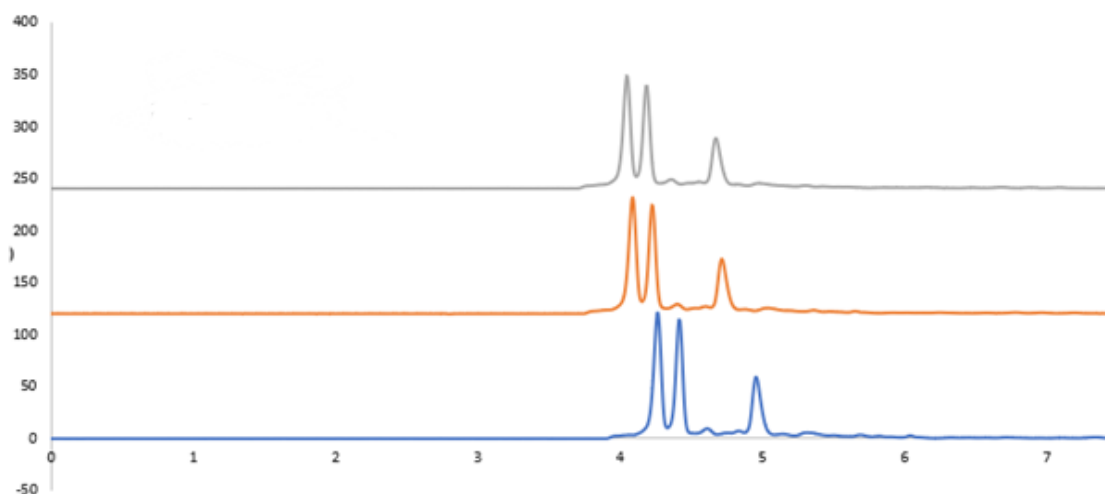


Obr. 15 Ukázka opakovatelnosti analýz vzorku BHQ mix v elektrolytu NaH_2PO_4 (5mM, pH 3 upraveno zředěnou H_3PO_4) + 5mM SDS, kde nástřiky č. 1 (modrý záznam) a 2 (oranžový záznam) byly provedeny hned po sobě, nástřik č. 3 (šedý záznam) byl proveden 30 minut po prvotním nástřiku a nástřik č. 4 (žlutý záznam) byl proveden s odstupem 2 hodin od ostatních tří; délka kapiláry 47 cm; pořadí píků bylo u všech analýz stejné,

příčemž první pík odpovídá analytu BHQ-FAM, druhý pík odpovídá analytu BHQ a třetí pík odpovídá analytu OLIGO; teplota 25 °C; napětí -25 kV; detekce DAD

5.2.6. Medronová kyselina

Jediný problém s analýzou BHQ mix vzorku byla opakovatelnost. Tento problém nás napadlo vyřešit přidavkem medronové kyseliny. Medronová kyselina (kyselina methylen difosfonová) obsahuje dvě fosfonové kyseliny spojené v jednu molekulu. Díky vyšší iontové síle dává pufru jiné kvality. Hlavní přínos medronové kyseliny je, že působí jako chelatační činidlo a zamezuje interakci mezi ionty kovů a analyty. [50] Byl připraven pufr 10mM NaH₂PO₄ s hodnotou pH 3. Rozdíl oproti předešlému pufru byla úprava pH. V předešlých kapitolách se pH upravovalo zředěnou fosforečnou kyselinou. V tomto případě byla nahrazená fosforečná kyselina za medronovou kyselinu.

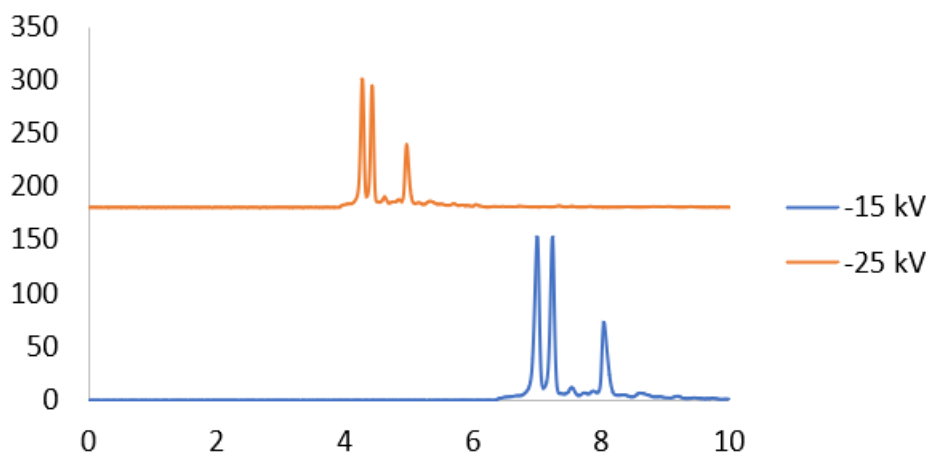


Obr. 16 Ukázka tří po sobě jdoucích analýz vzorku BHQ mix v základním elektrolytu NaH₂PO₄ (10mM, pH 3 upraveno zředěnou medronovou kyselinou) kde první pík odpovídá analytu BHQ-FAM, druhý pík odpovídá analytu BHQ a třetí pík odpovídá analytu OLIGO; délka kapiláry 47 cm; teplota 25 °C; napětí -25 kV; detekce DAD

Za těchto podmínek byla opakovatelnost nástřiků úspěšná (viz obr. 16). Čas analýzy v rozsahu 4-5 minut je perfektní. Pufr je stálý. Po 6 hodinách odstátého pufru byla analýza stejná.

V návaznosti na kapitolu 5.2.3., kde snížení přidaného napětí vedla k lepšímu rozlišení píků, byl tento poznatek aplikován i na pufr NaH₂PO₄ (10mM, pH 3 upraveno

medronovou kyselinou). Stejně jako v předešlé kapitole došlo ke prodloužení analýzy, konkrétně o 2 minuty. Mezi vzorky BHQ-FAM a BHQ se zlepšilo rozlišení o 0.4 (viz Obr. 17 a Tab. 9).



Obr. 17 vliv napětí na finální analýzu: porovnání analýz vzorku BHQ mix v základním elektrolytu NaH_2PO_4 (10mM, pH 3 upraveno zředěnou medronovou kyselinou) za odlišného napětí -15kV (modrý záznam) a -25kV (oranžový záznam), kde první pík odpovídá analytu BHQ-FAM, druhý pík odpovídá analytu BHQ a třetí pík odpovídá analytu OLIGO; délka kapiláry 47 cm; teplota 25 °C; detekce DAD

Tab. 9 vliv napětí na finální analýzu v základním elektrolytu NaH_2PO_4 (10mM, pH 3 upraveno zředěnou medronovou kyselinou) z obr. 17

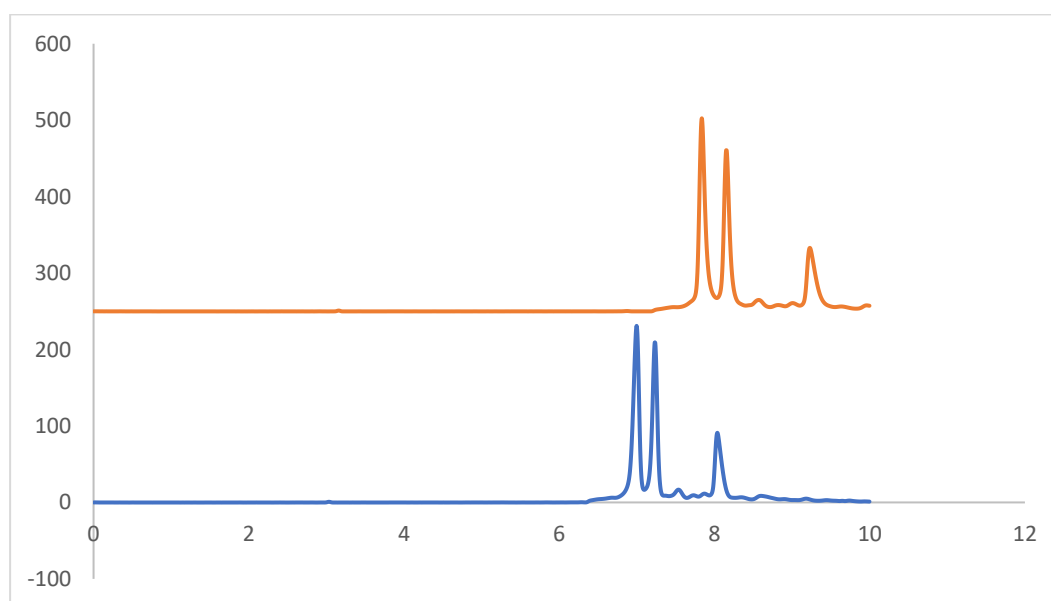
Napětí	Rozlišení mezi prvním (BHQ-FAM) a druhým píkem (BHQ)	Rozlišení mezi druhým (BHQ) a třetím píkem (oligonukleotid)	Migrační čas prvního píku (BHQ-FAM)	Migrační čas druhého píku (BHQ)	Migrační čas třetího píku (OLIGO)
-25kV	1.37	4.40	4.27	4.42	4.96
-15kV	1.78	5.50	6.99	7.23	8.04

V návaznosti na kapitolu 5.2.5. bylo přidáno do pufru NaH_2PO_4 (10mM, pH 3 upraveno medronovou kyselinou) určité množství SDS. Připravené byly dvě varianty a to s přidavkem 5mM SDS a s přidavkem 10mM SDS. U obou elektrolytů byla analýza velmi podobná jako bez přidavku SDS. Analýza se zrychlila, ale rozlišení se zhoršilo. Problém nastal opět s opakovatelností nástřiků. Po třech po sobě jdoucích analýz bylo

vidět výrazné zhoršení tvaru prvního píku. Kvůli špatné opakovatelnosti nástřiků a nestálosti pufru nebylo již nadále pokračováno v přidavku aditiv.

5.2.7. Porovnání nejlepších výsledků

Přídavek surfaktantu dodecylsíranu sodného vylepšil rozlišení mezi píky. Problém s opakovatelností nástřiků není až tak závažný. Je nutné hlídat stáří pufru, přičemž nejideálnější je připravit každý den nový pufr. Důležité je také dodržet přesný poměr pufru a SDS. I když tento pufr není příliš komplikovaný, je stále jednodušší držet se pouze základního pufru bez aditiv. Z toho důvodu považuji pufrы NaH_2PO_4 (10mM, pH 3 upraveno fosforečnou kyselinou) a NaH_2PO_4 (10mM, pH 3 upraveno medronovou kyselinou) za nejlepší prostředí pro separaci BHQ analytů. Vzhledem k velmi krátkému času analýzy je vyšší rozlišení při napětí -15 kV přínosem a převažuje nad dvouminutovým zkrácením analýzy při napětí -25 kV. O tom, jaké z těchto dvou podmínek jsou lepší rozhoduje symetrie píku, rozlišení a chvostování píků (viz Tab. 10). Čas analýzy je o něco kratší u pufru s medronovou kyselinou. Rozlišení má na druhou stranu lepší pufr s fosforečnou kyselinou. Symetrie a tailing píků jsou velmi podobné. Opakovatelnost je u obou analýz velmi dobrá. Z detailního rozboru (viz Tab. 10 a obr. 18) lze říci, že medronová kyselina pozitivně ovlivňuje tvar píků. Z tohoto důvodu pufr upravený medronovou kyselinou představuje optimální podmínky pro analýzu vzorku BHQ mix.



Obr. 18 porovnání analýz vzorku BHQ mix ve dvou základních elektrolytech: **oranžový záznam** představuje analýzu v elektrolytu NaH_2PO_4 (10mM, pH 3 upraveno zředěnou H_3PO_4) a **modrý záznam** představuje analýzu v elektrolytu NaH_2PO_4 (10mM, pH 3

upraveno zředěnou medronovou kyselinou); u obou analýz je pořadí píků stejný: první pík odpovídá analytu BHQ-FAM, druhý pík odpovídá analytu BHQ a třetí pík odpovídá analytu OLIGO; délka kapiláry 47 cm; teplota 25 °C; napětí -15 kV; detekce DAD

Tab. 10 Detailní porovnání analýz z obr. 18

	10mM NaH ₂ PO ₄ pH3 (upraveno fosforečnou kyselinou)	10mM NaH ₂ PO ₄ pH3 (upraveno medronovou kyselinou)
Rozlišení mezi prvním (BHQ-FAM) a druhým (BHQ) píkem	2.30	1.78
Rozlišení mezi druhým (BHQ) a třetím (OLIGO) píkem	6.19	5.50
BHQ-FAM symetrie	0.79	1.58
BHQ symetrie	0.74	1.13
OLIGO symetrie	0.46	0.54
BHQ-FAM usp-tailing	1.16	1.58
BHQ usp-tailing	0.74	1.13
OLIGO usp-tailing	1.73	1.60
BHQ-FAM čas analýzy	7.84	6.99
BHQ čas analýzy	8.15	7.23
OLIGO čas analýzy	9.23	8.04

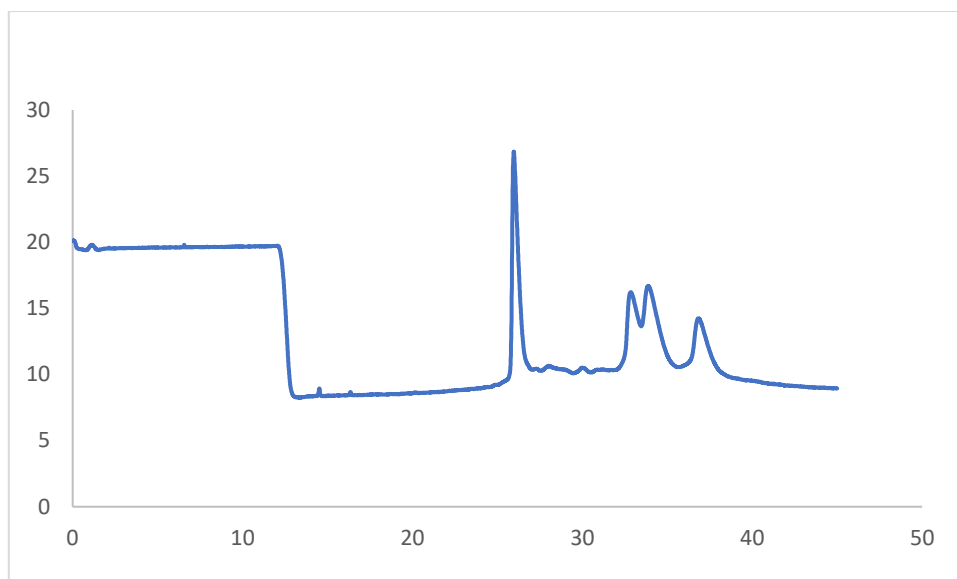
5.3. Separace vzorku PCQ mix

5.3.1. Organická složka

Narozdíl od vzorku BHQ mix, kde již od začátku byl víceméně neměnný základní elektrolyt, NaH₂PO₄ (10mM, pH 3 upraveno fosforečnou kyselinou) na separaci PCQ mix 1 nestačil. Respektive v těchto jednoduchých podmínkách ve vzorku PCQ mix 1 nedocházelo k separaci jednotlivých analytů PCQ, PCQ-FAM, PCQ-Cy5 a OLIGO.

Ze struktury azaftalocyaninového zhasiče nám bylo jasné, že se jedná o sloučeniny s větší tendencí k agregaci ve vodě. Předpoklad byl takový, že přidavek organického rozpouštědla ji může ovlivnit. Zkoušená rozpouštědla byla methanol, tetrahydrofuran, acetonitril a pyridin. První experiment se skládal z pufru NaH_2PO_4 (10mM, pH 3 upraveno zředěnou kyselinou fosforečnou) v poměru 1:1 s organickou složkou. Pyridin jsme rovnou vynechali z důvodu UV cut-off (viz kapitola 5.2.4.). V případě methanolu separace vůbec neproběhla. Viditelný byl pouze jeden pík (OLIGO) a ostatní analyty se nepodařilo detekovat pravděpodobně díky interakci s kapilární stěnou. Acetonitril pomohl oddělit OLIGO od ostatních analytů, které však migrovali v jednom smíšeném píku. V případě tetrahydrofuranu byl vidět náznak separace (viz obr. 19), analýza na kapiláře dlouhé 60 cm však trvala 25-40 min. Na základě tohoto experimentu byla kapilára zkrácena na 47 cm. Na této kapiláře byl otestován přidavek THF do základního elektrolytu, který vedl k částečné separaci všech složek vzorku PCQ mix 1. Při přidavku THF byl elektrický proud probíhající systémem velmi malý, což vedlo k proudloužení analýzy. Tento jev lze vysvětlit naředěním 10 mM pufru a současně změnou vodivosti základního elektrolytu.

Z těchto dvou důvodů byl na další experiment připraven stejný elektrolyt a pouze jsme měnili množství organické složky. Nejprve byl zkoušen 10mM pufr v poměru 9:1 s THF. Takto malý přidavek organické složky sice zrychlil analýzu oproti poměru 1:1, ale k separaci vůbec nedocházelo. Druhým zkoušeným poměrem 10mM pufru a organiky byl 4:1. V této analýze již byl náznak separace, ale stále se nejednalo o optimální podmínky. Jako poslední poměr byl zkoušen 2:1. V tomto případě se jednalo o velmi podobný výsledek jako u pufru s poměrem 1:1. Zkrátil se čas analýzy přibližně o 10 minut, ovšem nedošlo k výraznému zlepšení rozlišení mezi kritickými páry píků PCQ a PCQ-FAM. V příštích kapitolách navazují experimenty na pufr 10 mM NaH_2PO_4 pH 3 (upraveno fosforečnou kyselinou) se dvěma poměry organické složky buď 1:1 (lepší separace) a nebo 2:1 (rychlejší analýza).



Obr. 19 analýza vzorku PCQ mix 1 v elektrolytu NaH_2PO_4 (10mM, pH 3 upraveno H_3PO_4) - THF (1:1) kde první pík odpovídá analytu OLIGO, druhý pík odpovídá analytu PCQ-FAM, třetí pík odpovídá analytu PCQ a čtvrtý pík odpovídá analytu PCQ-Cy5; délka kapiláry 60 cm; teplota 25 °C; napětí -25 kV; detekce DAD

5.3.2. Vliv pH

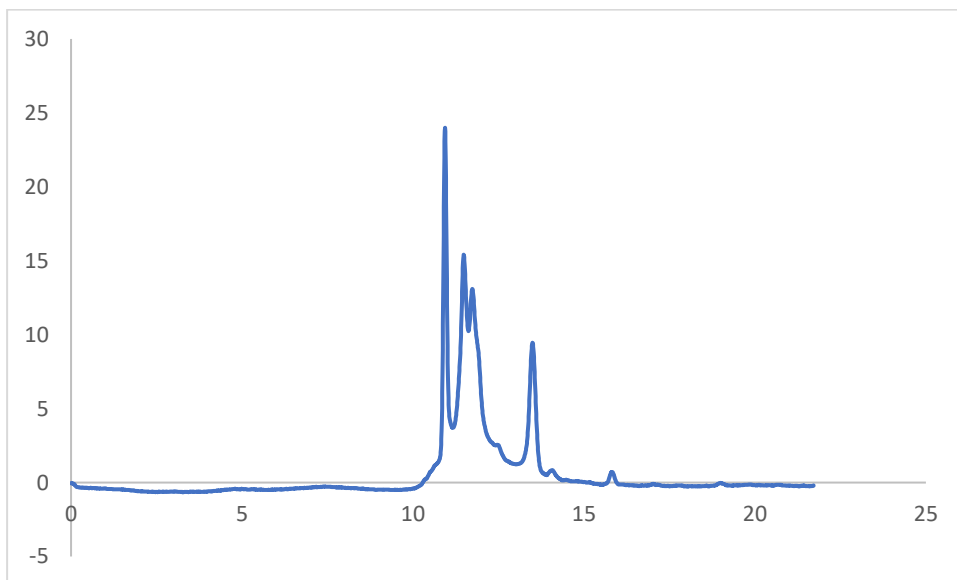
Změnou pH lze docílit zkrácení analýzy. Tento poznatek byl potvrzen u experimentů na vzorku BHQ mix (kapitola 5.2.2.) a bylo předpokládáno, že pokud snížíme hodnotu pH dojde ke zrychlení analýzy. U vzorku PCQ mix 1, kde azaphtalocyanin (viz tab. 7) obsahuje ionizovatelné bazické skupiny, by snížení pH mohlo ovlivnit separaci. Byly připraveny dva pufrů NaH_2PO_4 (10 mM) - THF (1:1) a NaH_2PO_4 (10 mM) – THF (2:1). U těchto pufrů bylo pomocí fosforečné kyseliny upravováno pH od nejvyšší po nejnižší: 2.9, 2.7, 2.5. V případě pH 2.7 se zlepšil čas analýzy a tvar píku.

5.3.3. Koncentrace pufru

Do tohoto bodu byl použitý jako základní pufr 10mM NaH₂PO₄. Vzhledem k velmi dlouhým analýzám byly vyzkoušeny různé koncentrace pufru. Vycházeno bylo z předchozích experimentů, a proto byl pufr ředěn organickou složkou v poměrech buď 1:1 nebo 2:1. Hodnota pH, upravená fosforečnou kyselinou, se pohybovala u všech pufrů okolo 2.7. Byly použity tři různé koncentrace a referenční koncentrace 10mM:

- a) 10mM NaH₂PO₄ (referenční)
- b) 25mM NaH₂PO₄
- c) 50mM NaH₂PO₄
- d) 100mM NaH₂PO₄

Všechny tyto koncentrace byly měřeny při napětí -25kV. V případě 25mM pufru nedocházelo k dostatečné separaci. Analýza byla zrychlená, ale tvar píků byl horší než u referenčního pufru. Podmínky 100 mM pufru poskytovaly nestabilní elektrický proud. Na druhou stranu 50mM pufr se jevil velmi slibně. Byla vyzkoušena jak varianta 1:1 s organickou složkou (dlouhá analýza) tak i varianta s poměrem 2:1 s organickou složkou (velmi dobrý čas analýzy). Na obr. 20 je zobrazena analýza vzorku PCQ mix 1. Jedná se o pufr NaH₂PO₄ (50 mM, pH 2.7-upraveno kyselinou fosforečnou) – THF (2:1).



Obr. 20 analýza vzorku PCQ mix 1 v elektrolytu NaH₂PO₄ (50 mM, pH 2.7 upraveno H₃PO₄) – THF (2:1) kde kde první pík odpovídá analytu OLIGO, druhý pík odpovídá analytu PCQ-FAM, třetí pík odpovídá analytu PCQ a čtvrtý pík odpovídá analytu PCQ-Cy5; délka kapiláry 47 cm; teplota 25 °C; napětí -25 kV; detekce DAD

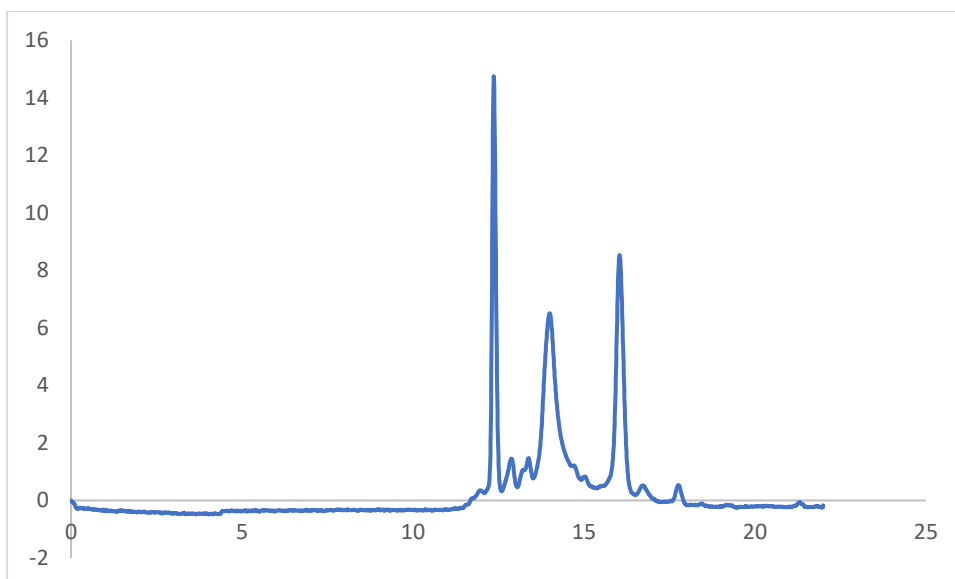
Za těchto podmínek se čas analýzy pohybuje v rozmezí 10-15 minut. Zřetelně oddělené jsou tři píky:

- První pík: OLIGO
- Druhý pík: nedokonale oddělené vzorky PCQ a PCQ-FAM
- Třetí pík: PCQ-Cy5

Mezi vzorky PCQ a PCQ-FAM je náznak separace. Na rozdělení těchto dvou vzorků bude potřeba úprava podmínek. První možností jak upravit podmínky je takzvané vysolení (viz. kapitola 5.3.5.). Druhou možností, jak zlepšit separaci, je přidáním aditiva k zamezení interakce s kapilární stěnou pomocí surfaktantu (viz. kapitola 5.3.4.)

5.3.3.1. Množství elektrolytu- Změna vzorku

V návaznosti na předešlou kapitolu, kde se podařilo oddělit OLIGO, PCQ a PCQ-Cy5, byl ze vzorku PCQ mix 1 odebrán jeden analyt (PCQ-FAM), abychom si potvrdili, zda dochází opravdu k dokonalé separaci zbylých tří analytů ve vzorku PCQ mix 2. Další důvod odebrání vzorku PCQ-FAM bylo to, že se při syntéze dvě dvojitě značené sondy nepotkají. Vzorek PCQ mix 2 byl analyzován za stejných podmínek jako v předešlé kapitole: NaH_2PO_4 (50 mM, pH 2.7-upraveno kyselinou fosforečnou) – THF (2:1). Za těchto podmínek jsou viditelné 3 píky. První pík odpovídá vzorku OLIGO. Druhý pík odpovídá vzorku PCQ. Spektrum posledního píku odpovídá vzorku PCQ-Cy5. Píky migrují v rozmezí 12-17 minut (viz obr. 21). Separace byla úspěšně zopakována. Jen musíme mít na mysli, že tetrahydrofuran je silně těkavá látka. Z toho vyplývá, že se musí hlídat stáří pufru. Vzhledem k tomu, že analýza trvá 17 minut, lze pufr použít na tři za sebou jdoucí nástřiky. Poté je nutné vytvořit nový pufr, aby nedocházelo ke změně poměru organické složky.



Obr. 21 Analýza vzorku PCQ mix 2 v elektrolytu NaH_2PO_4 (50 mM, pH 2.7 upraveno H_3PO_4) – THF (2:1) přičemž první pík odpovídá analytu OLIGO, druhý pík odpovídá analytu PCQ a třetí pík odpovídá analytu PCQ-Cy5; délka kapiláry 47 cm; teplota 25 °C; napětí -25 kV; detekce DAD

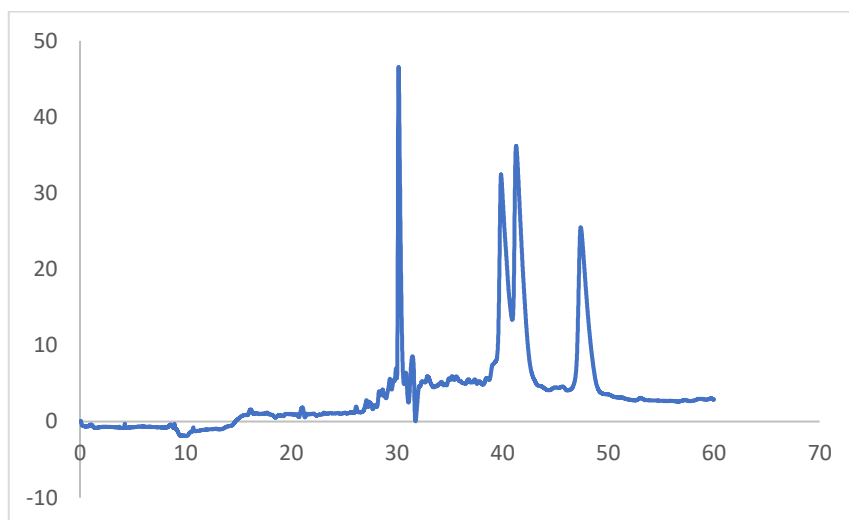
5.3.4. Přídavek SDS

Přídavek SDS zvyšuje množství iontů a tím zvyšuje elektrický proud v systému. Zvýšení elektrického proudu může vést ke zrychlení analýzy a ke zlepšení tvaru píků. První experiment přídavku SDS spočíval v tom, že jsme chtěli zjistit, jak by samotný přídavek SDS ovlivnil základní pufr bez přídavku organiky. 10mM NaH_2PO_4 pufr byl zkoušen s přídavkem 25mM SDS a 12.5mM SDS. U obou variant nedošlo k separaci analytů. U těchto analýz byl velmi vysoký nárůst proudu a hrozila elektrolýza. Tento krok nás utvrdil v tom, že je nutný přídavek organické složky.

Aby došlo ke snížení elektrického proudu v systému byl zvolen pufr NaH_2PO_4 (10 mM, pH 3) s přídavkem 10 mM SDS, který byl naředěn v poměru 1:1 s THF. Za těchto podmínek byl proud stabilní. 10 mM pufr (naředěný 1:1, což znamená 5 mM pufr) obsahoval nedostatečné množství elektrolytu a nebylo možné od sebe oddělit jednotlivé píky analytů.

V návaznosti na kapitolu 5.3.3. byl připraven 50mM NaH_2PO_4 pufr s přídavkem 10 mM SDS a poměrem THF 1:1. Kvůli obavám z příliš vysokého proudu byla hodnota pH vodného pufru zvolena 3.0. Navzdory velmi dlouhé analýze se všechny analyty separovaly (viz obr. 22). Ačkoliv rozlišení mezi PCQ-FAM a PCQ se oproti předchozím

analýzám zvýšilo, opakovatelnost analýzy se ukázala jako problematická, protože už při druhém nástřiku docházelo k posunu migračního času cca o 5 minut.



Obr. 22 analýza vzorku PCQ mix 1 v pufru : NaH_2PO_4 (50 mM, pH 3 upraveno H_3PO_4) + 10mM SDS – THF (1:1) kde kde první pík odpovídá analytu OLIGO, druhý pík odpovídá analytu PCQ-FAM, třetí pík odpovídá analytu PCQ a čtvrtý pík odpovídá analytu PCQ-Cy5; délka kapiláry 47 cm; teplota 25 °C; napětí -25 kV; detekce DAD

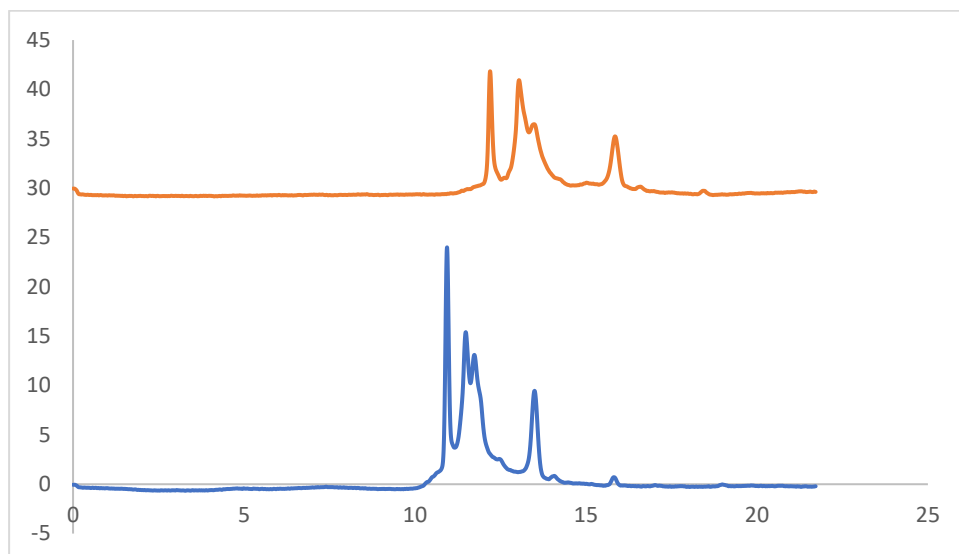
Navzdory všech uvedených nedokonalostí těchto podmínek lze konstatovat, že za těchto podmínek lze od sebe oddělit všechny čtyři analyty. Z toho důvodu považuji tuto analýzu za úspěšnou (detailnější rozbor viz. kapitola 5.3.9.).

5.3.5. Zvýšení iontové síly

Pomocí přídavku iontů ve formě NaCl lze docílit lepší selektivity a ovlivnit tvar píku. Změnou iontové síly základního elektrolytu lze docílit zvýšení elektrického proudu probíhajícího v systému. Liguó S. a spol [51] publikoval článek, ve kterém se velmi detailně věnuje vlivu NaCl na elektroforetické chování aniontů. Nadále komentuje i možný přínos NaCl i u ostatních typů analytů. Pokud se pohybujeme v koncentracích vyšších než 50 mM, ovlivňujeme především velikost a tvar píku. V nižších koncentracích může přídavek NaCl vést ke zlepšení rozlišení mezi píky. [51]

Cílem tohoto experimentu bylo zlepšit rozlišení mezi analyty PCQ a PCQ-FAM ve vzorku PCQ mix 1. Jako základní elektrolyt byl zvolen NaH_2PO_4 (50 mM, pH 2.7 upraveno kyselinou fosforečnou) + 25mM NaCl – THF (2:1). Tento experiment byl porovnán s analýzou v kapitole 5.3.3. Přídavek NaCl prodloužil čas analýzy (viz obr. 23). Rozlišení mezi prvním píkem (OLIGO) a druhým píkem (PCQ-FAM) se výrazně

zlepšilo. Stejně tak i rozlišení mezi třetím píkem (PCQ) a čtvrtým píkem (PCQ-Cy5) se zlepšilo stejně jako tvar a symetrie píků. Nicméně rozdělení analytů PCQ a PCQ-FAM na základní linii se nepodařilo.



Obr. 23 porovnání analýz vzorku PCQ mix 1 ve dvou elektrolytech: **modrý záznam** představuje analýzu v elektrolytu NaH_2PO_4 (50 mM, pH 2.7 upraveno H_3PO_4) – THF (2:1) a **oranžový záznam** představuje analýzu v elektrolytu NaH_2PO_4 (50 mM, pH 2.7 upraveno H_3PO_4) + 25 mM NaCl – THF (2:1); u obou analýz je pořadí píků stejný: první pík odpovídá analytu OLIGO, druhý pík odpovídá analytu PCQ-FAM, třetí pík odpovídá analytu PCQ a čtvrtý pík odpovídá analytu PCQ-Cy5; délka kapiláry 47 cm; teplota 25 °C; napětí -25 kV; detekce DAD

5.3.6. Vliv cyklodextrinu

Nejčastější užití cyklodextrinů v analytické chemii je bezkonkurenčně v chirálních separacích. Díky odlišným velikostem cyklodextrinů je lze využít i pro zvýšení selektivity u nechirálních separací. [52] Předpoklad je však takový, že analyzujeme vzorky s odlišnou velikostí a tvarem, aby měli separované látky v těchto podmínkách jinou konstantu stability komplexu s CD. Vzhledem k velkému počtu různých modifikací, lze předpokládat že cyklodextriny mohou ovlivnit separaci nejen z hlediska velikosti ale také z hlediska fyzikálně-chemické interakce cyklodextrinu s analytem. Alfa cyklodextriny mají nejmenší kavitu. Vliv na separaci modifikovaných oligonukleotidů by byl velmi malý. Z toho důvodu jsme se zaměřili spíše na beta a gama cyklodextriny.

V pufr NaH_2PO_4 (50 mM, pH 2.7 - upraveno kyselinou fosforečnou) – THF (2:1) byl pokaždé rozpuštěn jeden ze čtyř různých β -cyklodextrínů v koncentraci 5 mg/ml:

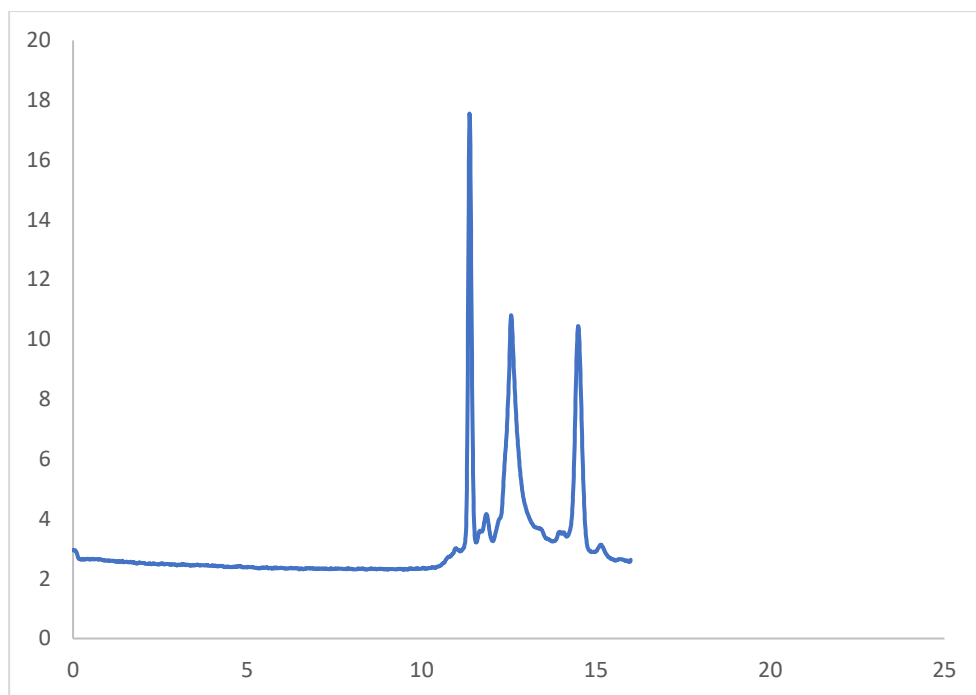
- 1) nemodifikovaný β -cyklodextrín
- 2) methyl- β -cyklodextrín
- 3) 6-(ω -sulfanyl-alkylen-sulfanyl)- β -cyclodextrin
- 4) hydroxypropyl- β -cyclodextrin

Ani jeden z β -cyklodextrínů neměl významný vliv na separaci analytů vzorku PCQ mix 1. Píky nebyly dostatečně separovány a elektroforeogramy byly nepřehledné. Nejspíš byla kavita β -cyklodextrínů příliš malá a nedocházelo k dostatečné interakci mezi analytem a β -cyklodextrínem. Vliv na analýzu byl v tomto případě pouze zvýšení elektrického proudu probíhajícího v systému.

Velmi odlišné výsledky byly získány při použití γ -cyklodextrinu. Obdobně jako u β -cyklodextrínu byl použit stejný základní elektrolyt, který byl upraven třemi různými γ -cyklodextríny v koncentraci 5 mg/ml:

- 1) nemodifikovaný γ -cyklodextrin
- 2) random-methyl- γ -cyklodextrin
- 3) hydroxypropyl- γ -cyklodextrin

U těchto analýz vzorku PCQ mix 1 docházelo k oddělení tří analytů. Hydroxypropyl- γ -cyklodextrin jako jediný výsledek nezlepšil. Jeho přítomnost změnila pořadí analytů a nedocházelo k oddělení jednotlivých analytů. Samotný γ -cyklodextrin se již jevil mnohem slibněji. Problém bylo rozlišení mezi prvním (OLIGO) a druhým (překryv PCQ a PCQ-FAM) píkem. Rozlišení mezi prvním a druhým píkem bylo nejlepší u methylovaného γ -cyklodextrínu (viz Obr. 24). Píky migrují v rozmezí 11-15 minut. Symetrie píků byla téměř ideální. Za těchto podmínek došlo k separaci pouze tří analytů, analyty PCQ a PCQ-FAM se navzájem dokonale překrývají.

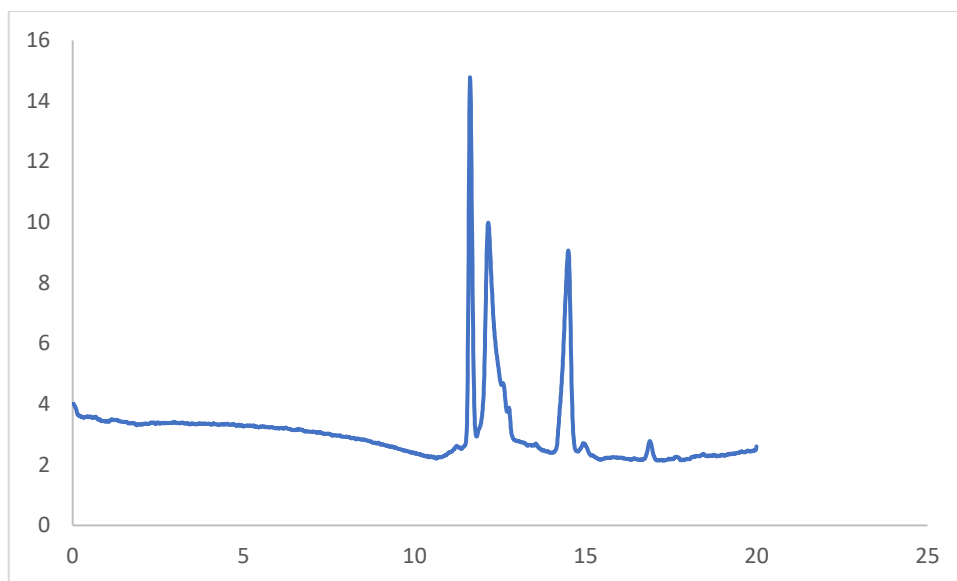


Obr. 24 analýza vzorku PCQ mix 1 v elektrolytu NaH_2PO_4 (50 mM, pH 2.7 upraveno H_3PO_4) + 5mg/1ml random-methyl- γ -CD – THF (2:1) přičemž první pík odpovídá analytu OLIGO, druhý pík odpovídá překryvu analytů PCQ a PCQ-FAM a třetí pík odpovídá analytu PCQ-Cy5; délka kapiláry 47 cm; teplota 25 °C; napětí -25 kV; detekce DAD

Přídavek random-methyl- γ -cyklodextrinu dokázal ovlivnit tvar píku a rozlišení. Lze z toho usoudit, že by mohlo docházet k pozitivní interakci mezi analyty a cyklodextrínem. Nedokonalá separace vzorku PCQ od vzorku PCQ-FAM naznačuje, že oba tyto analyty by mohli interagovat s cyklodextrínem podobně. V návaznosti na kapitolu 5.3.3.1. lze konstatovat, že za těchto podmínek je analýza úspěšná pro PCQ mix složený ze tří analytů a to buď OLIGO, PCQ a PCQ-Cy5 nebo OLIGO, PCQ-FAM a PCQ-Cy5. Z toho důvodu i přes nedokonalé oddělení PCQ od PCQ-FAM považují tento experiment za úspěšný a budu se mu detailněji věnovat v kapitole 5.3.9.

5.3.7. Vliv taurodeoxycholátu

Experiment s přídavkem SDS (viz kapitola 5.3.4.) nám ukázal, že pokud přidáme příliš velké množství surfaktantu, tak může díky vysokému proudu docházet k nesprávné separaci nebo elektrolýze. Proto byl připraven základní pufr NaH_2PO_4 (50 mM, pH 2,7 - upraveno zředěnou fosforečnou kyselinou) do kterého bylo přidáno 10 mM taurodeoxycholátu sodného. Tento pufr byl naředěn 2:1 tetrahydrofuranem (viz obr. 25).



Obř. 25 analýza vzorku PCQ mix 1 v elektrolytu NaH₂PO₄ (50 mM, pH 2.7 upraveno H₃PO₄) + 10 mM taurodeoxycholátu sodného – THF (2:1) přičemž první pík odpovídá analytu OLIGO, druhý pík odpovídá překryvu analytů PCQ a PCQ-FAM a třetí pík odpovídá analytu PCQ-Cy5; délka kapiláry 47 cm; teplota 25 °C; napětí -25 kV; detekce DAD

Vliv taurodeocholové kyseliny na separaci vzorku PCQ mix 1 je velmi podobný jako u přidavku cyklodextrinu. Pravděpodobně dochází k tvorbě micely, přičemž rovnovážná konstanta micela-elektrolyt je pro vzorky PCQ a PCQ-FAM stejná, což vede k nedokonalé separaci. Obdobně jako u předešlých experimentů dochází k separaci tří píků: OLIGO, spojené PCQ a PCQ-FAM, PCQ-Cy5. I tyto podmínky jsou vhodné k separaci vzorku PCQ mix 2, ale neřeší problém separace mezi PCQ a PCQ-FAM.

5.3.8. Medronová kyselina

V návaznosti na úspěšné experimenty u vzorku BHQ mix, kde přidavek medronové kyseliny vedl k nejlepším výsledkům, byly stejné podmínky aplikovány i na vzorek PCQ mix. První pufr byl úplně stejný jako v kapitole 5.2.6 (10 mM NaH₂PO₄ pH 3 upraveno medronovou kyselinou; -25 kV). Tento elektrolyt se u vzorku PCQ mix 1 neosvědčil. Nedošlo k separaci ani jednoho z analytů. Již v předešlých kapitolách bylo zmíněno, že oligonukleotidy s navázaným azaftalocyaninem potřebují k separaci přidavek organické složky. Vzhledem k tomu, že při analýze za podmínek NaH₂PO₄ (10 mM, pH 3 upraveno medronovou kyselinou) byl elektrický proud analýzy velmi vysoký, byl tento pufr naředěn tetrahydrofuranem v poměru 1:1. Organická složka měla na separaci

pozitivní efekt. Byly vidět dva píky, ale kvůli nízké odezvě detektoru nešlo s jistotou určit který pik odpovídá konkrétnímu analytu. I přes 50% organické složky byla analýza až příliš rychlá. Jako další byly připraveny dva 10 mM NaH₂PO₄ základní elektrolyty každý s odlišným množstvím SDS. První pufr měl koncentraci 10 mM SDS a druhý 5 mM SDS. Oba elektrolyty byly upraveny medronovou kyselinou na pH 3 a poté naředěny THF v poměru 1:1.

Ačkoli byl tvar píků vylepšen, byly detekovány pouze 2 píky. Po sérii nevydařených experimentů byl změněn základní pufr, kde byla použita 10 mM medronová kyselina jako základ elektrolytu a úprava pH probíhala pomocí NaOH. Byly zkoušeny různé hodnoty pH: 2.0, 2.5 a 3.0. Každý pufr byl vyzkoušen bez i s naředěním tetrahydrofuranem v poměru 1:1. U nízkého pH docházelo k rapidnímu navýšení elektrického proudu, který ani přidávkem organické složky nešel kontrolovat. Jako jediné slibné podmínky, za kterých byl možný vidět náznak separace, se jevily pufr 10mM medronové kyseliny pH 3 (upraveno zředěnou NaOH) 1:1 THF. Na tento pufr byl vyzkoušen princip vysolení přidávkem 30mM NaCl, což nevedlo k separaci ani jednoho analytu.

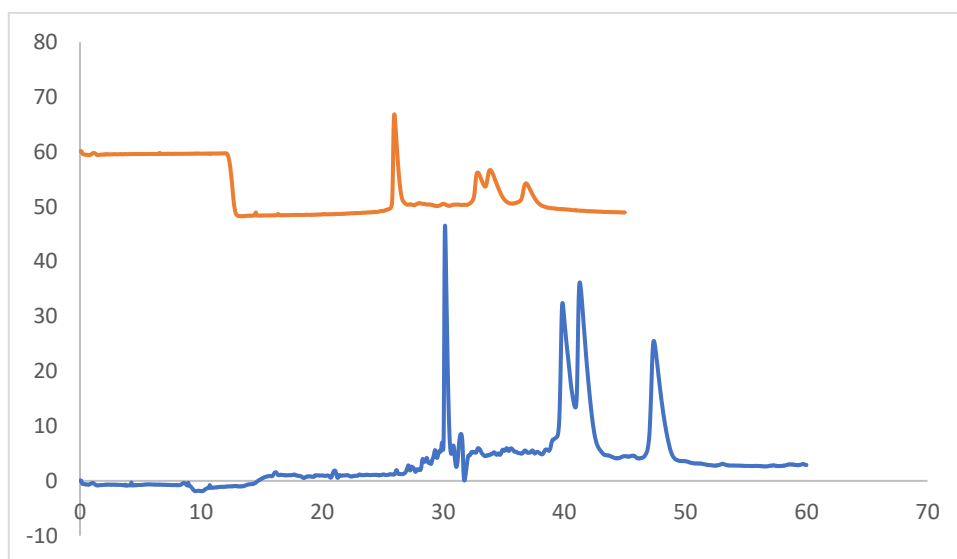
Jako poslední experiment byl připraven pufr 10 mM medronové kyseliny pH 3 (upraveno zředěnou NaOH) s přidávkem 10 mM SDS v poměru 1:1 s tetrahydrofuranem. I přesto že se jednalo o analýzu s nejlepším tvarem píků popsanou v této kapitole, nedocházelo k separaci všech čtyř analytů. Z tohoto důvodu lze konstatovat, že prostředí medronové kyseliny nepředstavuje optimální podmínky pro separaci vzorku PCQ mix.

5.3.9. Porovnání nejlepších výsledků

Všechny provedené analýzy vzorku PCQ mix 1 a PCQ mix 2 probíhaly v prostředí, které se skládalo z vodné a organické složky. Z toho vyplývá, že oproti vzorku BHQ mají analyty s navázaným azaftalocyaninem větší tendenci k agregaci v čistě vodném prostředí.

Také bych rád vyzdvihl benefit aditiva dodecylsírany sodného. Toto aditivum má pozitivní vliv na separaci vzorku PCQ a PCQ-FAM (viz obr. 26). Vzhledem k tomu, že separace vzorku PCQ a PCQ-FAM byla velmi problematická a podařila se pouze u velmi dlouhých analýz, lze konstatovat, že nebyly dosaženy optimální podmínky pro separaci vzorku PCQ mix 1 a bylo by třeba dále studovat. Na druhou stranu podmínky oddělující vzorky OLIGO, PCQ a PCQ-Cy5 se optimalizovat podařilo.

Oddělení všech čtyř komponentů ve vzorku PCQ mix 1 se podařilo pouze ve dvou analýzách trvajících okolo 50 minut, které se podařilo zreprodukovat. První podmínky, které bych rád vyzdvihl, jsou NaH_2PO_4 (10 mM, pH 3 - upraveno zředěnou kyselinou fosforečnou) v poměru 1:1 s THF. Druhá úspěšná analýza probíhala v pufru NaH_2PO_4 (50 mM, pH 3 - upraveno zředěnou kyselinou fosforečnou) s přidavkem 10 mM SDS a poté naředěno v poměru 1:1 THF. SDS má pozitivní vliv na selektivitu separace a rozlišení analytů PCQ a PCQ-FAM (viz obr. 26, Tab. 11). Tento efekt SDS lze vysvětlit omezením interakce analytů s kapilární stěnou.



Obr. 26 porovnání analýz vzorku PCQ mix 1 ve dvou elektrolytech: **oranžový záznam** předsavuje analýzu v elektrolytu NaH_2PO_4 (10 mM, pH 3 upraveno H_3PO_4) – THF (1:1) a **modrý záznam** předsavuje analýzu v elektrolytu NaH_2PO_4 (50 mM, pH 3 - upraveno H_3PO_4) + 10mM SDS – THF (1:1); u obou analýz je pořadí píků stejné: první pík odpovídá analytu OLIGO, druhý pík odpovídá analytu PCQ-FAM, třetí pík odpovídá analytu PCQ a čtvrtý pík odpovídá analytu PCQ-Cy5; délka kapiláry 47 cm; teplota 25 °C; napětí -25 kV; detekce DAD

Tab. 11 rozlišení mezi jednotlivými píky z obr. 26

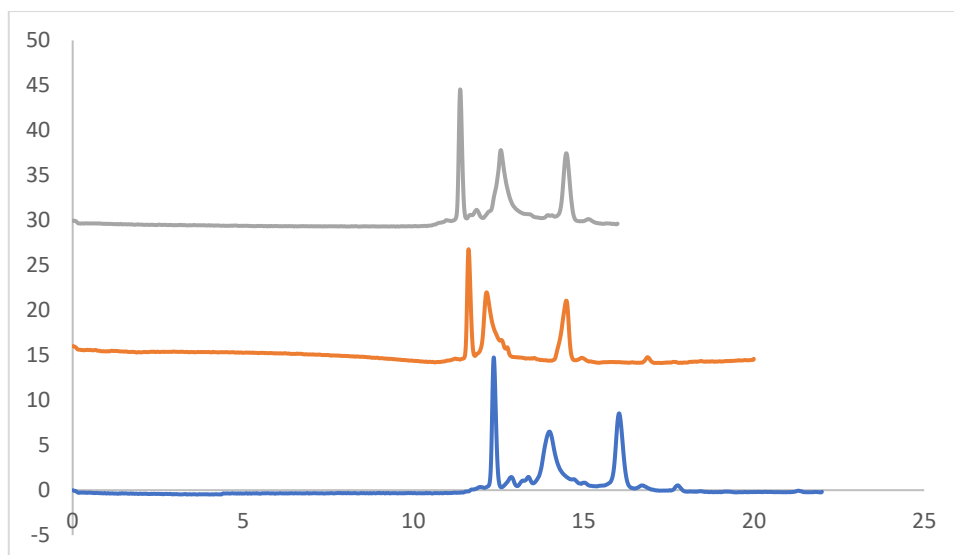
	Modrý záznam (50mM NaH ₂ PO ₄ + 10mM SDS 1:1 THF)	Oranžový záznam (10mM NaH ₂ PO ₄ 1:1 THF)
Rozlišení prvního píku (OLIGO) a druhého píku (PCQ-FAM)	10.64	6.59
Rozlišení mezi druhým píkem (PCQ-FAM) a třetím píkem (PCQ)	1.04	0.65
Rozlišení mezi třetím píkem (PCQ) a čtvrtým píkem (PCQ-Cy5)	4.30	1.97

Z tabulky 11 je patrné, že rozlišení mezi jednotlivými píky je lepší u pufru s přidavkem SDS. Jediná nevýhoda těchto podmínek je prodloužení analýzy o 5 minut. Vzhledem k tomu, že obě tyto analýzy jsou časově náročné, lze pěti minutové prodloužení považovat za nerelevantní. Také lze konstatovat, že všechny komponenty vzorku PCQ mix 1, tedy OLIGO, PCQ, PCQ-FAM a PCQ-Cy5, se nepodařilo rozdělit až na základní linii.

Druhý výsledek byla úspěšná separace tří komponentů ve vzorku PCQ mix 1. Podařily se oddělit dvě trojkombinace analytů OLIGO, PCQ, PCQ-FAM a OLIGO, PCQ-FAM, PCQ-Cy5. Vzhledem k tomu, že se při syntéze nepotkají dvě dvojitě značené sondy, bude rozebrána analýza vzorku OLIGO, PCQ a PCQ-Cy5 neboli PCQ mix 2. Separaci těchto tří komponentů se podařilo třemi různými pufrů:

- 1) NaH₂PO₄ (50 mM, pH 2.7 - upraveno fosforečnou kyselinou) – THF (2:1)
- 2) NaH₂PO₄ (50 mM, pH 2,7 - upraveno fosforečnou kyselinou) + 10 mM taurodeoxycholátu sodného - THF (2:1)
- 3) NaH₂PO₄ (50 mM, pH 2.7 - upraveno fosforečnou kyselinou) + 5mg/1ml random-methyl- γ -CD – THF (2:1)

Snížení hodnoty pH z 3.0 na 2.7 vedlo ke zkrácení času analýzy. Snížení obsahu organické složky na 33% vedlo ke zhoršení separace mezi vzorky PCQ a PCQ-FAM. Na druhou stranu doba potřebná k analýze a tvar píků ostatních analytů se výrazně zlepšily. O tom, který z těchto pufrů představuje vhodné podmínky rozhodovaly tyto faktory: rozlišení, čas analýzy, stabilita pufru a opakovatelnost analýz (viz Obr. 27 a Tab. 12).



Obr. 27 porovnání analýz vzorku PCQ mix 2 ve třech elektrolytech: **modrý záznam** předsavuje analýzu v elektrolytu NaH_2PO_4 (50 mM, pH 2.7 upraveno H_3PO_4) – THF (2:1), **oranžový záznam** předsavuje analýzu v elektrolytu NaH_2PO_4 (50 mM, pH 2,70 upraveno H_3PO_4) + 10 mM taurodeoxycholátu sodného – THF (2:1) a **šedý záznam** předsavuje analýzu v elektrolytu NaH_2PO_4 (50 mM, pH 2,70 upraveno H_3PO_4) + 5mg/1ml random-methyl- γ -CD – THF (2:1); pořadí píků je pro každou analýzu stejný: první pík odpovídá analytu OLIGO, druhý pík odpovídá analytu PCQ a třetí pík odpovídá analytu PCQ-Cy5; délka kapiláry 47 cm; teplota 25 °C; napětí -25 kV; detekce DAD

Tab. 12 rozlišení mezi jednotlivými píky z obr. 27

	Modrý záznam	Oranžový záznam	Šedý záznam
Rozlišení mezi prvním píkem (OLIGO) a druhým píkem (PCQ)	3.49	1.60	3.56
Rozlišení mezi druhým píkem (PCQ) a třetím píkem (PCQ-Cy5)	4.00	5.52	4.57

Všechny analýzy byly bez problému reprodukovány. Díky přítomnosti THF mají všechny tři pufrů stejně krátkou životnost a lze je použít pouze pro tři po sobě jdoucí nástřiky. Poté je nutné vytvořit nový pufr. Přídavek aditiva (CD, taurodeoxycholát sodný) zvyšuje elektrický proud v systému a zrychlí analýzu. Přídavek taurodeoxycholátu vedl k horšímu rozlišení mezi prvním a druhým píkem a k zhoršení tvaru píků. Z těchto dvou důvodů nelze považovat pufr s obsahem taurodeoxycholové kyseliny jako ideální. I přesto, že

pufr bez přídavku aditiva je nejjednodušší s velmi dobrým výsledkem, lze považovat pufr s přídavkem random-methyl- γ -cyklodextrinu jako optimální. Nejen, že se jedná o nejkratší analýzu s nejlepším rozlišením mezi píky, ale také má přídavek cyklodextrinu velmi pozitivní vliv na symetrii píků. Z toho důvodu lze konstatovat, že na analýzu vzorku PCQ mix 2 považují 50mM NaH_2PO_4 + 5 mg/ml random-methyl- γ -CD (pH 2.7 - upraveno fosforečnou kyselinou) v poměru 2:1 s tetrahydrofuranem za optimální podmínky.

5.4. Porovnání výsledků elektroforetických separací s HPLC

V nedávno publikované práci, ve které se Kučera et al. [31] pokoušeli o separaci oligonukleotidových sond pomocí HPLC, se podařilo oddělit oligonukleotidové sondy jednoduše značené BHQ-1 (BHQ) od dvojitě značených BHQ-1 a 6-FAM (BHQ-FAM) a oligonukleotidové sondy jednoduše značené AzaPC (PCQ) od dvojitě značených AzaPC a 6-FAM (PCQ-FAM) nebo AzaPC a Cy5 (PCQ-Cy5). Zkoušeny byly čtyři mobilní fáze a to konkrétně 50 mM nebo 5 mM triethylaminoacetát (TEAA) nebo Tris. [31]

Nejlepší výsledek HPLC analýzy neznačených oligonukleotidů, oligonukleotidových sond jednoduše značených BHQ a dvojitě značených BHQ-FAM byl proveden v 5 mM Tris, kde se podařilo oddělit BHQ (10 min.) od BHQ-FAM (23 min.), avšak s výrazně chvostujícími píky BHQ-FAM. Sondy PCQ a PCQ-FAM se podařily separovat v 5 mM Tris, kde mezi prvním píkem (11 min.) a druhým píkem (16 min.) nebylo kvůli nedostatečné selektivě rozlišení na základní linii. Analýza PCQ a PCQ-Cy5 sond byla nejlepší v 50 mM Tris, kde mezi prvním (20 min.) a druhým (26 min.) bylo rozlišení 5. [31]

V diplomové práci se pro oligonukleotidové sondy obsahující BHQ podařilo optimalizovat podmínky v kapilární elektroforéze. V prostředí pufru NaH_2PO_4 (pH 3, upraveno medronovou kyselinou) a napětí -15 kV jsou separovány OLIGO, BHQ a BHQ-FAM s velmi dobrým rozlišením a symetrií píků (viz Obr. 17 a Tab. 9). Analyty BHQ-FAM a BHQ se separují v čase 6.99 a 7.23. V HPLC systému je čas analýzy delší a symetrie píků horší. Z toho důvodu jsou elektroforetické podmínky NaH_2PO_4 (pH 3, upraveno medronovou kyselinou, napětí -15 kV) vhodnější pro separaci BHQ sond.

Separace PCQ-FAM od PCQ se podařila v pufru NaH_2PO_4 (50 mM, pH 3 upraveno fosforečnou kyselinou) + 10 mM SDS – THF (1:1) s napětím -25 kV (viz Obr. 26 a Tab.

11). Kritické páry PCQ-FAM (40 min.) a PCQ (41 min) se nepodařilo rozdělit na základní linii. Oproti HPLC je tato analýza dvakrát delší. Z toho důvodu lze konstatovat, že pro analýzu sond PCQ-FAM a PCQ jsme nenašli elektroforetické podmínky, které by měly lepší výsledek než u HPLC.

Analýza druhého kritického páru PCQ a PCQ-Cy5 byla v pufru NaH_2PO_4 (50 mM, pH 2,70 - upraveno fosforečnou kyselinou) + 5mg/1ml random-methyl- γ -CD – THF (2:1) a napětí -25 kV kratší než u HPLC o 11 minut (viz Obr. 27 a Tab. 12). Za těchto podmínek došlo i ke zlepšení symetrie píků oproti HPLC. Z těchto dvou důvodů lze konstatovat, že pro analýzu sond PCQ a PCQ-Cy5 jsou tyto elektrodoretické podmínky vhodnější.

6. Závěr

První a hlavní úlohou mé diplomové práce bylo otestovat možnost využití kapilární elektroforézy pro separaci nečistot vznikajících při syntéze reálných dvojitě značených oligonukleotidových sond a tyto výsledky porovnat s výsledky dosažených Kučerou et al. [31] na HPLC. Byl testován vliv různých koncentrací a různého pH základního elektrolytu NaH_2PO_4 na elektroforetické chování oligonukleotidových sond. Dále byl testován vliv přídavku různých aditiv do základního elektrolytu. Část práce je věnovaná vlivu medronové kyseliny jako modifikátor pH elektrolytu na separaci analytů.

Byly optimalizovány podmínky pro separaci oligonukleotidových sond značených BHQ zhášečem, kde v prostředí NaH_2PO_4 (10 mM, pH 3 – upraveno zředěnou kyselinou medronovou, napětí – 15 kV) separace probíhá do osmi minut s rozlišením 1,78 mezi kritickými páry píků vzorků BHQ a BHQ-FAM. Nadále se nám podařilo optimalizovat podmínky pro separaci jednoduše značené sondy azaftalocyaninovým zhášečem (PCQ) a dvojitě značené sondy azaftalocyaninovým zhášečem a fluorescenčním barvivem (PCQ-Cy5). V prostředí NaH_2PO_4 (50 mM, pH 2,70 - upraveno fosforečnou kyselinou, napětí -25 kV) + 5mg/1ml random-methyl- γ -CD – THF (2:1) separace probíhá do 15 minut s rozlišením mezi kritickým párem píků 4,57. Separace oligonukleotidových sond PCQ a PCQ-FAM se nám podařila v pufru 50mM NaH_2PO_4 (50 mM, pH 3 - upraveno fosforečnou kyselinou, napětí -25 kV) + 10mM SDS – THF (1:1) ve čtyřicáté minutě s nedokonalým oddělením píků na základní linii.

Z porovnaných výsledků dosažených na HPLC lze konstatovat, že dosažené elektroforetické podmínky jsou vhodnější pro separaci sond BHQ mix (BHQ, BHQ-FAM a OLIGO) a PCQ mix 2 (PCQ, PCQ-Cy5 a OLIGO). Separace oligonukleotidových sond PCQ a PCQ-FAM je lepší v HPLC.

Seznam citované literatury

[1] WILHELM, J.; PINGOUD, A. Real-Time Polymerase Chain Reaction. *ChemBioChem*, 2003, **4**(11), 1120-1128. ISSN 14394227. doi:10.1002/cbic.200300662

[2] MANGANO, M. F.; BATTAGLIA, C.; SALANI, G.; BERNARDI, L. R.; DE BELLIS, G. Composition dependent separation of oligonucleotides by capillary electrophoresis in acidic buffers with application to the quality control of synthetic oligonucleotides. *Journal of Chromatography A*, 1999, **848**(1-2), 435-442. ISSN 00219673. doi:10.1016/S0021-9673(99)00450-1

[3] ZHOU, J.; ROSSI, J. Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2017, **16**(3), 181-202. ISSN 1474-1776. doi:10.1038/nrd.2016.199

[4] LIBRETEXTS; PRECISSI J. Capillary Electrophoresis. *Chem.libretexts.org* [online]. [cit. 2023-01-22].

Dostupné z: https://chem.libretexts.org/Courses/BethuneCookman_University/BCU%3A_CH-346_Instrumental_Analysis/Capillary_Electrophoresis

[5] GAŠ, B. Kapilární elektroforéza: Separační analytická metoda pro věk mikročipů. *Vesmír* [online]. 2001, 370-373 [cit. 2023-01-15]. Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2001/cislo-7/kapilarni-elektroforeza.html>

[6] HEIGER, D. N. *High Performance Capillary Electrophoresis- An Introduction*. France: Hewlett-Packard Company, 1992. ISBN 12-5091-6199E.

[7] LAUER, H. H.; ROZING, G. P. *High Performance Capillary Electrophoresis*. Second completely revised edition. Germany: Agilent Technologies, 2014. ISBN 5990-3777EN.

[8] Figure 2: Electroosmotic Flow due to Applied Voltage. In: *LibreTexts Chemistry* [online]. LibreTexts Chemistry, 2019 [cit. 2023-01-15]. Dostupné z: https://chem.libretexts.org/Courses/BethuneCookman_University/BCU%3A_CH-346_Instrumental_Analysis/Capillary_Electrophoresis

- [9] DEPARTMENT OF CONDENSED MATTER PHYSICS FACULTY OF MATHEMATICS AND PHYSICS, CHARLES UNIVERSITY. Zeta potenciál zeta. *Xray.cz* [online]. Krystalografická společnost; Czech and Slovak Crystallographic Association (CSCA) [cit. 2023-02-11]. Dostupné z: <https://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/zeta.htm>
- [10] ENGINEERING ASSOCIATION FOR CHEMICAL ANALYSIS GBR. The influence of the EOF on the velocity of the ions. In: *Kapillarelektrophorese.com* [online]. [cit. 2023-01-15]. Dostupné z: <https://www.kapillarelektrophorese.com/theory/eof/>
- [11] O'NEAL', W. Theory, Application of TLC, HPLC, CE. *SlidePlayer* [online]. Temple University, 2017 [cit. 2023-03-06]. Dostupné z: <https://slideplayer.com/slide/13704208/>
- [12] KEATLEY, R. Exploring the 4 Basic Modes of Electrophoresis. *Cosmol* [online]. [cit. 2023-08-11]. Dostupné z: <https://www.comsol.com/blogs/exploring-the-4-basic-modes-of-electrophoresis/>
- [13] FISCHER, J.; ČESLA, P. *Kapilární elektroforéza: Interaktivní návod* [online]. [cit. 2023-03-09]. Dostupné z: <https://dokumenty.upce.cz/FCHT/kbbv-vk/pokrocila-instrumentalyza/kapilarni-elektroforeza.pdf>
- [14] DE JONG, G. Detection in Capillary Electrophoresis - An Introduction. In: *Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry (CE-MS): Principles and Applications*, Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2016, 2016-06-16, s. 1-5. ISBN 9783527339242. doi:10.1002/9783527693801.ch1
- [15] ŠINDELKOVÁ, M. Stanovení septonexu ve farmaceutických přípravcích metodou kapilární zónové elektroforézy s vodivostní detekcí. Diplomová práce, FaF UK, Hradec Králové 2009.
- [16] ZEMANN, A. J.; SCHNELL, E.; VOLGGER, D.; BONN, G. K. Contactless Conductivity Detection for Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 1998, **70**(3), 563-567. ISSN 0003-2700. doi:10.1021/ac9707592

- [17] In: HEIGER, D. N. *High Performance Capillary Electrophoresis- An Introduction*. France: Hewlett-Packard Company, 1992, s. 94. ISBN 12-5091-6199E.
- [18] SHRESTHA, A. Capillary Electrophoresis: Principle and Application. *Microbe Online* [online]. 2022 [cit. 2023-03-06]. Dostupné z: [https://microbeonline.com/capillary-electrophoresis/#:~:text=There%20are%20six%20types%20of,%2C%20and%20capillary%20isotachophoresis%20\(CITP\)](https://microbeonline.com/capillary-electrophoresis/#:~:text=There%20are%20six%20types%20of,%2C%20and%20capillary%20isotachophoresis%20(CITP))
- [19] DEEB, S. El; IRIBAN, M. A.; GUST, R. MEKC as a powerful growing analytical technique. *ELECTROPHORESIS*, 2011, **32**(1), 166-183. ISSN 01730835. doi:10.1002/elps.201000398
- [20] ŠALPLACHTA, J.; KUBESOVÁ, A.; HORKÁ, M. Latest improvements in CIEF: From proteins to microorganisms. *PROTEOMICS*, 2012, **12**(19-20), 2927-2936. ISSN 16159853. doi:10.1002/pmic.201200136
- [21] HUO, Y.; KOK, W. T. Recent applications in CEC. *ELECTROPHORESIS*, 2008, **29**(1), 80-93. ISSN 01730835. doi:10.1002/elps.200700639
- [22] SEPARATIONSCIENCE. Method Development in Capillary Electrophoresis (CE): Selecting your Background Electrolyte. *SeparationScience premier learning for analytical scientists* [online]. Separation Science Solutions Series [cit. 2023-01-15]. Dostupné z: <https://blog.sepscience.com/pharmascience/method-development-in-capillary-electrophoresis-ce-selecting-your-background-electrolyte>
- [23] LUCY, C. A.; UNDERHILL, R. S. Characterization of the Cationic Surfactant Induced Reversal of Electroosmotic Flow in Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 1996, 1996-01-01, **68**(2), 300-305. ISSN 0003-2700. doi:10.1021/ac950632h
- [24] MERCK. *Taurodeoxycholic Acid, Sodium Salt - CAS 1180-95-6 - Calbiochem* [online]. Merck, 2023 [cit. 2023-01-22]. Dostupné z: https://www.merckmillipore.com/CZ/cs/product/Taurodeoxycholic-Acid-Sodium-Salt-CAS-1180-95-6-Calbiochem,EMD_BIO-580221

- [25] YU, R. B.; QUIRINO, J. P. Bile Salts in Chiral Micellar Electrokinetic Chromatography: 2000–2020. *Molecules*, 2021, **26**(18). ISSN 1420-3049. doi:10.3390/molecules26185531
- [26] BLANCO, M.; VALVERDE, I. Electrophoretic behaviour of pharmacologically active alkylxanthines. *Journal of Chromatography A*, 2002, **950**(1-2), 293-299. ISSN 00219673. doi:10.1016/S0021-9673(02)00028-6
- [27] NIKITENKO, N. A.; PRASSOLOV, V. S. Non-Viral Delivery and Therapeutic Application of Small Interfering RNAs. *Acta Naturae*, 2013, 2013-09-15, **5**(3), 35-53. ISSN 2075-8251. doi:10.32607/20758251-2013-5-3-35-53
- [28] KENNDLER, E. Organic solvents in CE. *Electrophoresis*, 2009, **30**(S1), S101-S111. ISSN 01730835. doi:10.1002/elps.200900180
- [29] SCHWER, C.; KENNDLER, E. Electrophoresis in fused-silica capillaries: the influence of organic solvents on the electroosmotic velocity and the zeta potential. *Analytical Chemistry*, 1991, **63**(17), 1801-1807. ISSN 0003-2700. doi:10.1021/ac00017a026
- [30] GIRAULT, H. H. *Analytical and physical electrochemistry*. Italy: EPFL Press, 2004. ISBN 2-9402222-03-7.
- [31] KUČERA, R.; ŠČENSŇÁ, A.; MILETÍN, M.; ZIMČÍK, P. The chromatographic behaviour of new double-labelled oligodeoxynucleotide probes containing azaphthalocyanine dye as a quencher with respect to evaluation of their purity. *Biomedical Chromatography*, 2021, **35**(4). ISSN 0269-3879. doi:10.1002/bmc.5033
- [32] FANG, B.; SHEN, Y.; PENG, B. et al. Small-Molecule Quenchers for Förster Resonance Energy Transfer: Structure, Mechanism, and Applications. *Angewandte Chemie International Edition*, 2022, 2022-10-10, **61**(41). ISSN 1433-7851. doi:10.1002/anie.202207188
- [33] KOPECKY, K.; NOVAKOVA, V.; MILETIN, M.; KUČERA, R.; ZIMCIK, P. Synthesis of new azaphthalocyanine dark quencher and evaluation of its quenching

efficiency with different fluorophores. *Tetrahedron*, 2011, **67**(33), 5956-5963. ISSN 00404020. doi: 10.1016/j.tet.2011.06.038

[34] DEMUTH, J.; KANTOR, M.; KUCERA, R.; MILETIN M.; NOVAKOVA V. Comparison of Quenching Efficiencies in Long Triple-Labeled and Double-Labeled TaqMan Oligodeoxynucleotide Probes. *Bioconjugate Chemistry*, 2022, **33**(5), 788-794. ISSN 1043-1802. doi:10.1021/acs.bioconjchem.2c00023

[35] AAT BIOQUEST. Spectrum [FAM (Carboxyfluorescein)]. *AAT Bioquest* [online]. [cit. 2023-08-11]. Dostupné z: https://www.aatbio.com/fluorescence-excitation-emission-spectrum-graph-viewer/fam_carboxyfluorescein

[36] POVEDAILO, V. A.; LYSENKO, I. L.; TIKHOMIROV, S. A. et al. Fluorescent Properties of Carboxyfluorescein Bifluorophores. *Journal of Fluorescence*, 2020, **30**(3), 629-635. ISSN 1053-0509. doi:10.1007/s10895-020-02535-w

[37] KVACH, M. V.; STEPANOVA, I. A.; PROKHORENKO, I. A.; STUPAK, A. P.; BOLIBRUKH, D. A.; KORSHUN, V. A.; SHMANAI, V. V. Practical Synthesis of Isomerically Pure 5- and 6-Carboxytetramethylrhodamines, Useful Dyes for DNA Probes. *Bioconjugate Chemistry*, 2009, **20**(8), 1673-1682. ISSN 1043-1802. doi:10.1021/bc900037b

[38] SMITH, S.; PRETORIUS, W. *The conservative behaviour of fluorescein* [online]. 2002 [cit. 2023-02-26]. ISSN 0378-4738. Dostupné z: https://www.wrc.org.za/wp-content/uploads/mdocs/WaterSA_2002_04_1476.pdf

[39] THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. Cy5 dye. *Thermo Fisher Scientific* [online]. [cit. 2023-01-22]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/cy5-dye.html#:~:text=Cy5%20dye%20is%20a%20traditional,tracer%20DiD%20and%20its%20variants>

[40] ARMITAGE, B. A. Cyanine Dye–DNA Interactions: Intercalation, groove binding, and aggregation. *Topics in Current Chemistry*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2005, s. 55-76. ISBN 978-3-540-22835-6. doi:10.1007/b100442

- [41] SCHWECHHEIMER, C.; RÖNICKE, F.; SCHEPERS, U.; WAGENKNECHT, H. A. A new structure–activity relationship for cyanine dyes to improve photostability and fluorescence properties for live cell imaging. *Chemical Science*, 2018, **9**(31), 6557-6563. ISSN 2041-6520. doi:10.1039/C8SC01574K
- [42] MERK. DNA Oligonucleotide Synthesis. *Sigmaaldrich.com* [online]. [cit. 2023-01-15]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/technical-article/genomics/pcr/dna-oligonucleotide-synthesis>
- [43] ROMERO-PÉREZ, S.; LÓPEZ-MARTÍN, I.; MARTOS-MALDONADO, M. C.; SOMOZA, Á.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, D. Synthesis of Phosphoramidite Monomers Equipped with Complementary Bases for Solid-Phase DNA Oligomerization. *Organic Letters*, 2020, **22**(1), 41-45. ISSN 1523-7060. doi:10.1021/acs.orglett.9b03801
- [44] DE BELLIS, G.; SALANI, G. Oligonucleotide analysis by capillary zone electrophoresis at low pH. *Analytica Chimica Acta*, 1997, **345**(1-3), 1-4. ISSN 00032670. doi:10.1016/S0003-2670(97)00072-X
- [45] PIETTA, P. G.; MANGANO, M. F.; BATTAGLIA, C.; SALANI, G.; BERNARDI, L. R.; DE BELLIS, G. Application of capillary electrophoresis at low pH to oligonucleotides quality control. *Journal of Chromatography A*, 1999, **853**(1-2), 355-358. ISSN 00219673. doi:10.1016/S0021-9673(99)00451-3
- [46] GILAR, M.; BELENKY, A.; BUDMAN, Y.; SMISEK D. L.; COHEN, A. S. Study of phosphorothioate-modified oligonucleotide resistance to 3'-exonuclease using capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1998, **714**(1), 13-20. ISSN 03784347. doi:10.1016/S0378-4347(98)00160-1
- [47] BARAKAT, F.; GAUDIN, K.; VIALET, B.; BATHANY, K.; BENIZRI, S.; BARTHÉLÉMY, P.; FERÉY, L. Analysis of lipid-oligonucleotide conjugates by cyclodextrin-modified capillary zone electrophoresis. *Talanta*, 2020, **219**. ISSN 00399140. doi:10.1016/j.talanta.2020.121204

[48] AGILENT TECHNOLOGIES, INC. Agilent 7100 Capillary Electrophoresis System: User Manual. *Agilent.com* [online]. [cit. 2023-01-22]. Dostupné z: https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/7100_CE_System_User_Manual.pdf

[49] MOTIN, M. A.; HAFIZ MIA, M. A.; NASIMUL ISLAM, A. K. M. Thermodynamic properties of Sodium Dodecyl Sulfate aqueous solutions with Methanol, Ethanol, n-Propanol and iso-Propanol at different temperatures. *Journal of Saudi Chemical Society*, 2015, **19**(2), 172-180. ISSN 13196103. doi:10.1016/j.jscs.2012.01.009

[50] HSIAO, J. J.; POTTER, O. G.; CHU, T. W.; YIN, H. Improved LC/MS Methods for the Analysis of Metal-Sensitive Analytes Using Medronic Acid as a Mobile Phase Additive. *Analytical Chemistry*, 2018, **90**(15), 9457-9464. ISSN 0003-2700. doi:10.1021/acs.analchem.8b02100

[51] SONG, L.; OU, Q.; YU, W.; XU, G. Effect of high concentrations of salts in samples on capillary electrophoresis of anions. *Journal of Chromatography A*, 1995, **696**(2), 307-319. ISSN 00219673. doi:10.1016/0021-9673(94)01291-L

[52] ALTRIA, D. K. Using Cyclodextrins to Achieve Chiral and Non-chiral Separations in Capillary Electrophoresis. *Chromatography Online* [online]. LCGC Europe, 2009 [cit. 2023-03-06]. Dostupné z: <https://www.chromatographyonline.com/view/using-cyclodextrins-achieve-chiral-and-non-chiral-separations-capillary-electrophoresis>